(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0043922
(43) 공개일자 2013년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/706 (2006.01) *A61K 31/473* (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0108111
(22) 출원일자 2011년10월21일
심사청구일자 2011년10월21일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김종승
경기도 성남시 분당구 내정로 186, 롯데아파트 130-2402 (수내동, 파크타운)
강철훈
경기도 수원시 장안구 하률로30번길 22, 105동 704호 (천천동, 신안아파트)
이민희
서울특별시 성북구 보문로26길 83-7 (안암동1가)
(74) 대리인
특허법인충현

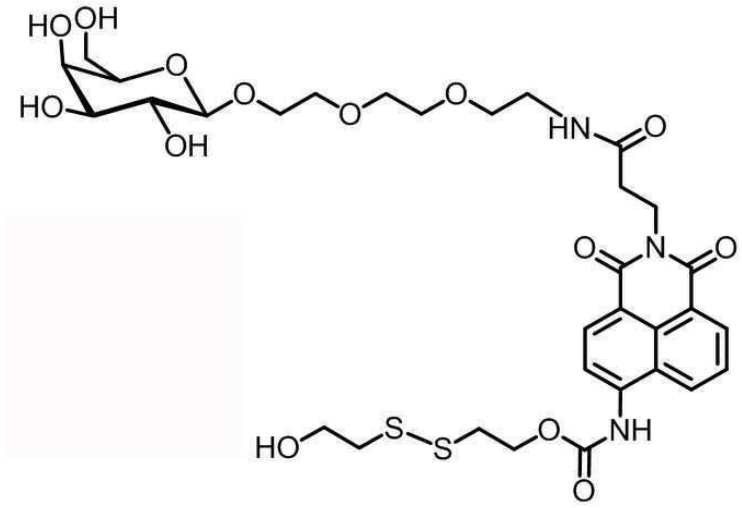
전체 청구항 수 : 총 5 항

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

(57) 요 약

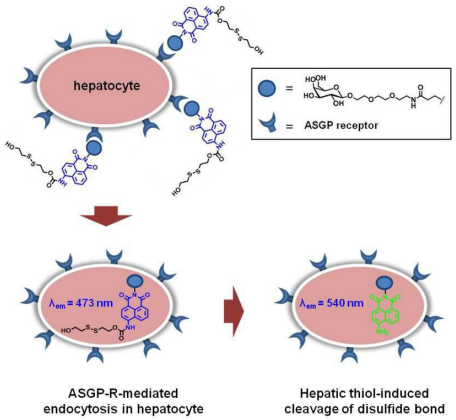
본 발명은 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체내 티올 영상화 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 화학식 1의 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체내 티올 영상화 방법에 관한 것이다:

<화학식 1>



본 발명에 따른 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자는 티올에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 생체 내에서, 특히 간 티올을 직접적이면서도 실시간으로 영상화하는 것을 가능케 한다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

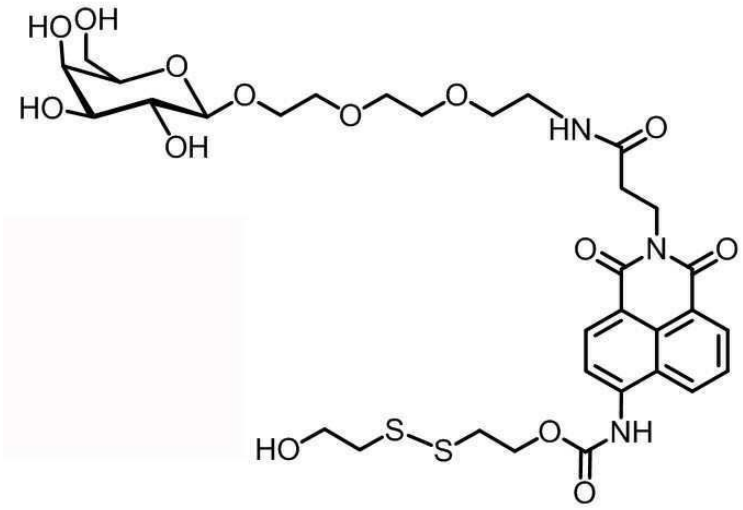
과제고유번호	20110000420
부처명	한국연구재단
연구사업명	리더연구자지원_창의연구
연구과제명	발광센서 재료 연구단
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.29

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자:

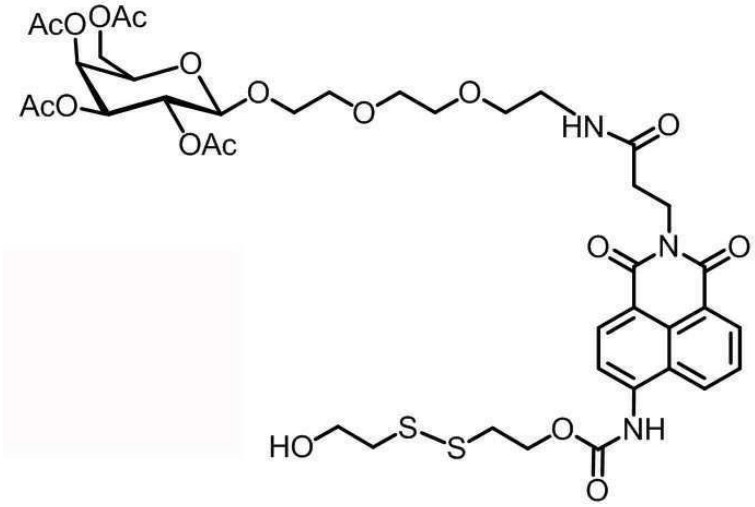
<화학식 1>



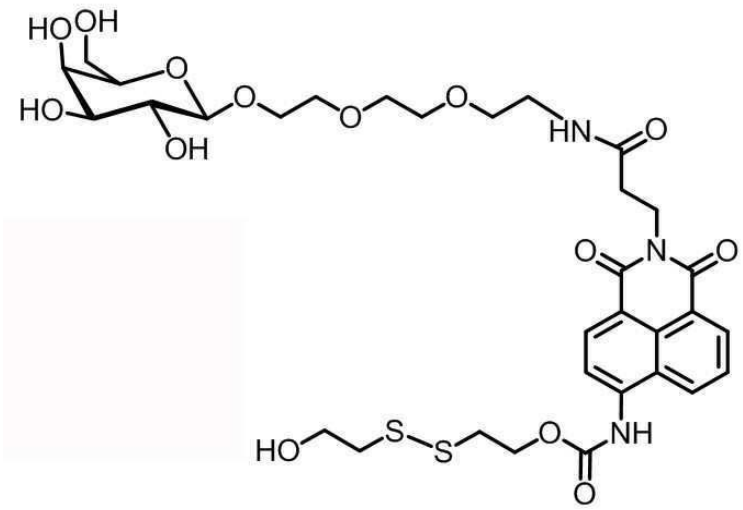
청구항 2

화학식 2의 화합물에 대해서 디아세틸화 반응을 수행함으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법:

<화학식 2>



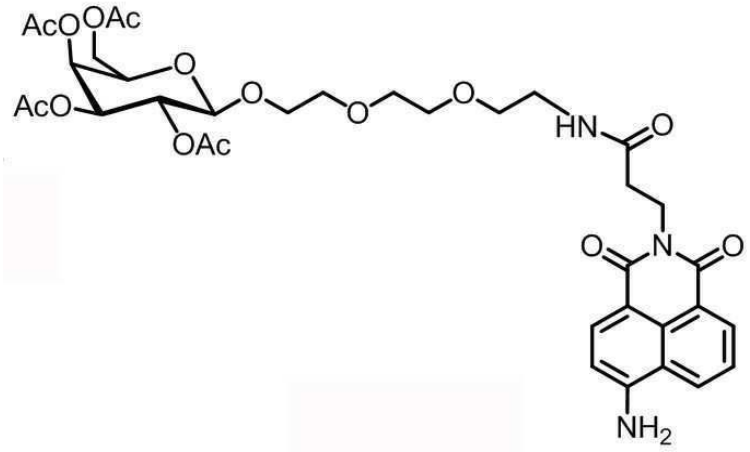
<화학식 1>



청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 3의 화합물을 트리포스겐 및 2,2'-디티오에탄올과 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 화학정량 형광 표지자의 제조방법:

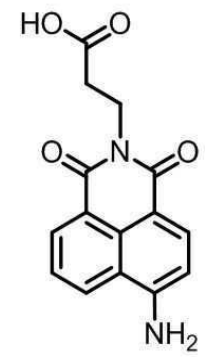
<화학식 3>



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물과 $-NH_2$ 말단을 갖는 갈락토오스 테트라아세테이트 유도체를 반응시킴으로써 제조하는 것을 특징으로 하는 화학정량 형광 표지자의 제조방법:

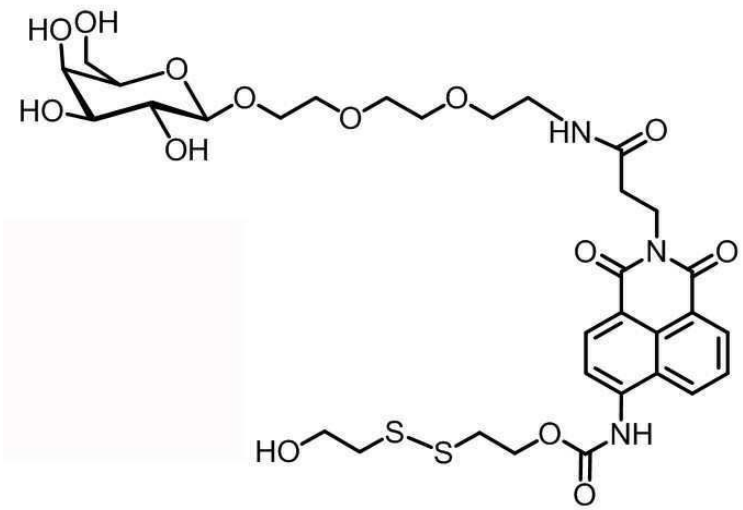
<화학식 4>



청구항 5

화학식 1의 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계를 포함하는 생체내 티올 영상화 방법:

<화학식 1>



명 세 서

기 술 분 야

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

배 경 기 술

[0002] 글루타티온 (GSH)은 세포 내에서 함량이 가장 큰 티올로서, 세포 내 농도는 1~10 mM 범위이며 생물학적 산화환원 시스템의 항상성에 있어 매우 중요한 역할을 한다. 세포 내의 글루타티온/산화 글루타티온 (GSH/GSSG) 비율은 세포 내 산화환원 상태를 알려주는 중요한 지표로서 정상적인 생리적 조건 하에서 100 : 1을 초과하며, 이 수치가 비정상적인 경우 다수의 질병 및 암과 연관된 경우가 많다 ((a) S. C. Lu, *Curr. Top. Cell. Regul.* **2000**, *36*, 95-116; (b) T. P. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4248-4252; (c) D. M. Townsend, K. D. Tew, H. Tapiero, *Biomed. Pharmacother.* **2003**, *57*, 145-155).

