



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월27일
(11) 등록번호 10-1781565
(24) 등록일자 2017년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 401/14 (2006.01) C07D 221/14 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 401/14 (2013.01)
C07D 221/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0065468
(22) 출원일자 2016년05월27일
심사청구일자 2016년05월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020140010857 A
논문(Tetrahedron, 20131007, 69(40), pp. 8645-8654)
논문(Organic Letters, 2011.10, 13(19), pp. 5294-5297)
논문(Journal of the American Chemical Society (20100120), 132(2), pp. 601-610)

(73) 특허권자
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 서빙고동 이촌로 347 신동아아파트 2동 501호
채샤오창
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 이화여대 종합과학관 D동 501호
이다영
서울특별시 서대문구 봉원사길 41-7 110호 (대신동)
(74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 9 항

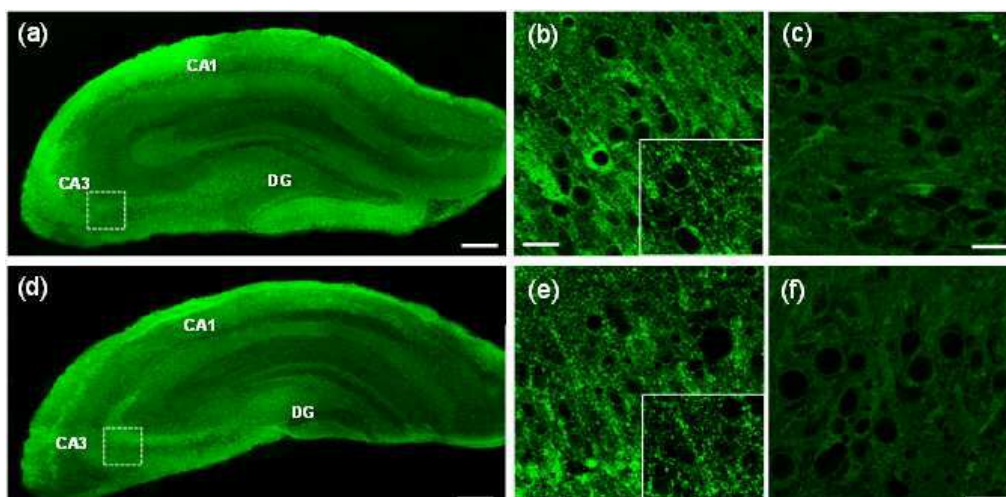
심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 NMDA 수용체의 아연 검출용 화합물 및 이를 함유하는 NMDA 수용체의 아연 검출용 형광 프로브

(57) 요약

본 발명은 NMDA 수용체의 아연 검출용 화합물 및 이를 함유하는 NMDA 수용체의 아연 검출용 형광 프로브에 관한 것으로, 본 발명에 따른 NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물은 NMDA 수용체와 결합한 후, NMDA 수용체 주변의 아연이온을 포집함으로 나타나는 이광자 형광 변화를 통해, 아연이온을 검출할 수 있다. 이로부터, 신경자극에 따른 아연이온의 변화를 감지함으로써, 신경병리학적 연구에 사용될 수 있고, 또한 이를 유효성분으로 함유하여 신경병증성 질병의 진단 또는 검사용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

G01N 33/52 (2013.01)

G01N 33/581 (2013.01)

G01N 2800/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A3A2048814

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구

연구과제명 다차원 유기소재 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2016.08.31

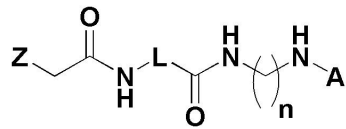
명세서

청구범위

청구항 1

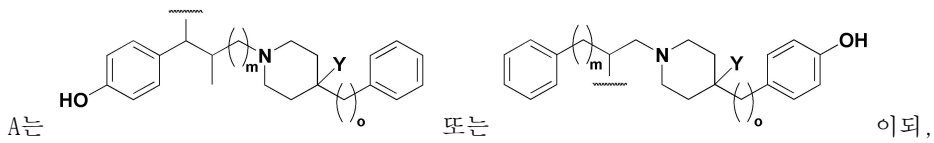
하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 입체 이성질체:

[화학식 1]

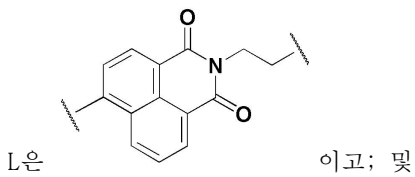


(상기 화학식 1에서,

n은 1 내지 20의 정수이고;



여기서 상기 A의 m은 0 내지 2의 정수이고, o는 0 또는 1이고, 및 Y는 -H 또는 -OH이고;



L은 이고; 및

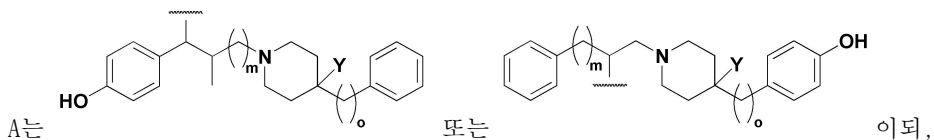


Z는 또는 이다).

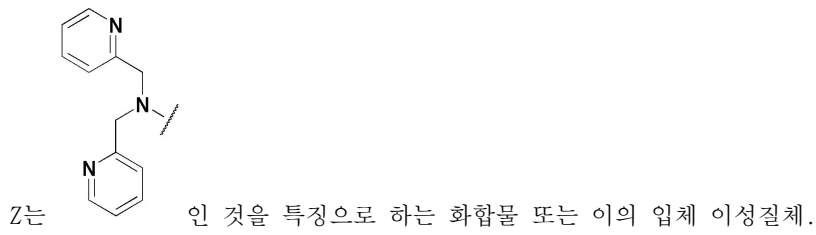
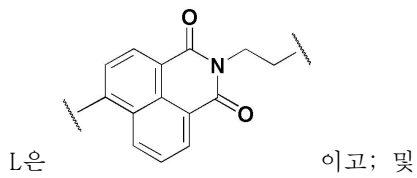
청구항 2

제1항에 있어서,

n은 1 내지 20의 정수이고;



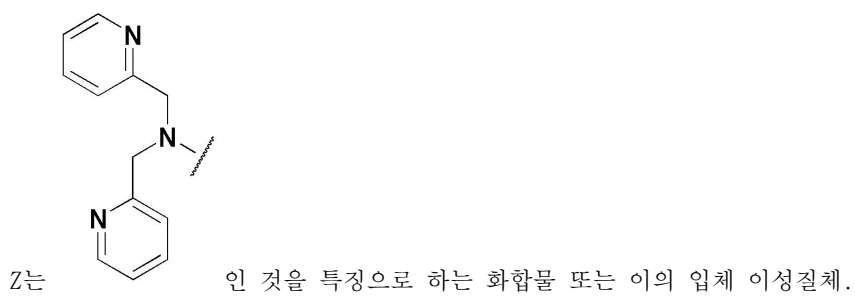
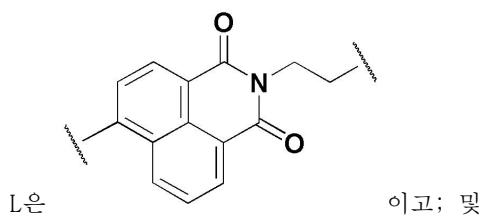
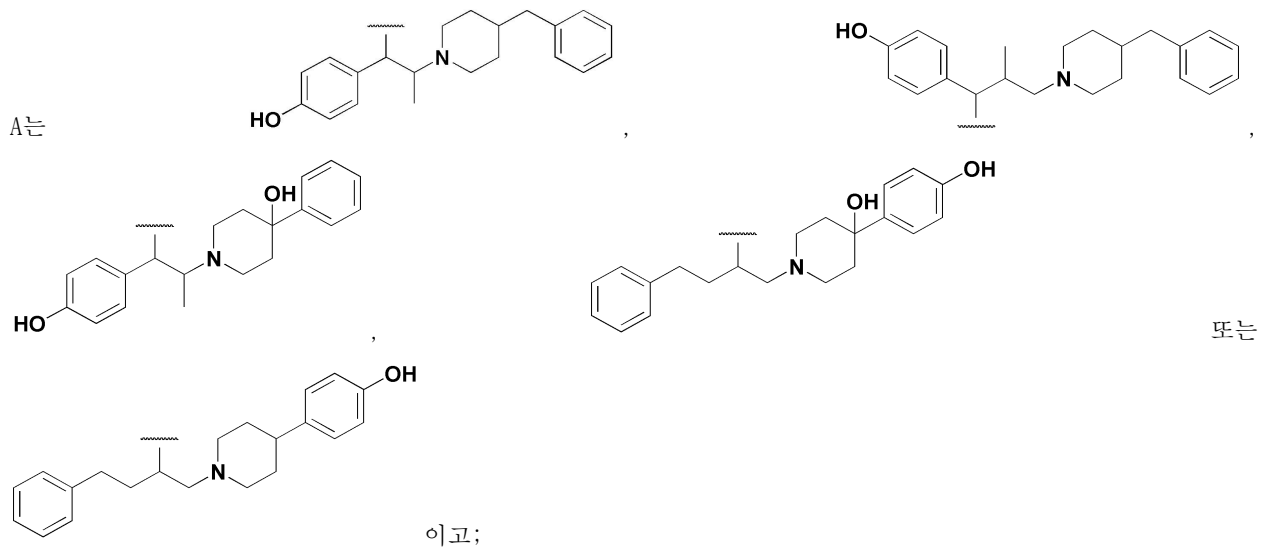
여기서 상기 A의 m은 0 내지 2의 정수이고, o는 0 또는 1이고, 및 Y는 -H 또는 -OH이고;



