

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2014년 1월 16일 (16.01.2014)



(10) 국제공개번호
WO 2014/011005 A1

- (51) 국제특허분류:
G01N 33/50 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)
C07D 401/14 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2013/006288
- (22) 국제출원일: 2013년 7월 12일 (12.07.2013)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2012-0076859 2012년 7월 13일 (13.07.2012) KR
10-2012-0139682 2012년 12월 4일 (04.12.2012) KR
- (71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (EWha UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).
- (72) 발명자: 윤주영 (YOON, Juyoung); 137-795 서울시 서초구 잠원로 14길 23, 207동 1703호 (잠원동, 롯데캐슬아파트), Seoul (KR). 귀즈첸 (GUO, Zhiqian); 120-750 서울시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 종합과학관 D동 501호, Seoul (KR). 신인재 (SHIN, In-jae); 412-745 경기도 고양시 덕양구 백양로 8, 1704동 503호 (화정동, 옥빛마을 17단지아파트), Gyeonggi-do

(KR). 김건희 (KIM, Gun-Hee); 471-735 경기도 구리시 건원대로 34번길 51, 504동 1203호 (인창동, 5단지삼환신일아파트), Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 엠에이피에스 (MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM); 137-810 서울시 서초구 사평대로 343, 4층 (반포동, 제일약품빌딩), Seoul (KR).

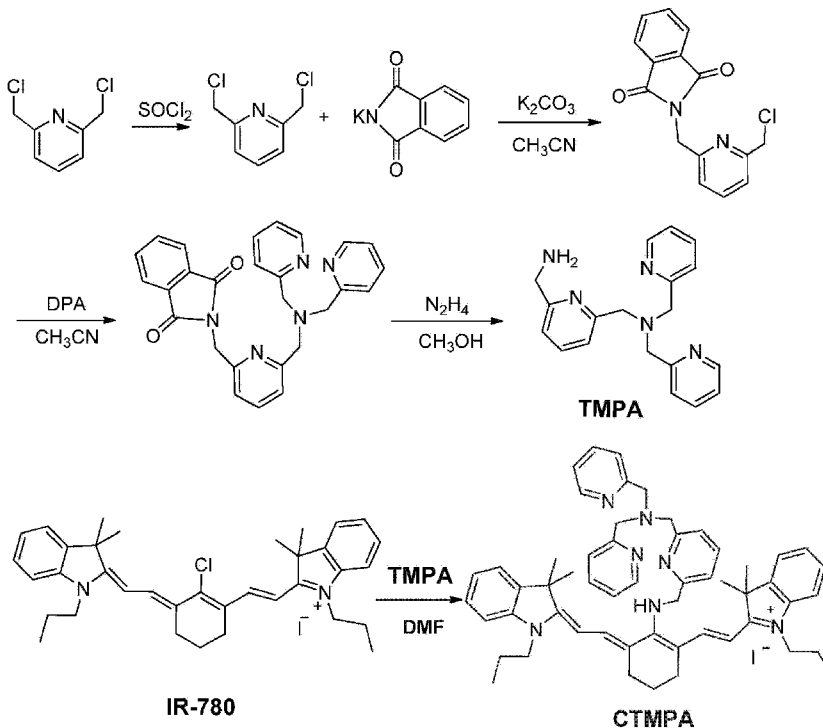
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: CYANINE FLUORESCENT PROBE, METHOD FOR DETECTING ZINC ION USING SAME AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) 발명의 명칭: 시아닌계 형광 프로브, 이를 이용한 아연 이온 검출방법, 및 이의 제조방법



(57) Abstract: The present application relates to a cyanine fluorescent probe, to a method for detecting zinc ion using the cyanine fluorescent probe, to a method for preparing the cyanine fluorescent probe, to a fluorescent sensor comprising the cyanine fluorescent probe and to a cyanine compound.

(57) 요약서: 본원은, 시아닌계 형광 프로브, 상기 시아닌계 형광 프로브를 이용한 아연 이온 검출방법, 및 상기 시아닌계 형광 프로브의 제조방법, 상기 시아닌계 형광 프로브를 포함하는 형광 센서, 및 시아닌계 화합물에 관한 것이다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, **공개:**

MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,

SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,

GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 시아닌계 형광 프로브, 이를 이용한 아연 이온 검출방법, 및 이의 제조방법

