



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월16일
(11) 등록번호 10-1255261
(24) 등록일자 2013년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/06 (2006.01) A61K 31/4741 (2006.01)
C07D 491/16 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0109417
(22) 출원일자 2011년10월25일
심사청구일자 2011년10월25일
(56) 선행기술조사문헌
Biomaterials Volume 33, Issue 3, January
2012, Pages
KR1020120061576 A
경기대학교 일반대학원 화학과 김태기, 학위논문
(석사)(2009. 2)
J. Am. Chem. Soc., 2007, 129 (34), pp
10322-10323

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김중승
경기도 성남시 분당구 내정로 186, 롯데아파트
130동 2402호 (수내동, 파크타운)
정효성
서울특별시 강남구 선릉로 221, 409동 1101호 (도
곡동, 도곡렉슬아파트)
강철훈
경기도 수원시 장안구 하북로30번길 22, 105동
704호 (천천동, 신안아파트)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 4 항

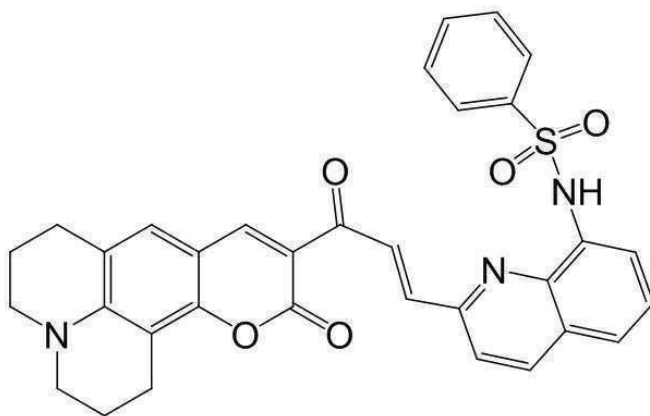
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체내 시스테인 영상화 방법

(57) 요약

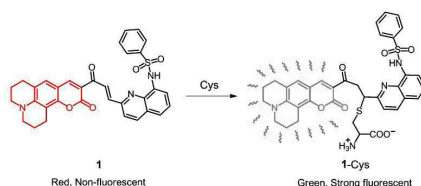
본 발명은 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체내 시스테인 영상화 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 화학식 1의 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조 방법 및 이를 이용한 생체내 시스테인 영상화 방법에 관한 것이다:

<화학식 1>



본 발명에 따른 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자는 시스테인에 대해서 높은 선택성을 나타내고, 매우 작은 농도의 시스테인도 검출할 수 있으며, 우수한 발광 특성을 보이고, 특히, 생체 내에서 직접적으로, 또한 실시간으로 시스테인을 영상화할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

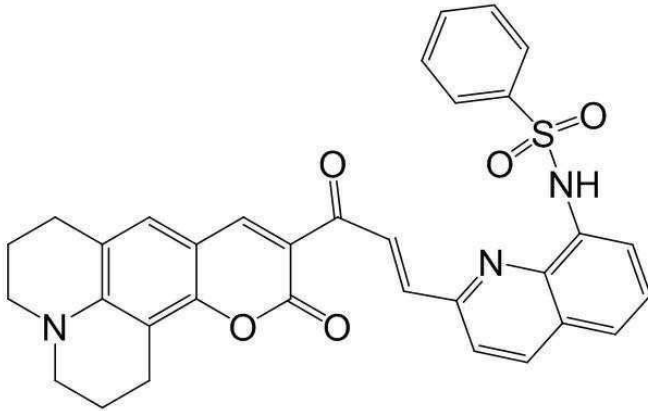
과제고유번호	20110000420
부처명	한국연구재단
연구사업명	리더연구자지원_창의연구
연구과제명	발광센서 재료 연구단
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자:

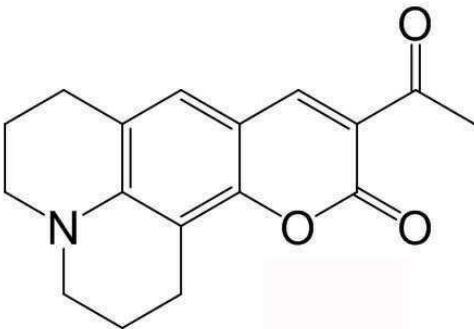
<화학식 1>



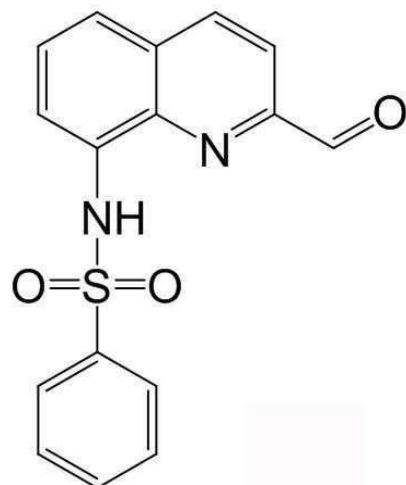
청구항 2

화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 축합 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법:

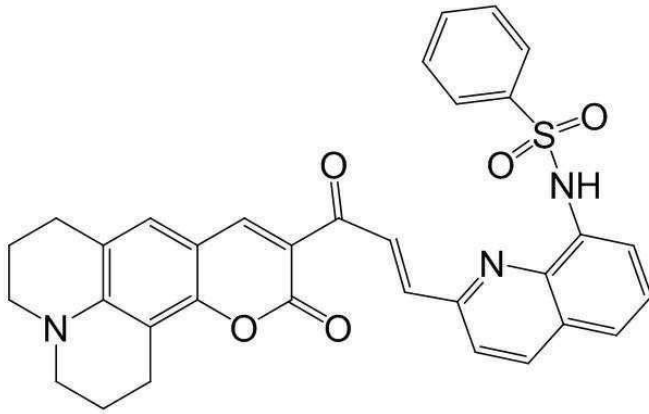
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 1>



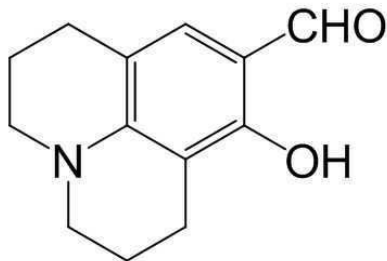
청구항 3

제2항에 있어서, 상기 축합 반응은 피페리딘 촉매 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법.

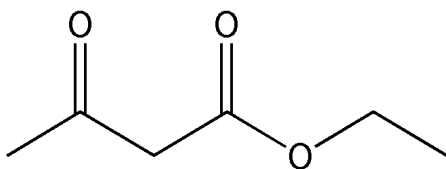
청구항 4

제2항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 화학식 5의 화합물을 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법:

<화학식 4>



<화학식 5>



청구항 5

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체내 시스테인 영상화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 시스테인 (Cys), 호모시스테인 (Hcy) 및 글루타티온 (GSH)과 같은 생물학적 티올은 생체에서 여러 중요한 역할

을 담당하며, 특히 Cys는 GSH, CoA 및 타우린의 전구체로서, 그리고 철-황 클러스터의 황의 공급원으로서 생물학적으로 필수불가결한 역할을 한다 ((a) Reddie, K. G.; Carroll, K. S. Curr. Opin. Chem. Biol. **2008**, 12, 746; (b) Weerapana, E.; Wang, C.; Simon, G. M.; Richter, F.; Khare, S.; Dillon, M. B. D.; Bachovchin, D. A.; Mowen, K.; Baker, D.; Cravatt, B. F. Nature **2010**, 468, 790; (c) Lill, R.; Mühlenhoff, U. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. **2006**, 22, 457). Cys의 농도가 비정상적인 경우, 성장 저해, 모발 탈색, 부종, 무력증, 간 손상, 근육 및 지방 소실, 피부 병변 등과 같은 다양한 인체 질환과 관련이 있을 수 있다. 그러므로, 세포 내의 Cys를 선택적으로 측정할 수 있다면 Cys의 생체 내에서의 역할을 이해하는 데 큰 도움이 될 것이다. 또한, GSH가 세포 내 티올 중에서 가장 함량이 높고 티올의 친핵성을 이용한 검출방법에 있어 Cys의 강력한 경쟁자로 작용한다는 점에서도 그러한 방법은 상당히 매력적이다.