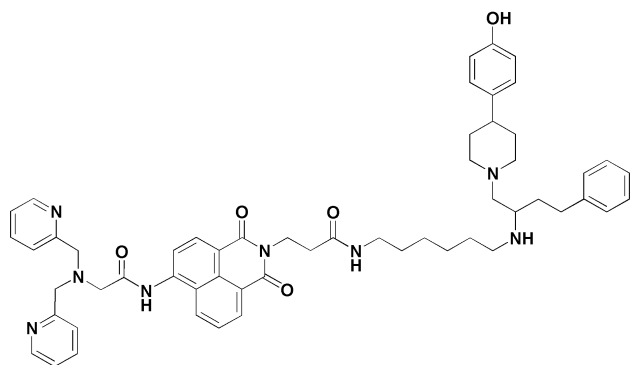
청구항 3

제1항에 있어서,

n은 6이고;



청구항 4



청구항 5

하기 반응식 1에서 나타난 바와 같이,

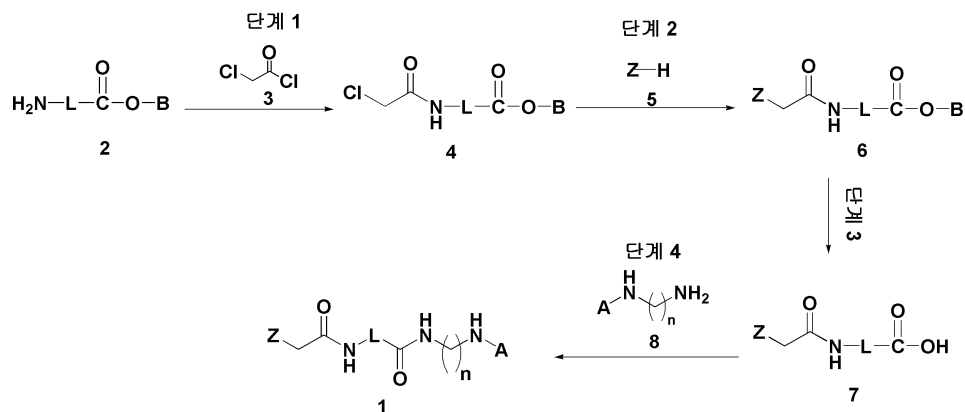
화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);

상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3); 및

상기 단계 3에서 제조한 화학식 7로 표시되는 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 제1항의 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법;

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

n, A, L, Z는 제1항의 화학식 1에서 정의한 바와 같고; 및

B는 tert-부틸이다).

청구항 6

제1항의 화합물을 포함하는, 아연이온 검출용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

NMDA 수용체에 선택적으로 결합하여 아연이온 검출을 수행하는 것을 특징으로 하는 아연이온 검출용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조성물은 아연이온의 농도 변화를 검출하는 것을 특징으로 하는 검출용 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항의 화합물을, 생체 외에서 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 아연이온 검출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 NMDA 수용체의 아연 검출용 화합물 및 이를 함유하는 NMDA 수용체의 아연 검출용 형광 프로브에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 아연이온은 주로 사람의 시냅스 소포에 위치한, 글루탐산성 신경 말단(glutamatergic nerve terminal)에 풍부하게 존재한다. 시냅스의 아연은 신경조절 물질로 작용하여 신경 전달 작용에 있어 중요한 역할을 수행한다. 세포 외 및 세포질 구획구간에서 아연이온의 시공간적 가변성의 농도 수치는 적절한 시냅스 기능을 수행하기 위해 필요한 요소이다. 결과적으로, 상기 구획 구간에서의 아연 수치의 조절 방해는 신경계 질환을 야기한다. 뉴런 자극이 발생하면, 시냅스 전 아연이, 중추 신경계의 다양한 이온 채널 및 기능의 활성을 조절하는, 시냅스 후 간극으로 방출된다. 방출된 아연의 시냅스 후 표적으로 NMDA 수용체(ionotropic glutamate N-methyl-D-aspartate receptor)가 알려져 있다. 아연이온과 상기 리셉터 사이의 친화도는 주의 아연이온 수치를 통제한다. 낮은 농도(10-20 nM)에서는, 아연이온은 NMDA 수용체의 GluN2A 소 단위체와 결합하고, 반면 이보다 높은 농도에서는 아연이온은 NMDA 수용체의 GluN2B 소 단위체와 결합하여, NMDA 수용체 활성을 저해한다.

[0005] 글루타메이트 시스템의 여러 측면에서의 기능 조절에 있어, 아연이온의 역할에 대한 심층적인 이해를 하기 위해서는, 시냅스의 아연이온 농도의 시공간적인 변화를 확인하기 위한 이미징 도구의 개발이 필요하나, 현재까지 관련 시냅스의 정확한 위치를 지정하는데 사용할 수 있는 프로브가 없고, 종래의 개발된 아연 검출 방법 들은 단순히 제한적인 아연 농도의 검출만이 가능했다(특허문헌 1).

[0007] 이에, 시냅스에서 아연이온의 선택적인 검출과 고해상도를 구현할 수 있는 형광 프로브를 개발하기 위해 노력하던 중, 본 발명에 따른 신규 화합물이 NMDA 수용체에 선택적으로 결합하며, 결합 후, 시냅스의 아연이온에 선택적으로 검출할 수 있고, 이로부터 형광을 나타낼 수 있는, NMDA 수용체 아연이온 검출용 형광 프로브를 개발하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 공개 특허: 10-2014-0010857

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 것이다.

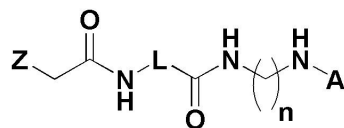
[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 유효성분으로 함유하는 아연이온 검출용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기의 목적을 달성하기 위하여,

[0017] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 입체 이성질체를 제공한다:

[0018] [화학식 1]

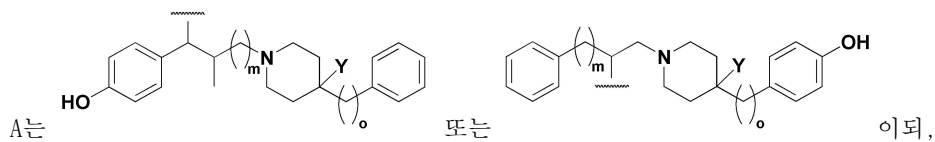


[0019]

[0020] (상기 화학식 1에서,

[0021] n은 1 내지 20의 정수이고;

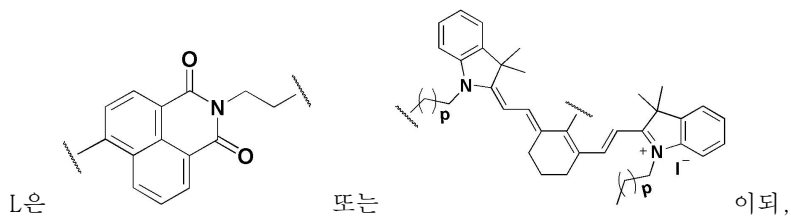
[0022]



[0023]

여기서 상기 A의 m은 0 내지 2의 정수이고, o는 0 또는 1이고, 및 Y는 -H 또는 -OH이고;

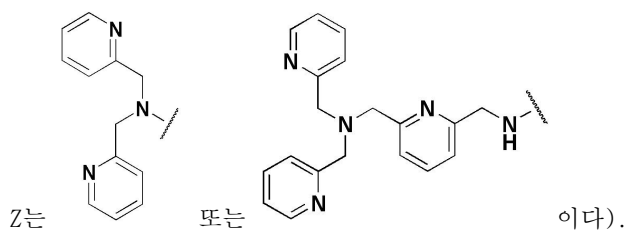
[0025]



[0026]

여기서 상기 L의 p는 0 내지 20의 정수이고; 및

[0028]



[0030]

또한, 본 발명은

[0031]

하기 반응식 1에서 나타난 바와 같이,

[0032]

화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 1);

[0033]

상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);

[0034]

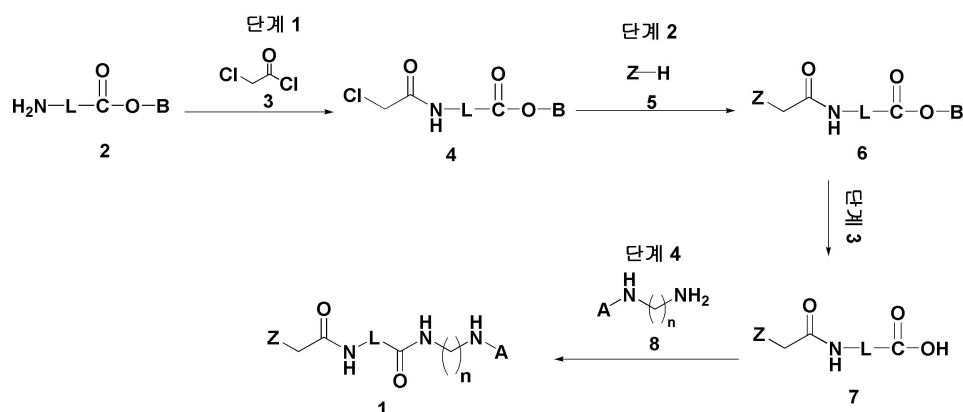
상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3); 및

[0035]

상기 단계 3에서 제조한 화학식 7로 표시되는 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표

시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[반응식 1]



(상기 반응식 1에서,

n, A, L, Z는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; 및

B는 tert-부틸이다).

나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 아연이온 검출용 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 신경병증성 질병의 진단 또는 검사용 조성물을 제공한다.