기술분야

- [1] 본원은, 시아닌계 형광 프로브, 상기 시아닌계 형광 프로브를 이용한 아연 이온 검출방법, 및 상기 시아닌계 형광 프로브의 제조방법, 상기 시아닌계 형광 프로브를 포함하는 형광 센서, 및 시아닌계 화합물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 아연 이온은 다양한 생물학적인 과정에서 필수적인 성분이고 단백질 내에서 단단하게 결합된 형태로 흔히 존재한다. 게다가, 이동성 있는 세포 내 아연 이온은 또한 뇌, 장, 췌장, 및 망막을 포함한 다양한 인간 조직 내에 존재한다. 더욱이, 아연 이온은 세포사멸(apoptosis)의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 이러한 과정 중에 세포 내 금속 단백질로부터 방출된다. 유리(free) 아연 대사(metabolism)로부터 발생하는 질환들은, 알츠하이머병, 간질, 파킨슨씨병, 뇌졸중, 및 유아 설사증과 같은 많은 생리 상태와 밀접하게 연관된다. 병태생리학적인 과정에서 이동성 아연 이온의 참여의 분자적 근거가 광범위하게 연구되어 왔음에도, 기초적인 의문, 특히 세포사멸의 조절에 있어 이동성 아연 이온에 의해 작용하는 역할에 관한 질문들은 해결되지 않은 채 남아있다. 따라서, 상기 이동성 아연 이온을 정량화하고 시각화하기 위한 개선된 방법들의 개발은 매우 중요하다.
- [3] 형광 센서는 생물학적으로 관련된 종들의 인비트로(in vitro) 및 인비보(in vivo) 수준(level)을 관찰하고 이들의 기능을 이해하기 위한 강력한 도구가 되어 왔다. Zn^{2+} 선택성 형광 센서는 아연 생물학에 대한 많은 정보를 획득하는데 사용되어 왔다. 상기 대부분 분야의 경우에서, 아연 이온에 대한 센서를 개발하는데 사용된 전략은 플루오레세인(fluorescein), 쿠마린(coumarin), 및 4-니트로벤조옥사디아졸(4-nitrobenzooxadiazole)과 같은 형광 발색단에 아연 특이 수용체를 콘쥬게이팅(conjugating)하는 것에 집중되어 왔다. 일부 형광 아연 센서는 생체 세포들 및 해마 절편(hippocampus slices) 내 내인성 Zn^{2+} 를 이미지화하는데 사용되었으며, 더욱 흥미롭게도, 가시광 활성 형광 프로브는 제브라피쉬 발달 중에 내인성 Zn^{2+} 를 추적하기 위해 사용되어 왔다.
- [4] 상기 프로브들의 매력적인 특성에도, 현재 개발된 형광 아연 이온 센서는, 자가형광 autofluorescence), 높은 광산란, 및 상대적으로 낮은 결합 친화성에 의해 일어나는 고유의 시그널 오염(signal contamination)을 포함함으로써 인하여, 일부 심각한 약점을 가지고 있다. 특히, Zn^{2+} 와 결합에 따른 상기 프로브의 최대 흡광 및 발광에서 상대적으로 작은 파장 이동이 부분적으로 발생하는 강한 배경 시그널(background signals)은 심각한 문제이다. 이러한 심각한 문제들의 한계를

극복하기 위하여, 장파장에서 발광하는 높은 아연-선택성 형광 프로브가 생체 세포들 및 생물 내 내인성 아연 이온의 수준을 검출하기 위해 좀 더 바람직하며, 이는 상기 프로브가 낮은 자가형광 배경을 나타내고 생물학적 시료에 손상을 덜 일으키기 때문이다. 게다가, 분석 농도가 두 개의 파장에서 흡광 또는 형광 강도의 비율을 측정함으로써 결정되는 비율계량법(ratiometric method)은 주변 효과를 제거하고 신호 신뢰도(signal fidelity)를 증가시키는 빌트-인 보정(built-in correction)을 제공한다. 지금까지, 장파장에서 발광하는 몇 개의 비율계량 형광 프로브가 내인성 Zn^{2+} 의 인비보(in vivo) 검출을 위해 고안되었다.

- [5] 종래 개발된 방법과 관련된 이러한 한계를 인식해서, 본 발명자들은 생체 세포들 및 생물 내 아연 이온에 반응하여 큰 발광 파장 변화를 나타내는 고선택성의 장파장-흡수 형광 Zn^{2+} 센서를 개발하는 데 목표를 두는 연구를 수행해 왔다. 생체 세포 및 생물 내의 아연 검출에 대한 고감도 및 고선택성 검출용 프로브의 요구에도, 아직 고감도 및 고선택성 아연 형광 프로브에 대한 많은 연구가 이루어지지 않고 있다. 예를 들어, "서로 다른 형광색의 이광자 형광 프로브를 이용하여 나트륨/칼슘 활성을 동시에 이미지화하는 방법 및 이광자 형광 프로브의 제조방법[대한민국 공개특허 제2012-00013627호]" 등의 연구에서 형광 프로브를 이용한 나트륨/칼슘 활성을 이미지화하는 방법에 관한 연구가 있었다. 그러나 고감도 및 고선택성 아연 형광 프로브에 대한 연구 보고는 거의 이루어져 있지 않다.

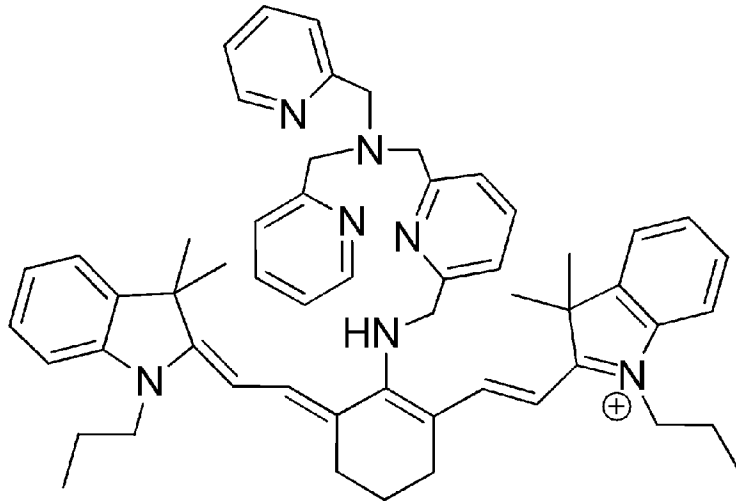
발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 본원은, 장파장에서 발광하는 아연-선택성 프로브로서, 아연에 대한 고감도 및 고선택성을 가지며, 생체 세포들 및 생물 내 내인성 아연과 반응하여 최대 발광 파장에서 청색에서 적색으로 변화를 나타내고 큰 단파장 이동이 나타나는 아연 이온 검출용 시아닌 유도체로서, 시아닌계 형광 프로브, 상기 시아닌계 형광 프로브를 이용한 아연 이온 검출방법, 및 상기 시아닌계 형광 프로브의 제조방법을 제공하고자 한다.
- [7] 그러나 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않는 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

