



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년11월30일

(11) 등록번호 10-1681425

(24) 등록일자 2016년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 31/22 (2006.01) C07F 5/02 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 31/22 (2013.01)

C07F 5/02 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0133989

(22) 출원일자 2015년09월22일

심사청구일자 2015년09월22일

(56) 선행기술조사문헌

Chem. Commun., Vol(47), pp. 7583-7601, 2011

Chem. Commun., Vol(51), pp. 13389-13392, 2015.06.13.

Org. Biomol. Chem., Vol(11), pp. 8166-8170, 2013

Anal. Methods, Vol(5), pp. 30-49, 2013

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김중승

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

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 김도현

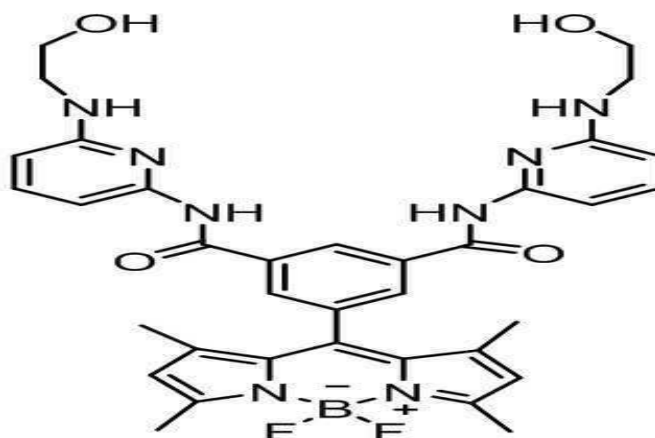
(54) 발명의 명칭 요산 검출용 프로브 화합물

(57) 요약

본 발명은 요산 검출용 프로브 화합물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는,

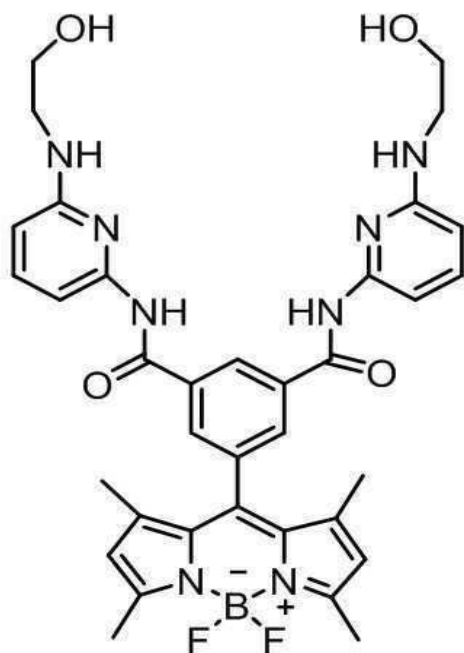
(뒷면에 계속)

대표도



하기 화학식 1로 표시되는 요산 검출용 화합물에 관한 것이다:

[화학식 1]



본 발명에 따른 요산 검출용 화합물은 타 분석물 대비 요산에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 요산에 대해서 높은 검출 감도를 나타내는 바, 턴-온 방식에 의해서 요산을 단순하고 효과적으로 검출해낼 수 있어서, 임상 및 약제학적 분석에 있어서 매우 높은 효용성을 나타낸다.

(52) CPC특허분류

C07F 5/022 (2013.01)

G01N 21/75 (2013.01)

G01N 33/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015001883

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)리더연구자지원_창의연구

연구과제명 발광센서 재료 연구단

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2015.03.01 ~ 2016.02.28

공지예외적용 : 있음

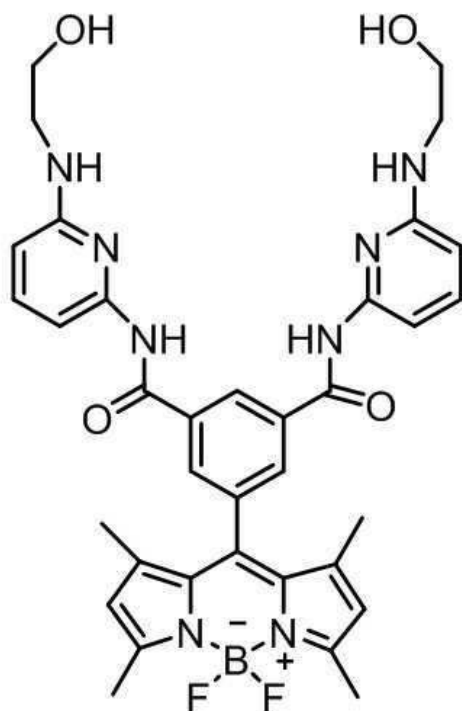
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 요산 검출용 화합물:

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 요산 검출용 프로브 화합물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 혈액 및 소변과 같은 인간의 체액에 있는 요산 (Uric Acid, UA)은 핵산의 퓨린 염기인 아데닌과 구아닌의 주요 대사산물이다. 인간의 소변 내 UA의 정상 농도는 약 2 mM로서, 다양한 생물학적 과정에 의해 인체로부터 요산의 생산 및 분비에 의해 유지되고, 혈액 또는 혈청 내 요산의 정상 농도 범위는 120 내지 380 μ M이다.

[0003] UA의 농도 수준 변화 (고요산혈증 또는 저요산혈증)는 각종 이상을 일으키므로 통풍, 관절염과 심혈관 질환, 레시-나이한 증후군, 신염, 고혈압과 2형 당뇨병과 같은 많은 질환의 지표이다. 고요산혈증은 림프종과 백혈병 환자에게서 관찰되어 이들의 신장에 손상을 일으킬 가능성이 있다. 따라서, 혈청과 소변 중 요산의 농도가 상승하는 것을 모니터링하는 것은 매우 중요하고 바람직하다.