나아가, 본 발명은 상기 아연이온 검출용 조성물을, 생체 외에서 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 신경병증성 질병의 진단 방법을 제공한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물은 NMDA 수용체와 결합한 후, NMDA 수용체 주변의 아연이온을 포집함으로써 나타나는 이광자 형광 변화를 통해, 아연이온을 검출할 수 있다. 이로부터, 신경자극에 따른 아연이온의 변화를 감지함으로써, 신경병리학적인 연구에 사용될 수 있고, 또한 이를 유효성분으로 함유하여 신경병증성 질병의 진단 또는 검사용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 다양한 금속 이온(10 당량) 존재하에, 실시예 1 화합물(5 μ M)을 0.02 M의 HEPES 버퍼(pH 7.4, 0.5% DMSO)에서 368 nm의 파장(슬릿 3 $\times$ 3)으로 여기 후, 나타나는 형광을 측정한 그래프이다.

도 2의 (a)는 단일광자 여기 후, 관찰되는 아연이온 농도별 형광 강도이다. 도 2의 (b)는 이광자 여기 후, 관찰되는 아연이온 농도별 형광 강도이다. 도 2의 (c)는 단일 광자 여기 및 이광자 여기로 나타나는 형광으로부터 확인되는 아연이온 및 실시예 1 화합물과의 복합체 형성을 도시한 그래프이다. 도 2의 (d) 단일 광자 여기 및 이광자 여기 각각의 형광 적정 곡선을 도시한 그래프이다.

도 3의 (a)는 비교예 화합물 1(1 μ M)을 1차 대뇌피질 신경 세포에 처리하고 이광자 여기한 뒤 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 이때, 도 (a)의 하얀 박스 부분(수상돌기 및 축색돌기)을 확대하여, 도 3의 (c)에 나타내었다(스케일 바: 12 μ m). 도 3의 (b)는 Ifenprodil을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 이때, 도 (b)의 하얀 박스 부분(수상돌기 및 축색돌기)을 확대하여, 도 3의 (d)에 나타내었다(스케일 바: 12 μ m).

도 4의 (a)는 실시예 화합물 1(1 μ M)을 1차 대뇌피질 신경 세포에 처리하고 이광자 여기한 뒤 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (b)는 신경 자극 물질인 DTDP(2,2'-디싸이오-디피리딘, 150 μ M)을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (c)는 아연이온 킬레이터인 TPEN(N,N,N',N'-테트라키스(2-피리딜메틸)에탄-1,2-디아민, 10 μ M)을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (d)는 시간 경과에 따른 이광자 여기 형광 강도의 변화를 도시한 그래프

프이다.

도 5는 비교예 1 화합물 및 실시예 화합물을 각각 처리한 랫트의 해마 TPM 이미지이다. 도 5의 (a)는 비교예 1 화합물을 처리한 랫트 해마의 Z축으로 대략 100-200 μm 의 깊이의 TPM 50 섹션을 축적하여 나타낸 이미지이다 (스케일 바: 360 μm). 도 5의 (b)는 ca. 120 μm 깊이의 배율 80 $\times$ 의 CA 3 영역(도 5의 (a)의 하얀 박스 부분)을 나타낸 확대 이미지이다(스케일 바: 75 μm). 도 5의 (c)는 100 μm 의 Ifenprodil을 처리한 뒤, 형광 변화를 나타낸 이미지(도 5의 (b)의 하얀 박스 부분을 두배 확대한 이미지)이다(스케일 바: 75 μm).

도 5의 (d)는 실시예 1 화합물을 처리한 랫트 해마의 Z축으로 대략 100-200 μm 의 깊이의 TPM 50 섹션을 축적하여 나타낸 이미지이다(스케일 바: 360 μm). 도 5의 (e)는 ca. 120 μm 깊이의 배율 80 $\times$ 의 CA 3 영역(도 5의 (d)의 하얀 박스 부분)을 나타낸 확대 이미지이다(스케일 바: 75 μm). 도 5의 (f)는 200 μM 의 TPEN을 처리한 뒤, 형광 변화를 나타낸 이미지(도 5의 (e)의 하얀 박스 부분을 두배 확대한 이미지)이다(스케일 바: 75 μm).

도 6은 실시예 1의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 7은 실시예 1의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 8은 실시예 1의 HRMS 스펙트럼을 나타낸다.

도 9는 비교예 1의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 10은 비교예 1의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

도 11은 비교예 1의 HRMS 스펙트럼을 나타낸다.

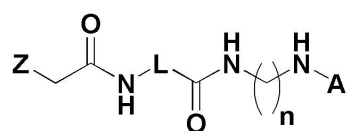
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 이하 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위해 제공되는 것이며, 본 발명이 이에 제한되는 것은 아니다.

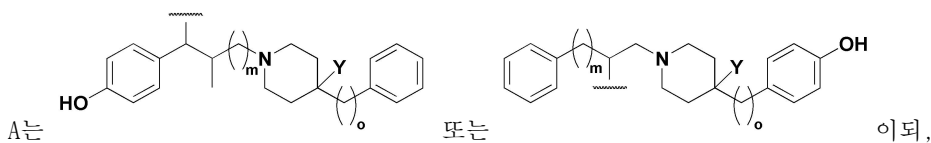
본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 입체 이성질체를 제공한다:

[화학식 1]

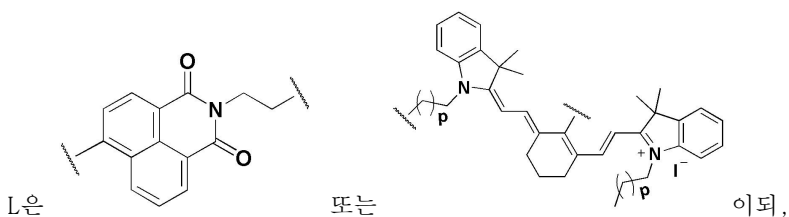


(상기 화학식 1에서,

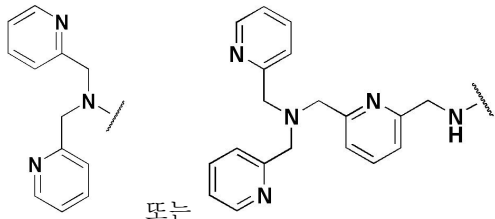
n 은 1 내지 20의 정수이고;



여기서 상기 A의 m 은 0 내지 2의 정수이고, o 는 0 또는 1이고, 및 Y 는 $-\text{H}$ 또는 $-\text{OH}$ 이고;



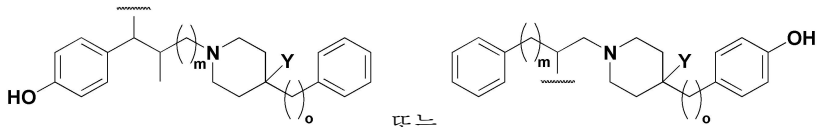
여기서 상기 L의 p 는 0 내지 20의 정수이고; 및



[0065] Z는 또는 이다).

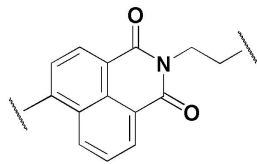
[0067] 바람직하게는,

[0068] n은 1 내지 20의 정수이고;

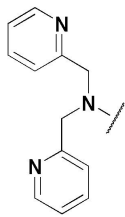


[0069] A는 이 되,

[0070] 여기서 상기 A의 m은 0 내지 2의 정수이고, o는 0 또는 1이고, 및 Y는 -H 또는 -OH이고;



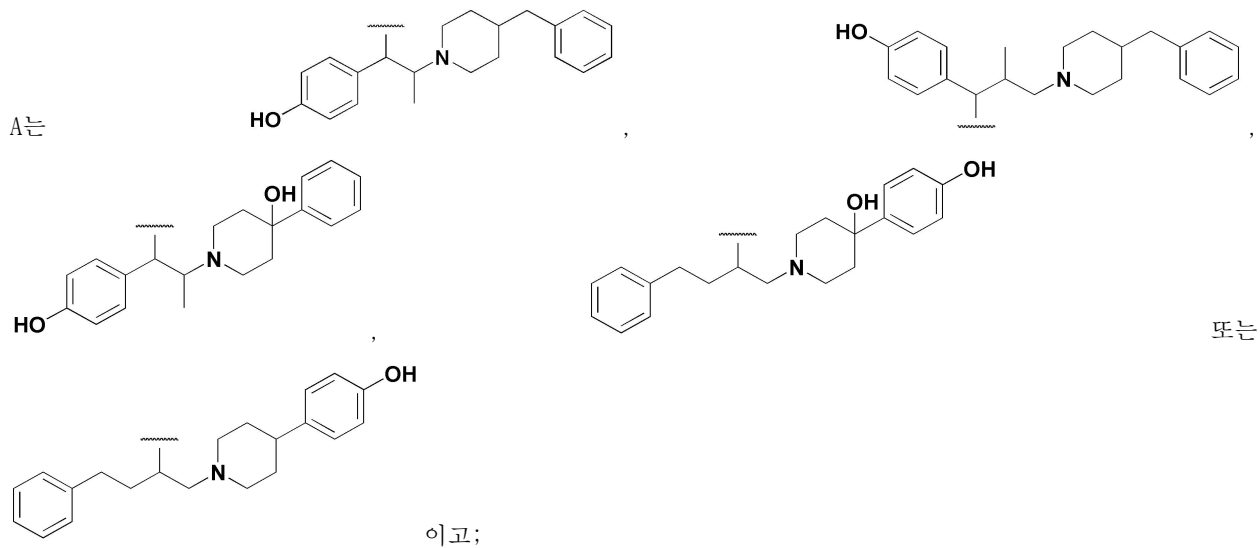
[0072] L은 이고; 및



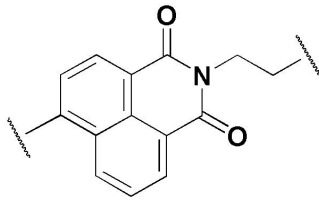
[0074] Z는 이다.