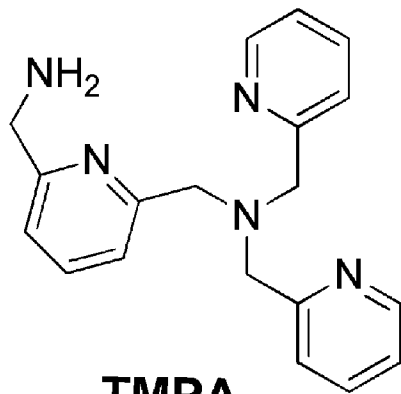
- [8] 본원의 제 1 측면은, 하기의 화학식 1로서 표시되는 화합물을 포함하는 시아닌계 형광 프로브를 제공할 수 있다:
- [9] [화학식 1]
- [10]

**CTMPA**

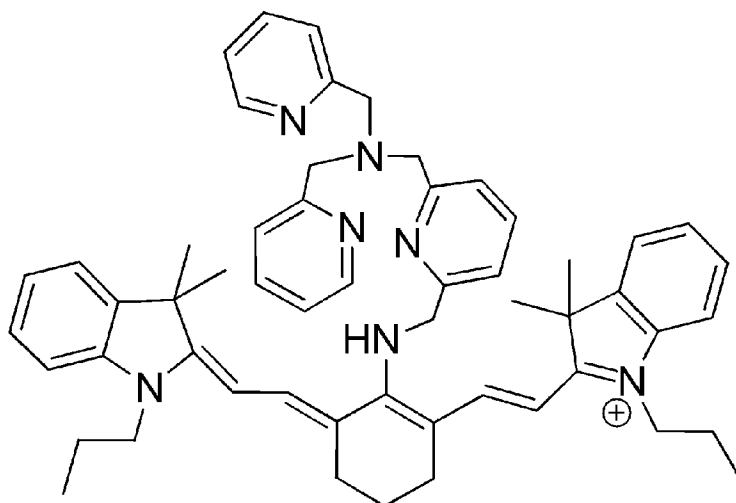
- [11] 본원의 제 2 측면은, 상기 시아닌계 형광 프로브를 이용하는, 생체 내 아연 이온 검출방법을 제공할 수 있다.
- [12] 본원의 제 3 측면은, 하기 화학식 2로서 표시되는 TMPA를 염화 트리카르보시아닌과 반응시키는 것을 포함하는, 시아닌계 형광 프로브의 제조방법을 제공할 수 있다:

[13] [화학식 2]

[14]

**TMPA**

- [15] 본원의 제 4 측면은, 상기 시아닌계 형광 프로브를 포함하는 형광 센서를 제공할 수 있다.
- [16] 본원의 제 5 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는 시아닌계 화합물을 제공할 수 있다:
- [17] [화학식 1]
- [18]



CTMPA

발명의 효과

- [19] 본원의 발명에 따라 고감도 및 고선택성 시아닌계 형광 센서가 제조될 수 있고, 상기 시아닌계 형광 센서는 생체 세포들 및 생물 내 내인성(endogenous) Zn^{2+} 이온을 검출하는데 이용될 수 있다. 본원에 따른 형광 센서에 포함되는 시아닌계 형광 프로브는, CTMPA의 용액에 Zn^{2+} 가 첨가되면, 육안으로 쉽게 판별될 수 있는 청색에서 밝은 적색으로의 색변화가 발생되고, 동시에 CTMPA의 최대 발광 내에서 현저하게 큰 단파장 이동(hypsochromic shift)이 약 730 nm에서 약 590 nm으로, 약 140 nm 파장 변화를 보이며, 셀 이미지 또는 신경 소구의 이미지 검출도 가능하다. 본원에 따른 CTMPA는 Zn^{2+} 에 의하여 유도된 큰 스펙트럼 이동(spectral shift), 낮은 형광 백그라운드(fluorescence background), 및 Zn^{2+} 에 대한 고감도를 포함하는 유용한 특징 때문에 생체 세포들 및 생물 내 아연 이온을 검출하는데 사용될 수 있다. 상기 CTMPA가 세포사멸(apoptosis) 중에 방출된 내인성 아연 이온을 관찰하기 위하여 사용될 수 있고, 상기 프로브는 제브라피쉬(zebrafish) 발달 과정 중에 무손상(intact) Zn^{2+} 를 추적하는데 사용될 수 있다. 상기 CTMPA의 낮은 백그라운드 및 고감도 때문에, 본원에 따른 CTMPA는 제브라피쉬 내 신경소구(neuromasts)의 첫 번째 형광 검출용 프로브로서, 아연 생물학 연구에서 매우 유용하게 이용될 수 있다. 최종적으로, 금속 이온 배위결합에 의해 촉진된 시아닌 분자들의 π -전자 공액계이전 길이의 변화에 의존하는 전략은 신규 시아닌계 프로브의 창출을 위한 커다란 잠재력을 가짐을 보여줄 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [20] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 형광 Zn^{2+} 프로브 CTMPA의 합성을 나타낸 개략도이다.
- [21] 도 2a 내지 도 2d는, 본원의 일 실시예에 따른 10% CH_3CN 를 포함하는 HEPES