[0004] 현재, 의학 실험실에서는 우리카아제 효소 분석법 (비특허문헌 1 및 2)과 전기화학기술 (비특허문헌 3 및 4)을 이용하여 UA 농도를 모니터링하고 있다. 우리카아제 효소는 요산을 알란토인 (수용성 화합물)과 과산화수소로 가수분해하고, 이들은 색소 화합물의 발색을 유도하는 직간접적인 방법에 의해 검출된다. 그러나, 체액 중에 다량 존재하는 아스코르브산에 의한 큰 방해, 고비용의 효소와 pH를 정밀하게 제어할 필요성으로 인해 UA 농도의 정확한 측정을 위해 이들 방법을 더욱 실행할 수 없게 된다. 유사하게, UA 분석을 위한 다양한 전기화학적 방법 또한 요산과 아스코르브산을 전기화학적으로 서로 구별하기 어렵게 하는 유사한 산화 전위로 인해 아스코

르브산에 의한 큰 방해를 받는다. 관련해서, 다양한 비효소적인 방법과 효소적인 방법을 이용하여 UA를 감지하기 위한 상당한 개발이 이루어져 왔지만 (비특허문헌 5 내지 7), UA를 일상적으로 측정하기 위해 적용할 수 있는 비효소적이고 비침습적이며 신뢰성이 있는 단순한 방법을 개발할 필요가 있다.

[0005] 관련해서, 분자 인식의 형광 신호 변환을 수반하는 형광 신호전달은 검출 감도가 높고 반응시간이 빨라 기존의 방법들에 대해 유망한 대안으로 제시되고 있으며 (비특허문헌 8)Valeur et al., 1993), 다양한 형광 메커니즘 중에서, 높은 신호 출력을 관찰하기 위해서는 주로 형광증강이 바람직하다.

[0006] 또한, 특허문헌으로서, 요산 검출을 위해서 효소-양자점 하이브리드 시스템을 사용하는 기술도 보고된 바 있고 (특허문헌 1), 요산이 산화되어 생성되는 과산화수소와 이에 형광반응하는 소정 화합물 다이머를 이용한 요산 검출방법 (특허문헌 2)도 개시된바 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 국제특허출원 공개번호 WO 2015/047079호

(특허문헌 0002) 특허문헌 2: 국제특허출원 공개번호 WO 1991/015597호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Goyal et al., 1998. Bioelectrochem. Bioener. 44, 201

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Odo et al., 2004. J. Health Sci. 50, 594

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Yu et al., 1997. Analyst 122, 839

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Zheng et al., 2001. Electroanalysis 13, 1351

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Dey, S.; Saina, D.; Goswami, S., 2014. RSC Adv. 4, 428

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: Chu, H.; Wei, X.; Wu, M.; Yan, J.; Tu, Y., 2012. Sens. Actuators B 163, 247

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: Chen, D.; Wang, Q.; Jin, J.; Wu, P.; Wang, H.; Yu, S.; Zhang, H.; Cai, C., 2010. Anal. Chem. 82, 2448

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: Valeur, B.; Bourson, J.; Pouget, J.; Czarnik, A. W., 1993. Fluorescent Chemosensors for Ion and Molecule Recognition. ACS Symposium Series 538; American Chemical Society: Washington, DC.

발명의 내용

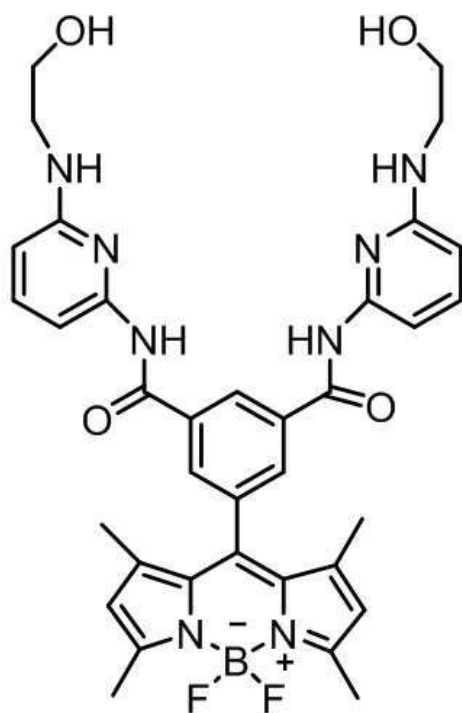
해결하려는 과제

[0009] 따라서, 본 발명에서는 광범위한 농도 범위에 걸쳐서 혈청 시료 내의 요산을 효과적으로 검출할 수 있는 요산 검출 프로브를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서, 하기 화학식 1로 표시되는 요산 검출용 화합물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]



[0012]

발명의 효과

[0013]

본 발명에 따른 요산 검출용 화합물은 타 분석물 대비 요산에 대해서 우수한 선택성으로 반응하며, 요산에 대해서 높은 검출 감도를 나타내는 바, 턴-온 방식에 의해서 요산을 단순하고 효과적으로 검출해낼 수 있어서, 임상 및 약제학적 분석에 있어서 매우 높은 효용성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0014]

도 1a 내지 1d는 화학식 1에 따른 화합물의 화학식 (1a), 요산의 화학식 (1b), 화학식 1에 따른 화합물의 최적화된 구조 (1c) 및 화학식 1에 따른 화합물-요산 복합체의 최적화된 구조 (1d)를 도시한 도면이다.

도 2a 및 2b는 화학식 1에 따른 화합물 (2a)과 화학식 1에 따른 화합물-요산 복합체 (2b)의 프런티어 분자 궤도를 도시한 도면이다.

도 3a 및 3b는 서로 다른 요산 농도에서 화학식 1에 따른 화합물의 형광 스펙트럼 (3a) 및 수용액 중 서로 다른 분석물이 존재하는 상태에서 화합물 8 (6 μ M)의 형광 스펙트럼 변화 (3b)를 도시한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

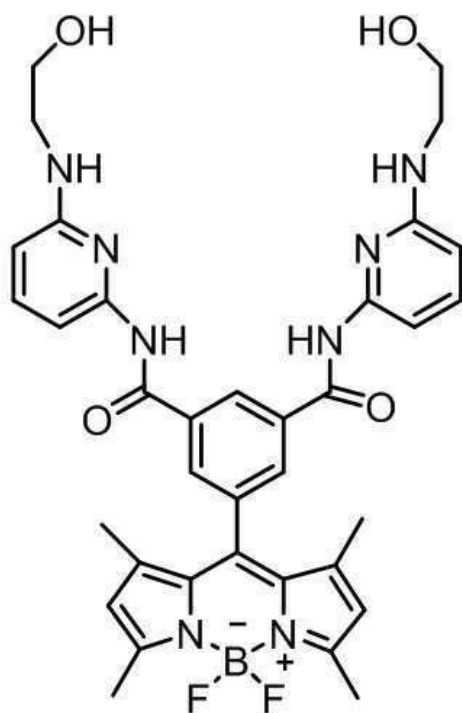
[0016]

본 발명에서는 광범위한 농도 범위, 예를 들어 60 μ M 내지 700 μ M의 요산 농도 범위 걸쳐서 턴-온 (turn-on) 형광 거동에 의해서 혈청 시료내 요산을 효과적으로 검출할 수 있는 비효소적 프로브를 제공하고자 한다.