[0076] 보다 바람직하게는,

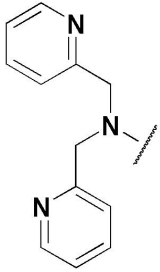
[0077] n은 6이고;



[0078] A는 , 또는 이고;

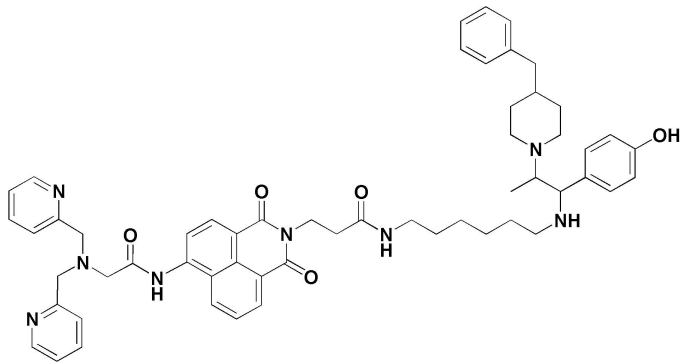


[0079] L은 이고; 및

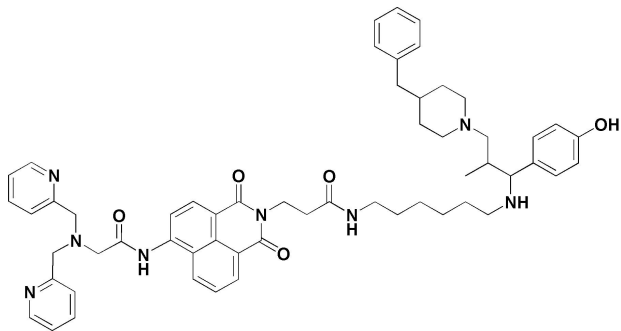


[0080] Z는 이다.

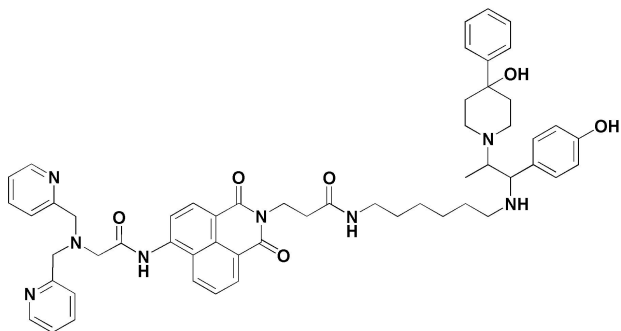
[0082] 가장 바람직하게, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 하기 화합물 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 이의 입체 이성질체이다.



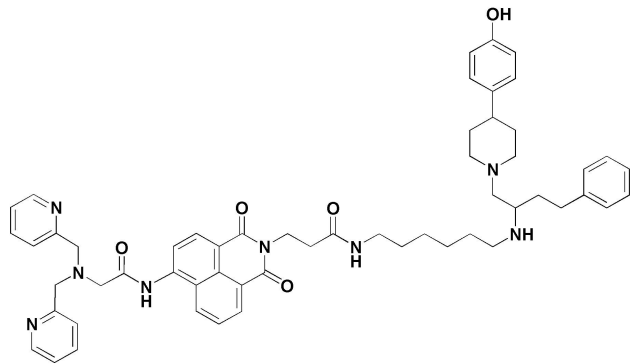
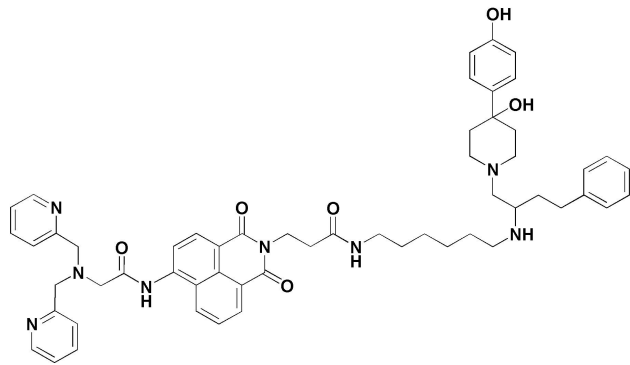
[0083] ;



[0084] ;



[0085] ;



[0089] 이때, 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물에 있어서,

[0090] 상기 화합물은 하기 3가지 부분으로 구성된다:

[0092] 먼저, 상기 화학식 1의 A는 NMDA 수용체와 결합하는 NMDA 수용체 결합부;

[0094] 여기서, 상기 A는 NMDA 수용체와 결합할 수 있다면, 즉, NMDA 수용체의 결합부위(binding site)와 본 발명의 아연 검출을 수행할 수 있을 정도의 결합력(Affinity)을 갖는다면, 본 발명에 포함되고, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게, ifenprodil 유도체일 수 있다.

[0096] 상기 화학식 1의 L은 형광을 나타낼 수 있는 형광발색부; 및

[0098] 여기서, 상기 L은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물이 아연이온과 결합한 뒤, 형광 또는 발색 변화를 나타내는 화합물이라면, 본 발명에 포함되고, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게, 적외선 영역의 파장으로 여기될 수 있는 형광발색단 화합물이고, 이광자 형광을 나타낼 수 있는 화합물일 수 있다.

[0099] 예를 들어, 본 발명의 화합물에 사용될 수 있는 발색단은, 본 발명자의 이전 특허 및 문헌에 수록되어 있는 발색단을 본 발명의 목적에 맞게 수정하거나 변경하여 사용할 수 있다(한국 공개특허 10-2008-0093674, 한국 등록특허 10-0810007, 한국 공개 특허 10-2009-0128737, 및 한국 공개특허 10-2014-0010857).

[0101] 상기 화학식 1의 Z는 아연이온을 포집할 수 있는 포집부.

[0103] 여기서, 상기 Z는 아연이온을 포집할 수 있는 화합물이라면 제한되지 않으나, 바람직하게 아연이온과 배위결합, 이온결합 또는 공유결합을 형성할 수 있는 화합물이라면 본 발명에 맞게 포함될 수 있고, 바람직하게 가역적으로 결합할 수 있는 배위결합을 형성하는 화합물일 수 있다. 가장 바람직하게는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 Z(아연 포집부)로 제시된, 트리스(2-피리딜메틸)아민(TMPA) 등과 같은 화합물을 사용할 수 있다.

[0105] 이때, 상기 각각의 A, L, 및 Z는 하기 본 발명의 실시예와 같은 순서로, 결합으로 구성될 수 있으나, 해당분야의 당업자라면 변경하거나 수정할 수 있는 범위를 포함하여, 상기 A, L, 및 Z의 순서를 변경하거나 조합하여 적용할 수 있고, 각 구성간의 연결에 있어서도, 해당분야의 당업자라면 변경하거나 수정할 수 있는 범위를 포함한다.

[0107] 또한, 본 발명은

[0108] 하기 반응식 1에서 나타난 바와 같이,

[0109] 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하

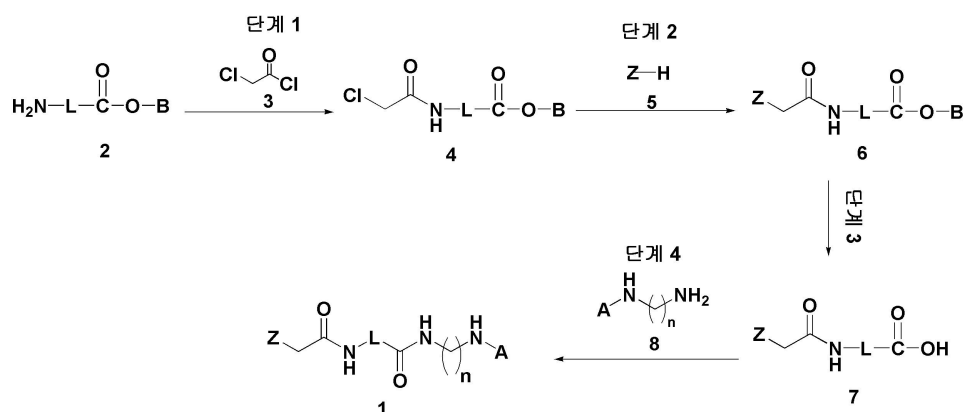
는 단계(단계 1);

[0110] 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 2);

[0111] 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 3); 및

[0112] 상기 단계 3에서 제조한 화학식 7로 표시되는 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0113] [반응식 1]



[0114]

(상기 반응식 1에서,

[0115]

n, A, L, Z는 상기 화학식 1에서 정의한 바와 같고; 및

[0116]

B는 tert-부틸이다).

[0117]

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

[0119]

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 화합물과 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 4로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0121]

이때, 상기 단계 1은 화학식 2로 표시되는 형광 발색단 화합물에 화학식 3으로 표시되는 연결기(예를 들어, 2-클로로아세틸 클로라이드)를 도입하여 화학식 4로 표시되는 화합물(알파-클로로아마이드)을 제조하는 단계이다.

[0123]

여기서, 상기 화학식 3으로 표시되는 연결기는 화학식 2로 표시되는 형광 발색단과 상기 아연이온 포집부를 연결할 수 있는 화합물이라면 본 발명에 포함되고, 상기 단계 1은 바람직하게, CH_2Cl_2 에서 DMAP(4-디메틸아미노피리딘) 존재하에 수행될 수 있다.

[0124]

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 제조한 화학식 4로 표시되는 화합물과 화학식 5로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 6으로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0126]

이때, 상기 단계 2의 화학식 5로 표시되는 화합물은 아연이온을 포집할 수 있는 화합물이라면 본 발명에 포함되고, 바람직하게 N,N-디피리딜메틸아민을 사용할 수 있다. 또한, 상기 단계 2는 CH_3CN 에서 KI 조건 하에 반응할 수 있다.

[0128]

본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조한 화학식 6으로 표시되는 화합물로부터 화학식 7로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.