[0003] 간은 혈액과, 신장, 폐, 대장 및 소장과 같은 타 기관에 GSH를 공급하므로, 체내의 산화환원 상태 유지에 기여하는 매우 중요한 기관으로서, 산화 스트레스가 심할 경우, 간세포의 GSH/GSSG 비율은 4 : 1 미만으로 감소할 수 있다 (O. W. Griffith, *Free Radic. Biol. Med.* **1999**, *27*, 922-935). 또한, GSH의 조직간 이동은 다른 조직으로의 암 전이에도 지대한 영향을 미친다. 따라서, 간 내의 GSH/GSSG 비율의 변화와 간 티올 함량을 정량적으로 파악하는 것은 중요한 의미가 있다.

[0004] 생체 내의 특정한 분자를 검출하기 위한 목적으로, 특히 생체 내 및 생체 외에서 티올을 영상화하기 위한 용도로, 민감도, 특이성, 사용의 용이성 면에서 다른 방법들에 비해 뚜렷한 장점을 가지는 다양한 화학정량 형광 표지자 (chemodosimetric fluorescent probe)가 개발되었다. 그러나, 티올 검출을 위한 형광 표지자에 관해서는 많이 연구된 바 있지만 ((a) P. K. Pullela, T. Chiku, M. J. Carvan, D. S. Sem, *Anal. Biochem.* **2006**, *352*, 265-273; (b) N. Shao, J. Jin, H. Wang, J. Zheng, R. Yang, W. Chan, Z. Abliz, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 725-736; (c) X. Chen, Y. Zhou, X. Peng, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 2120-2135; (d) L.-L. Yin, Z.-Z. Chen, L.-L. Tong, K.-H. Xu, B. Tang, *Chin. J. Anal. Chem.* **2009**, *37*, 1073-1081; (e) H. S. Jung, K. C. Ko, G. H. Kim, A. R. Lee, Y. C. Na, C. Kang, J. Y. Lee, J. S. Kim, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 1498-1501; (e) H. S. Jung, J. H. Han, Y. Habata, C. Kang, J. S. Kim, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 5142-5144), 이를 실제로 이용하여 간과 같은 특정 기관에서 티올을 검출한 예는 아직까지 보고된 바가 없다.

[0005] 종래기술로서, 대한민국 공개특허공보 제2011-0090417호는 티올 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 개시하고

있으며, 이는 티올과 선택적으로 결합하여 녹색 형광 증강 효과를 나타내는 화합물에 관한 것이다. 또한, 대한민국 공개특허공보 제2011-0085270호는 생체 세포 및 조직에서 티올을 검출하기 위한 이광자 형광 프로브를 개시하고 있으며, 이는 2-메틸아미노-6-아세틸나프탈렌 및 이황화기를 포함하는 화합물에 관한 것이다. 그러나, 세포 원형질막 상에 존재하는 수용체에 의해서 인식되어 엔도시토시스 과정을 거치고, 화학정량적으로 발광함으로써 생체 내 티올, 특히 간 티올을 실시간으로 직접 영상화할 수 있는 화학정량적 형광 표지자에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0006] 따라서, 간 티올의 조절은 세포 내 산화환원 대사의 유지에 있어 중요하다는 점을 고려할 때, 살아있는 기관 내에서 간 티올을 직접, 실시간으로 영상화할 수 있게 해 주는 화학정량 형광 표지자는 매우 중요한 의미를 가지며, 건강한 상태 및 병적 상태의 간 내 티올 수치를 직접 측정할 수 있게 해 주는 강력한 수단이 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는, 티올에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 특히, 생체 내에서 직접적으로, 또한 실시간으로 티올을 영상화할 수 있는 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공하는 것이다.

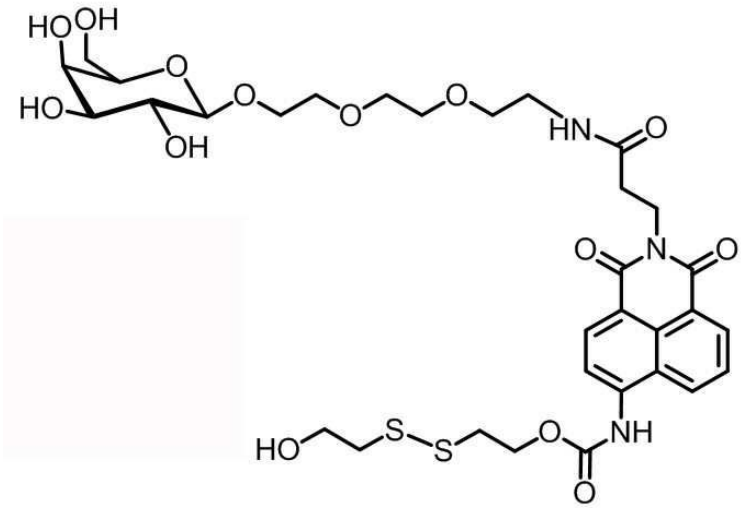
[0008] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 기술적 과제는 상기 화학정량 형광 표지자를 이용한 생체내 티올 영상화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공한다:

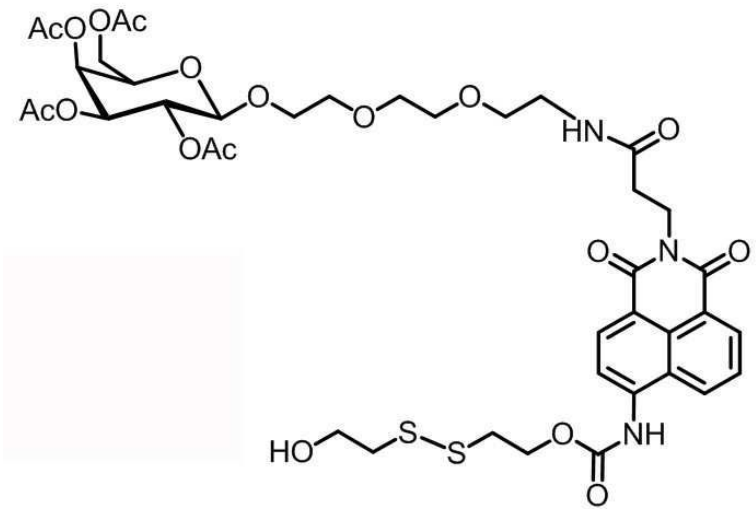
화학식 1

[0011] 

[0012] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

[0013] 화학식 2의 화합물에 대해서 디아세틸화 반응을 수행함으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공한다:

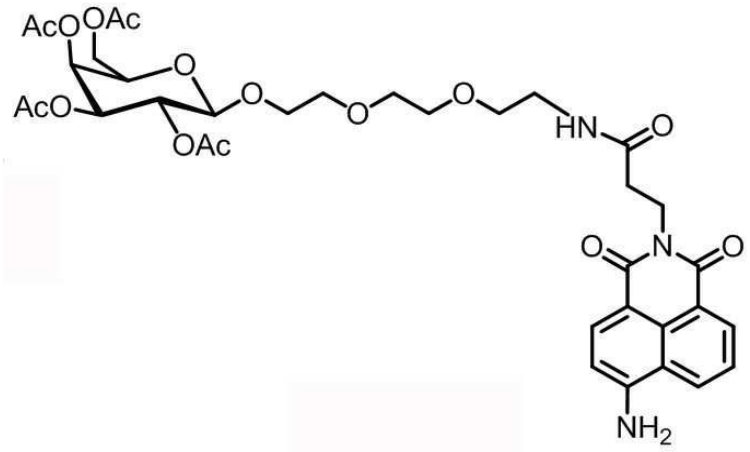
화학식 2



[0014]

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 3의 화합물을 트리포스겐 및 2,2'-디티오에탄올과 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

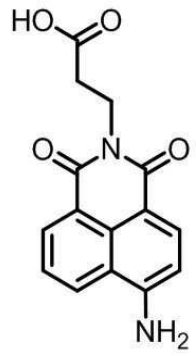
화학식 3



[0016]

[0017] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물과 $-NH_2$ 말단을 갖는 갈락토오스 테트라아세테이트 유도체를 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

화학식 4

[0018] 

[0019] 본 발명은 상기 세 번째 기술적 과제를 달성하기 위해서, 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계를 포함하는 생체내 티올 영상화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자는 티올에 대해서 높은 선택성을 나타내며, 우수한 발광 특성을 보이고, 생체 내에서, 특히 간 티올을 직접적이면서도 실시간으로 영상화하는 것을 가능케 한다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 간 세포 내로 ASGP-R에 의해 매개되는 엔도시토시스를 통해서 본 발명에 따른 화합물 1이 간 티올을 검출하는 과정에 대한 개략도이다.

도 2는 생리적 조건 하에서 측정한 화합물 1에 대한 정규화된 흡수 및 발광 스펙트럼이다.

도 3a는 화합물 1에 대한 티올기를 갖는 화합물들의 반응성과 티올기를 갖지 않는 다른 화합물들의 반응성을 비교한 도면이고, 도 3b는 화합물 1이 존재하지 않는 용액의 형광 (Flu) 및 흡수 (Abs) 사진 (도면에서 A 및 C)과, 화합물 1이 존재하는 용액의 형광 및 흡수 사진 (도면에서 B 및 D)을 도시한 도면이다.

도 4는 GSH가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에, 화합물 1의 473 nm에서의 형광 강도에 대한 540 nm에서의 형광 강도의 비율 (F_{540}/F_{473})을, pH의 함수로서 표시한 그래프이다.

도 5a 및 5b는 GSH 존재 하에서 시간에 따른 화합물 1의 형광강도의 변화를 도시한 그래프이다.

도 6은 Cys 존재 하에서 시간에 따른 화합물 1의 형광강도의 변화를 도시한 그래프이다.

도 7은 화합물 1과 티올기와의 가능한 반응 메카니즘을 도시한 도면이다.

도 8a 및 8b는 GSH의 농도 변화 (0~1.0 mM)에 따른 화합물 1의 형광 스펙트럼 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 화합물 1 (10 μM) 및 비교예에 따른 화합물 6 (1.0 μM)으로 처리된 HepG2, C2C12, HaCat 및 N2a 세포들의 공초점 현미경 영상들을 도시한 사진들이다.

도 10은 0~10^{-8} M의 다양한 비오틴 농도범위에서, 본 발명에 따른 화합물 1 (10 μM) 및 비교예에 따른 화합물 6 (1.0 μM)으로 처리된 HepG2 세포들의 공초점 현미경 영상들을 도시한 사진들이다.