[0003] 형광프로브는 다른 유형의 프로브에 비해 높은 선택성과 특이성, 조작의 용이성, 그리고 실시간 모니터링이 가능하다는 장점을 가진다. 따라서, 형광프로브, 특히 티올의 검출을 위한 형광프로브의 개발을 위해 많은 노력이 있었다 ((a) Yamamoto, K.; Sekine, T.; Kanaoka, Y. Anal. Biochem. **1977**, 79, 83; (b) Matsumoto, T.; Urano, Y.; Shoda, T.; Kojima, H.; Nagano, T. Org. Lett. **2007**, 9, 3375; (c) Lee, K. S.; Kim, T. K.; Lee, J. H.; Kim, H. J.; Hong, J. I. Chem. Commun. **2008**, 6173; (d) Yi, L.; Li, H.; Sun, L.; Liu, L.; Zhang, C.; Xi, Z. Angew. Chem., Int. Ed. **2009**, 48, 4034; (e) Hong, V.; Kislukhin, A. A.; Finn, M. G. J. Am. Chem. Soc. **2009**, 131, 9986). 다수의 형광 티올 센서가 보고되었으나, 그 중 소수만이 Hcy나 GSH에 비해 Cys를 선택적으로 검출할 수 있다. Tseng 등은 Cys의 선택적인 검출을 위한 센서로서 불소화 계면활성제로 개핑한 금 나노입자를 보고하였으며, 강한 염기성 조건 (pH 12)에서 Cys가 검출됨을 입증하였다 (Wu, H.-P.; Huang, C.-C.; Cheng, T.-L.; Tseng, W.-L. Talanta **2008**, 76, 347). Peng 등은 Cys를 Hcy 및 GSH와 구별할 수 있는 화학정량 형광프로브를 보고하였는데, 이것은 로다민 시스템의 스피로락탐의 개환반응을 이용한다 (Li, H.; Fan, J.; Wang, J.; Tian, M.; Du, J.; Sun, S.; Sunb, P.; Peng, X. Chem. Commun. **2009**, 5904). 최근, Lin 등은 Cys의 "7-엔도-트릭" 고리화를 통해 개선된 Cys 정량 형광센서를 개발하였다 (Yuan, L.; Lin, W.; Yang, Y. Chem. Commun. **2011**, 47, 6275). 그러나, 다른 검출원리에 기초한 새로운 Cys 선택적 형광프로브의 개발은 여전히 어려운 과제이다.

[0004] 종래 특허기술로서, 미합중국 등록특허공보 제6,605,459호에서도 수은 이온과 금 나노입자가 혼합된 구성물과 올리고뉴클레오타이드와 결합한 금 나노입자를 이용한 시스템의 선택적 검출을 위한 센서를 개시하고 있으며, 이는 5 ~ 200 nm 정도의 입자 크기를 갖고, 그 감지농도는 100 nM ~ 10 nM이며, 시스템과 결합 시에 518 nm에서 550 nm로 여기되는 것을 특징으로 한다.

[0005] 한편, GSH 및 Hcy에 비해 Cys를 선택적으로 검출하기 위해서는, 두 가지 사항이 특히 중요하다. 첫째로, GSH의 경우 티올기가 트리펩티드인 GSH의 가운데에 위치하고 있어, 입체적 환경이 비교적 복잡하다는 점이다. 이로 인해 GSH는 입체적 장애를 갖는 친전자체와의 친핵반응에 대한 반응성이 낮을 수 있다. 둘째로, 수용액 환경에서 Cys의 설프하이드릴기의 pK_a 값이 다른 두 화합물에 비해 작다는 점이다. 이러한 이유로 인해, 중성에 가까운 pH에서 Cys는 높은 티올레이트/티올 비를 갖고, 따라서 티올의 친핵반응 반응성이 상대적으로 더 높다. 이러한 관점에서 볼 때, Cys에 대한 선택성이 뛰어난 형광프로브를 제조하려면, 애초에는 형광을 발광하지 않고 입체장애를 갖는 친전자 중심을 가지며 Cys와의 선택적인 반응을 통해 형광을 발광하는 분자를 설계하는 것이 이상적이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는, 시스템에 대해서 높은 선택성을 나타내고, 매우 작은 농도의 시스템도 검출할 수 있으며, 우수한 발광 특성을 보이고, 특히, 생체 내에서 직접적으로, 또한 실시간으로 시스템을 영상화할 수 있는 시스템 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공하는 것이다.

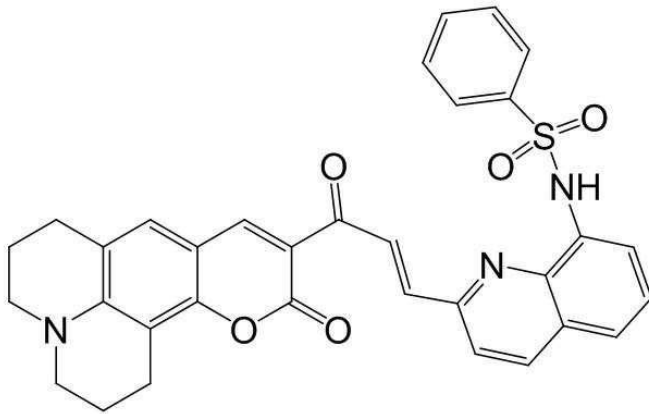
[0007] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 기술적 과제는 상기 화학정량 형광 표지자를 이용한 생체내 시스템 영상화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공한다:

화학식 1

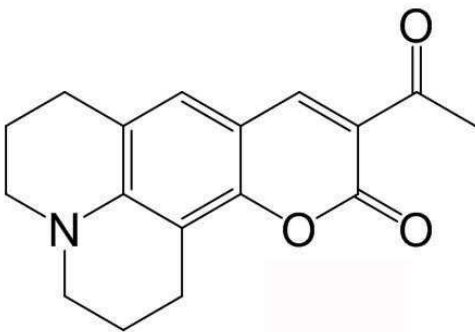


[0010]

[0011] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

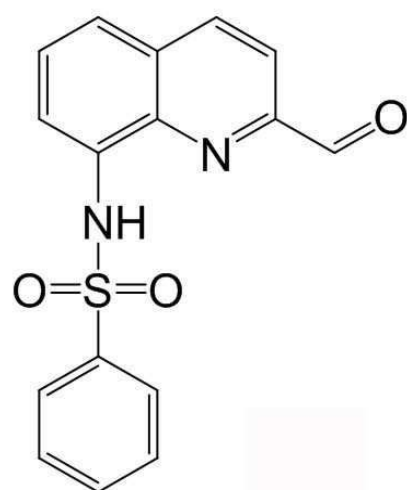
[0012] 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 축합 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공한다:

화학식 2



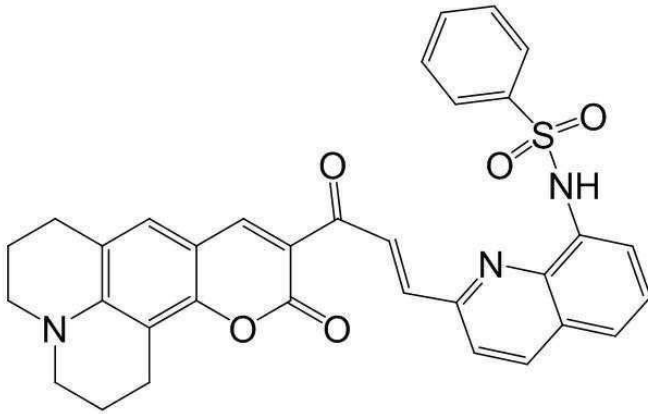
[0013]

화학식 3



[0014]

[0015] <화학식 1>

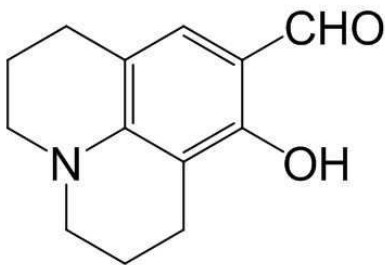


[0016]

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 축합 반응은 피페리딘 촉매 조건 하에서 수행될 수 있다.

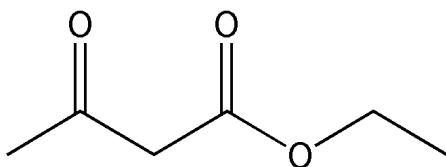
[0018] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 화학식 5의 화합물을 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

화학식 4



[0019]

화학식 5



[0020]

[0021] 본 발명은 상기 세 번째 기술적 과제를 달성하기 위해서, 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계를 포함하는 생체내 시스테인 영상화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자는 시스테인에 대해서 높은 선택성을 나타내고, 매우 작은 농도의 시스테인도 검출할 수 있으며, 우수한 발광 특성을 보이고, 특히, 생체 내에서 직접적으로, 또한 실시간으로 시스테인을 영상화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 1과 Cys가 화학정량적으로 반응함으로써 형광을 발산하는 것을 개략적으로 도시

한 도면이다.