[0017]

이를 위해서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 요산 검출용 화합물을 제공하며,

[0018] [화학식 1]



[0019]

[0020]

상기 화학식 1의 화합물은 혈청 내에 존재하는 아스코르브산 및 기타 분석물에 비해서 요산에 대해서 매우 높은 선택성을 가지고 반응한다.

[0021]

상기 화학식 1의 화합물은 요산과 프로브 사이의 상보적 수소결합을 기반으로 합리적으로 설계되었는 바, 수소결합은 다수의 생물학적 분자의 3차원 구조를 구성 및 유지하는데 필수적인 역할을 수행한다. 요산도 다른 생물학적 분자와 마찬가지로 적절한 호스트와 게스트 화합물로서 상보적 수소결합을 형성하는 경우, 여러 개의 수소결합 부위를 보유한다. 이에, 본 발명에서는 요산에 대해서 높은 선택성을 갖는 킬레이팅 단위를, 양자 효율이 높고 장파장 방출 특성을 가지며 광안정성이 우수한 형광 프로브로 알려진 BODITY 단위와 결합시킴으로써 요산에 대해서 높은 선택성을 가지면서 고감도로 요산을 검출해낼 수 있는 요산 검출용 화합물을 제조하게 되었다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물은 요산과 수소결합 상호작용을 통해서 턴-온 형광 거동에 의해서 우수한 선택성과 검출 감도로 요산을 검출해낼 수 있다.

[0022]

이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0023]

합성 재료와 시료 준비

[0024]

반응을 위해 사용된 화학물질들은 Aldrich, Acros Organics, Alfa-Aesar, Carbosynth와 TCI로부터 구입하여 입수한 대로 사용하였다. 분석 TLC는 Merck 60 F254 실리카겔을 이용하여 수행하였다. 칼럼 크로마토그래피를 위해서 실리카 겔 60 (Merck, 0.063-0.2 mm)을 이용하였다. ^1H NMR과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian 300과 400 MHz 분광계에서 CDCl_3 , CD_3OD 와 DMSO를 이용하고 내부표준물질로서 TMS를 이용하여 측정하였다. Thermo Scientific LTQ Orbitrap Mass Spectrometer를 이용하여 ESI-MS 스펙트럼을 측정하였다. 혈청 시료는 단국대학교병원으로부터 제공받았다. 화학식 1에 따른 화합물 (이하, '화합물 8'이라 함)의 희석표준용액은 이들의 DMSO 모액 (1.0 mM)으로부터 준비하였고, 모든 스펙트럼은 생리적 조건 (PBS 완충액, pH 7.2, 37 °C)에서 측정하였다. 슬릿 폭 3 nm(여기)와 3 nm(방출)로 여기 파장 475 nm에서 S-3100 (Scinco) 분광광도계와 RFPC-5301 분광광도계 (Shimadzu)를 이용하여 6 μM 의 화합물 8의 흡수 및 형광 스펙트럼을 측정하였다.

[0025]

합성예

[0026]

(a) 3,5-비스(메톡시카르보닐)벤조산(2)의 합성

[0027]

보고된 과정에 따라 화합물 2를 합성하였다 (Haridas, V.; Sharma, Y. K.; Naik, S., 2009. Eur. J. Org.

Chem. 1570), 수율: 55%

[0028] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 4.01(brs, 6H), 8.95(brs, 3H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 53.3, 53.4, 131.4, 132.7, 133.7, 134.0, 134.3, 165.3, 166.2, 166.3 ppm. ESI-MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6(\text{M}^+)$ 에 대한 계산치 240.21; 실측치 240.95.

[0029] (b) 디메틸 5-(히드록시메틸)이소프탈레이트(3)의 합성

[0030] 보고된 과정에 따라 화합물 **3**을 합성하였다 (Haridas et al., 2009), 수율: 45%

[0031] ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz): δ 3.94(s, 6H), 4.81(brs, 2H), 8.23(brs, 2H), 8.58(s, 1H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): 52.7, 64.4, 130.0, 131.0, 132.2, 142.2, 166.4 ppm. ESI-MS: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_5(\text{M}-1)$ 에 대한 계산치 224.06; 실측치 223.00.

[0032] (c) 5-포르밀이소프탈레이트(4)의 합성

[0033] DMSO (15 mL) 중 디메틸 5-(히드록시메틸)이소프탈레이트 (500 mg, 2.23 mmol)와 0.07 mL의 HBr (48%)의 혼합물을 오일조에서 5시간 동안 100 °C에서 가열하였다. 반응을 TLC로 모니터링하고, 완료 후 반응 혼합물을 에테르로 희석하고 염수로 세척하였다. 용매를 감압 증발시키고 반응 혼합물을 칼럼 크로마토그래피(에테르:헥산 2:8 내지 4:6)로 정제하여 화합물 **4** (80 mg, 16% 수율)를 백색 고체로서 수득하였다.

[0034] ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz): δ 3.92(s, 6H), 8.61(s, 2H), 8.80(s, 2H), 10.05(s, 1H). ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz): 52.9, 131.9, 134.4, 135.8, 137.0, 165.3, 190.5 ppm. HRMS: $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5(\text{M}+1)$ 에 대한 계산치 222.0528; 실측치 223.0608.