완충액(10 mM, pH = 7.4) 중 Zn^{2+} (0 μ M, 0.5 μ M, 1.0 μ M, 1.5 μ M, 2.0 μ M, 2.5 μ M, 3.0 μ M, 3.5 μ M, 4.0 μ M, 4.5 μ M, 및 5.0 μ M)를 이용하여 적정한 CTMPA (5.0 μ M)의 흡광 및 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[22] 도 3은 본원의 일 구현예에 따른 Zn^{2+} 에 대한 CTMPA의 제시된 결합 모드를 나타내는 개략도이다.

[23] 도 4a는 본원의 일 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 pH 프로파일을 나타낸 것이고, 도 4b는 본원의 일 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 흡광도 변화를 나타낸 것이고, 도 4c는 본원의 일 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 730 nm에서 형광 강도 변화($\lambda_{ex} = 670$ nm)를 나타낸 것이며, 도 4d는 본원의 일 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 I_{590nm}/I_{730nm} 의 형광 강도 비율($\lambda_{ex} = 560$ nm)을 나타낸 것이다.

[24] 도 5는 본원의 일 구현예에 따른 CTMPA의 제시된 pH-반응 모드에 대한 개략도이다.

[25] 도 6a는 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA의 Zn^{2+} 유무에 따른 수소 넘버링을 나타낸 것이고, 도 6b는 본원의 일 실시예에 따른 Zn^{2+} 를 이용하여 적정 과정에서 CD_3CN 내 CTMPA의 1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 여기서, (i)는 유리 CTMPA의 스펙트럼이며, (ii)는 $[Zn^{2+}]/[CTMPA]$ 의 0.5 : 1의 혼합물의 스펙트럼이고, (iii)는 $[Zn^{2+}]/[CTMPA]$ 의 1 : 1의 혼합물의 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[26] 도 7은 본원의 일 실시예에 따른 CD_3CN 중 Zn^{2+} 적정 과정에서 CTMPA의 1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[27] 도 8a는 본원의 일 실시예에 따른 $CH_3CN-HEPES$ (1:9) ($\lambda_{ex} = 560$ nm) 중 Zn^{2+} 적정을 이용한 CTMPA (1 μ M)의 흡광 스펙트럼을 나타낸 것이고, 도 8b는 본원의 일 실시예에 따른 $CH_3CN-HEPES$ (1:9) ($\lambda_{ex} = 560$ nm) 중 Zn^{2+} 적정을 이용한 CTMPA (1 μ M)의 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다.

[28] 도 9a는 본원의 일 실시예에 따른 완충용액 중 CTMPA (1 μ M) 대 $\log_{10} C_{[Zn^{2+}]_{free}}$ 의 흡광비율 ($A_{510\text{ nm}}/A_{670\text{ nm}}$)을 나타내는 그래프이고, 도 9b는 본원의 일 실시예에 따른 완충용액 중 CTMPA (1 μ M) 대 $\log_{10} C_{[Zn^{2+}]_{free}}$ 의 형광비율 ($I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$)을 나타내는 그래프이다.

[29] 도 10은 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA의 금속 이온 선택성을 보여주는 막대그래프이다.

[30] 도 11은 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 외인성 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다.

[31] 도 12는 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 세포사멸 중에 방출된 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 무손상 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다.

[32] 도 13은 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3

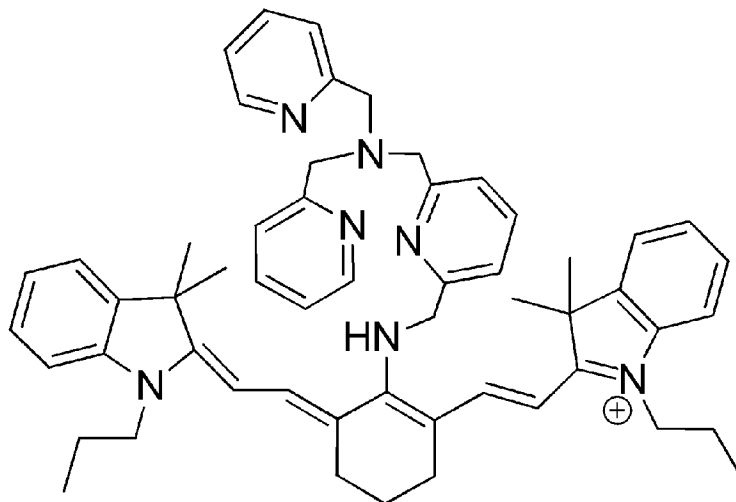
세포들 내 사멸세포 중에 방출된 무손상 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다.