도 2a 및 2b는 각각 화합물 1에 Cys를 첨가하는 경우에 관찰되는 UV-Vis 스펙트럼 및 형광 스펙트럼이다.

도 3은 DFT 계산에 따른 화합물 1과 화합물 1-Cys의 최적화된 구조를 도시한 도면이다.

도 4는 수용액 내에서 다양한 생물학적 분석물에 대한 화합물 1의 512 nm에서의 형광강도를 도시한 그래프이다.

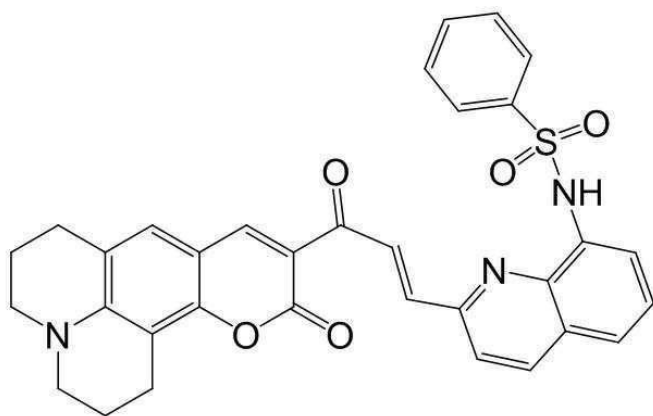
도 5는 화합물 1과 티올의 화학정량 반응을 다양한 농도의 Cys, Hcy 또는 GSH에 대하여 모니터링한 그래프이다.

도 6은 HepG2 세포 내에서, 화합물 1의 N-에틸말레이미드 (NEM)-의존성 소광 실험을 수행하고, 이를 형광 공초점 현미경으로 관찰한 영상들을 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명에서는, 화학식 1의 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공한다:

[0025] <화학식 1>



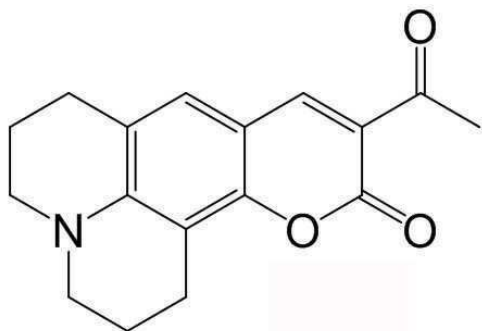
[0026]

[0027] 본 발명에 따른 화합물 1은 티올 함유 화합물과의 마이클 반응을 통해 형광특성이 크게 변화하는, 이중결합으로 컨쥬게이트된 (double bond conjugated) 퀴놀린기를 갖는 쿠마린 유도체이다. 선택성 및 반응시간에 있어, 화합물 1은 Hcy 또는 GSH에 비해 Cys에 대해 가장 최적의 반응을 나타내는데, 이러한 화합물 1의 선택성은, 하기 실시예에서 보다 상세히 설명하는 바와 같이, 퀴놀린기의 치환기와 티올기 사이의 공간적 상호작용과, Hcy 및 GSH에 비해 상대적으로 낮은 Cys의 pK_a 값 때문인 것으로 판단된다. 즉, 화합물 1은 그 벤젠설포닐기가 Cys와 같이 작은 친핵체를 더 선호하기 때문에 Cys에 대한 선택성을 갖는데, 이것은 Cys가 주어진 pH 조건에서 높은 티올레이트 대 티올의 비를 갖기 때문이다.

[0028] 본 발명에 따른 화합물과 Cys와의 반응은, Cys의 티올기가 화합물 1의 퀴놀린기의 α -탄소와의 마이클 첨가반응을 통해 화합물 1-Cys의 부가생성물을 형성할 수 있다. 화합물 1은 초기에는 쿠마린기에서 컨쥬게이션 벤젠설포나미드기로의 분자 내 전하이동 (Intramolecular Charge Transfer, ICT) 작용으로 인해 비형광 발광 상태 ($\Phi_f = 0.003$)이지만, 여기에 화합물 1을 가해주면, 최대흡수파장에서 청색편이가 발생하며, 오렌지색에서 녹색으로의 색상 변화가 관찰된다.

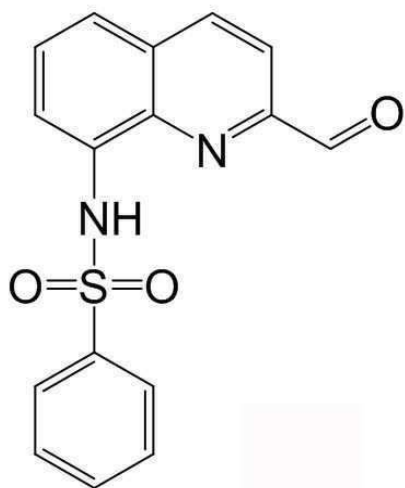
[0029] 본 발명은 또한, 하기 화학식 2의 화합물과 화학식 3의 화합물을 축합 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 시스테인 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공한다:

[0030] <화학식 2>



[0031]

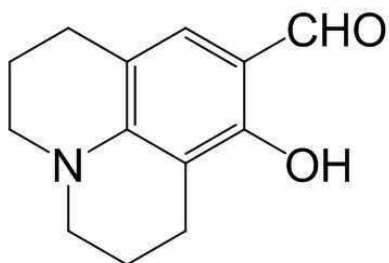
[0032] <화학식 3>



[0033]

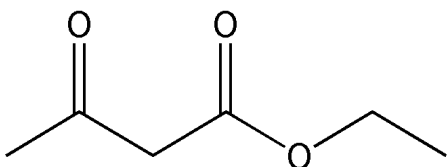
[0034] 상기 반응은 이중결합으로 컨쥬게이트된 퀴놀린기를 갖는 쿠마린 유도체인 화학식 2의 화합물과 벤젠설폰닐기를 갖는 화학식 3의 화합물을 축합시키는 반응으로서, 예를 들어, 상기 화합물 2와 상기 화합물 3을 에탄올-아세트 니트릴 등의 용매에 녹이고, 피페리딘과 같은 촉매를 가하여 줌으로써 수행될 수 있다. 상기 화학식 3의 화합물은 종래문헌에 공지된 방법을 사용하여 합성할 수 있으며 (Xue, G.; Bradshaw, J. S.; Dalley, N. K.; Savage, P. B.; Izatt, R. M.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N. *Tetrahedron* **2002**, 58, 4809), 상기 화학식 2의 화합물은 쿠마린 유도체인 하기 화합물 4와 화합물 5를 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

[0035] <화학식 4>



[0036]

[0037] <화학식 5>

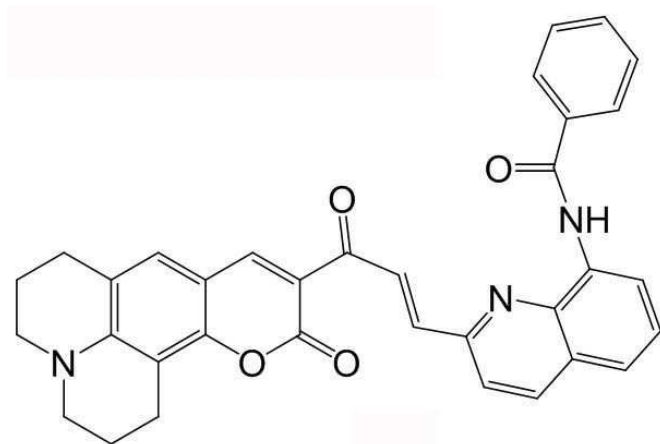


[0038]

[0039] 상기 화합물 4와 5의 반응은 예를 들어, 에탄올 용매 중의 환류 조건 하에서 수행될 수 있다.

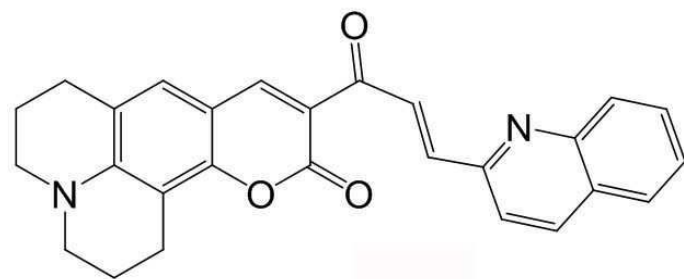
[0040] 참고로, 하기 반응식에는 화합물 4 및 5로부터, 화학식 1의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다. 하기 반응식에서, 퀴놀린기 주변의 입체환경 변화가 화합물 1-티올 반응에 미치는 영향을 알아보기 위해, 비교예로서 화합물 6 및 화합물 7을 함께 제조하였다.