[0130]

이때, 상기 단계 3은 상기 단계 1의 시작 물질로 사용되었던 화학식 2로 표시되는 화합물의 보호기를 제거하는 단계이다. 상기 단계 1의 화학식 2로 표시되는 화합물은 B를 보호기(protecting group)로 사용하였는데, 여기서 보호기는 상기 본 발명의 제조방법에 있어, 상기 단계 1 내지 단계 2를 수행시 부가적인 반응을 막을 수 있는 작용기라면 본 발명에 포함되고, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게 tert-부틸기를 사용할 수 있다. 또한, 상기 단계 3은 바람직하게, CH_2Cl_2 에서 CF_3COOH 를 사용하여 수행될 수 있다.

[0132]

- [0134] 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 있어서, 상기 단계 4는 상기 단계 3에서 제조한 화학식 7로 표시되는 화합물과 화학식 8로 표시되는 화합물을 반응시켜 화학식 1로 표시되는 화합물을 제조하는 단계이다.
- [0136] 이때, 상기 단계 4는 NMDA 수용체와 결합할 수 있는 결합부를 도입하는 단계로, NMDA 수용체와 결합하여 본 발명의 아연이온 검출을 수행할 수 있는 화합물이라면 본 발명에 포함되고, 이에 제한되지 않으나, 바람직하게, ifenprodil 유도체를 사용할 수 있고, 바람직하게 본 발명의 화학식 8로 표시되는 화합물을 사용할 수 있다. 또한, 상기 단계 4는 CH_2Cl_2 에서 디사이클로헥실카보디이미드/N-히드록시숙신이미드(DCC/NHS) 존재하에 수행될 수 있다.
- [0138] 이때, 본 발명의 제조방법의 각 단계는 해당 분야의 당업자라면, 각 단계별 목적에 맞게 수정하거나 변경할 수 있는 범위를 포함하고, 반응 용매, 온도, 반응 시간과 같은 반응 조건은 특별히 제한되지 않고, 바람직하게 하기 본 발명의 실시예와 같이 수행할 수 있다.
- [0140] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 아연이온 검출용 조성물을 제공한다.
- [0142] 이때, 상기 아연이온 검출용 조성물은, 본 발명에 따라 제조된 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하고, NMDA 수용체와 선택적으로 결합한 후, 아연이온을 선택적으로 포집하여(또는 결합하여) 아연이온을 형광 변화를 통해 검출할 수 있다.
- [0144] 여기서, NMDA 수용체와의 선택적 결합은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물이 NMDA 수용체 결합부로 ifenprodil 유도체를 사용함으로써 달성될 수 있고, 또한, 아연이온 선택적 결합은 본 발명의 하기 실험예에서 확인할 수 있고, 아연이온 포집 후, 형광 변화는 하기 실험예에서 확인할 수 있다.
- [0146] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 함유하는 신경병증성 질병의 진단 또는 검사용 조성물을 제공한다.
- [0148] 상술한 본 발명의 배경기술에서 알 수 있듯이, 신경 자극 후, 아연이온 방출 및 농도 변화는 신경 자극의 전달과 직접적인 상관관계를 갖는다는 것은 종래에 알려진 사실로써, 이로부터 본 발명의 화합물은 신경병증성 질병의 진단 또는 검사에 척도가 될 수 있다. 이에, 이를 유효성분으로 함유하는 신경병증성 질병의 진단 또는 검사용 조성물로 제조되어 유용하게 사용될 수 있다.
- [0150] 나아가, 본 발명은 상기 아연이온 검출용 조성물을, 생체 외에서 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 신경병증성 질병의 진단 방법을 제공한다.
- [0152] 이때, 상기 생체 외에서 조직 또는 세포에 처리하는 단계를 포함하는 신경병증성 질병의 진단 방법은 생체로부터 분리된 조직 또는 세포, 혹은 인공적으로 생산된 조직, 세포, 등에 하기 본 발명의 하기 실험예와 같이 수행될 수 있다.
- [0154] 본 발명의 효과를 하기 실험예 1 내지 4를 통해 확인할 수 있었다.
- [0156] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 화합물의 형광 특성을 평가하기 위한 실험을 수행한 결과, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 선택적으로 아연이온과 515 nm 부근에서 강한 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 상기 형광은 아연 이가 양이온과 본 발명의 실시예 1 화합물이 복합체를 형성함으로써 나타나고 아연이온 선택성을 갖는 것으로 확인되었다.
- [0157] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 아연이온 선택성을 갖는 형광을 나타내며, 이를 함유하는 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다(하기 실험예 1 참조).
- [0159] 본 발명에 따른 화합물의 이광자 형광 효율 및 아연이온 민감도를 평가하기 위한 실험을 수행한 결과, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 단일 광자 여기 또는 이광자 여기로부터 동등한 효율로 아연이온을 검출할 수 있고, 아연이온을 nM 단위 이하의 민감도로 아연이온을 검출할 수 있음을 알 수 있고, 또한, 아연이온과 실시예 화합물이 1:1로 결합하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0160] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 화합물은 단일광자 여기와 동등한 효율로 이광자 여기를 사용하여 아연이온을 검출할 수 있어, 상대적으로 생체에 안전한 영역의 파장을 사용한 이광자 여기를 사용하여 아연이온을 검출할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 nM 단위 이하의 우수한 민감도를 가지는 것으로 확인되어, 이를 함유하는 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다(하기 실험예 2 참조).

[0162] 본 발명에 따른 화합물의 1차 대뇌피질 신경 세포에서의 아연이온 검출을 평가하기 위한 실험을 수행한 결과, 본 발명에 따른 하기 비교예 1 화합물이 NMDA 수용체가 있는 수상돌기 및 축삭돌기에 분포된 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있고, Ifenprodil 처리 후, 형광이 사라지는 것으로 보아 NMDA 수용체와 결합하였음을 확인할 수 있었다. 또한, 실시예 1의 경우, 미세한 형광이 비교예 1의 형광 위치와 유사하게 나타나는 것으로 확인되나, DTDP 처리 후, 아연이온 방출로 인한 아연이온 농도 증가와 함께, 극명한 형광 강도 증가가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 40초 후, 아연이온 증가가 완만해짐과 함께, 형광강도 증가도 완만해지고, TPEN 처리 후, 아연이온이 제거됨으로써, 형광강도도 급감하는 것을 확인할 수 있었다.

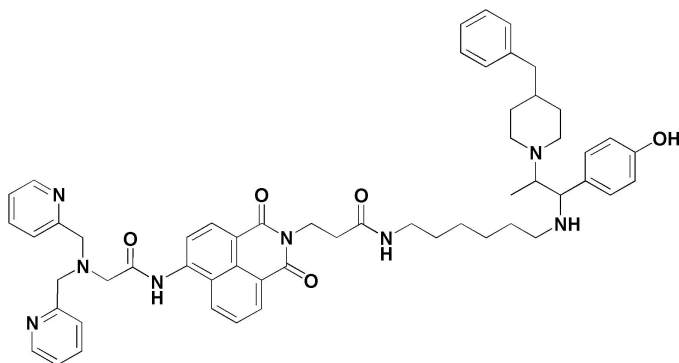
[0163] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은, 상기 실험에서도 알 수 있듯이, 신경세포의 NMDA 수용체와 선택적으로 결합하여, 시냅스 소포에서 아연이온 농도에 따른 형광 변화를 검출할 수 있어, 이를 함유하는 신경세포 내 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있고, 또한, 이로부터 신경 자극과 아연이온 농도의 상관관계를 더욱 분명히 할 수 있고, 나아가, 신경병증성 질환에서의 아연이온 농도의 변화 및 이의 상관관계를 연구하는데 유용하게 사용될 수 있다(하기 실험예 3 참조).

[0165] 본 발명에 따른 화합물의 랫트 해마 단면에서의 형광 변화를 관찰하기 위한 실험을 수행한 결과, 본 발명의 실시예 화합물이 NMDA 수용체 부근의 아연이온 검출여부에 따라 형광을 나타내며, 아연이온 농도의 변화와 형광 강도의 변화가 비례적으로 나타남을 알 수 있었다.

[0166] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은, NMDA 수용체에서의 아연이온을 nM 단위 이하의 민간도로 우수하게 검출할 수 있고, 신경세포, 조직, 및 NMDA 수용체에서의 아연이온의 신경병리학적 변화와 동태를 관찰할 수 있어, 이를 유효성분으로 함유하는 신경병증성 질환의 진단 및 검사용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있었다(실험예 4 참조).

[0168] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[0170] <실시예 1> NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물의 제조 1



[0171]

[0172] 단계 1: 4-(2-클로로아세틸)-아미노-N-(3-tert-부톡시-3-옥소프로필)-1,8-나프탈리마이드의 제조

[0173] 2-클로로아세틸 클로라이드(0.09 g, 0.75 mmol)이 녹아있는 CH₂Cl₂ 용액을 한 방울씩 4-아미노-N-(3-tert-부톡시-3-옥소프로필)-1,8-나프탈리마이드(0.20 g, 0.58 mmol) 및 DMAP(0.12 g, 0.95 mmol)이 녹아있는 30 mL의 CH₂Cl₂ 용액에 첨가하였다. 2시간 동안 실온에서 교반한 뒤, 용액을 증발건조하여 고체를 수득하였고, CH₂Cl₂/CH₃OH(100 : 0.5, v/v)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 하여 0.21 g의 목적 화합물을 수득하였다(수율: 87%).

[0175] 단계 2: 4-(디-(2-피콜릴)아세틸)-아미노-N-(3-tert-부톡시-3-옥소프로필)-1,8-나프탈리마이드의 제조

[0176] 상기 단계 1에서 제조한 화합물(0.18 g, 0.43 mmol), 디-(2-피콜리)아민(DPA)(0.10 g, 0.52 mmol), N,N-디이소프로필에틸아민(DIPEA)(0.5 mL) 및 KI(40 mg)을 아세트니트릴(50 mL)에 첨가하였다. 질소하에 밤새도록 교반 및 환류 후, 혼합물을 실온으로 냉각하였다. 감압하에 용액을 증발건조한 뒤, 얻어진 고체를 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100 : 2, v/v)로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 하여 0.16 g, 황색의 목적 화합물을 수득하였다(수율: 64%).