- [33] 도 14는 본원의 일 실시예에 따른 1 시간 동안 CTMPA를 이용하여 배양된 수정 후 (a) 24 시간, (b) 36 시간, (c) 48 시간, (d) 72 시간, 및 (e) 96 시간 경과된 제브라피쉬 내 무손상 아연 이온의 형광 검출 사진이다.
- [34] 도 15는 본원의 일 실시예에 따른 CTMPA를 이용한 제브라피쉬 내 내인성 아연 이온의 검출을 나타내는 사진이다.
- [35] 도 16은 본원의 일 구현예에 따른 (A) 측면 및 (B) 등쪽면 영역에서의 그룹화시킨 생체에 따른 신경소구의 분포를 도시화한 이미지이다. 상안와 영역 (supraorbital region)은 시각교차앞 (preoptic, PO), 및 상안와 (supraorbital, SO) 신경소구를 포함한다. 미골-두개골 영역 (caudal-cranial region)은 귀 (otic, O), 후두부 (occipital, OC), 등 (dorsal, D) 및 중간열 (middle, MI) 신경소구를 포함하며, 후부 (posterior, P) 신경소구는 트렁크(trunk) 영역 내 놓여진 것이다.
- [36] 도 17a 내지 도 17h는 본원의 일 실시예에 따른 화합물들의 NMR 및 질량 분석기 스펙트럼을 각각 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [37] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [38] 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [39] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.
- [40] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [41] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는, "A 또는 B, 또는 A 및 B"를

[44]



[47] 이러한 장애를 극복하기 위하여, 상기 π -전자계의 콘쥬게이션의 정도에 있어 변화에 의존하는 상기 시아닌 부위의 최대 흡광 및 발광에서 상당한 파장 이동이 발생하도록 신규 전략이 채택될 수 있다. 상기 시아닌계 Zn^{2+} -선택성 프로브를 디자인하는데 있어서 두 가지 요소가 고려될 수 있다. 첫 번째 요소로서, 상기 프로브는 Zn^{2+} 에 강하고 선택적인 결합을 나타내는 부위를 함유해야 한다는 것이다. 이러한 목적을 위하여, 트리스-피리딘 부위(TMPA)의 큰 Zn^{2+} 결합 친화성 때문에 트리스-피리딘 부위(TMPA)가 상기 프로브 내로 도입될 수 있다(도 1 참조). 두 번째 요소로서, 좀 더 중요하게, 상기 센서는 Zn^{2+} 결합이 상기

트리카르보시아닌 발색단/형광단의 폴리메틴 π -전자계 상에 메조-치환기의 효과를 변경할 수 있도록 하는 특징을 포함해야 한다는 것이다. 이러한 방법이 있어서, Zn^{2+} 의 결합은 최대 흡광 및 발광에 있어서 큰 이동을 초래해서, 낮은 형광 배경을 나타낼 것이다.

- [48] 이러한 기준을 토대로 해서, Zn^{2+} 의 복합체화(complexation)에 따른 상기 시아닌 발색단/형광단의 π -전자계 내에 명확하고 가역적인 변화를 가지는 것이 예상되는 상기 형광 Zn^{2+} 프로브 CTMPA가 내인성 아연 이온의 인비보(in vivo) 검출을 위한 센서로서 고안될 수 있다(도 1). 하기에, CTMPA의 제조 및 이것의 인비보(in vivo) 응용을 탐구하는 연구의 결과가 설명된다. 이러한 노력으로 얻어진 관찰은 CTMPA가 Zn^{2+} -유도된 큰 흡광 및 발광 파장 이동, 낮은 형광 배경, 및 생체 세포들 및 생물 내 내인성 Zn^{2+} 를 추적하게 하는 특유의 적용가능성을 포함하는 여러 가지의 유용한 특징이 있다는 것을 입증할 수 있다.
- [49] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시아닌계 형광 프로브가 아연 이온(Zn^{2+}) 검출용으로 사용되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [50] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물이 아연 이온(Zn^{2+})과 반응하여 착물을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물을 포함하는 시아닌계 형광 프로브가 생체 내 내인성 아연 이온(Zn^{2+})을 검출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [51] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와 반응하여 최대 발광 파장에서 청색에서 적색으로 색변화가 나타나는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [52] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와의 반응에 의해 발광 파장 및 흡광 파장에서 단파장 이동을 나타내는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [53] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와의 반응에 의해 최대 발광 파장에서, 약 730 nm에서 약 590 nm으로 단파장 이동이 나타나는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [54] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물 (CTMPA) 내의 피리딘 및 메조-치환되는 질소가 상기 Zn^{2+} 과 반응하여 배위결합하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [55] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 1로서 표시되는 화합물 (CTMPA)과 상기 Zn^{2+} 가 약 1 : 약 1의 비율로 복합체를 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [56] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시아닌계 형광 프로브가 생체 내 내인성 아연 이온(Zn^{2+})을 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.
- [57] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시아닌계 형광 프로브가 아연 이온을 nM 범위 내에서 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다. 상기 시아닌계 형광