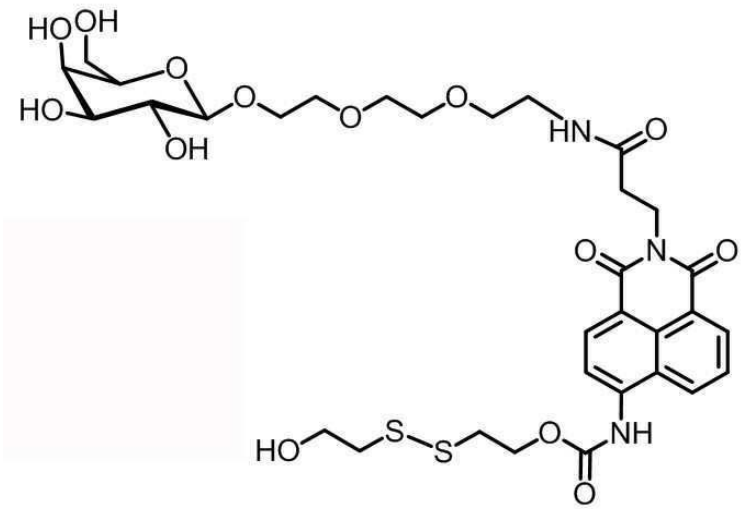
도 11은 *N*-에틸말레이미드 (NEM)의 다양한 농도범위에서, 본 발명에 따른 화합물 1 (10 μM) 및 비교예에 따른 화합물 6 (1.0 μM)으로 처리된 HepG2 세포들의 공초점 현미경 영상들을 도시한 사진들이다.

도 12는 간, 폐, 신장, 췌장 및 심장에 대한 화합물 1 및 6의 형광 이미지를 도시한 사진들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명에서는, 화학식 1의 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자를 제공한다:

[0023] <화학식 1>



[0024]

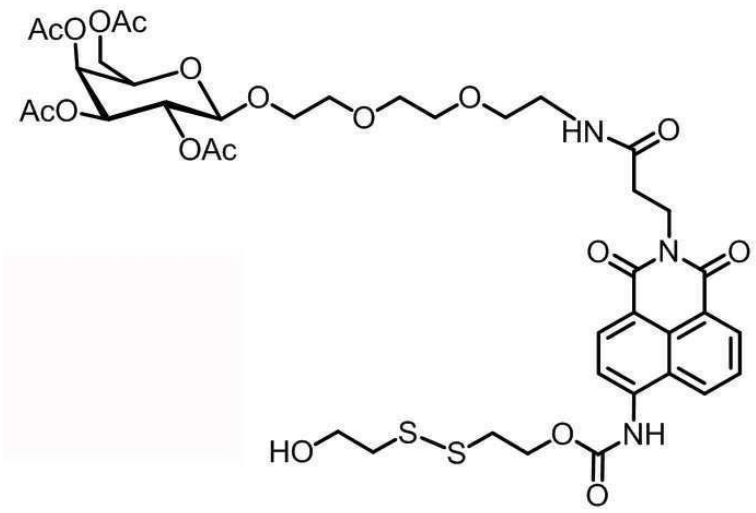
[0025] 상기 화학식 1의 화합물은 티올에 특이적인 산화환원 반응을 나타내는 이황화결합과, 간 세포 표적화 단위로서의 갈락토스 잔기를 가지며, 이러한 특성으로 인하여 생체 내에서, 특히 간 티올을 실시간으로 영상화할 수 있다. 상기 이황화결합은 GSH와 반응하여 형광 발광의 변화를 일으킬 수 있는데 반하여, 상기 갈락토스 잔기는 간 세포의 원형질막 상에서 탈시알로당단백질 수용체 (ASGP-R)에 의해 인식되어 상기 화합물 1이 엔도시토시스되는 것을 가능케 한다. 도 1에 나타낸 바와 같이, 화합물 1은 ASGP-R에 의해 매개되는 엔도시토시스에 의해 간세포 내로 쉽게 침투하며, 그에 따라 간세포 내의 GSH에 의해 이황화결합이 분리되어 형광 발광에 변화가 나타나는 것으로 판단된다. 즉, 본 발명에서는 극성을 갖는 친수성 갈락토스기를, 일반적으로 소수성을 띠는 형광 표지자에 도입함으로써, 우수한 용해도 및 간 세포 내로의 선택적인 침투성을 동시에 달성할 수 있게 된다.

[0026] 또한, 화합물 1은 내부 전하이동 (ICT) 효율과 같은 분광학적 특성, 양자수율, 및 다양한 변형을 위한 구조적 유연성이 우수한 4-아미노나프탈이미드를 형광 표지자의 골격으로 채택하고 있으며, 여기에 이황화결합을 갖는 카바메이트기가 도입되어, 티올과의 반응에 의해 이러한 이황화결합이 분리된 후 재차 분리 반응을 거침으로써, 화합물 1의 발광 스펙트럼 (473 nm → 540 nm) 및 흡수 스펙트럼 (367 nm → 428 nm)에 큰 변화를 일으키는 1차 아민이 형성되게 된다.

[0027] 하기 실시예에 서술하는 바와 같이, 본 발명에 따른 화합물 1은, 우수한 수용성을 나타내며, 비율당량적인 신호 변화 특성을 지니고, 다른 비티올계 아미노산 및 생물학적으로 중요한 금속이온보다 티올에 대해서 높은 선택성을 지니며, 그 적용 pH 범위가 넓다. 또한, HepG2, C2C12, HaCat 및 N2a 세포주에 대한 공초점 현미경 관찰 결과, 화합물 1은 HepG2 세포에 선택적으로 침투한 후에, 티올에 의해 유도되는 산화환원 반응을 거침으로써, 540 nm에서 적색 편이된 형광 발광 특성을 나타내는 것이 확인되었다.

[0028] 본 발명은 또한 화학식 2의 화합물에 대해서 디아세틸화 반응을 수행함으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 티올 선택성을 갖는 화학정량 형광 표지자의 제조방법을 제공한다:

[0029] <화학식 2>

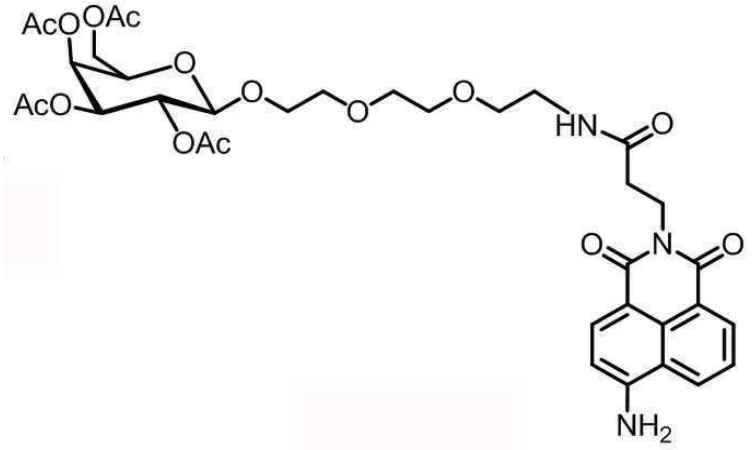


[0030]

[0031] 상기 디아세틸화 반응으로는, O에 결합하고 있는 아세틸기를 가수분해로 해리하여 OH기를 재생하는 일반적인 반응이 사용될 수 있으며, 예를 들어 NaOMe/MeOH의 존재 하에서 양이온 교환 수지를 사용하여 수행될 수 있다.

[0032] 바람직하게는, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 화학식 3의 화합물을 트리포스겐 및 2,2'-디티오에탄올과 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

[0033] <화학식 3>

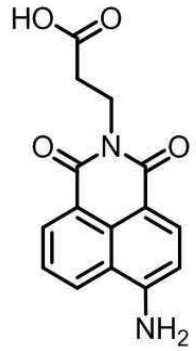


[0034]

[0035] 상기 반응은 4-아미노나프탈이미드가 근간이 되는 형광 표지자 골격에 이황화결합을 갖는 카바메이트기를 도입하기 위한 것으로서, 도입된 이황화결합은 생체 내에서 티올과의 반응에 의해 분리되어 결과적으로 1차 아민을 생성함으로써 화합물 1의 발광 스펙트럼 변화를 야기하게 된다.

[0036] 바람직하게는, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 $-NH_2$ 말단을 갖는 갈락토오스 테트라아세테이트 유도체를 반응시킴으로써 제조할 수 있다:

[0037] <화학식 4>

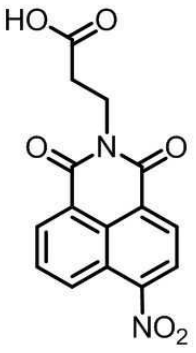


[0038]

[0039] 상기 반응은 4-아미노나프탈이미드가 근간이 되는 형광 표지자 골격에 간 세포 표적화 단위로서의 갈락토스 잔기를 도입하기 위한 반응으로서, 도입된 갈락토스 잔기는 간 세포의 원형질막 상에서 탈시알로당단백질 수용체(ASGP-R)에 의해 인식되어 상기 화합물 1이 엔도시토시스되는 것을 가능케 한다. 또한, 상기 갈락토스 잔기는 친수성 특성을 나타내므로, 화합물 1이 세포 환경 내에서 우수한 용해도를 발현하는 데에도 기여한다.

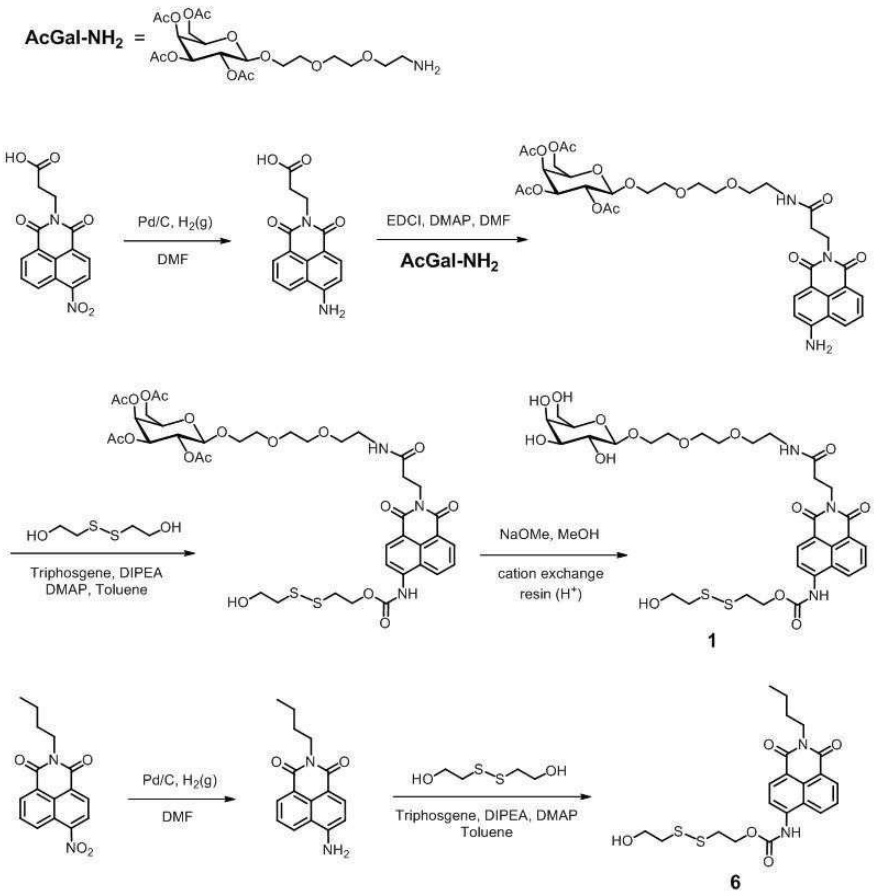
[0040] 한편, 나프탈이미드 유도체인 상기 화학식 4의 화합물 (하기 화학식 5의 화합물을 환원시킴으로써 제조), 하기 화학식 5의 화합물 및 갈락토스 잔기의 도입을 위한 갈락토스 테트라아세테이트 유도체는 종래 공지된 방법에 의해서 제조될 수 있다 ((a) L. G. F. Patrick, A. Whiting, *Dyes Pigments* **2002**, *55*, 123-132; (b) D. Yuan, R. G. Brown, J. D. Hepworth, M. S. Alexiou, J. H. P. Tyman, *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 397-404; (c) H. Sato, E. Hayashi, N. Yamada, M. Yatagai, Y. Takahara, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 701-710).