[0178] 단계 3: 4-(디-(2-피콜일)아세틸)-아미노-N-((아세트산일)-메틸)-1,8-나프탈리마이드의 제조

[0179] 5 mL의 CF_3COOH 를 상기 단계 2에서 제조한 화합물(0.16 g, 0.28 mmol)이 녹아있는 5 mL의 CH_2Cl_2 용액에 첨가하

였다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반하였다. 추가적인 정제과정 없이, 감압하에 용액을 증발건조하여 목적 화합물을 수득하였다.

[0181] 단계 4: 4-(디-(2-피콜릴)아세틸)-아미노-N-(6-(N-1-페-4-놀일-2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)아미노)-헥실아미노)-1,8-나프탈리마이드의 제조

[0182] 디사이클로헥실카르보디이미드(DCC)(0.21 g, 1.0 mmol) 및 N-히드록시숙신이미드(NHS)(0.12 g, 1.0 mmol)을 상기 단계 3에서 제조한 화합물(0.16 g, 0.331 mmol)이 녹아있는 CH_2Cl_2 에 첨가하였다. 혼합물을 실온에서 12시간 동안 교반한 후, 침전물을 여과하여 제거하였다. 감압하에 용액을 증발건조한 뒤, 잔여물을 용리제로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100 : 5, v/v)으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 하여 0.07 g의 NHS-활성화 생성물을 수득하였고, 상기 NHS-활성화 생성물(0.07 g, 0.11 mmol)과 0.09g의 4-(1-(6-아미노헥실아미노)2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)페놀을 CH_2Cl_2 에 혼합하고, 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 감압하에 용액을 증발건조한 뒤, 잔여물을 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$ (100 : 10, v/v)으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 하여 0.03 g, 황색의 목적 화합물을 수득하였다 (수율: 10%).

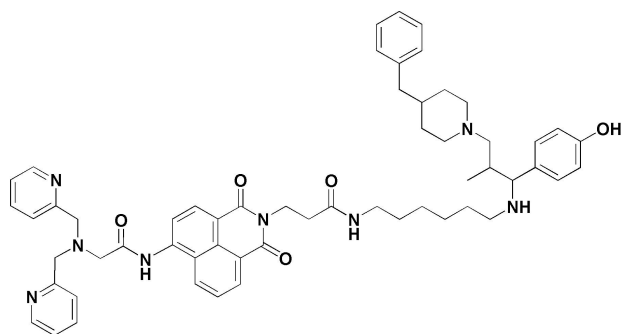
[0184] 상기 실시예 1 화합물의 NMR 및 HRMS 스펙트럼은 도 6, 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0186] 도 6은 실시예 1의 ^1H -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

[0188] 도 7은 실시예 1의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 나타낸다.

[0190] 도 8은 실시예 1의 HRMS 스펙트럼을 나타낸다.

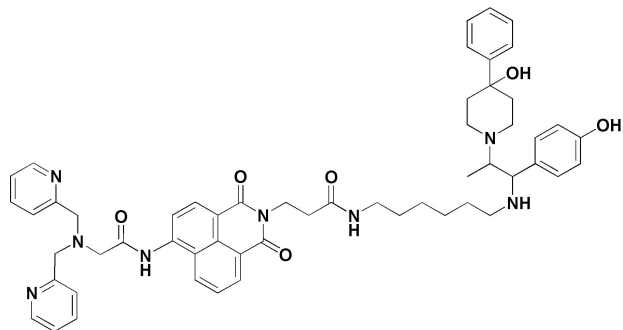
[0192] <실시예 2> NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물의 제조 2



[0193]

[0194] 실시예 1의 단계 4에서 NMDA 수용체 결합부로 사용한 화합물, 4-(1-(6-아미노헥실아미노)2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)페놀을 4-(1-(6-아미노헥실아미노)-3-(4-벤질피페리딘-1-일)-2-메틸프로필)페놀로 변경한 것을 제외하고 상기 실시예 1 화합물과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

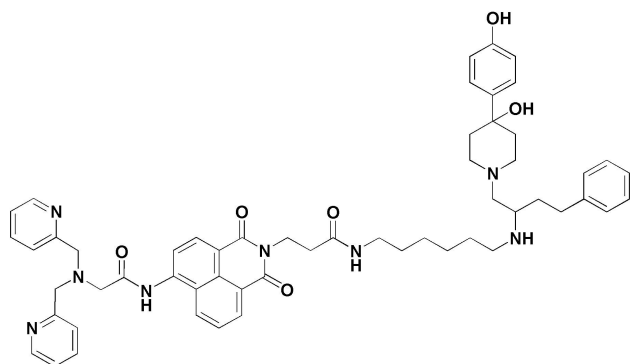
[0196] <실시예 3> NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물의 제조 3



[0197]

[0198] 실시예 1의 단계 4에서 NMDA 수용체 결합부로 사용한 화합물, 4-(1-(6-아미노헥실아미노)2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)페놀을 1-(1-(6-아미노헥실아미노)-1-(4-히드록시페닐)프로판-2-일)-4-페닐피페리딘-4-올로 변경한 것을 제외하고 상기 실시예 1 화합물과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

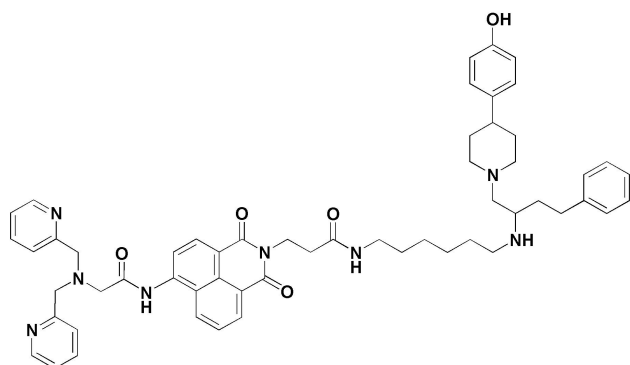
[0200] <실시예 4> NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물의 제조 4



[0201]

[0202] 실시예 1의 단계 4에서 NMDA 수용체 결합부로 사용한 화합물, 4-(1-(6-아미노헥실아미노)2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)페놀을 1-(2-(6-아미노헥실아미노)-2-(4-히드록시페닐)에틸-4-(4-히드록시페닐)피페리딘-4-올로 변경한 것을 제외하고 상기 실시예 1 화합물과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

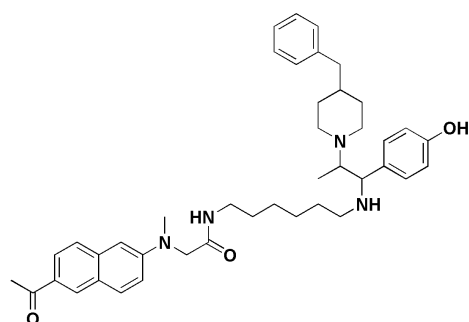
[0204] <실시예 5> NMDA 수용체의 아연이온 검출용 화합물의 제조 5



[0205]

[0206] 실시예 1의 단계 4에서 NMDA 수용체 결합부로 사용한 화합물, 4-(1-(6-아미노헥실아미노)2-(4-벤질피페리딘-1-일)프로필)페놀을 4-(1-(6-아미노헥실아미노)-2-(4-(4-히드록시페닐)피페리딘-1-일)에틸)페놀로 변경한 것을 제외하고 상기 실시예 1 화합물과 동일한 방법으로 목적 화합물을 제조하였다.

[0208] <비교예 1> NMDA 수용체 검출용 화합물



[0209]

[0210] 비교예 1 화합물은 상기 실시예와 비교하여 별도의 아연 포집부 없이, 상기 실시예 1의 1,8-나프탈리마이드 발색단을 대신하여 N-(6-아세틸나프탈렌-2-일)-N-메틸글리신을 사용한 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 유사하게 수행하여 제조하였다.

[0211] 상기 비교예 1 화합물의 NMR 및 HRMS 스펙트럼은 도 9, 도 10 및 도 11에 나타내었다.

[0213] 도 9는 비교예 1의 ¹H-NMR 스펙트럼을 나타낸다.