프로브는, 예를 들어, 약 0.1 nM 내지 약 1,000 nM, 약 0.1 nM 내지 약 500 nM, 약 0.1 nM 내지 약 100 nM, 약 0.1 nM 내지 약 80 nM, 약 0.1 nM 내지 약 50 nM, 약 0.1 nM 내지 약 30 nM, 약 0.1 nM 내지 약 10 nM, 약 0.1 nM 내지 약 5 nM, 약 0.1 nM 내지 약 1 nM, 약 1 nM 내지 약 1,000 nM, 약 1 nM 내지 약 500 nM, 약 1 nM 내지 약 100 nM, 약 1 nM 내지 약 80 nM, 약 1 nM 내지 약 50 nM, 약 1 nM 내지 약 30 nM, 약 1 nM 내지 약 10 nM, 약 1 nM 내지 약 5 nM, 약 5 nM 내지 약 1,000 nM, 약 5 nM 내지 약 500 nM, 약 5 nM 내지 약 100 nM, 약 5 nM 내지 약 80 nM, 약 5 nM 내지 약 50 nM, 약 5 nM 내지 약 30 nM, 약 5 nM 내지 약 10 nM, 약 10 nM 내지 약 1,000 nM, 약 10 nM 내지 약 500 nM, 약 10 nM 내지 약 100 nM, 약 10 nM 내지 약 80 nM, 약 10 nM 내지 약 50 nM, 약 10 nM 내지 약 30 nM, 약 30 nM 내지 약 1,000 nM, 약 30 nM 내지 약 500 nM, 약 30 nM 내지 약 100 nM, 약 30 nM 내지 약 80 nM, 약 30 nM 내지 약 50 nM, 약 50 nM 내지 약 1,000 nM, 약 50 nM 내지 약 500 nM, 약 50 nM 내지 약 100 nM, 약 50 nM 내지 약 80 nM, 약 80 nM 내지 약 1,000 nM, 약 80 nM 내지 약 500 nM, 약 80 nM 내지 약 100 nM, 약 100 nM 내지 약 1,000 nM, 약 100 nM 내지 약 500 nM, 또는 약 500 nM 내지 약 1,000 nM의 아연 이온을 검출할 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

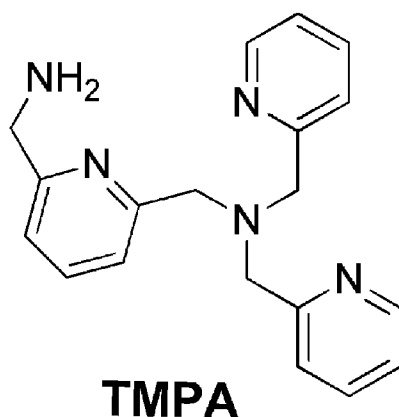
[58] 본원의 제 2 측면은, 상기 시아닌계 형광 프로브를 이용하는, 생체 내 아연 이온 검출방법을 제공할 수 있다.

[59] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 검출방법은 생체 내 내인성 아연 이온의 분포를 이미지화할 수 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[60] 본원의 제 3 측면은, 하기 화학식 2로서 표시되는 TMPA를 염화 트리카르보시아닌과 반응시키는 것을 포함하는, 시아닌계 형광 프로브의 제조방법을 제공할 수 있다:

[61] [화학식 2]

[62]



[63] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 TMPA와 상기 염화 트리카르보시아닌은 아르곤 분위기 하에서 약 70°C 내지 약 100°C에서 가열하여 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[64] 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 시아닌계 형광 프로브를 정제시키는 것을

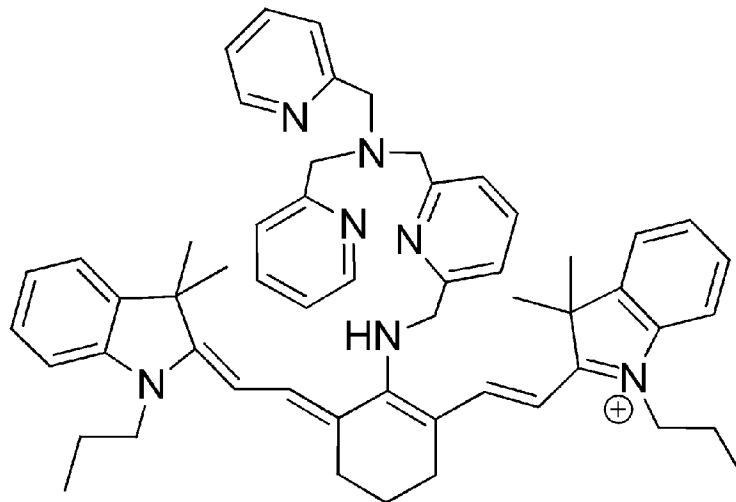
추가 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않을 수 있다.

[65] 본원의 제 4 측면은, 상기 시아닌계 형광 프로브를 포함하는 형광 센서를 제공할 수 있다.