화학식 5



[0041]

[0042] 참고로, 하기 반응식에는 화학식 5의 화합물로부터, 화학식 1의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.



[0043]

[0044] 본 발명은 또한 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내에 주입한 후, 방출되는 형광을 모니터링하는 단계를 포함하는 생체내 티올 영상화 방법을 제공한다.

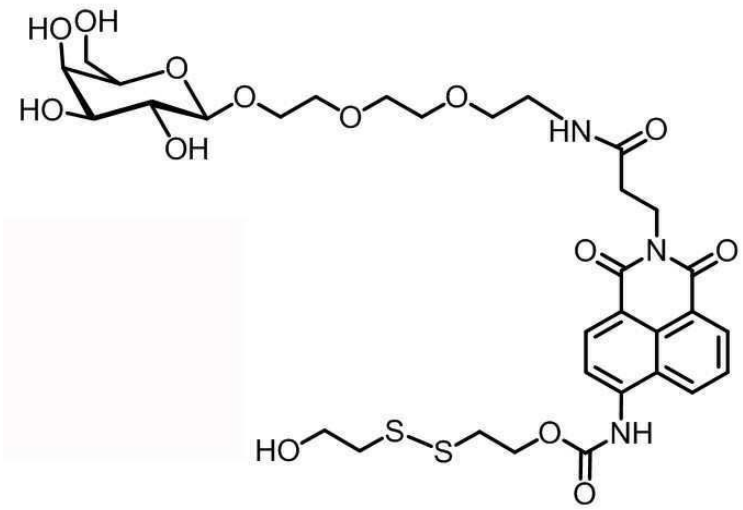
[0045] 본 발명에 따른 화합물 1은 정맥 주사 등에 의해서 생체 내로 손쉽게 주입될 수 있으며, 주입된 화합물 1은 생체내 조직, 특히 간 조직에 의해서 선택적으로 흡수된다. 이어서, 간 조직에 흡수된 화합물 1은 티올에 의해서 유도되는 산화환원 반응에 따른 적색 편이 형광 발광을 나타내는데, 본 발명에 따른 생체내 티올 영상화 방법은 이러한 방출 형광을 화학정량적으로 모니터링함으로써 살아있는 시료 내의 티올 수치를 직접적, 실시간으로 영상화할 수 있게 된다. 따라서, 본 발명에 따른 화합물 1은 이러한 영상화를 위한 용도 이외에도, 유용 분자의 선택적 생체내 전달에도 사용될 수 있다.

[0046] 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.

[0047] 제조예. 본 발명에 따른 형광 표지자의 제조

[0048] 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 형광 표지자인 하기 화학식 1의 화합물을 제조하였다.

[0049] <화학식 1>



[0050]

[0051] 제조예 1.1. 화학식 5의 화합물 합성

[0052] 상기 화학식 4의 화합물, 화학식 5의 화합물 및 아세틸화된 갈락토스아민 (AcGal-NH_2)은 종래 공지된 방법에 의해서 제조하였다 ((a) L. G. F. Patrick, A. Whiting, *Dyes Pigments* **2002**, *55*, 123-132; (b) D. Yuan, R. G. Brown, J. D. Hepworth, M. S. Alexiou, J. H. P. Tyman, *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 397-404; (c) H. Sato, E. Hayashi, N. Yamada, M. Yatagai, Y. Takahara, *Bioconjugate Chem.* **2001**, *12*, 701-710).

[0053] 제조예 1.2 화학식 3의 화합물 합성

[0054] 무수 DMF에 용해된 화합물 4 (0.9 g, 3.1 mmol), EDCI (0.7 g, 3.1 mmol) 및 DMAP (0.8 g, 6.2 mmol)의 혼합물을 질소 분위기의 실온에서 10분 동안 교반하였다. 이어, 혼합물에 AcGal-NH_2 (2.0 g, 3.1 mmol)을 가하였다. 얻어진 반응 혼합물을 밤새 교반하고, 용매를 증발시킨 후, CH_2Cl_2 (100 mL)와 물 (100 mL)을 가하고, 형성된 유기층을 분리하였다. CH_2Cl_2 층을 무수 $MgSO_4$으로 건조시키고, 용매를 제거한 후, 얻어진 조생성물을 CH_2Cl_2/MeOH (v/v, 97:3)를 용리액으로 사용하여 실리카겔 상에서 정제하여 노란색 오일 상태의 화합물 3을 수득하였다 (1.7 g, 72%).

[0055] IR (DCM 용액의 석출물을 NaCl 플레이트 상에서 분석, cm^{-1}): 3370, 3250, 2920, 2870, 1750, 1640, 1580. ESI-MS *m/z* (M^+) 계산값 745.7, 측정값 768.7 ($M+Na^+$). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.45 (d, 1 H, *J* = 7.2 Hz); 8.25-8.18 (m, 2 H); 7.49 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz); 6.76 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz); 6.66 (t, 1 H, *J* = 4.40 Hz); 5.80 (s, 2 H); 5.40 (d, 1 H, *J* = 3.3 Hz); 5.31-5.19 (m, 1 H); 5.05-5.01 (m, 1 H); 5.56 (d, 1 H, *J* = 4.6 Hz); 4.47 (d, 2 H, *J* = 7.2 Hz); 4.19-3.71 (m, 3 H); 3.77-3.47 (m, 12 H); 2.70 (t, 2 H, *J* = 7.2 Hz); 2.13 (s, 3 H); 2.07 (s, 3 H); 2.04 (s, 3 H). 2.00 (s, 3 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 171.3, 170.6, 169.8, 164.7, 164.0, 151.2, 134.2, 131.5, 129.9, 128.3, 122.4, 119.9, 110.1, 109.2, 101.5, 71.0, 70.8, 70.3, 69.8, 69.0, 67.3, 61.5, 39.5, 36.9, 35.3, 20.9 ppm.

[0056] 제조예 1.3 화학식 2의 화합물 합성

[0057] 20 mL의 무수 톨루엔에 용해된 화합물 3 (0.3 g, 0.4 mmol)과 트리포스겐 (0.3 g, 0.8 mmol)의 혼합물에 DIPEA (0.3 mL, 1.4 mmol)를 적가하였다. 얻어진 용액을 3시간 동안 환류하였다. 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 질소기체로 플러싱하였다. 반응하지 않은 트리포스겐 기체를 제거한 후, 증류된 CH_2Cl_2 (5 mL)에 용해된 2,2'-디티오디에탄올 (0.3 g, 2.0 mmol)을 혼합물에 가하였다. 얻어진 반응 혼합물을 밤새 교반한 후, 용매를 증발시키고 CH_2Cl_2 (100 mL)와 물 (100 mL)을 가한 후 유기층을 분리하였다. 무수 $MgSO_4$를 사용하여 CH_2Cl_2 층을 건조시켰다. 용매를 제거한 후, 얻어진 조생성물을 에틸 아세테이트/MeOH (v/v, 98:2)를 용리액으로 사용하여 실리카겔 상에서 정제하여 노란색 오일 상태의 화합물 2를 수득하였다 (150.0 mg, 60%). IR (DCM 용액의 석

출물을 NaCl 플레이트 상에서 분석, cm^{-1}): 3342, 3250, 2919, 1650, 1538. ESI-MS *m/z* (M^+) 계산값 925.3, 측정값 924.4 ($M-H^+$). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.55 (s, 1 H); 8.39-8.28 (m, 3 H); 8.11 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz); 7.55 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz); 6.79 (t, 1 H, *J* = 4.40 Hz); 5.38 (d, 1 H, *J* = 3.1 Hz); 5.22-5.17 (m, 1 H); 5.03-4.99 (m, 1 H); 4.56-4.50 (m, 3 H); 4.41 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz); 4.14-3.67 (m, 3 H); 3.66-3.46 (m, 12 H); 3.08 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz); 2.96 (t, 2 H, *J* = 6.0 Hz); 2.69 (t, 2 H, *J* = 7.1 Hz); 2.14 (s, 3 H); 2.06 (s, 3 H); 2.03 (s, 3 H); 1.97 (s, 3 H). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 171.2, 170.6, 169.8, 164.1, 163.6, 153.6, 139.9, 132.4, 131.3, 128.7, 127.5, 126.4, 123.2, 122.7, 117.2, 101.5, 71.0, 70.8, 70.3, 69.8, 69.0, 67.2, 64.0, 63.7, 61.5, 60.6, 41.8, 39.5, 37.7, 37.1, 34.8, 39.9, 20.8 ppm.

[0058] 제조예 1.4 화학식 1의 화합물 합성

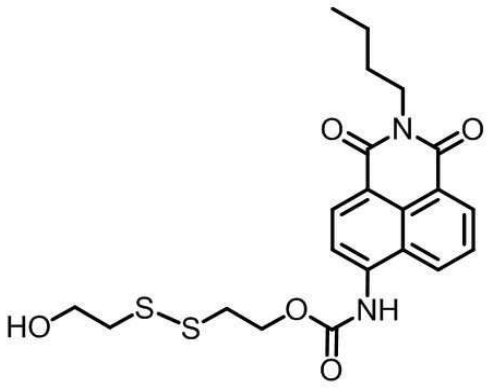
[0059] MeOH (2 mL)에 용해된 화합물 2 (60.0 mg, 0.06 mmol)에 소듐 메톡사이드 (MeOH에 용해된 0.5 M 용액, 129 ㎕)를 가하였다. 얻어진 반응 혼합물을 출발물질이 사라질 때까지 실온에서 교반하였다. 얻어진 용액에 양이온 교환수지 (H^+)를 가하여 중화시키고, 여과 및 MeOH로 세척한 후, 용매를 진공 상태에서 제거하였다. 얻어진 고체를 DCM에서 재결정하여 노란색 고체 상태의 화합물 1을 수득하였다 (30.0 mg, 61%).