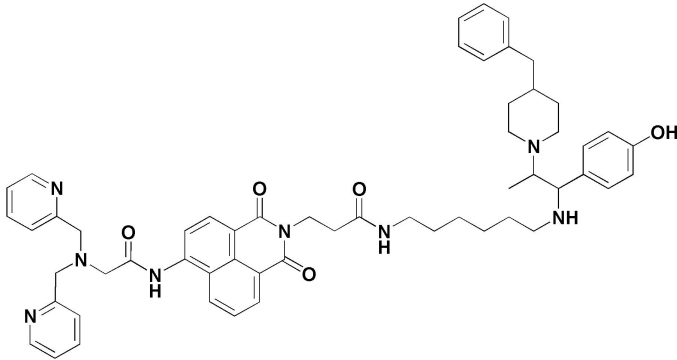
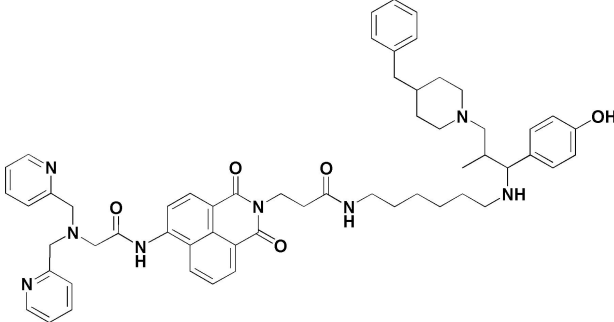
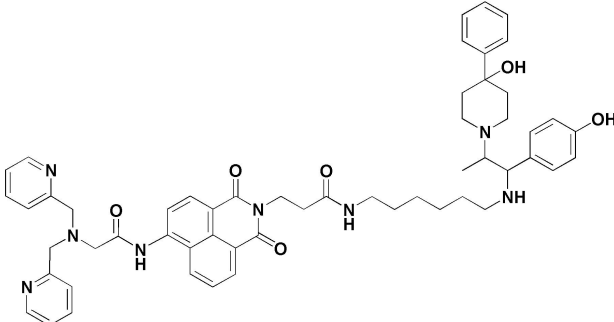
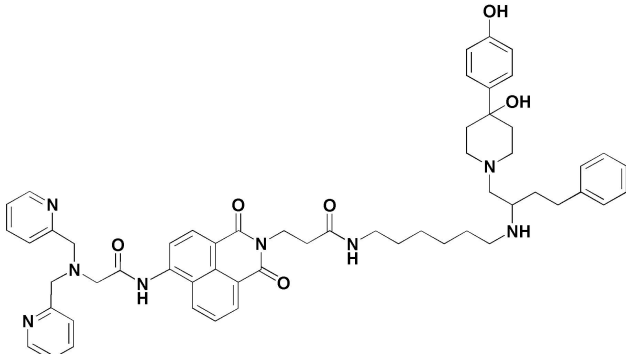
[0215] 도 10은 비교예 1의 ¹³C-NMR 스펙트럼을 나타낸다.

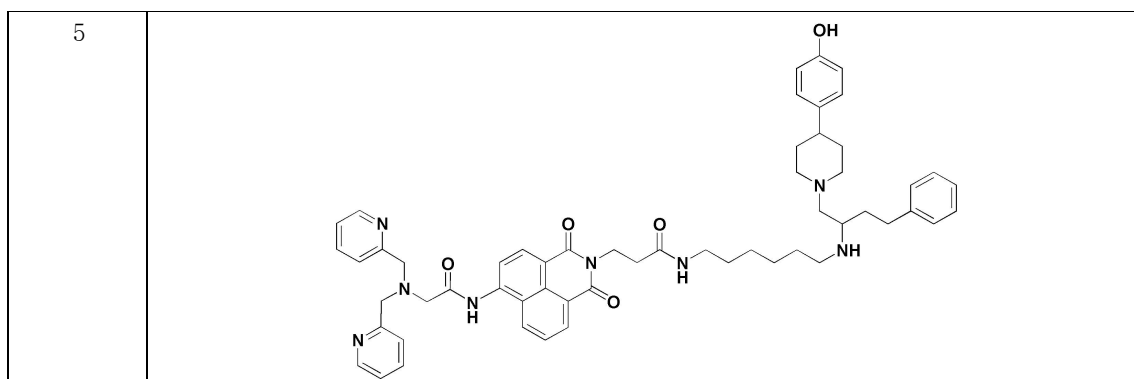
[0217] 도 11은 비교예 1의 HRMS 스펙트럼을 나타낸다.

[0219] 상기 실시예 1 내지 실시예 5 화합물을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0220]

실시예	구조
1	
2	
3	
4	



[0222] <실험예 1> 형광 특성 평가

[0223] 본 발명에 따른 화합물의 형광 특성을 평가하기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0225] 구체적으로, Ag^+ , Al^{3+} , Ca^{2+} , Cr^{3+} , Cs^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , K^+ , Li^+ , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , Ni^{2+} , Pb^{2+} 및 Sr^{2+} 을 포함하는 다양한 금속 이온(10 당량) 존재하에, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물(5 μM)을 0.02 M의 HEPES 버퍼(pH 7.4, 0.5% DMSO)에서 368 nm의 파장(슬릿 3×3)으로 단일 광자 여기하여 형광 특성을 평가하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0227] 도 1은 다양한 금속 이온(10 당량) 존재하에, 실시예 1 화합물(5 μM)을 0.02 M의 HEPES 버퍼(pH 7.4, 0.5% DMSO)에서 368 nm의 파장(슬릿 3×3)으로 여기 후, 나타나는 형광을 측정한 그래프이다.

[0229] 도 1을 살펴보면, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 선택적으로 아연이온과 515 nm 부근에서 강한 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 상기 형광은 아연 이가 양이온과 본 발명의 실시예 1 화합물이 복합체를 형성함으로써 나타나며, 도 1에서 확인되는 바와 같이 아연이온 선택성을 갖는다.

[0231] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 아연이온 선택성을 갖는 형광을 나타내며, 이를 함유하는 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0233] <실험예 2> 이광자 형광 효율 및 아연이온 민감도 평가

[0234] 본 발명에 따른 화합물의 이광자 형광 효율 및 아연이온 민감도를 평가하기 위해, 다음과 같이 실험하였다.

[0236] 구체적으로, 본 발명에 따른 실시예 화합물 1을 단일 광자 여기(368 nm) 또는 이광자 여기(750 nm)하여 아연이온 농도별(0-47 nM) 형광 강도를 측정하였다(30 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH 7.2). 상기 실험의 결과를 도 2에 (a)단일 광자 여기, (b)이광자 여기, (c)아연이온-실시예 화합물 복합체 형성 그래프, 및 (d) 형광 적정 곡선으로 나타내었다.

[0238] 도 2의 (a)는 단일광자 여기 후, 관찰되는 아연이온 농도별 형광 강도이다. 도 2의 (b)는 이광자 여기 후, 관찰되는 아연이온 농도별 형광 강도이다. 도 2의 (c)는 단일 광자 여기 및 이광자 여기로 나타나는 형광으로부터 확인되는 아연이온 및 실시예 1 화합물과의 복합체 형성을 도시한 그래프이다. 도 2의 (d) 단일 광자 여기 및 이광자 여기 각각의 형광 적정 곡선을 도시한 그래프이다.

[0240] 도 2를 살펴보면, 본 발명에 따른 실시예 1 화합물은 단일 광자 여기 또는 이광자 여기로부터 동등한 효율로 아연이온을 검출할 수 있고, 아연이온을 nM 단위 이하의 민감도로 아연이온을 검출할 수 있음을 알 수 있고, 또한, 도 2의 (c)에서 확인되는 바와 같이, 직선 형상의 그래프로부터 아연이온과 실시예 화합물이 1:1로 결합하는 것을 확인할 수 있다.

[0242] 따라서, 본 발명에 따른 실시예 화합물은 단일광자 여기와 동등한 효율로 이광자 여기를 사용하여 아연이온을 검출할 수 있어, 상대적으로 생체에 안전한 영역의 파장을 사용한 이광자 여기를 사용하여 아연이온을 검출할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물은 nM 단위 이하의 우수한 민감도를 가지는 것으로 확인되어, 이를 함유하는 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0244] <실험예 3> 1차 대뇌피질 신경 세포에서의 아연이온 검출 평가

[0245] 본 발명에 따른 화합물의 1차 대뇌피질 신경 세포에서의 아연이온 검출을 평가하기 위해, 다음과 같이 실험하였

다.