[66] 본원의 제 5 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는 시아닌계 화합물을 제공할 수 있다:

[67] [화학식 1]

[68]



CTMPA

[69] 본원의 제 2 측면 내지 제 5 측면은 각각 본원의 제 1 측면에 따른 시아닌계 형광 프로브를 이용하는, 생체 내 아연 이온 검출방법, 본원의 제 1 측면에 따른 시아닌계 형광 프로브의 제조방법, 상기 시아닌계 형광 프로브를 포함하는 형광 센서, 및 상기 화학식 1로서 표시되는 시아닌계 화합물에 관한 것으로서, 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 2 측면 내지 제 5 측면 각각에서 그 설명이 생략되었더라도 동일하게 적용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 이하, 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본원이 이러한 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

[71] [실시예]

[72] 실시예 1: 시아닌계 형 프로브 유도체 및 제조

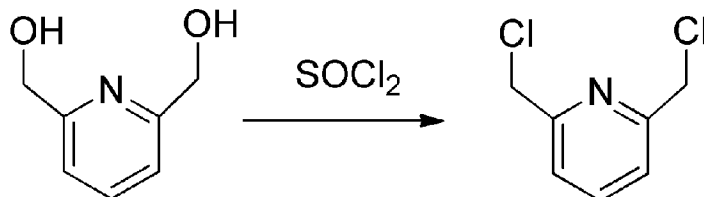
[73] 물질 및 방법

[74] 별다른 언급이 없는 한, 물질들은 Aldrich의 제품을 사용하였고, 추가적 정제 없이 사용되었다. ^1H NMR 및 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Bruker AM-300분광계를 사용하여 내부 표준물질로서 테트라메틸실란(TMS)을 포함하는 CDCl_3 용액 상에서 측정되었다. 질량 스펙트럼은 JMS-HX 110A/110A Tandem 질량 분석기(JEOL)를 사용하여 획득하였다. UV-VIS 스펙트럼은 25°C에서 Scinco

3000 분광광도계 (1 cm 석영 셀)를 사용하여 획득하였다. 형광 스펙트럼은 25°C에서 RF-5301/PC (Shimada) 형광 분광광도계 (1 cm 석영 셀)상에서 기록되었다. 탈이온수는 모든 수성 용액을 제조하기 위하여 사용되었다.

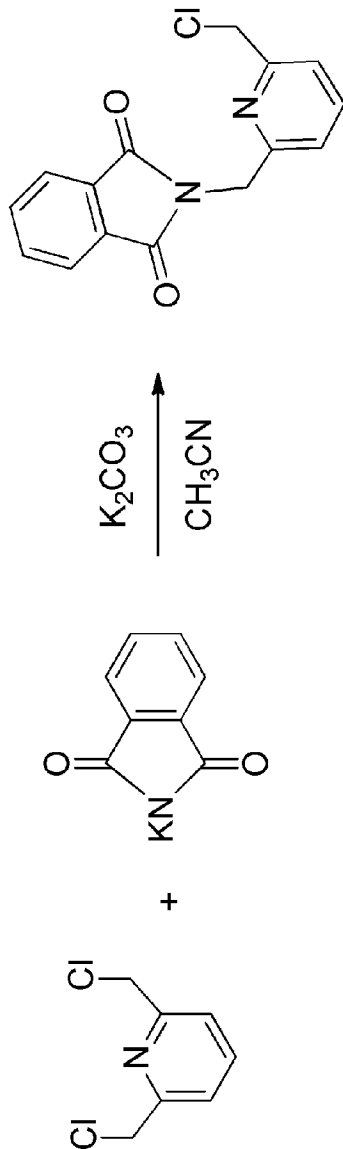
[75] TMPCl를 비롯한 CTMPA의 합성을 위한 전구체 합성

[76]



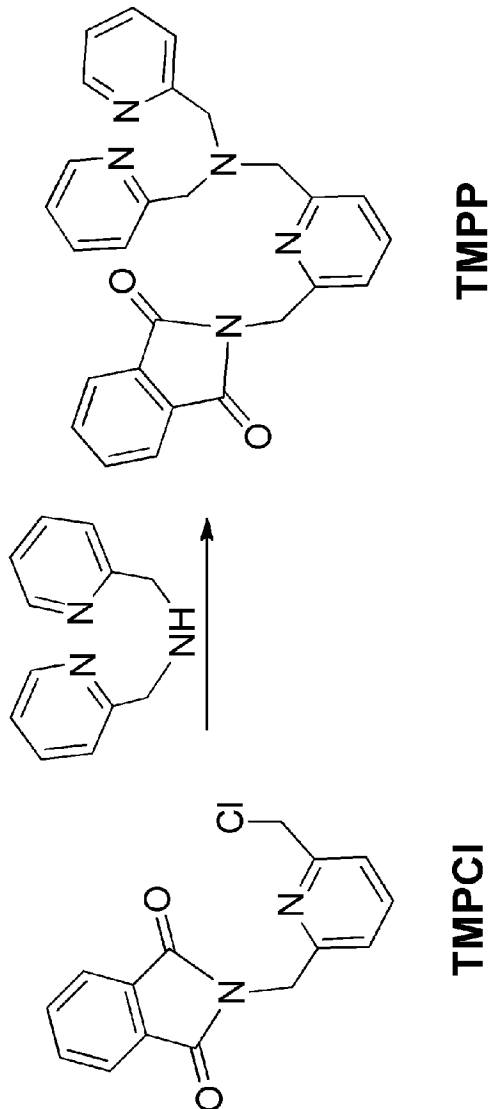
[77] 티오닐 클로라이드 (15 mL)를 30 분에 걸쳐 0°C에서 추가 깔때기를 통하여 2,6-비스(하이드록시메틸)피리딘 (2.0 g, 14.4 mmol)에 첨가시켰다. 실온에서 따뜻하게 한 후, 상기 반응 혼합물은 5 시간 동안 열처리하여 환류시켰고, 그리고 나서 실온으로 냉각시켰다. 톨루엔 (20 mL)이 백색 고체를 침전시키기 위하여 상기 혼합물에 천천히 첨가되었다. 상기 여과된 염산염이 200 mL 물 중에 용해되었고, 고체 Na_2CO_3 은 pH 7에 도달할 때까지 천천히 상기 용액에 첨가되었다. 백색 고체를 침전시켜, 여과시키고, 물을 이용하여 반복적으로 세척시켰다. 상기 미정제 생성물을 석유 에테르로부터 재결정화시켜서, 무색 바늘형 (needle)으로서 생성물이 제공되었다: ^1H NMR (CDCl_3 , 300 MHz) δ 7.78 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, 피리딘-H), 7.46 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, 피리딘-H), 4.67 (s, 4 H, Py-CH_2 -).