화학식 6



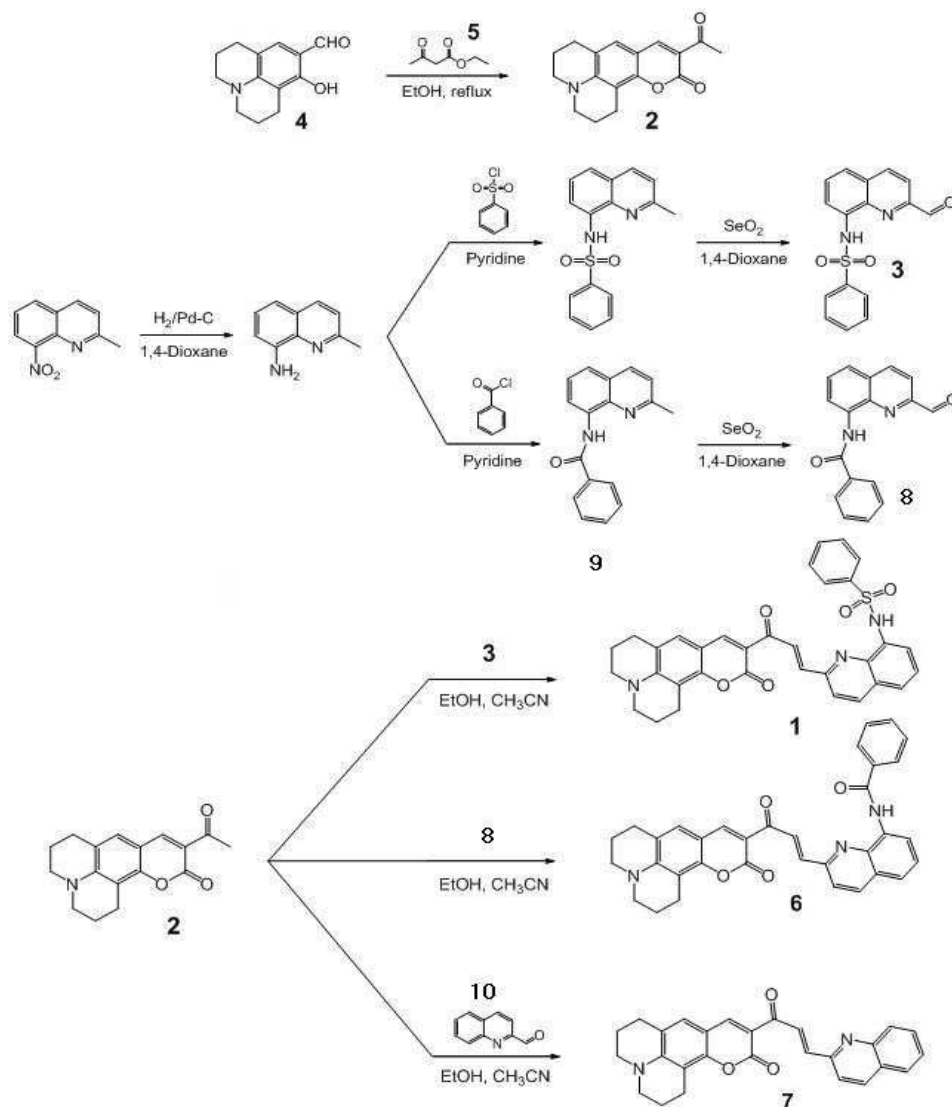
[0041]

화학식 7



[0042]

[0043] <반응식>



[0044]

[0045] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계를 포함하는 생체내 시스테인 영상화 방법을 제공한다.

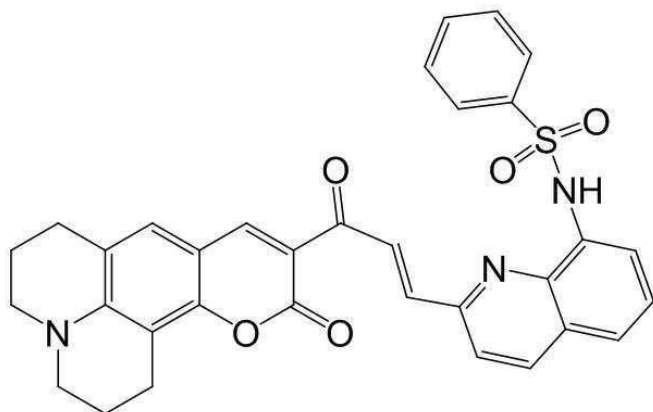
[0046] 본 발명에 따른 화합물 1은 정맥 주사 등에 의해서 생체 내로 손쉽게 주입될 수 있으며, 주입된 화합물 1은 시스테인의 티올기와 마이클 반응을 일으키고, 이어서 그 형광특성이 크게 변화한다. 본 발명에 따른 생체내 시스테인 영상화 방법은 이러한 방출 형광을 화학정량적으로 모니터링함으로써 살아있는 시료 내의 시스테인 수치를 직접적, 실시간으로 영상화할 수 있게 된다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 서술된 것이다.

[0048] 제조예 1. 본 발명에 따른 형광 표지자의 제조

[0049] 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 형광 표지자인 하기 화학식 1의 화합물을 제조하였다.

[0050] <화학식 1>



[0051]

[0052] 쿠마린 334 (화합물 2) (200.0 mg, 0.706 mmol)와 화합물 3 (Xue, G.; Bradshaw, J. S.; Dalley, N. K.; Savage, P. B.; Izatt, R. M.; Prodi, L.; Montalti, M.; Zaccheroni, N. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 4809에 기재된 방법에 의해서 합성하였다. 228.9 mg, 0.733 mmol)를 에탄올-아세트니트릴 (5 mL; 1 : 1)에 녹이고, 3방울의 피페리딘을 촉매로서 가하였다. 얻어진 혼합물을 가열하여 12시간 동안 환류시키고, 감압 하에 용매를 제거하였다. 잔류물을 실리카 상에서 컬럼 크로마토그래피 (*n*-헥산-EtOAc (1 : 1 v/v)를 용리액으로 사용)로 정제하여 상기 화합물 1 (182.0 mg, 46%)을 얻었다.

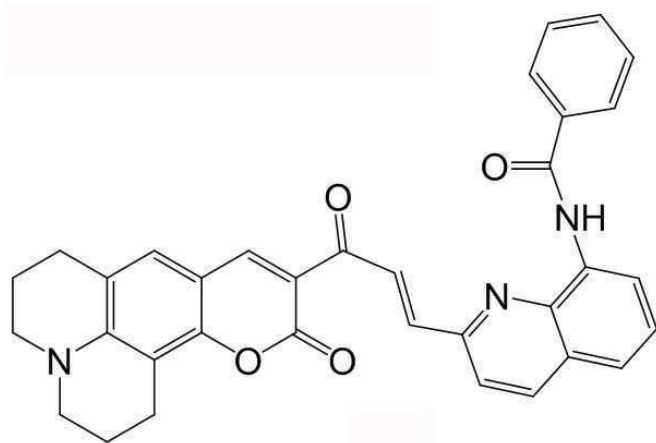
[0053] Mp: 236 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.22 (s, 1H), 8.51 (t, *J* = 8.52 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 8.36 Hz, 1H), 7.95-7.90 (m, 3H), 7.87 (t, *J* = 3.40 Hz, 1H), 7.82 (d, *J* = 8.75 Hz, 1H), 7.46-7.43 (m, 2H), 7.41-7.33 (m, 3H), 7.04 (s, 1H), 3.38 (q, *J* = 6.14 Hz, 4H), 2.92 (t, *J* = 6.39 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 6.39 Hz, 2H), 2.00 (m, 4H); ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃): 186.8, 161.5, 154.0, 153.4, 149.3, 149.1, 141.3, 139.3, 138.7, 136.6, 134.0, 133.0, 131.0, 129.0, 128.1, 128.0, 127.5, 127.4, 122.3, 120.9, 119.9, 116.3, 115.0, 108.8, 105.8, 50.6, 50.1, 27.6, 21.2, 20.2, 20.1; ESI-MS: C₃₃H₂₇N₃O₅S [M+H]⁺ 계산값 577.17, 측정값 578.4.