[0035] (d) (Z)-디메틸 5-((3,5-디메틸-1H-피롤-2-일)(3,5-디메틸-2H-피롤-2-일리덴)메틸)이소프탈레이트(5)의 합성

[0036] 40 mL의 CH_2Cl_2 용매 중 화합물 **4** (230 mg, 1.04 mmol)와 2,4-디메틸피롤 (197 mg, 2.07 mmol)의 혼합물에 촉매량의 TFA를 첨가하였다. 반응 혼합물을 밤새 상온에서 교반하고 알데히드가 소모될 때까지 TLC로 모니터링하였다. DDQ (307 mg, 1.35 mmol) 용액을 첨가하고 1시간 더 교반하였다. 완료 후, 물을 첨가하여 반응을 종결시키고, CH_2Cl_2 층을 분리하여 감압증발하고 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (EtOAc:헥산 1:1-9:1)로 정제하여 암적색의 점성이 있는 고체로서 화합물 **5** (270 mg, 67% 수율)를 수득하였다.

[0037] ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.23(s, 6H), 2.35(s, 6H), 3.94(s, 6H), 5.89(s, 2H), 8.21(s, 2H), 8.76(s, 1H). HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4(\text{M}+1)$ 에 대한 계산치 392.1736; 실측치 393.1816.

[0038] (e) 10-(3,5-비스(메톡시카르보닐)페닐)-5,5-디플루오로-1,3,7,9-테트라메틸-5H-디피콜로[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]디아자보리닌-4-이움-5-우이드(6)의 합성

[0039] 20 mL 디클로로메탄 용매에 화합물 **5** (150 mg, 0.68 mmol)와 DIPEA(1.8 mL, 10.2 mmol)를 용해시키고 상온에서 10분 동안 교반하였다. $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (1.45 mL, 10.2 mmol)를 서서히 첨가하고 밤새 교반하여 반응시켰다. 완료 후, 염수로 반응을 종결시키고, CH_2Cl_2 층을 분리하여 감압증발하고 실리카겔 칼럼 크로마토그래피 (EtOAc:헥산 1:9 내지 3:7)로 정제하여 점성이 있는 고체로서 화합물 **6** (110 mg, 65% 수율)을 수득하였다.

[0040] ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz): δ 1.33(s, 6H), 2.56(s, 6H), 3.97(s, 6H), 6.00(s, 2H), 8.21(s, 2H), 8.82(s, 1H). ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz): 14.8, 14.9, 15.3, 52.9, 122.0, 122.0, 131.4, 131.9, 131.9, 132.0, 133.8, 133.8, 136.1, 138.9, 142.8, 142.8, 156.6, 165.7 ppm. HRMS: $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_4$ 에 대한 계산치: 440.1719; 실측치 440.1724.

[0041] (f) 10-(3,5-디카르복시페닐)-5,5-디플루오로-1,3,7,9-테트라메틸-5H-디피콜로[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]디아자보리닌-4-이움-5-우이드(7)의 합성

[0042] NaOH 수용액을 10 mL 메탄올 중 화합물 **6** (50 mg, 0.11 mmol)의 용액에 서서히 첨가하고 1일 동안 교반하여 반

응시켰다. 이 반응 혼합물을 HCl 수용액으로 중화시키고 EtOAc로 희석하였다. 유기 용매를 분리한 다음, 감압 제거하였다. 조 생성물을 에테르로 2회 세척하여 화합물 **7** (40 mg, 85% 수율)을 암적색 고체로서 수득하였다.

[0043] ^1H NMR(MeOD, 300 MHz): δ 1.34(s, 6H), 2.48(s, 6H), 6.08(s, 2H), 8.14(s, 2H), 8.76(s, 1H). ^{13}C NMR(MeOD, 100 MHz): 14.6, 14.6, 15.0, 15.0, 122.8, 122.8, 122.8, 132.3, 134.0, 134.6, 134.6, 136.9, 157.5, 167.9 ppm. ESI-MS: $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{BF}_2\text{N}_2\text{O}_4(\text{M}+1)$ 에 대한 계산치 412.14; 실측치 413.31(M+1).

[0044] (g) 10-(3,5-비스(6-(2-히드록시에틸아미노)피리딘-2-일카르바모일)페닐)-5,5-디플루오로-1,3,7,9-테트라메틸-5H-디피콜로[1,2-c:1',2'-f][1,3,2]디아자보리닌-4-이올-5-우이드(8)의 합성

[0045] 건조 DMF (5 mL) 중 화합물 **7** (50 mg, 0.12 mmol), HATU (115 mg, 0.30 mmol)와 DIPEA(39 mg, 0.30 mmol)의 교반 용액에 화합물 **9** (37 mg, 0.24 mmol)를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 24시간 동안 아르곤 분위기하 상온에서 교반하였다. 반응 완료 후, 반응 혼합물에 EtOAc와 염수를 첨가하고, EtOAc 층을 분리하고 감압 제거하여 조생성물을 얻고, 이 조생성물을 칼럼 크로마토그래피 (MeOH:DCM 0.5:9.5 내지 2:9)에 의해 정제하여 최종 화합물 **8** (20 mg, 24% 수율)을 암적색 고체로 수득하였다.

[0046] ^1H NMR(CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.25(s, 6H), 2.58(s, 6H), 3.71(t, $J=5.4$ Hz, 4H), 4.16(s, 2H), 4.49(t, $J=5.4$ Hz, 4H), 4.56(s, 2H), 5.68(d, $J=7.8$ Hz, 2H), 5.79(d, $J=7.9$ Hz, 2H), 6.00(s, 2H), 7.08(t, $J=7.8$ Hz, 2H), 8.00(s, 2H), 8.75(s, 1H). ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz): 14.9, 14.9, 15.4, 15.4, 40.8, 65.6, 96.2, 97.3, 121.9, 121.9, 121.9, 131.5, 131.8, 133.8, 136.0, 139.5, 143.0, 156.5, 157.8, 158.0, 165.3 ppm. HRMS: $\text{C}_{35}\text{H}_{37}\text{BF}_2\text{N}_8\text{O}_4$ 계산치: 682.2999; 실측치 705.2902(M+Na).

[0047] (h) 2-(6-아미노피리딘-2-일아미노)에탄올(9)의 합성

[0048] 6-클로로피리딘-2-아민 (500 mg, 3.90 mmol)과 2-아미노에탄올 (286 mg, 4.68 mmol)의 혼합물을 밀봉 튜브 내 순수 조건에서 1시간 동안 가열하였다. 이 반응 혼합물에 DCM과 염수를 첨가하고 유기층을 분리, 건조 및 감압 제거하여 조생성물을 얻고, 이 조생성물을 칼럼 크로마토그래피 (MeOH: DCM 1:9 내지 2:8)로 정제하여 화합물 **9** (90 mg, 15% 수율)를 암녹색의 점성이 있는 액체로서 수득하였다.