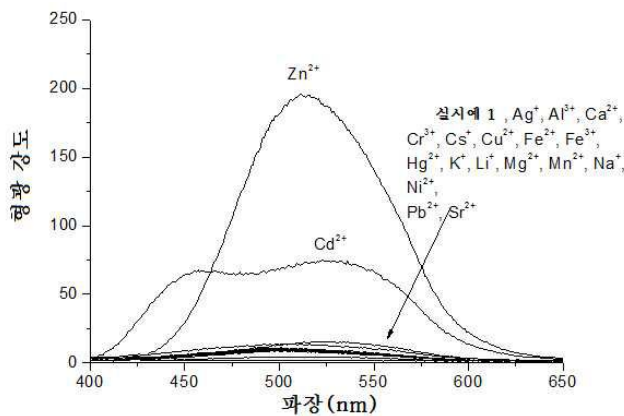
- [0247] 구체적으로, 본 발명에 따른 실시예 화합물 및 비교예 화합물을 1차 대뇌피질 신경 세포에 1 μ M을 각각 처리한 뒤, 나타나는 형광 변화 및 ifenprodil을 처리한 후, 형광 변화를 관찰하여, 도 3 및 도 4에 나타내었다. 각각은 750 nm의 펨토-초 펄스(femto-second pulse)의 이광자 여기를 사용하였고 400-600 nm에서 형광을 수득하였다.
- [0249] 도 3의 (a)는 비교예 화합물 1(1 μ M)을 1차 대뇌피질 신경 세포에 처리하고 이광자 여기한 뒤 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 이때, 도 (a)의 하얀 박스 부분(수상돌기 및 축색돌기)을 확대하여, 도 3의 (c)에 나타내었다(스케일 바: 12 μ m). 도 3의 (b)는 Ifenprodil을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 이때, 도 (b)의 하얀 박스 부분(수상돌기 및 축색돌기)을 확대하여, 도 3의 (d)에 나타내었다(스케일 바: 12 μ m).
- [0251] 도 4의 (a)는 실시예 화합물 1(1 μ M)을 1차 대뇌피질 신경 세포에 처리하고 이광자 여기한 뒤 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (b)는 신경 자극 물질인 DTDP(2,2'-디싸이오-디피리딘, 150 μ M)을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (c)는 아연이온 킬레이터인 TPEN(N,N,N',N'-테트라키스(2-피리딜메틸)에탄-1,2-디아민, 10 μ M)을 처리한 뒤, 나타나는 TPM 이미지를 도시한 것이다(스케일 바: 60 μ m). 도 4의 (d)는 시간 경과에 따른 이광자 여기 형광 강도의 변화를 도시한 그래프이다.
- [0253] 도 3을 살펴보면, 본 발명에 따른 비교예 화합물이 NMDA 수용체가 있는 수상돌기 및 축색돌기에 분포된 형광을 나타내는 것을 확인할 수 있고, Ifenprodil 처리 후, 형광이 사라지는 것으로 보아 NMDA 수용체와 결합하였음을 확인할 수 있다.
- [0255] 도 4를 살펴보면, 먼저, 미세한 형광이 도 3의 형광 위치와 유사하게 나타나는 것으로 확인되나, DTDP 처리 후, 아연이온 방출로 인한 아연이온 농도 증가와 함께, 극명한 형광 강도 증가가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 40 초 후, 아연이온 증가가 완만해짐과 함께, 형광강도 증가도 완만해지고, TPEN 처리 후, 아연이온이 제거됨으로써, 형광강도도 급감하는 것을 확인할 수 있다. 도 4의 (d)를 살펴보면, 각각의 아연이온 증가 및 감소와 함께 형광강도의 변화를 시간경과에 따라 관찰할 수 있다.
- [0257] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은, 상기 실험에서도 알 수 있듯이, 신경세포의 NMDA 수용체와 선택적으로 결합하여, 시냅스 소포에서 아연이온 농도에 따른 형광 변화를 검출할 수 있어, 이를 함유하는 신경세포 내 아연이온 검출용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0258] 또한, 이로부터 신경 자극과 아연이온 농도의 상관관계를 더욱 분명히 할 수 있고, 나아가, 신경병증성 질환에서의 아연이온 농도의 변화 및 이의 상관관계를 연구하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0260] <실험예 4> 랫트의 해마 단면에서의 평가
- [0261] 본 발명에 따른 화합물의 랫트 해마 단면에서의 형광 변화를 관찰하기 위한 실험을 하기와 같이 수행하였다.
- [0263] 구체적으로, 2주생 랫트의 해마에 본 발명의 실시예 1 화합물 및 비교예 화합물을 처리하여 표시한 뒤, 각각 100 μ M의 Ifenprodil 및 200 μ M의 TPEN을 처리하여 나타나는 형광 변화를 관찰하여, 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0264] 이때, 형광 이미지는 750 nm의 펨토-초 펄스(femto-second pulse)의 이광자 여기를 사용하였고 400-650 nm에서 형광을 수득하여 나타내었다.
- [0266] 도 5는 비교예 1 화합물 및 실시예 화합물을 각각 처리한 랫트의 해마 TPM 이미지이다. 도 5의 (a)는 비교예 1 화합물을 처리한 랫트 해마의 Z축으로 대략 100-200 μ m의 깊이의 TPM 50 섹션을 축적하여 나타낸 이미지이다(스케일 바: 360 μ m). 도 5의 (b)는 ca. 120 μ m 깊이의 배율 80×의 CA 3 영역(도 5의 (a)의 하얀 박스 부분)을 나타낸 확대 이미지이다(스케일 바: 75 μ m). 도 5의 (c)는 100 μ M의 Ifenprodil을 처리한 뒤, 형광 변화를 나타낸 이미지(도 5의 (b)의 하얀 박스 부분을 두배 확대한 이미지)이다(스케일 바: 75 μ m).
- [0267] 도 5의 (d)는 실시예 1 화합물을 처리한 랫트 해마의 Z축으로 대략 100-200 μ m의 깊이의 TPM 50 섹션을 축적하여 나타낸 이미지이다(스케일 바: 360 μ m). 도 5의 (e)는 ca. 120 μ m 깊이의 배율 80×의 CA 3 영역(도 5의 (d)의 하얀 박스 부분)을 나타낸 확대 이미지이다(스케일 바: 75 μ m). 도 5의 (f)는 200 μ M의 TPEN을 처리한 뒤, 형광 변화를 나타낸 이미지(도 5의 (e)의 하얀 박스 부분을 두배 확대한 이미지)이다(스케일 바: 75 μ m).

[0269] 도 5를 살펴보면, 먼저, 도 5의 (a) 내지 (c)를 살펴보면, NMDA 수용체가 해마 CA 1, CA 3, 치아 이랑(DG, dentate gyrus) 영역 전반에 고르게 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다. Ifenprodil 처리 후, 신경세포 실험과 유사하게 형광이 사라지는 것을 확인할 수 있다. 또한, 도 5의 (d) 내지 (f)를 살펴보면, CA 3 및 DG 영역에서 보다강한 형광이 나타나고, TPEN 처리 후, 형광이 감소되는 것을 확인할 수 있다. 이로부터 본 발명의 실시예 화합물이 NMDA 수용체 부근의 아연이온 검출여부에 따라 형광을 나타내며, 아연이온 농도의 변화와 형광 강도의 변화가 비례적으로 나타남을 알 수 있다.

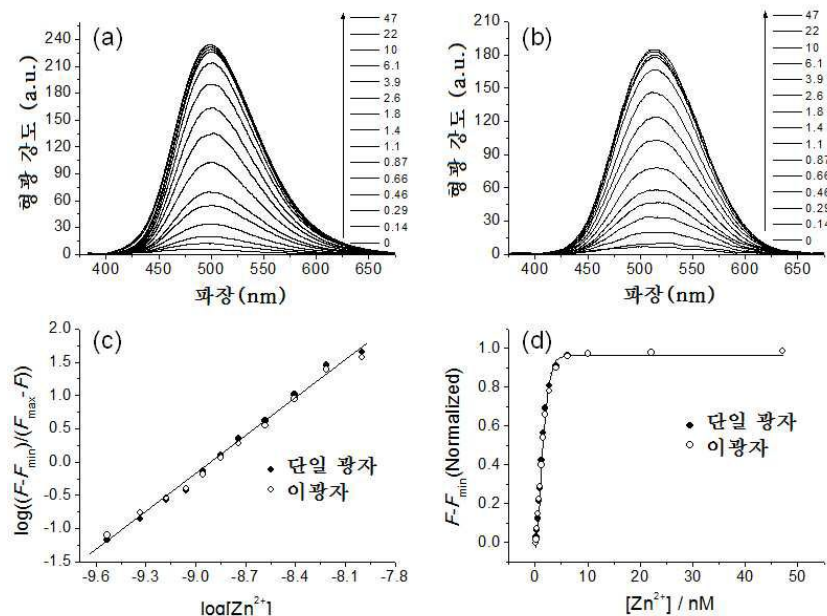
[0271] 따라서, 본 발명에 따른 화합물은, NMDA 수용체에서의 아연이온을 nM 단위 이하의 민감도로 우수하게 검출할 수 있고, 신경세포, 조직, 및 NMDA 수용체에서의 아연이온의 신경병리학적 변화와 동태를 관찰할 수 있어, 이를 유효성분으로 함유하는 신경병증성 질환의 진단 및 검사용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면

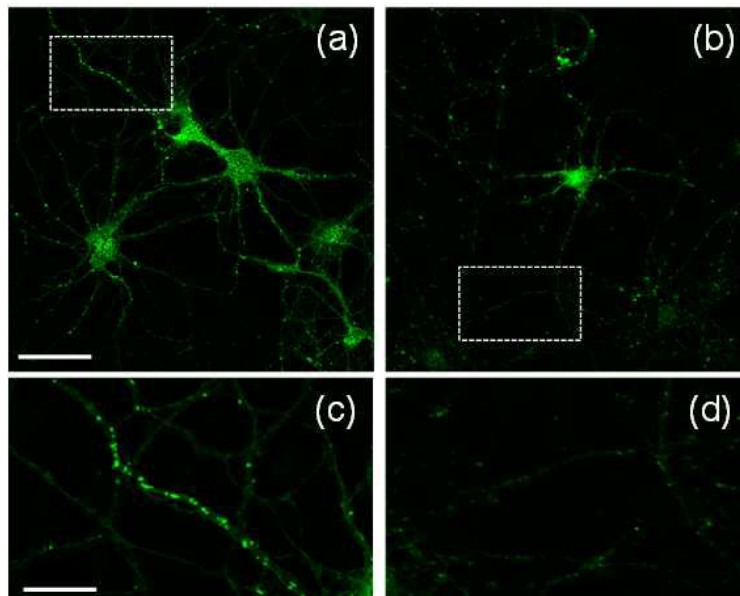
도면1



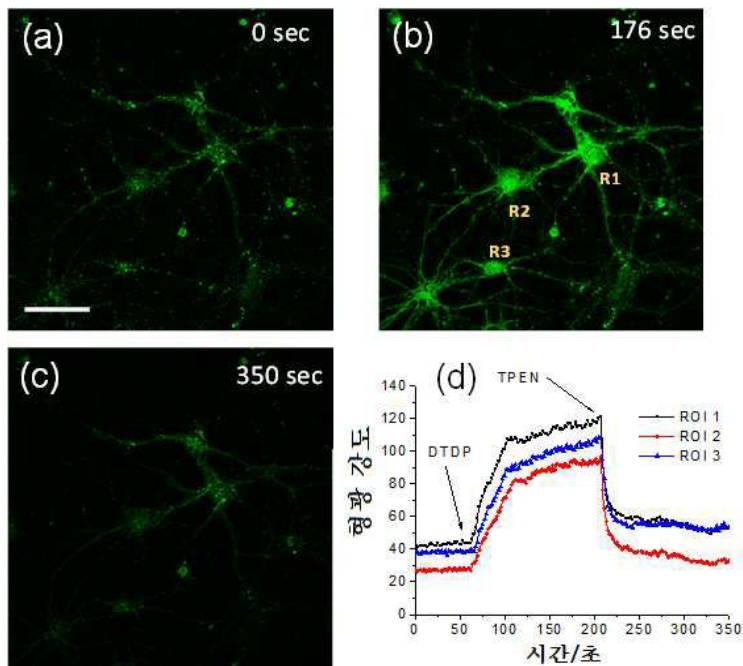
도면2



도면3



도면4



도면11