[0054] 제조예 2. 비교예에 따른 화합물의 제조

[0055] 제조예 2.1 화합물 6의 제조

[0056] 비교예로서, 화합물 3 대신에 화합물 8의 알데히드 유도체를 사용하였다는 점을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 하기 화합물 6 (210.0 mg, 55%)을 제조하였다:

[0057] <화학식 6>



[0058]

[0059] Mp: 250 °C; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 10.92 (s, 1H), 8.99 (d, *J* = 7.82 Hz, 1H), 8.79 (d, *J* = 15.85 Hz, 1H), 8.47 (s, 1H), 8.23 (d, *J* = 7.95 Hz, 2H), 8.20 (d, *J* = 8.52 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 15.62 Hz, 1H),

7.81 (d, $J = 8.52$ Hz, 1H), 7.70 (t, $J = 7.67$ Hz, 2H), 7.64-7.57 (m, 2H), 7.53 (d, $J = 8.06$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 3.56 (m, 4H), 2.93 (t, $J = 6.39$ Hz, 2H), 2.76 (t, $J = 6.39$ Hz, 2H), 1.99 (m, 4H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 186.8, 165.4, 161.3, 154.0, 152.3, 149.2, 148.9, 141.0, 138.8, 137.1, 135.0, 134.8, 132.0, 130.6, 129.2, 128.3, 128.1, 128.0, 127.6, 122.0, 121.5, 119.9, 117.0, 115.1, 108.7, 105.7, 50.5, 50.1, 27.5, 20.3, 20.1; ESI-MS: $\text{C}_{34}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산값 541.20, 측정값 542.2.

[0060] 한편, 상기 화합물 6의 제조를 위한 화합물 8은 하기 방법에 따라서 합성하였다.

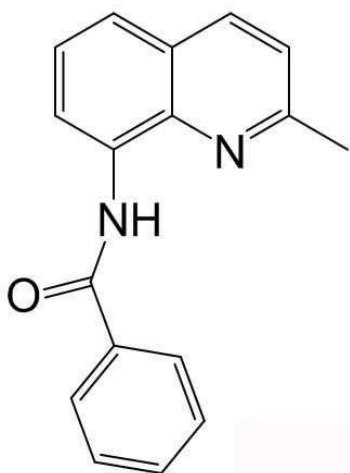
화학식 8



[0061]

[0062] 새로 승화시킨 SeO_2 (3.33 g, 30 mmol)를 150 mL의 디옥산에 가하고 교반하여 현탁시킨 후, 50 mL의 디옥산에 용해시킨 하기 화학식을 갖는 화합물 9 (Wang, K.; Shen, M.; Sun, W.-H. *Dalton Trans.* **2009**, 4085에 기재된 방법에 의해서 합성, 4.30 g, 16.4 mmol)를 50~55 °C에서 1.5시간 동안 가하였다.

화학식 9



[0063]

[0064] 얻어진 혼합물을 90~95 °C에서 밤새 교반하고 여과한 다음, 디옥산을 감압 하에 제거하였다. 잔류물을 CH_2Cl_2 를 용리액으로 사용하여 실리카겔 상에서 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 흰색 고체 상태의 화합물 8 (4.03 g, 89%)을 얻었다.

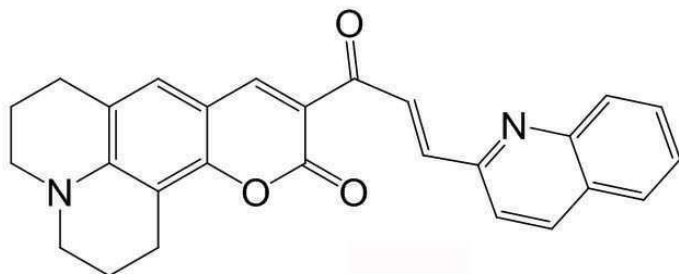
[0065] Mp: 194~195 °C; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 10.61 (s, 1H), 10.23 (s, 1H), 8.99 (d, $J = 7.54$ Hz, 1H),

8.31 (d, $J = 8.61$ Hz, 1H), 8.10-8.04 (m, 3H), 7.71 (t, $J = 8.94$ Hz, 1H), 7.63-7.55 (m, 4H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 192.9, 165.5, 150.2, 138.2, 138.0, 135.4, 134.9, 132.3, 130.7, 130.1, 129.1, 127.3, 121.7, 117.9, 117.5; ESI-MS: $\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산값 276.09, 측정값 277.1.

[0066] 제조예 2.2 화합물 7의 제조

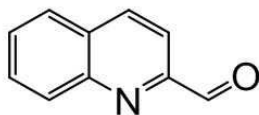
[0067] 비교예로서, 화합물 3 대신에 화합물 10의 알데히드 유도체를 사용하였다는 점을 제외하고는 제조예 1과 동일한 방법으로 하기 화합물 7 (204.0 mg, 68%)을 제조하였다:

[0068] <화학식 7>



[0069]

화학식 10



[0070]

[0071] Mp: 240 °C; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.57 (d, $J = 15.50$ Hz, 1H), 8.48 (s, 1H), 8.17 (d, $J = 8.80$ Hz, 1H), 8.13 (d, $J = 8.46$ Hz, 1H), 8.00 (d, $J = 15.85$ Hz, 1H), 7.85 (d, $J = 8.81$ Hz, 1H), 7.81 (d, $J = 8.10$ Hz, 1H), 7.73 (t, $J = 8.46$ Hz, 1H), 7.54 (t, $J = 8.46$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 3.35 (m, 4H), 2.91 (t, $J = 6.39$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.39$ Hz, 2H), 1.98 (m, 4H); ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): 186.8, 161.5, 154.9, 154.0, 149.2, 149.1, 148.6, 142.4, 136.7, 130.7, 130.1, 130.0, 128.2, 128.1, 127.7, 127.3, 120.4, 119.9, 108.8, 105.9, 50.6, 50.2, 50.1, 27.6, 21.3, 20.4, 20.2; ESI-MS: $\text{C}_{27}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 계산값 422.16, 측정값 423.1.

[0072] 실시예

[0073] <스펙트럼 데이터>

[0074] 생물학적 분석물 [아미노산 (Cys, Hcy, GSH, Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Gluc, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tau, Thr, Trp, Tyr, Val), 금속 (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}), ROS (H_2O_2 , NADH) 및 글루코스]의 저장용액 (1.0 mM)은 2차 증류수를 사용하여 제조하였다. 화합물 1, 6 및 7의 저장용액 (0.2 mM)은 DMSO (디메틸 설펍사이드)를 사용하여 제조하였다. 모든 형광 스펙트럼 측정의 여기파장은 490 nm 이었으며, 여기 및 방출을 위한 슬릿의 폭은 각각 1.5 nm와 3 nm이었다. 모든 UV/Vis 및 형광 적정실험은 실온에서 하였으며, 10% DMSO 수용액 (pH 7.4, 10 mM PBS 완충액)에 용해된 5.0 μM 및 2.0 μM 의 분석물을 사용하였다.

[0075] <반응속도 데이터>

[0076] 반응속도 측정에는 Shimadzu RF-5301PC 분광계를 사용하였다. 25 °C에서 두 반응물을 혼합하여, 단일-혼합 모드에서 측정하였다. 티올 (1.0 mM)에 대한 화합물 1 (2.0 μM)의 시간에 따른 반응 정도는 10% DMSO 수용액 (pH 7.4, 10 mM PBS 완충액) 내에서 유사1차 반응조건 하에 측정하였다. 반응에 따른 스펙트럼 변화 ($\lambda_{\text{max}} = 512$

nm)는 0.16초의 시간간격을 두고 기록하였으며 RF-530XPC 분석/시뮬레이션 소프트웨어를 사용하여 반응속도를 추적하였다.

[0077] <계산>

[0078] 화합물 1, 화합물 1-Cys 및 이량체 (화합물 1 및 Cys, 화합물 1 및 Hcy, 화합물 1 및 GSH)의 구조를 이론적 B3LYP/6-31G(d) 수준으로 최적화하였다. 최적화된 구조의 진동분석 후에 남은 가상 주파수는 없었으며, 이것은 최적화된 구조가 포텐셜에너지 표면 (PES) 상의 실제 최소값이라는 것을 뜻한다. 균형보정법을 이용하여 바탕 집합 중첩오차 (BSSE)를 수정하였으며 (Simon, S.; Duran, M.; Dannenberg, J. J. J. Chem. Phys. **1996**, 105, 11024.), 이를 최적화된 구조에 적용하여 상호작용 에너지를 계산하였다. 상호작용 에너지 (I.E)는 하기 수학적식에 의해 정의되며, 이 때 E_{Ligand} 와 E_{AA} 는 각각 화합물 1과 아미노산 (예컨대, Cys, Hcy 또는 GSH)의 최적화된 에너지이고, $E_{\text{BSSEdimer}}$ 는 균형보정된 이량체의 에너지이며, $\Delta E_{\text{dimerization}}(\text{corr.})$ 는 보정된 이량화 에너지로서 상호작용 에너지에 해당한다.