[0049] ^1H NMR($\text{DMSO}-d_6$, 300 MHz): δ 3.32(t, $J=5.5$ Hz, 2H), 3.73(t, $J=5.4$ Hz, 2H), 4.664.67(brs, 2H), 5.03(s, 1H), 5.745.78(m, 2H), 7.16(t, $J=7.9$ Hz, 1H). ^{13}C NMR(MeOD, 100 MHz): 42.6, 59.7, 93.7, 94.7, 137.9, 156.6 ppm. HRMS: $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{N}_3\text{O}$ 에 대한 계산치: 153.0902; 실측치 154.0980(M+1).

[0050] 실험예

[0051] 이론적 계산

[0052] 밀도함수이론 (DFT)을 이용하여 화합물 **8**과 **8**-요산의 기하구조를 최적화하였다. 이들을 이론적 B3LYP/6-31G(d) 수준에서 계산하였다. 최적화된 구조의 진동 분석 후, 어떠한 가상의 주파수를 발견하지 못하였는데, 이는 최적화된 구조 각각이 포텐셜 에너지 표면 (PES)에서 실제 최소 상태에 있음을 암시하였다. 상호작용 에너지 계산을 위해서 최적화된 기하구조에 적용되는 카운터포이즈 보정법 (Simon et al., 1996)에 의해 기저계 중첩 오차 (BSSE)를 보정하였다. 하기 수학적 1에 의해서 상호작용 에너지 (I.E)를 정의하였다:

[0053] [수학적 1]

$$I.E = \Delta E_{\text{dim erization}} (\text{corr.}) = E_{BSSE} (\text{dim er}) - (E_{\text{comp.8}} + E_{UA})$$

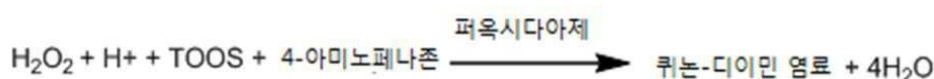
[0054] 상기 식에서, $E_{\text{comp.8}}$ 과 E_{UA} 은 각각 화합물 **8**과 요산의 최적화 에너지이고, $E_{BSSE} (\text{dim er})$ 는 이

[0055] 합체 시스템(**8**-UA) 카운터포이즈 보정 에너지를 나타내며, $\Delta E_{\text{dim erization}} (\text{corr.})$ 는 보정된 이량화 에너지로서, 이 경우에는 상호작용 에너지 또는 결합에너지이다. 본 실험예에서는 시간 의존 밀도함수이론 (TDDFT)을 적용하여 이론의 B3LYP/6-31G(d) 수준에서 전자 여기 에너지와 진동자 강도를 계산하였다. 모든 계산은

Gaussian 09 W 프로그램 패키지를 이용하여 실시하였다 (Frisch et al., 2010. Gaussian 09, Revision B. 01; Gaussian, Inc.: Wallingford, CT)

[0056] 문헌 방법에 의한 요산 분석 과정

[0057] 아스코르베이트 옥시다아제와 함께 시료를 배양함으로써 요산의 검출을 방해하는 아스코르브산을 시료로부터 제거하였다. 다음, 요산을 알란토인, CO₂와 H₂O₂로 전환시키는 우리카아제 효소와 시료를 반응 처리하였다. 퍼옥시다아제 (POD) 존재하에서 H₂O₂를 N-에틸-N-(2-히드록시-3-설포프로필)3-메틸아닐린(TOOS)과 4-아미노페나존과 반응시켜 퀴논-이민 염료를 형성하였다. 이러한 퀴논-이민 염료의 적색 강도는 요산 농도에 비례하고 광도계에 의해 측정된다.



[0058]

[0059] 상기 분석을 위해 사용된 시약: 인산염 완충액: 0.05 mol/L, pH 7.8; TOOS: 7 mmol/L; 지방알코올 폴리글리콜 에테르: 4.8%; 아스코르베이트 옥시다아제 (EC 1.10.3.3; 주키니; 25 °C) ≥ 83.5 μkat/L; 포타슘 헥사시아노 페레이트 (II): 0.30 mmol/L; 4-아미노페나존 ≥ 3 mmol/L; 우리카아제 (EC 1.7.3.3; 아르트로박터 프로토포르 미아에; 25 °C) ≥ 83.4 μkat/L; 퍼옥시다아제 (POD) (EC 1.11.1.7; 서양고추냉이; 25 °C) ≥ 50 μkat/L.