[0060] Mp 109-110 ℃. IR (MeOH 용액의 석출물을 NaCl 플레이트 상에서 분석, cm^{-1}): 3340, 2920, 1650, 1540. ESI-MS *m/z* (M^+) 계산값 757.2, 측정값 756.3 ($M-H^+$). ^1H NMR (CD_3OD, 400 MHz): δ 8.56-8.49 (m, 3 H); 8.22 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz); 7.81-7.78 (m, 1 H); 4.51 (t, 2 H, *J* = 6.4 Hz); 4.41 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz); 4.18 (d, 1 H, *J* = 7.5 Hz); 3.95-3.30 (m, 20 H); 3.08 (t, 2 H, *J* = 6.5 Hz); 2.88 (t, 2 H, *J* = 6.7 Hz); 2.60 (t, 2 H, *J* = 7.0 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 173.8, 165.6, 165.0, 155.8, 142.2, 133.1, 132.4, 130.0, 129.9, 127.6, 125.7, 124.0, 119.5, 118.9, 105.1, 76.7, 74.8, 72.5, 71.3, 71.0, 70.5, 70.2, 69.4, 64.7, 62.5, 61.2, 42.2, 40.4, 38.3, 38.1, 35.7 ppm.

[0061] 비교예

[0062] 비교예로서, 갈락토스가 존재하지 하지 않는 구조적 유사체인 하기 화학식 6의 화합물을 제조하였다.

화학식 6

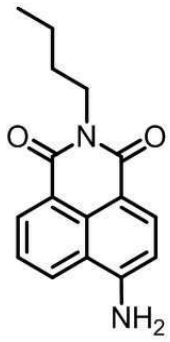
[0063] 

[0064] 20 mL의 톨루엔에 용해된 하기 화학식 7의 화합물 (0.2 g, 0.7 mmol) (L. G. F. Patrick, A. Whiting, *Dyes Pigments* **2002**, *55*, 123-132 및 D. Yuan, R. G. Brown, J. D. Hepworth, M. S. Alexiou, J. H. P. Tyman, *J. Heterocyclic Chem.* **2008**, *45*, 397-404에 기재된 방법에 의해서 제조)과 트리포스겐(0.4 g, 1.4 mmol)의 혼합물에 DIPEA (0.5 mL, 2.5 mmol)를 적가하였다. 얻어진 용액을 3시간 동안 환류하고, 실온으로 냉각한 후, 반응 혼합물을 질소기체로 플러싱하였다. 반응하지 않은 트리포스겐 기체를 제거한 후, CH_2Cl_2 (5 mL)에 용해된 2,2'-디티오디에탄올 (0.6 g, 3.5 mmol)을 혼합물에 가하였다. 얻어진 반응 혼합물을 밤새 교반한 다음, 용매를 증발시키고 CH_2Cl_2 (100 mL)와 물 (100 mL)을 가한 후 유기층을 분리하였다. 무수 $MgSO_4$를 사용하여 CH_2Cl_2

층을 건조시켰다. 용매를 제거한 후, 얻어진 조생성물을 에틸 아세테이트/헥산 (v/v, 3:2)을 용리액으로 사용하여 실리카겔 상에서 정제하여 노란색 고체 상태의 화합물 6을 얻었다 (200.0 mg, 60%).

[0065] Mp 123~124 ℃. IR (DCM 용액의 석출물을 NaCl 플레이트 상에서 분석, cm^{-1}): 3430, 2910, 1640, 1360, 1260. ESI-MS *m/z* (M^+) 계산값 448.1, 측정값 447.1 ($M-H^+$). ^1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 8.62-8.56 (m, 2 H); 8.34 (d, 1 H, *J* = 8.2 Hz); 8.25 (d, 1 H, *J* = 8.5 Hz); 7.82 (br, 1 H); 7.75 (t, 1 H, *J* = 8.0 Hz); 4.56 (t, 2 H, *J* = 6.3 Hz); 4.16 (d, 2 H, *J* = 7.5 Hz); 3.96 (t, 2 H, *J* = 5.6 Hz); 3.06 (t, 2 H, *J* = 6.3 Hz); 2.96 (t, 2 H, *J* = 5.8 Hz); 2.42 (br, 1 H); 1.74-1.67 (m, 2 H); 1.47-1.39 (m, 2 H); 0.97 (t, 3 H, *J* = 7.3 Hz). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 100 MHz): 164.1, 163.6, 152.9, 138.8, 132.4, 131.2, 128.8, 126.6, 126.1, 123.3, 123.0, 117.9, 116.9, 63.8, 60.5, 41.5, 40.2, 37.4, 30.2, 20.4, 13.8 ppm.

화학식 7

[0066] 

[0067] 실시예 1. 스펙트럼 분석

[0068] 생리적 조건 (PBS 완충액, pH 7.4, 37 ℃) 하에 GSH를 가한 후 UV/vis 및 형광 스펙트럼의 변화를 관찰하여 화합물 1의 분광학적 특성을 조사하였다. GSH가 없을 때, 화합물 1은 각각 367 nm와 473 nm 근방에서 넓은 흡수 스펙트럼 및 발광 스펙트럼을 보였다. 이처럼 스토크스 편이 (Stokes shift) (Δλ= 106 nm)가 큰 것은 화합물 1의 아미노나프탈이미드기가 전자 공여체와 수용체를 가지고 있어서 강한 ICT (분자 내 전하이동) 특성을 나타낸다는 것을 보여준다 (도 2).

[0069] 도 3a는 1.0 μM의 화합물 1에 대한 티올기를 갖는 화합물들, 예를 들어 글루타티온 (GSH) 등의 반응성과 티올기를 갖지 않는 다른 화합물들, 예를 들어 발린 등의 반응성을 비교한 도면이다. 또한, 도 3b는 화합물 1이 존재하지 않는 용액의 형광 (Flu) 및 흡수 (Abs) 사진 (도면에서 A 및 C)과, 화합물 1이 존재하는 용액의 형광 및 흡수 사진 (도면에서 B 및 D)을 도시한 도면이다. 도 3a에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 1의 용액에 5.0 mM의 GSH를 가하자 형광강도가 증가하였으며, 흡수 및 형광 스펙트럼의 최대 파장이 각각 428 nm (λ_{abs} = 61 nm) 및 540 nm (λ_{em} = 67 nm)로 상당한 적색 편이를 나타내었다. 또한, 도 3a를 참조하면, GSH가 아닌, 다양한 티올을 갖는 화합물, 예를 들어 시스테인 (Cys), 호모시스테인 (Hcy), 2-아미노에탄티올 (AET), 2-메르캅토에탄올 (ME) 및 디티오트레이톨 (DTT) 등을 가한 경우에도 역시 비슷한 결과가 얻어졌다. 그러나, 발린 이외의 다른 비티올계 아미노산이나 생물학적으로 필수적인 금속이온의 경우에는 이러한 변화가 관찰되지 않았다.

[0070] 또한, pH가 GSH에 의한 이황화 결합의 분리에 미치는 영향을 조사하였다. 도 4는 GSH (5.0 mM)가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에, 화합물 1 (1.0 μM)의 473 nm에서의 형광 강도에 대한 540 nm에서의 형광 강도의 비율 (F_{540}/F_{473})을, pH의 함수로서 표시한 그래프이다 (각각의 지점들은 37℃에서, λ_{ex} = 428 nm로, 3시간 경과 후 측정되었다). 도 4를 참조하면, 화합물 1은 pH 2~10 범위에서 안정적이었으나, 생물학적 pH 범위 (5~10)에서 GSH와 쉽게 반응하였다. 따라서, 화합물 1은 세포 내 티올, 특히 그 중 가장 함량이 높은 GSH를 다른 생물학적 분석물 및 pH에 대한 영향 없이 검출할 수 있다는 것을 알 수 있다.

[0071] 한편, 도 5a 및 5b에는 5.0 mM의 GSH 존재 하에서 시간에 따른 화합물 1의 형광강도의 변화를 도시하였다. 화합물 1의 용액에 GSH를 가하자, 473 nm에서의 방출강도가 일시적으로 증가하면서 16 분 시점에 540 nm에서 새로

운 방출밴드 (녹색 화살표)가 나타났다. 이후, 473 nm에서의 방출강도는 점차 감소하고 540 nm에서의 방출강도는 강화되었으며 (적색 화살표), 492 nm에서 뚜렷한 등흡광점이 나타났다. 100 분이 경과하자, 형광강도는 더 이상 변하지 않았다. 또한, 화합물 1의 용액에 Cys를 가한 경우에도 비슷한 결과가 관찰되었다 (도 6 참조). 이처럼 두 가지의 형광강도가 나타나는 것은 최종 화합물이 얻어지기 전에 중간체가 존재한다는 것을 의미한다. 즉, 도 7에는 화합물 1과 티올기와의 가능한 반응 메카니즘을 도시하였으며, 도 7을 참조하면, 화합물 1의 이황화 결합의 분리반응에 의해 중간체 A가 형성되며, 이어 느린 분자 내 고리화와 인접 카바메이트 결합의 분리에 의해 적색 편이된 아미노나프탈이미드 (도면에서 B)가 형성되는 것을 알 수 있다.

[0072] 도 8a 및 8b에는 GSH의 농도 변화 (0~1.0 mM)에 따른 화합물 1의 형광 스펙트럼 변화를 나타내었다. 형광강도의 비 (F_{540}/F_{473})는 GSH의 농도 (0~0.05 mM)에 대하여 우수한 선형관계 (R = 0.99)를 보이면서 0.7에서 6.7까지 (10 배) 증가하였다 (도 8b 참조). 이러한 결과로부터, 화합물 1을 이용하여 생리적 조건 하에서 높은 마이크로몰 수준을 유지하는 GSH의 농도를 검출할 수 있음을 알 수 있으며, 이는 형광강도의 비율 변화에 의한 GSH의 정량적 측정이 가능하다는 점에서, 특히 그 측정범위가 GSH의 생리적 농도 수준을 포함한다는 점에서 의미가 있다.

[0073] 실시예 2. 배양 세포 내 티올의 검출

[0074] 수용체에 의해 매개되는 엔도시토시스 과정에서 화합물 1을 간세포로 유도하는 갈락토스기를 확인하기 위하여, 화합물 1 및 화합물 6을 각각 HepG2를 포함하는 다양한 세포와 함께 배양하였다. HepG2 세포 내에서 탈시알로당단백질 수용체 발현의 정도는 낮다고 보고된 바 있으며, 비오틴 처리에 의해 유도될 수 있다 ((a) A. M. Pujol, M. Cuillel, O. Renaudet, C. Lebrun, P. Charbonnier, D. Cassio, C. Gateau, P. Dumy, E. Mintz, P. Delangle, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 286-296; (b) J. C. Collins, E. Paiettall, R. Green, A. G. Morell, R. J. Stockert, *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 11280-11283).