[0079] <수학적식>

[0080]
$$I.E = \Delta E_{\text{dimerization}}(\text{corr.}) = E_{\text{BSSEdimer}} - (E_{\text{Ligand}} + E_{\text{AA}})$$

[0081] 전자 여기 에너지와 진동자 강도는 시간의존 밀도범함수 이론 (TDDFT)을 이용하여 이론적 B3LYP/6-31G (d) 수준에서 계산하였다. 모든 계산은 Gaussian 09 W 프로그램을 사용하여 수행하였다.

[0082] <세포배양 및 화합물 1의 공초점 현미경 관찰>

[0083] 인간 간암 세포주인 HepG2 세포를, 37 °C에서 5% CO₂ 및 95% 공기 조건 하의, 10% 우태아혈청과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 DMEM에서 배양하였다. 세포를 24-웰 플레이트에 분주하고 밤새 안정화하였다. 화합물 1을 처리하기 전에, 세포를 다양한 농도의 NEM을 포함하는 배지에서 37 °C에서 1시간 동안 배양하여 세포 내 티올과 반응하도록 하였다. 이어, 세포를 1 mL의 PBS로 2회 세척한 후 PBS에 녹인 2 mM의 화합물 1로 처리하였다. 30분 동안 배양한 후, 488 nm 아르곤 레이저와 505 nm 장파장 투과필터가 구비된 공초점 레이저 주사현미경 (Zeiss LSM 510, Zeiss, Oberko, Germany)을 사용하여 형광 이미지를 촬영하였다.

[0084] 실시예 1. 스펙트럼 분석

[0085] 도 1에는 본 발명에 따른 화합물 1과 Cys가 화학정량적으로 반응함으로써 형광을 발산하는 것을 개략적으로 도시하였다. 도 1에서, Cys의 티올기는 화합물 1의 컨주게이트드 퀴놀린기의 α-탄소와의 마이클 첨가반응을 통해 화합물 1-Cys 부가생성물을 형성할 수 있다.

[0086] 티올과의 반응에 의한 화합물 1의 광물리적 변화와 관련하여, 본 발명자는 화합물 1이, 쿠마린기에서 컨주게이트된 벤젠설폰아미드기로서의 ICT (분자 내 전하이동) 작용으로 인해 초기에는 비형광 발광 상태 ($\Phi_f = 0.003$)이라는 것을 확인하였다. 그러나, Cys에 화합물 1을 가하자 최대 흡수파장 $\lambda_{\text{ab}} = 474$ nm에서 23 nm의 청색 편이가 나타났으며, 도 2a에 도시된 화합물 1의 UV-Vis 스펙트럼으로부터도 알 수 있는 바와 같이, 오렌지색에서 녹색으로의 색상 변화가 관찰되었다. 또한, 도 2b에 도시된 형광 스펙트럼으로부터 알 수 있는 바와 같이, [Cys]가 증가함에 따라 $\lambda_{\text{em}} = 512$ nm에서의 형광강도가 점차 증가하였고 ($\Phi_f = 0.160$), 화합물 1과 Cys가 반응함에 따라 0~0.9 mM 범위에서 형광강도가 선형적으로 증가하였으며, 이는 화합물 1이 생체 내에서 Cys를 검출하기 위한 화학정량 형광표지자로서 매우 적합하다는 것을 의미한다.

[0087] 한편, 화합물 1-티올 부가생성물의 형성에 따른 형광강도 증가의 메커니즘을 밝히기 위하여, 6-31G(d)를 바탕집합으로 하고 Gaussian 09 W 프로그램을 사용하여 밀도범함수 이론 (Density Functional Theory, DFT) 계산을 수행하였다. 화합물 1과 화합물 1-Cys의 최적화된 구조를 도 3에 도시하였다. TD-DFT 계산 결과, 화합물 1과 화합물 1-Cys 모두 최초의 1중항 여기상태 (S_1)가 HOMO→LUMO 전이에 주로 기여하는 것으로 나타났다. 화합물 1과 화합물 1-Cys의 HOMO는 형광체 부분 (쿠마린기)에 주로 위치한다. 화합물 1-Cys의 LUMO는 형광체 부분에 위치하는 반면, 화합물 1의 LUMO는 형광체 부분과 비형광체 부분, 그리고 비형광체인 퀴놀린 부분 사이의 '에논 (enone)' 브릿징기에 분산되어 있다. 따라서, 화합물 1의 경우 컨주게이트드 브릿지를 통해 빛에 의해 유도된 분자 내 전하이동 (PICT)이 일어날 것으로 예상되나, 화합물 1-Cys의 경우 브릿지가 컨주게이트되지 않았으므로 이러한 현상은 발생하지 않는다. 따라서, 화합물 1-Cys의 형광강도가 크게 증가하는 것은 PICT 과정이 화합물

1과 비교할 때 약화되기 때문에 판단된다. 최초의 1중항 여기상태 (S_1)에 해당하는 화합물 1과 화합물 1-Cys의 여기과장 계산값은 각각 431 nm와 409 nm이었다. 청색 편이는 ~22 nm로 계산되어 실험적으로 관찰된 청색 편이 (~23 nm)와 매우 일치하였는데, 이로써 Cys가 화합물 1과 화합물 1-Cys 부가생성물을 생성함을 알 수 있다.

[0088] 실시예 2. 시스테인 선택성 분석

[0089] 수용액 (10 mM PBS 완충액, pH 7.4, 10% DMSO) 내에서 다양한 생물학적 분석물에 대한 화합물 1의 형광 스펙트럼의 변화를 조사하였다. 512 nm에서의 형광강도를 도 4에 도시하였다. 도 4를 참조하면, 화합물 1은 다른 아미노산 (Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tau, Thr, Trp, Tyr, Val)이나 생물학적 금속이온 (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}), ROS (H_2O_2) 환원제 (NADH) 또는 글루코스에 비해 Cys를 첨가하였을 때 선택적인 형광강도의 증가를 나타냄을 알 수 있으며, Hcy나 GSH와 같은 친핵성 티올의 경우, 발광강도에 큰 변화가 없었다.

[0090] Cys, Hcy 및 GSH에 대한 화합물 1의 반응성을 비교하기 위하여, 화합물 1과 티올의 화학정량 반응을 다양한 농도의 Cys, Hcy 또는 GSH에 대하여 모니터링하였으며, 그 결과를 도 5에 도시하였다. 형광강도 (I_{512})에 있어서, 화합물 1은 Hcy 및 GSH에 비해 Cys에 대하여 탁월한 선택성을 보였다. 도 4의 조건에서, Cys를 가한 경우 발광강도가 240배 증가한 반면, Hcy와 GSH를 가하였을 때에는 각각 19배 및 6배 증가에 그쳤다. 이러한 선택성을 보다 자세히 확인하기 위하여, pH 7.4의 유사 1차 반응조건에서 화합물 1과 Cys, Hcy 또는 GSH의 반응속도를 조사하였고, 그 결과를 하기 표 1에 요약하였다.

표 1

	1	2	3
Cys	$1.48 \pm 0.12 \times 10^{-3a}$ (247) ^b	$7.84 \pm 0.92 \times 10^{-4a}$ (2780) ^b	1.74×10^{-2a} (102) ^b
Hcy	$2.34 \pm 0.18 \times 10^{-4a}$ (39.1) ^b	$5.85 \pm 0.97 \times 10^{-5a}$ (207) ^b	$1.61 \pm 0.17 \times 10^{-3a}$ (9.41) ^b
GSH	$5.98 \pm 0.47 \times 10^{-6a}$ (1) ^b	$2.82 \pm 0.66 \times 10^{-7a}$ (1) ^b	$1.71 \pm 0.15 \times 10^{-4a}$ (1) ^b

[0091]

[0092] Cys 및 GSH에 대한 화합물 1의 반응성의 비는 247로서, 화합물 1은 GSH보다 Cys에 대하여 우수한 선택성을 보였다. 화합물 1의 벤젠설포아미드기를 벤즈아미드기로 치환한 화합물 6의 경우, Cys에 대한 선택성은 더욱 증가하였으나 (GSH의 2,780배), 해당 위치에 치환기가 없는 화합물 7의 경우, 선택성의 비가 감소하였다 (102배). 이러한 결과로부터, Cys에 대한 화합물 1의 선택성이 GSH에 비해 우수한 것은 친전자 중심에 더 큰 치환기가 도입되었기 때문임을 알 수 있다.