[0060] 결과 및 고찰

[0061] 요산과 함께 화합물 8의 이론적 계산

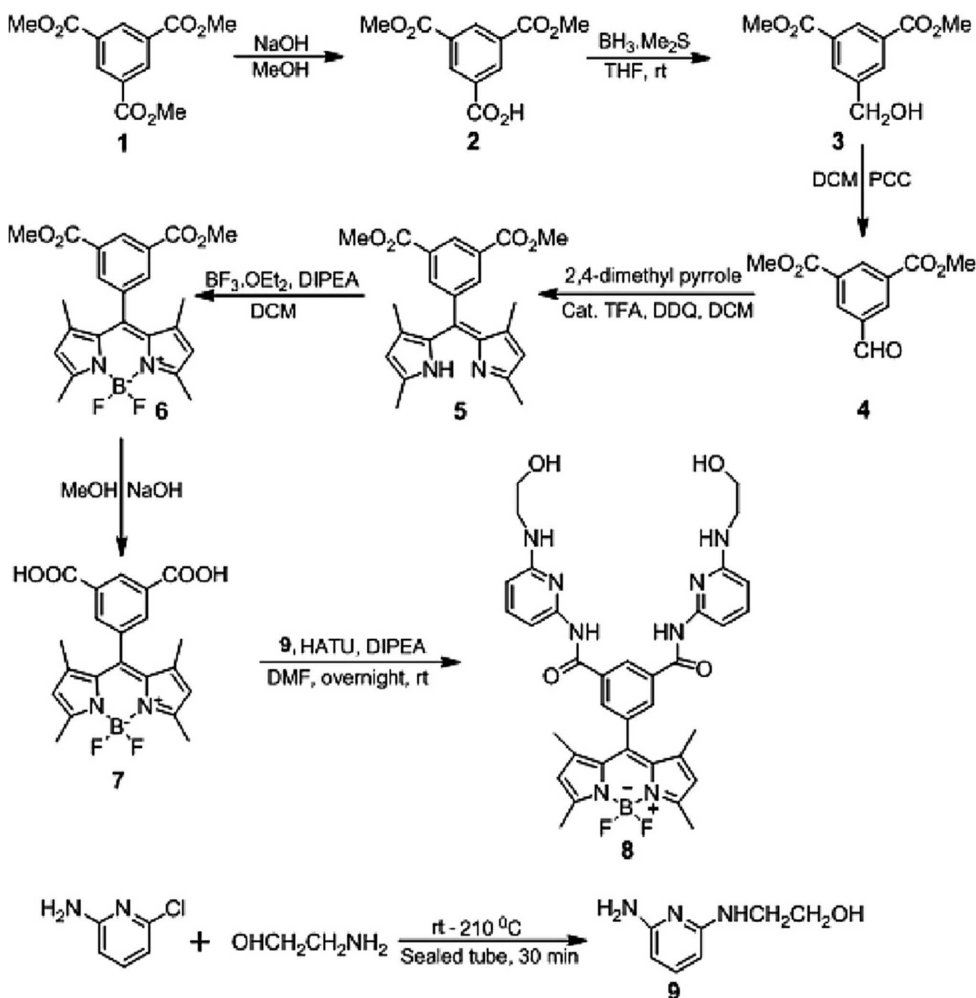
[0062] 화합물 8의 합성에 앞서, 먼저 밀도함수이론 (DFT)과 시간 의존 밀도함수이론 (TDDFT)을 기초로 계산하여 (Gaussian 09 이용, Frisch et al., 2010) 분자수준에서 화합물 8과 요산 사이의 상호작용을 규명하였다. 도 1a 내지 1d는 화합물 8과 그 요산 착체 (8-요산 착체)의 화학식 및 최적화된 구조를 보여주고 있다 (도 1c 및 1d에서 적색, 청색, 회색과 백색은 각각 산소, 질소, 탄소와 수소원자를 의미하며, 화합물 8-요산 착체에서 검정색 점선(a-n)은 H-결합을 의미한다). 화합물 8은 2개의 신축적인 킬레이팅 단위, 즉 H-결합을 통한 피리디늄 가지를 통해서 요산에 결합한다. 이론적 계산으로부터 예측한 대로, 8-요산 착체는 14개의 서로 상보적인 H-결합을 형성한다 (도 1d). 상기 H-결합은 하기 2개의 기하학적 파라미터에 의해 정의되었다 (Steiner, T., 2002. Angew. Chem. Int. Ed. 41, 48.; Steiner, T.; Desiraju, G. R., 1998. Chem. Commun. 891.): H···A 거리 <3.0 Å이고, D-H···A 각도 >110°이다. 가스상에서 계산한 결합에너지 (-25.19 kcal/mol)는 화합물 8과 요산 사이의 적당한 상호작용이 있음을 의미한다. H-결합 각각에 대한 평균 결합에너지 (계산치)는 ~1.8 kcal/mole로, 이는 일부 합성 호스트와의 바비츠허이트 약물 착화 연구에서 밝혀진 H-결합에너지와 일치하였다 (Chang, S. K.; Engen, D. V.; Fan, E.; Hamilton, A. D., 1991. J. Am. Chem. Soc., 113, 7640). TDDFT 계산을 통해 화합물 8에서 바닥상태로부터 첫 번째 단일항 여기상태로의 전이는 분자궤도에서 다음과 같은 여기와 관련이 있는 것으로 밝혀졌다: HOMO-2 → LUMO, HOMO-1 → LUMO 및 HOMO → LUMO. HOMO-1과 HOMO-2의 전자밀도는 주로 킬레이팅 단위에 위치해 있는 반면에, HOMO와 LUMO의 경우에는 BODIPY 단위에 있다 (도 2a 및 2b 참조, 도 2a 및 2b에서 HOMO와 LUMO에 대한 서로 다른 상은 각각 녹색과 적색으로 표시되어 있고 0.02 a.u.로 등가이다). 이는 킬레이팅 단위로부터 BODIPY로 광 유도 전자 전달 (또는 광 유도 전하 전달)이 일어날 수 있음을 의미하는 것으로, 화합물 8의 형광특성이 약한 이유이다. 요산이 화합물 8과 상호작용할 때 분자궤도 HOMO, LUMO와 LUMO+1은 전자 전이에 관여한다. 요산과 상호작용시, 화합물 8의 HOMO는 더 이상 킬레이팅 단위 상에 있지 않아 PET는 더 이상 가능하지 않게 된다. 계산된 진동자 강도는 0.05에서 0.202로 증가하는데, 이는 요산과 킬레이팅 후 가시광선 스펙트럼에서 화합물 8의 흡광도 증가가 일어날 수 있음을 의미한다.

[0063] 화합물 8의 합성

[0064] 하기 반응식 1에 나타난 것과 같이 화합물 8을 합성하였다. 디클로로메탄 중에서 피리디늄 클로로크로메이트 (PCC)로 화합물 3을 산화시켜 16%의 수율로 디메틸-5-포르밀이소프탈레이트 4를 수득하였다. DDQ와 TFA가 존재하는 상태에서 화합물 4와 2,4-디메틸피롤을 반응시켜 화합물 5를 제조하였고, 이를 BF₃OEt₂와 반응시켜 BODIPY 유도체 6을 수득하였다. 화합물 6을 가수분해하여 화합물 7을 형성한 후, 화합물 9와 HATU 결합 반응으로 화합

물 8 (24% 수율)을 암적색 고체로서 수득하였다. 모든 화합물들을 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ESI-MS와 HRMS에 의해 특성 분석 및 확인하였다.