[0075] 도 9에는 화합물 1 (10 μM) 및 화합물 6 (1.0 μM)으로 처리된 HepG2, C2C12, HaCat 및 N2a 세포들의 공초점 현미경 영상들을 도시하였다. 세포 영상들은 458 nm의 여기 파장을 사용하고, 530-600 nm의 밴드-경로를 갖는 발광 필터를 사용하여 얻어졌으며, 세포들은 10^{-8}M의 비오틴을 함유하는 배지 내에서 2일 동안 37℃로 배양, 세척한 다음, 화합물 1 또는 6을 함유하는 PBS 용액으로 20분 동안 배양하였다. 두 번째 행 및 네 번째 행의 하단 사진들은 비-공초점 상 대조군과의 형광 영상들을 중첩한 사진들이다.

[0076] 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, HepG2 세포 내에서 화합물 1의 형광강도는 배지 내 비오틴의 존재 여부에 따라 달라지며, 다른 세포에서는 이와 비슷한 변화가 관찰되지 않았다. 화합물 1과는 달리, 화합물 6은 세포의 종류나 배지 내 비오틴의 유무에 무관하게 강한 형광강도를 보인다. 화합물 1과 6의 이러한 관계는 0~10^{-8} M의 다양한 비오틴 농도범위에서도 확인되었다 (도 10 참조).

[0077] 화합물 1 또는 6의 형광강도 변화가 도 7에 도시된 반응에 따른 것인지를 확인하기 위해서, 세포를 티올기와 잘 반응하는 *N*-에틸말레이미드 (NEM)로 처리하고, 화합물 1 또는 6에 의한 세포의 형광강도를 측정하였다. 도 11에서 볼 수 있는 바와 같이, 화합물 1 및 6의 형광 발광은 세포 내 티올 농도에 의존한다. 상기 결과들을 종합해 볼 때, 화합물 1은 HepG2 세포 내에 특이적으로 침투할 수 있는 것을 알 수 있는데, 이는 탈시알로당단백질 수용체에 의한 엔도시토시스에 의한 것으로 판단되며, 이에 따라 S-S 결합의 분리와 1차아민의 형성으로 인해 540 nm에서의 형광강도가 증가하는 것을 추론할 수 있다.

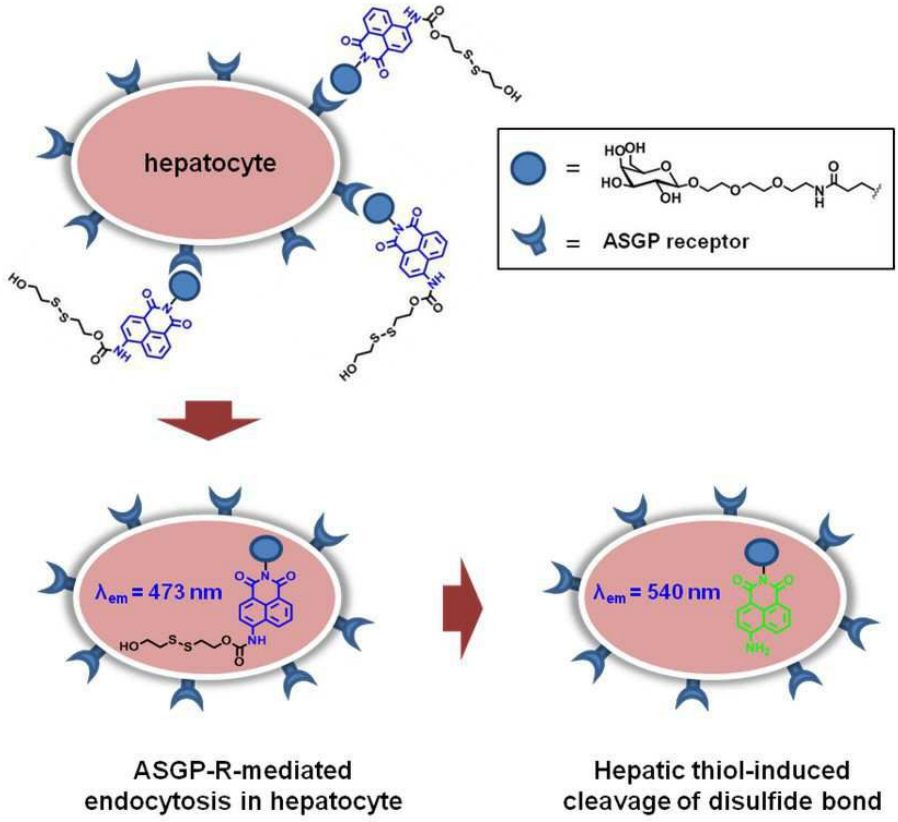
[0078] 한편, 화합물 1에 의한 간 내 티올의 영상화가 동물의 체내에서도 가능한지 여부를 확인하기 위하여, 화합물 1을 쥐의 꼬리정맥 내로 주입하였다. 주입 1.5 시간 후, 쥐를 마취하고 희생시켜 경추탈골하여 희생시켰다. 이어, 각 기관을 빠르게 제거한 후 차가운 PBS 완충액으로 세척하였다. 화합물 1의 각 기관 내 분포를 확인하기 위하여, 공초점 현미경을 사용하여 각 조직 절편 (두께 10 ㎛)의 형광 이미지를 얻었다. 또한, 간세포 표적화 능력의 비교를 위하여 갈락토스 잔기가 없는 화합물 6으로도 쥐를 처리하였으며, 화합물 1 또는 화합물 6을 주입하지 않은 정상 쥐를 대조군으로 사용하였다.

[0079] 도 12는 간, 폐, 신장, 췌장 및 심장에 대한 화합물 1 및 6의 형광 이미지를 도시하였다. 도 12를 참조하면, 화합물 1은 간 (패널 b)에서 선택적으로 축적되어 화학정량 반응에 의한 간 내 티올 이미징이 가능한 반면, 다른 기관 (패널 e, h, k 및 n)의 경우 형광 발광이 거의 없는 것을 알 수 있다. 한편, 화합물 6은 간 (패널 c)과 신장 (패널 i)에서 상당량 축적되는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 화합물 1이 ASGP-R에 의해 매개되는 엔도시토시스에 의해 간조직 내에 선택적으로 흡수되며, 그 결과 티올에 의한 산화환원 반응으로 인해 적색 편

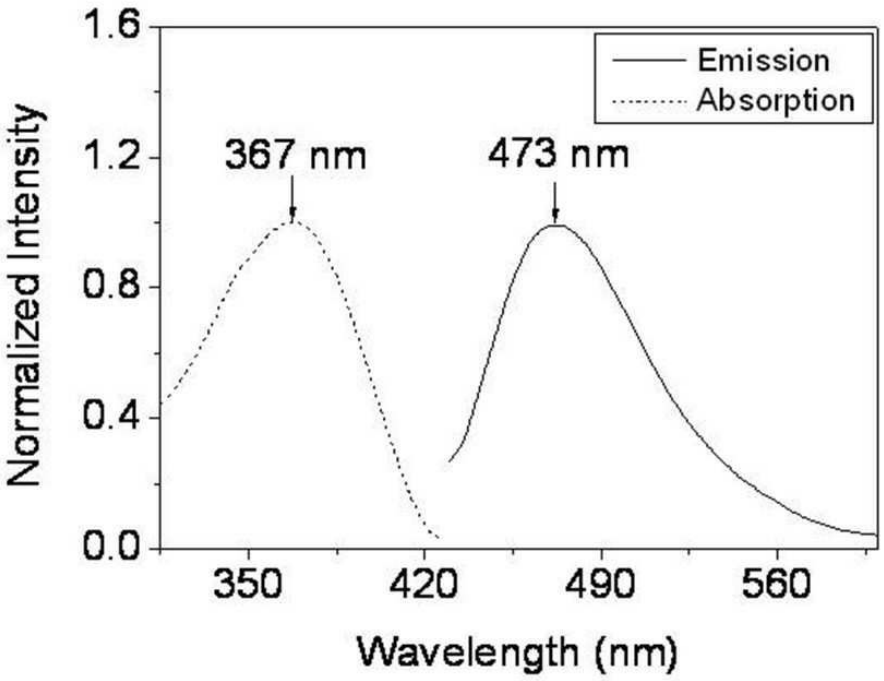
이된 형광 발광이 나타난다는 것을 확인시켜 준다. 따라서, 화합물 1은 생체 내의 간 내 티올 검출에 매우 유용하다는 것을 알 수 있다.

도면

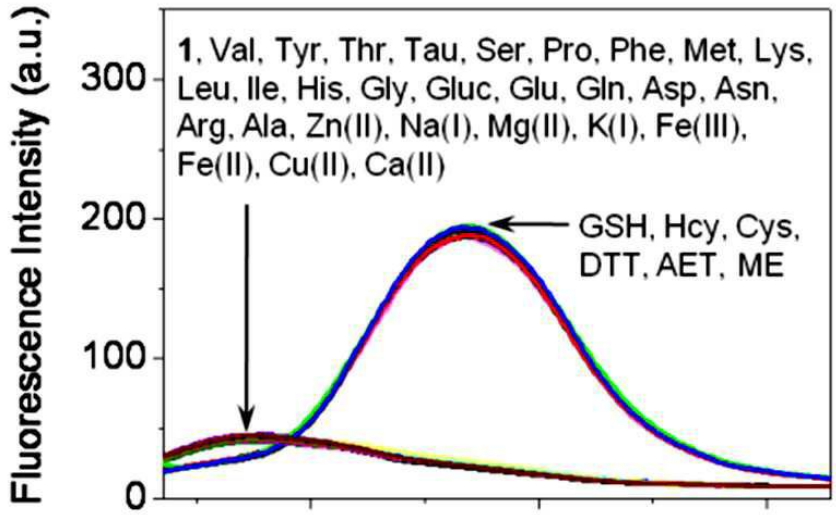
도면1



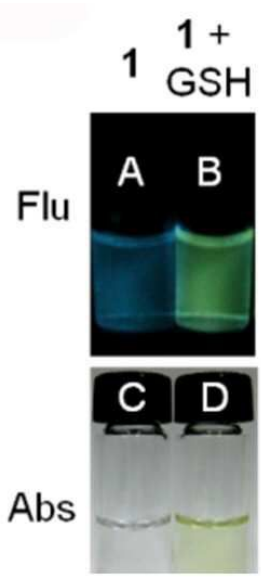
도면2


Emission
Absorption
367 nm
473 nm
Normalized Intensity
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
350
420
490
560
Wavelength (nm)