[0093] 한편, Cys에 대한 선택성과 관련하여, Cys의 티올기의 pK_a 값 (8.53)이 Hcy (pK_a 10.00) 또는 GSH (pK_a 9.20)보다 작다는 점에 주목할 필요가 있다. 즉, pH 7.4에서 Cys의 티올기는 마이클 첨가반응시 더 우수한 친핵체인 티올레이트 상태로 존재한다. 화합물 1의 Hcy 대비 Cys에 대한 선택성은 Cys와 Hcy의 pK_a 값 차이에 기인한 것으로 판단된다. pH 7.0에서, Cys와의 반응에 의한 화합물 1의 형광강도가 Hcy와의 반응에 의한 경우보다 훨씬 크지만, 용액의 pH가 10으로 증가하면 비슷한 값이 된다. 또한, 여러 티올의 화합물 1과의 반응성을 시험한 결과, Cys (pK_a 8.53)와 2-아미노에탄티올 (pK_a 8.3)이 pH 7.4에서 높은 반응성을 보였으며, 이들의 반응성은 염기성 pH에서는 다른 티올의 경우와 비슷하였다. 그러나, 티올 pK_a 값과 관련된 이러한 결과에 있어서 GSH만은 예외였다. 따라서, 화합물 1이 Hcy보다 Cys에 대하여 선택성을 갖는 이유는 pK_a 값의 차이 때문이지만, GSH에 비해 선택성을 갖는 이유는 입체장애 때문이라고 할 수 있다.

[0094] 실시예 3. 배양 세포 내 시스테인의 검출

[0095] 화합물 1이 세포 환경에서도 Cys를 선택적으로 검출할 수 있는지 알아보기 위하여 세포를 이용한 실험을 수행하

였다. HepG2 세포 내에서, 화합물 1의 N-에틸말레이미드 (NEM)-의존성 소광 실험을 수행하였는데, HepG2 세포들을 다양한 농도의 NEM으로 37°C에서 1시간 동안 처리하고, 세포들을 1.0 ml의 PBS로 잠시 동안 2회 세척한 후, PBS 중의 2 μ M 농도 화합물 1로 처리하였다. 30분 배양한 후에, 488 nm의 아르곤 레이저 및 505 nm의 장경로 발광 필터를 사용하여 형광 공초점 현미경 영상들을 얻었다.

[0096]

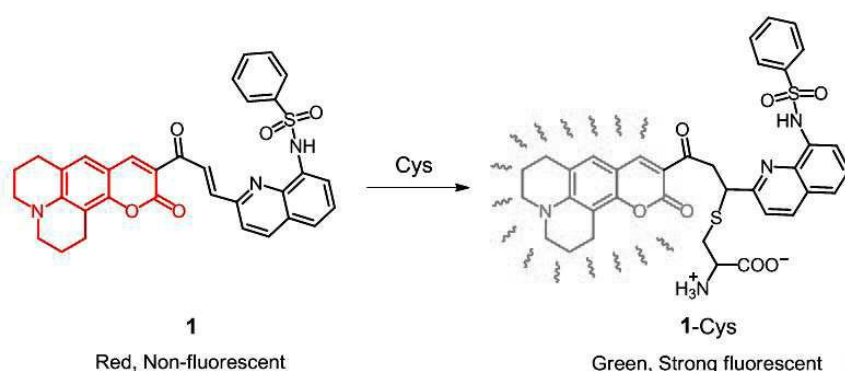
도 6에는 상기에서 얻어진 현미경 영상들을 도시하였으며, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, NEM의 농도가 증가함에 따라 화합물 1의 형광강도가 점차 감소하였다. NEM은 티올에 특이적인 시약이므로, 도 6에 나타난 형광강도의 변화는 티올과의 세포 내 반응에 의한 것이며, 이때 티올은 Cys, GSH 또는 Hcy일 수 있다. 상기 도 4 및 표 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 화합물 1의 반응성이 GSH보다 Cys에 대해 더 크긴 하지만, 세포 내 GSH 함량이 Cys 함량보다 훨씬 높은 것으로 알려져 있으므로 방출강도의 변화가 세포 내 Cys와의 반응에 의한 것이라고 단언할 수는 없다. 세포 내에서의 GSH의 형성은 γ -글루타밀시스테인 합성효소의 작용에 의해 Cys로부터 시작되는데, 이는 산화 스트레스, 예컨대 H_2O_2 처리에 따른 GSH의 손실을 보충하는 데 있어 중요한 역할을 한다. 세포 내에서 Cys에 대한 선택성을 입증하기 위하여, γ -글루타밀시스테인 합성효소의 억제제로 잘 알려진 L-부티오닌 설펡시민 (BSO)을 사용하여 Cys로부터 GSH가 형성되는 것을 억제한 다음, GSH의 감소 또는 Cys의 증가에 따른 세포의 형광 이미지를 조사하였다. 실험 결과, BSO가 존재하는 경우 H_2O_2 처리에 의해 GSH의 농도를 낮추어도 화합물 1의 형광강도는 전혀 감소하지 않았다. 이러한 결과는 도 6의 형광강도가 GSH와의 반응이 아닌 Cys와의 반응에 의한 것임을 분명히 확인시켜 준다. Hcy가 화학정량 반응에 참여하는 가능성도 생각해 볼 수 있지만, 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, Hcy의 반응성은 Cys에 비해 매우 약하며, 따라서 그러한 가능성은 낮다고 할 수 있다. 상기 결과들을 종합해보면, 화합물 1은 세포 내에서도 다른 티올에 비해 Cys와 선택적으로 화학정량 반응하는 것을 알 수 있다.

[0097]

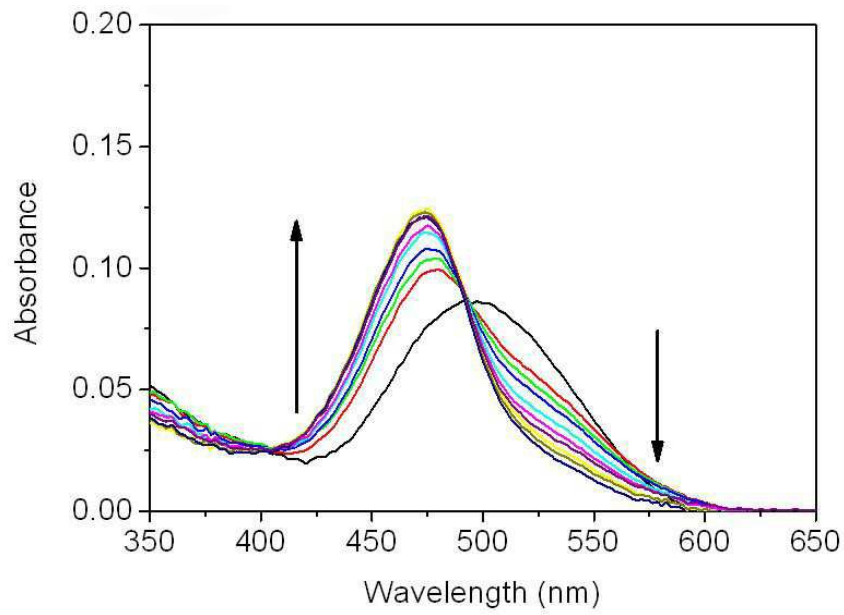
상기 실시예로부터, 본 발명에 따른 화합물 1은 마이클 반응을 통한 형광 발광에 의해 Hcy나 GSH와 같이 구조적, 기능적으로 유사한 다른 아미노산에 비해 Cys를 선택적으로 인식할 수 있는 형광 표지자임을 알 수 있다. 이는 본 발명에 따른 화합물의 구조로부터, 생리적 조건에서 비교적 낮은 pK_a 값을 가지는 Cys가 강력한 친핵체로 작용하고, 호스트로서 크기가 큰 이 친핵체가 친전자 중심에 접근하는 과정에서 입체장애를 겪기 때문에 가능한 것으로 판단된다. 화합물 1은 수용액 내에서 10^{-7} M의 검출한계로 Cys를 검출할 수 있으며, HePG2 세포 내의 Cys를 성공적으로 형광 이미징할 수 있었다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물 1은 생물학적으로 중요한 아미노산의 검출을 위한 형광센서의 개발에 높은 활용도를 가질 수 있다.