[반응식 1]



화합물 8과 요산의 결합 연구

생리적 조건 (PBS 완충액, pH 7.2, 37 °C)에서 화합물 8의 광물리학적 거동과 요산과의 결합 상호작용을 UV-Vis 및 형광 분광법에 의해 조사하였다. 화합물 8은 수용액 중 507 nm에서 흡수 밴드를 나타내었다. 요산의 첨가에 의해 요산과 화합물 8의 결합을 의미하는 507 nm에서의 흡수가 증가하는 것을 관찰하였다.

형광 스펙트럼에서 화합물 8은 475 nm에서 여기시 510 nm에서 약한 방출 밴드 ($s=0.004$)를 나타낸다 (도 3a 참조). 화합물 8의 약한 형광은 아미노-피리딘 단위로부터 BODIPY 단위로의 PET에 기인한 것일 수 있고; 이 결과는 이론적 계산과 일치한다. 화합물 8의 형광은 UA의 첨가 (10-700 μM , 도 3a)에 의해 크게 증강되었고 ($s=0.029$) 양호한 선형 관계를 보였다. UA에 의해 유도된 형광 방출 증강은 아미노-피리딘 단위로부터 BODIPY 단위로의 PET가 억제되었기 때문이다. 화합물 8과 UA의 화학양론비는 UA에 의한 화합물 8의 형광변화를 이용한 연속 변화법에 의해 평가했을 때 (Job's plot) 1:1이었다. UA에 대한 화합물 8의 선택성은 수용액 중 크산텐, 하이포크산틴, 크레아티닌, 아스코르브산, 시스테인, 호모시스테인, 글루타티온, 글리신, L-티로신, L-아르기닌, L-글루탐산, L-아스파르트산과 L-세린과 같은 다양한 생체 분석물의 존재하 512 nm에서 형광 세기 변화를 관찰함으로써 조사하였다. 모든 시험 분석물 중에서, 화합물 8은 UA에 대한 선택성이 높다는 것이 밝혀졌다 (도 3b). 중요한 것은, 아스코르브산과 같이 잠재적으로 경쟁하는 분석물 (UA와 AA의 매우 작은 산화전위 차이로 인해 요산의 전기화학적 검출에 있어서 강한 방해로 일으키는), 크산텐, 하이포크산틴과 크레아티닌 (요산과 구조적으로 유사)은 화합물 8의 방출 세기에 있어 상대적으로 경미한 변화를 보였다. 화합물 8과 UA의 착화를 pH 함수로서 조사하였고 생물학적 pH 범위 5-9에 걸쳐 매우 안정하는 것을 발견한바, 이는 다양한 생물학적 조건에서 화합물 8의 유용성을 입증하는 것이다.

[0070] 혈청 중 화합물 8의 이용을 조사하기 전에, UA 농도에 따른 형광 세기 변화를 보정하는 것이 중요하다. 화합물 8의 형광 세기는 요산 농도에 따라 (0-700 μM) 증가하고, 이러한 변화를 1차 방정식을 이용하여 피팅할 수 있다. 본 발명에서는 상관관계 곡선을 이용하여 혈청 시료 내 UA 농도를 평가하였다. 이 또한 화합물 8의 감도가 생리적 환경에서 10 μM 수준의 UA를 검출하기에 충분히 높음을 나타내었다. 정상 인간, 고요산혈증과 저요산혈증 환자로부터 수거한 8개의 서로 다른 혈청 시료로부터 혈청 중 UA 농도를 추가로 정량화하였다. 정량화를 위한 혈청 시료의 전처리는 실시하지 않았다. 혈청 UA가 존재하는 상태에서 화합물 8의 스펙트럼 형태는 도 3에 나타낸 형광 변화와 유사하게 510 nm에서 형광 세기가 크게 증가하였다. 하기 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 본 발명에서는 화합물 8의 형광 세기로부터 혈청 시료의 배경 형광을 차감하여 혈청 시료 중 UA를 정량화하기 위한 순 형광 세기를 얻었다. 또한, 결과를 문헌 (Kageyama, N., 1971. Clin. Chim. Acta 31, 421.)에 보고되어 있는 결과와 비교하기 위해서, 동일한 시료를 Roche Uric Acid Assay (Uric Acid Assay Kit를 이용한 현재의 상업적인 방법)로 시험하였다. 그 결과, 본 발명에 따른 방법이 혈청 중 UA 측정을 위한 현재의 상업적인 방법만큼 효율적이라는 것을 알 수 있었다 (표 1 참조). 그러나, 본 발명에 따른 방법은 간단하고 비효소적인 속성을 갖고 있기 때문에, 미래에 임상용으로 매우 적합하다.

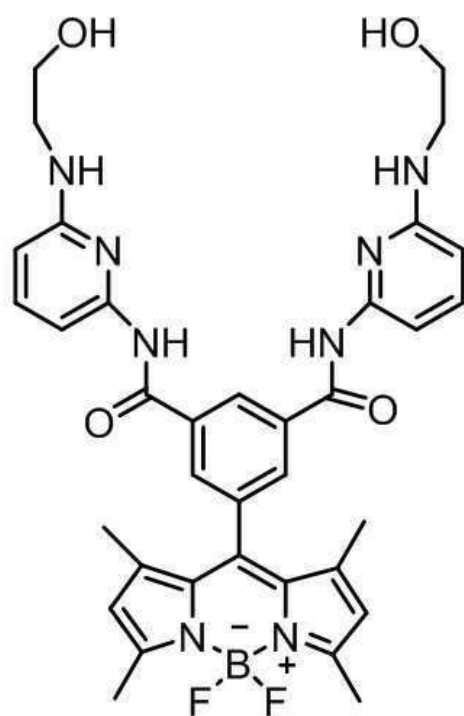
표 1

시료 번호	종래 문헌에 따른 방법 (μM)	본 발명에 따른 방법 (μM)
1	773	> 700 (917 $\pm$ 30)
2	666	630 $\pm$ 17
3	500	576 $\pm$ 12
4	476	469 $\pm$ 20
5	303	325 $\pm$ 15
6	196	217 $\pm$ 18
7	131	181 $\pm$ 21
8	63	145 $\pm$ 10