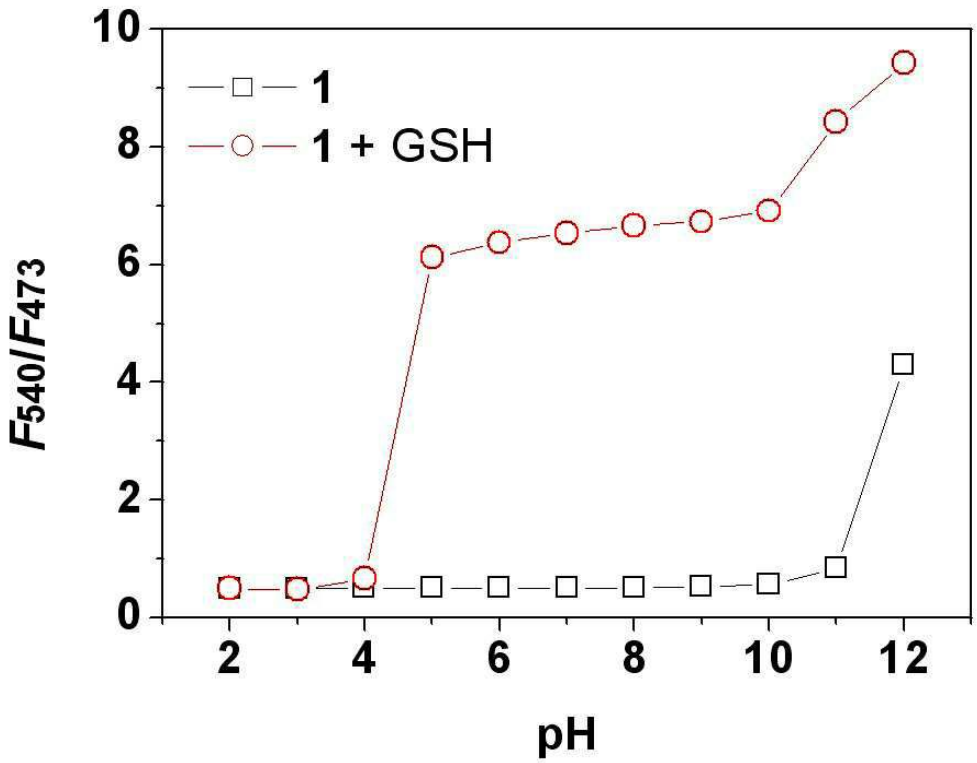
도면3a


1, Val, Tyr, Thr, Tau, Ser, Pro, Phe, Met, Lys, Leu, Ile, His, Gly, Gluc, Glu, Gln, Asp, Asn, Arg, Ala, Zn(II), Na(I), Mg(II), K(I), Fe(III), Fe(II), Cu(II), Ca(II)
GSH, Hcy, Cys, DTT, AET, ME
Fluorescence Intensity (a.u.)
300
200
100
0