도면

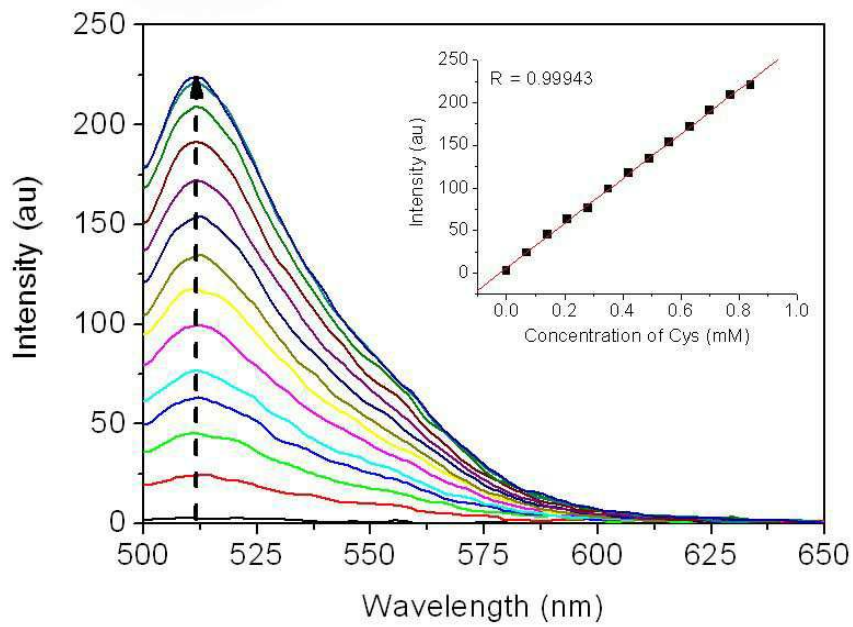
도면1



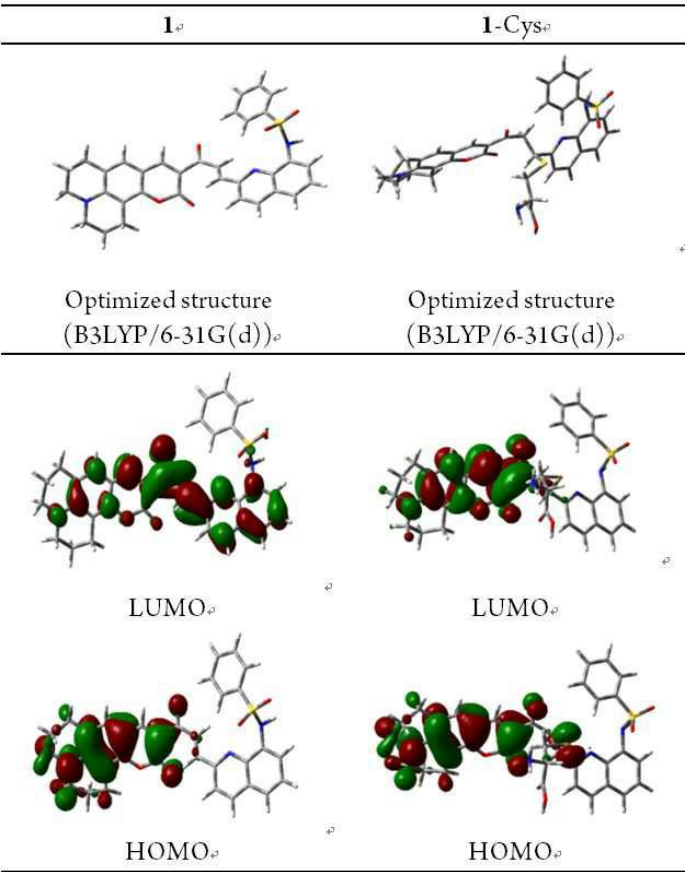
도면2a



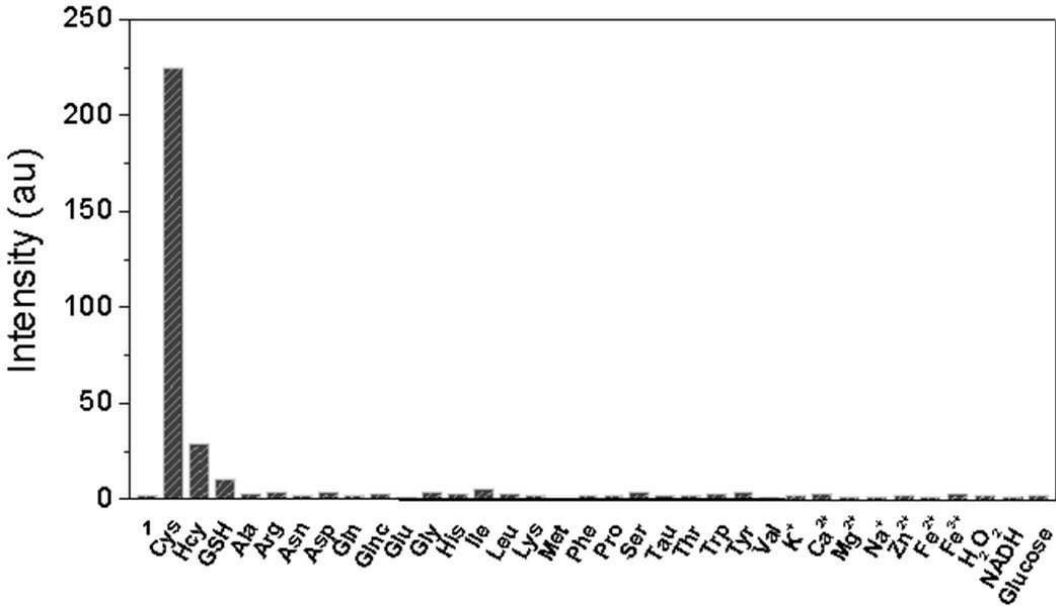
도면2b



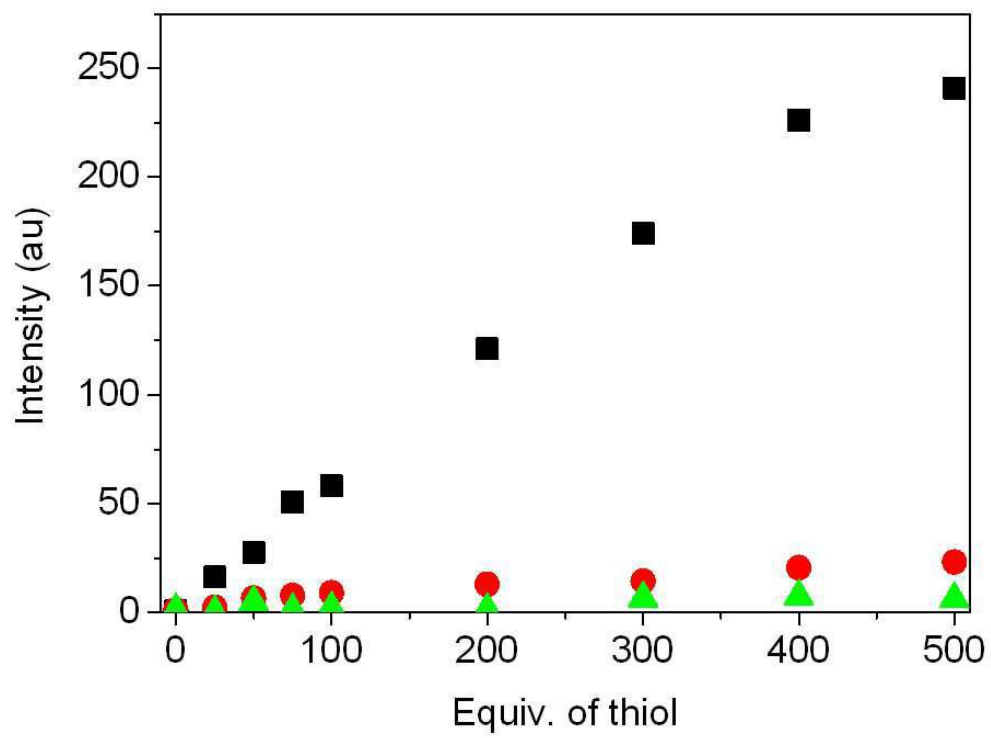
도면3



도면4



도면5



도면6