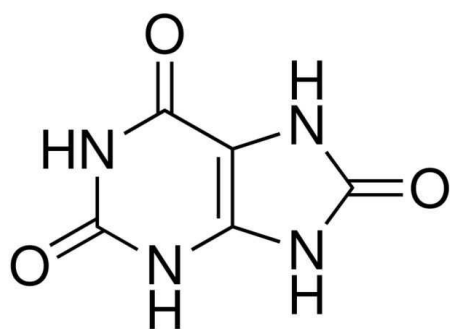
[0072] 종합하면, 본 발명에서는, 혈청 시료 중 요산을 검출하기 위한 매우 선택적인 비효소적 “턴-온” 형광 프로브를 제공한다. 화합물 8은 여러 상보적 H-결합을 통해 UA와 결합하여 킬레이팅 단위로부터 BODIPY 단위로의 PET를 감소시키고 그 결과 “턴-온” 형광을 얻는다. 또한, 화합물 8은 혈청 시료 중 광범위한 UA 농도 (하한: ~60 μM , 상한: ~700 μM , 정상: ~120-380 μM)를 검출하는데 효율적이다. 본 발명에 따른 방법 시판 임상 분석기와 비슷한 검출 한계와 감도를 갖고 있어 일상적인 임상 및 약제학적 분석에 있어서 유용하다.

도면

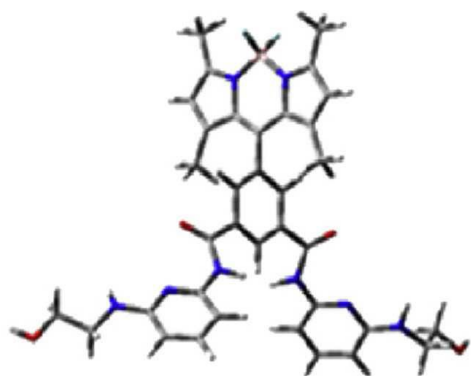
도면1a



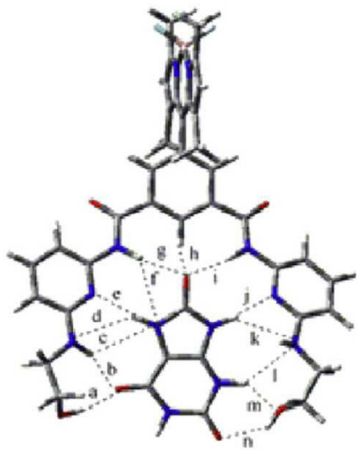
도면1b



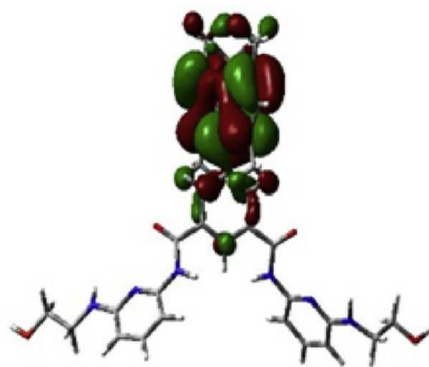
도면1c



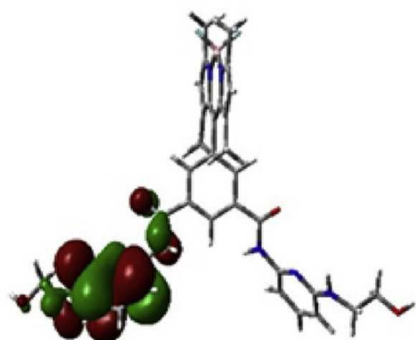
도면1d



도면2a

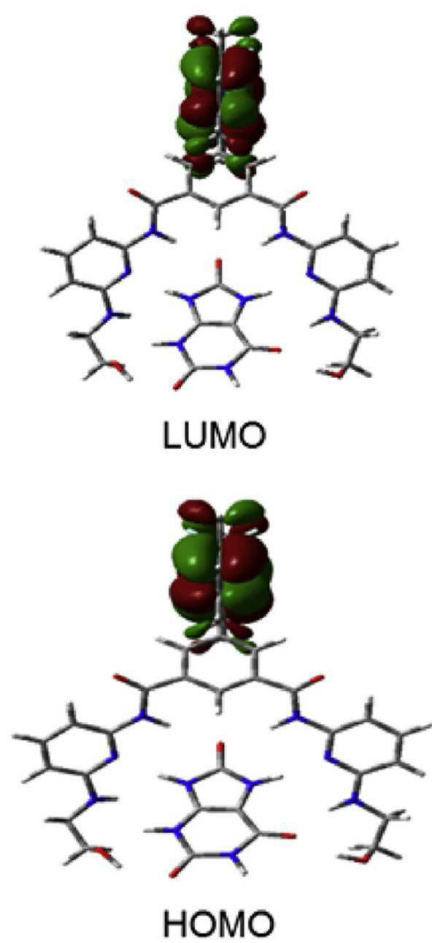


LUMO

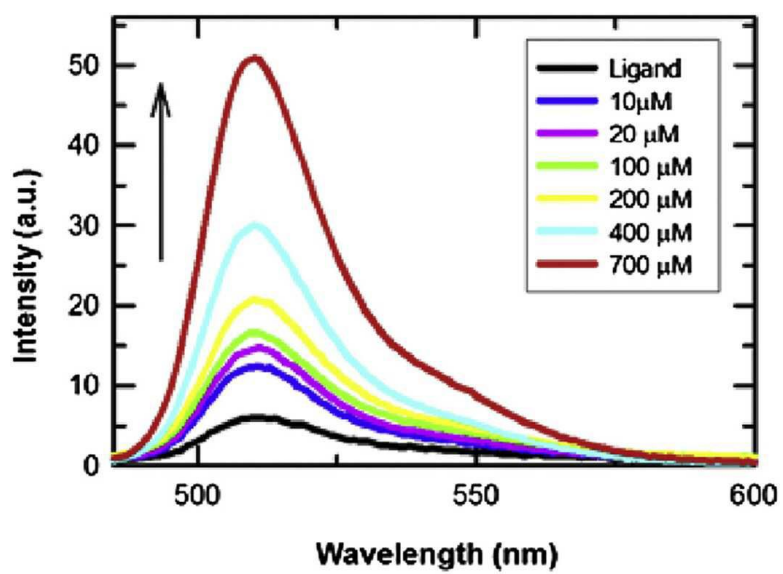


HOMO-1

도면2b



도면3a



도면3b