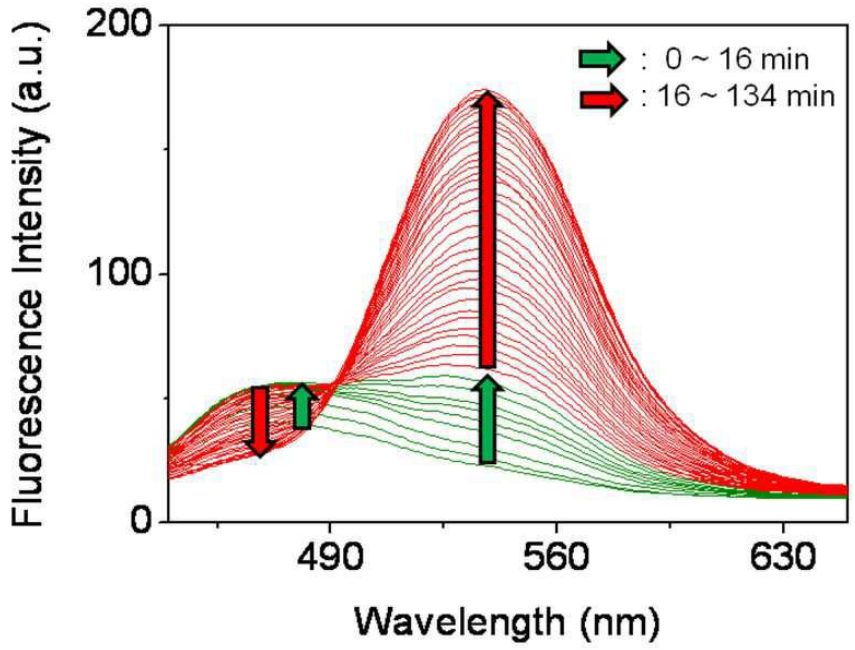
도면3b



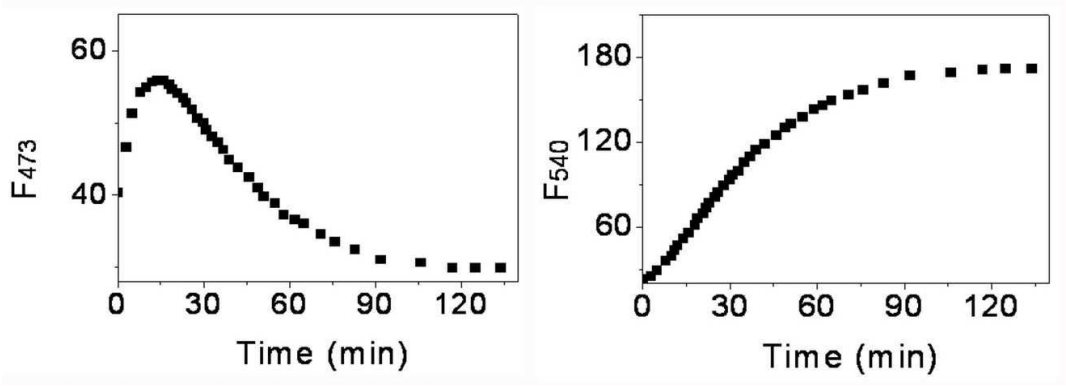
도면4



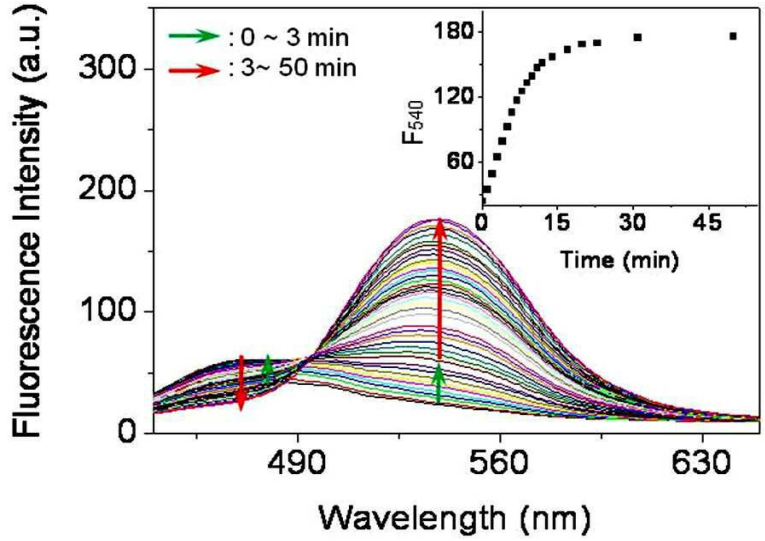
도면5a



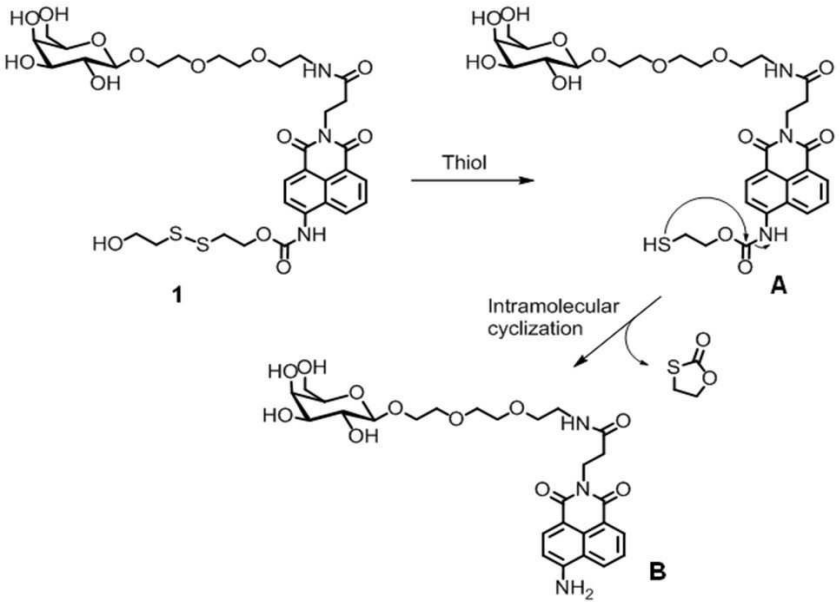
도면5b



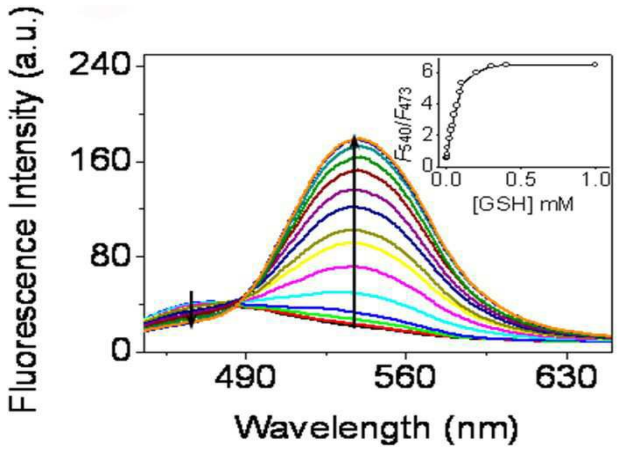
도면6



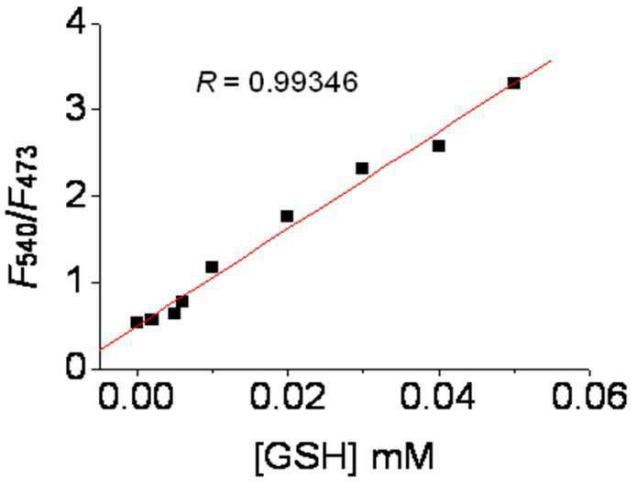
도면7



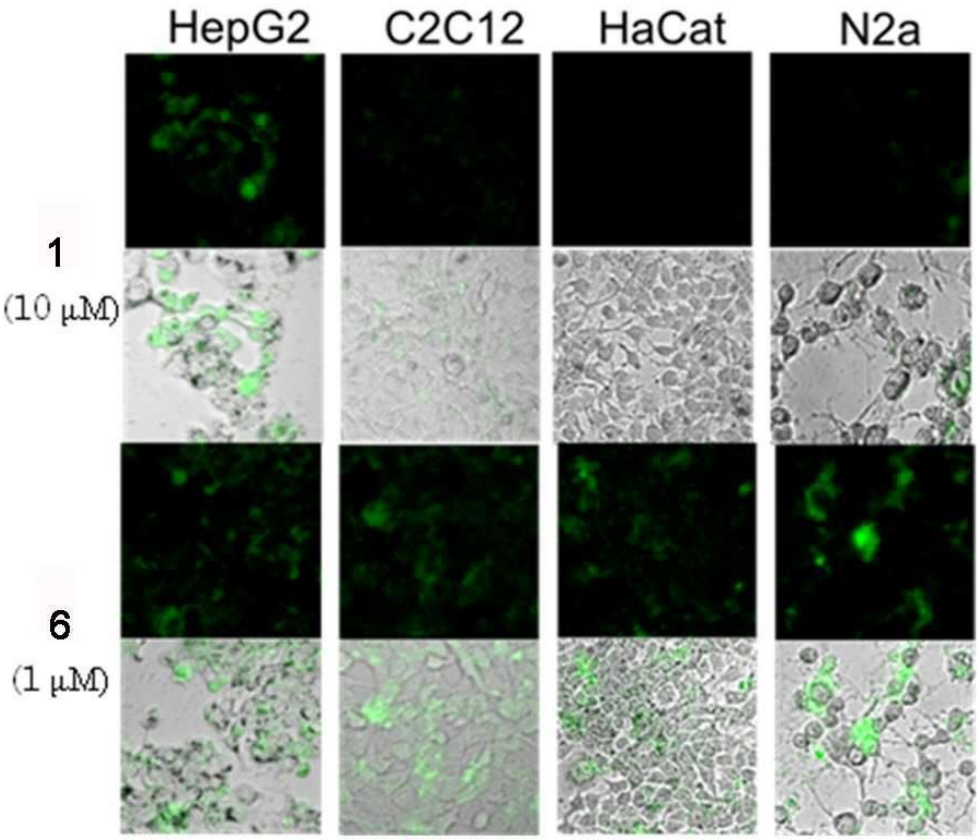
도면8a



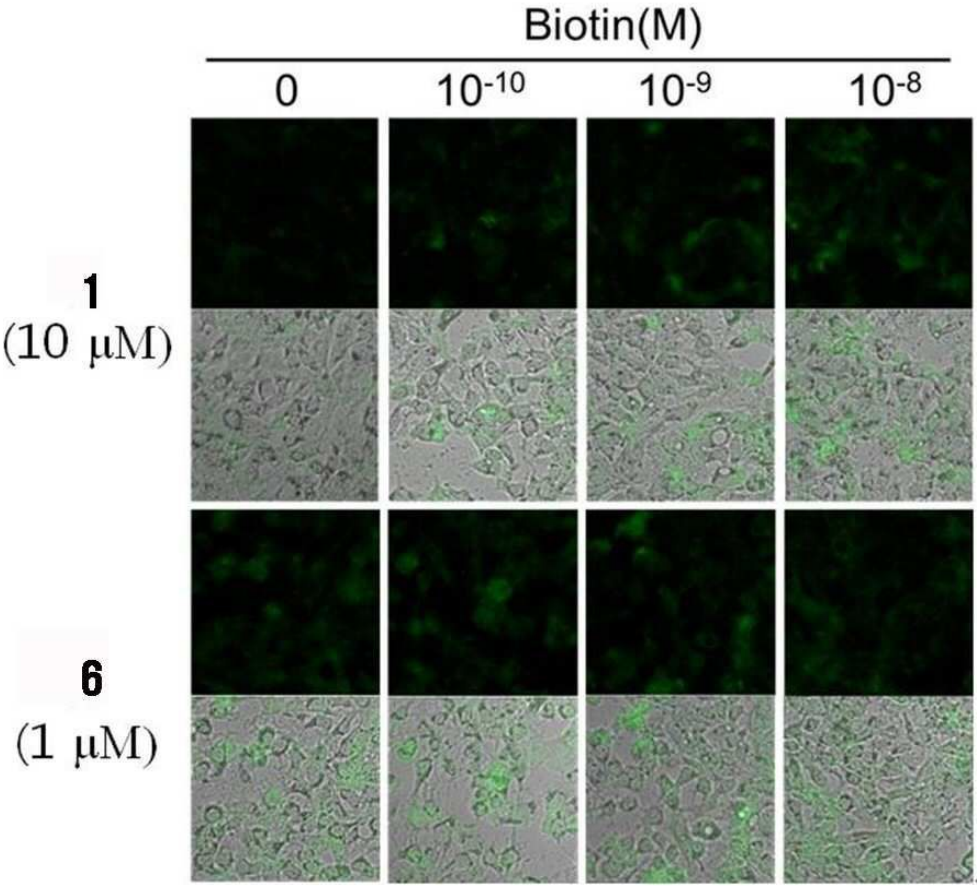
도면8b



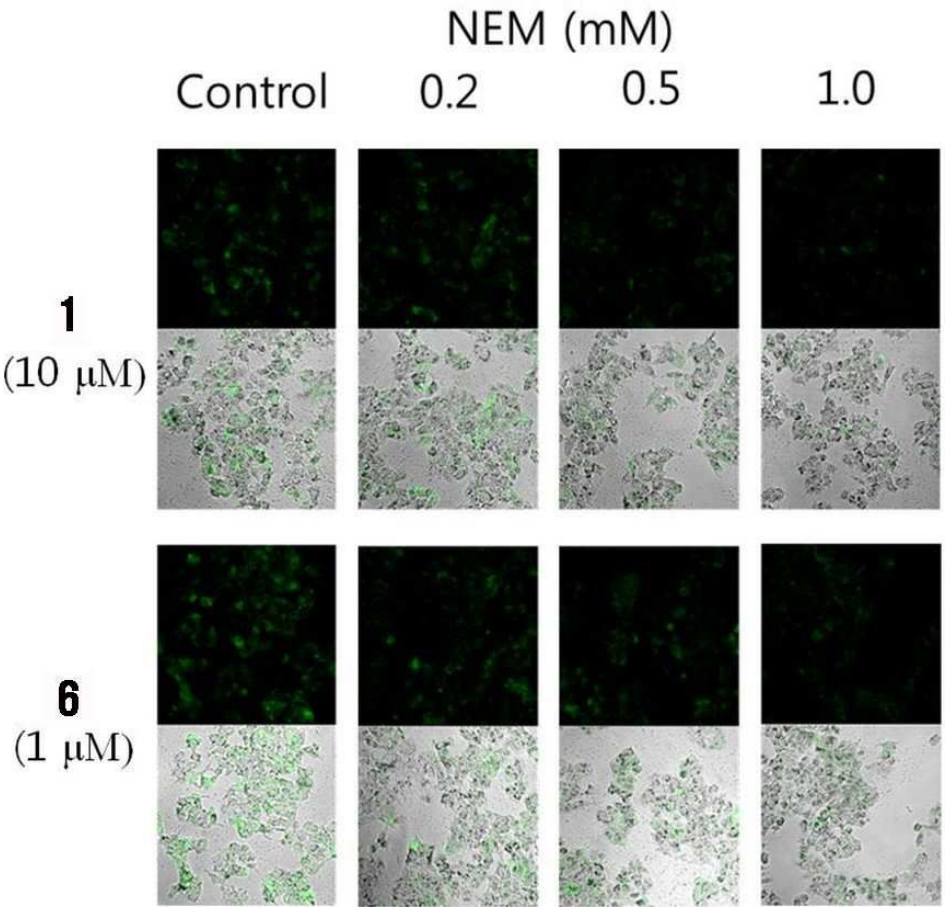
도면9



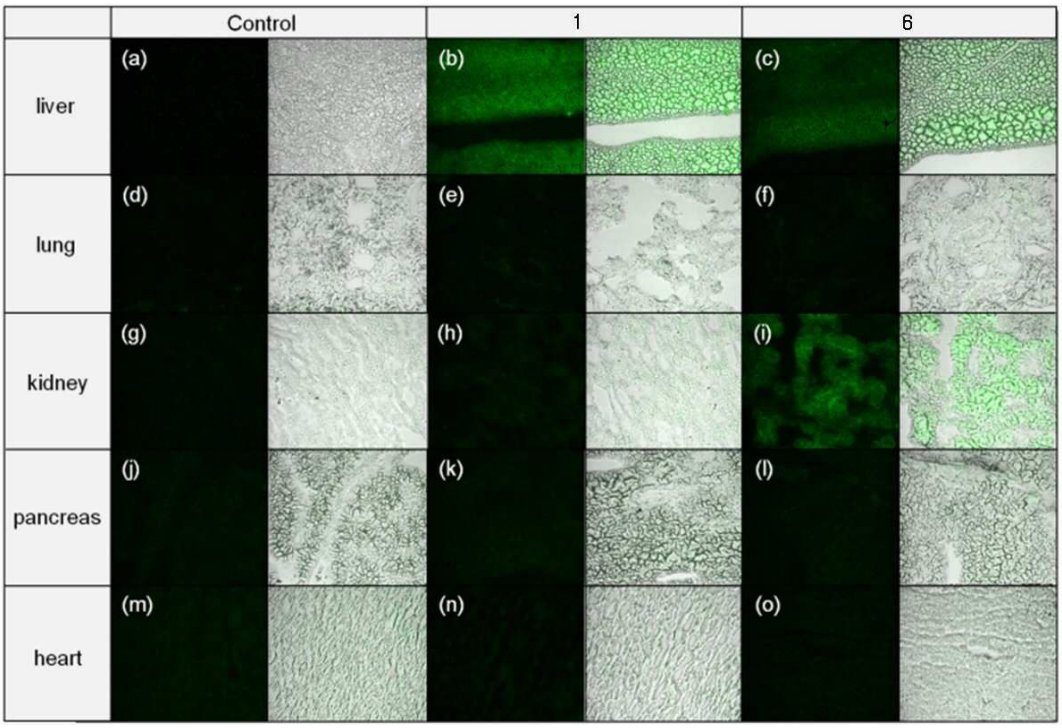
도면10



도면11


NEM (mM)
Control
0.2
0.5
1.0
1
(10 μM)
6
(1 μM)

도면12


Control
1
6
liver
lung
kidney
pancreas
heart
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
(j)
(k)
(l)
(m)
(n)
(o)