[78]



- [79] CH_3CN 30 mL 중 2,6-비스(클로로메틸)피리딘 (1.25 g, 0.71 mmol)의 용액에 프탈이미드 및 K_2CO_3 (1.32 g, 0.71 mmol)를 첨가시켰다. 상기 반응 혼합물은 열처리되어 밤새 환류시키고, 그리고 나서 실온에서 냉각시켰다. 상기 혼합물은 여과시키고, 감압 하에 농축시켜 백색 고체가 제공되었다. 상기 미정제 생성물은 에틸 아세테이트/헥산 1 : 1 (v/v)을 이용하여 용출되는 실리카 겔 상에 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제되어 백색, 바늘형 결정 생성물이 제공되었다 (0.85 g, 51% 수율): 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ 4.59 (s, 2 H, CH_2Cl), 5.02 (s, 2 H, $-CH_2-$ 프탈), 7.17 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.38 (d, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.67 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H), 7.74-7.77 (m, 2 H), 7.88-7.91 (m, 2 H)(도 17a 참조).

[80]



- [81] 비스(2-피코릴)아민 (0.62 g, 3.11 mmol) 및 TMPCl (0.8 g, 2.82 mmol)을 CH₃CN 30 mL 중에 용해시켰다. 칼륨 카보네이트 (0.83 g, 6.01 mmol)를 상기 혼합물에 첨가시켰고, 그리고 상기 반응 혼합물을 12 시간 동안 열처리하여 환류시켰다. 상기 미정제 생성물은 CH₂Cl₂/CH₃OH (15:1, v/v)를 이용하여 용출되는 실리카 겔 상에 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제되어 노란색-백색의 고체 (1.1 g, 86% 수율)가 제공되었다: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 3.76 (s, 2 H, CH₂), 3.82 (s, 4 H, 2CH₂) 5.00 (s, 2 H, CH₂-프탈), 7.08-7.13 (m, 3 H), 7.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 1 H), 7.51 (d, *J* = 7.5 Hz, 2 H), 7.59 (t, *J* = 7.5 Hz, 3 H), 7.71-7.74 (m, 2 H), 7.86-7.89 (m, 2 H), 8.49 (d, 2 H, 피리딘-H)(도 17b 참조).

[82] TMPP의 합성

- [83] 메탄올 20 mL 중 TMPP (0.85 g, 1.89 mmol)의 교반시킨 용액에, 히드라진 수화물 (1.0 g, 20.0 mmol)을 첨가시키고, 밤새 열처리하여 환류(reflux)시켰다. 상기 용매는 감압 하에 제거되어 백색 고체를 획득했다. 상기 백색 고체를 CHCl₃에 용해시키고, 1 M NaOH 200 mL를 상기 용액에 첨가하였다. 상기 유기층이

분리되었고, Na_2SO_4 상에서 건조시켰으며, 여과시켰고, 감압 하에 농축시켰다. 상기 미정제(crude) 생성물(오렌지 레드)은 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}(10:1, \text{v/v})$ 을 이용하여 용출시킴으로써 실리카 겔 상에 플래쉬 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 노란색-적색 고체 생성물(0.55 g, 91% 수율)이 제공되었다: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.84 (br, 2 H, NH_2) 3.88 (s, 2 H, CH_2), 3.90 (s, 4 H, CH_2), 3.94 (s, 2 H, CH_2), 7.11-7.17 (m, 3 H), 7.45 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 7.59-7.69 (m, 5 H), 8.54 (d, 2 H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 47.5, 60.1, 60.1, 119.3, 120.8, 121.9, 122.8, 136.4, 136.9, 149.0, 158.7, 159.4; ESI-MS [$\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{N}_5+\text{H}^+$] 계산치 320.1875, 측정치 320.1875(도 17c 내지 도 17e 참조).

[84] CTMPA의 합성

[85] IR-780 (0.25 g, 0.38 mmol)의 용액 및 무수 DMF (15 mL) 중 TMPA (0.12 g, 0.40 mmol)은 아르곤 분위기 하에 10 시간 동안 80°C 내지 90°C 에서 열처리 되었다. 상기 용매는 감압 하에 제거되었고, 상기 미정제 생성물은 실리카 겔 상에 플래쉬 컬럼 크로마토그래피에 의하여 정제된 후 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}(40:1)$ 을 이용하여 용출시킴으로써 진한 청색 고체 (120 mg, 32%)로서 원하는 생성물이 제공되었다: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ 1.05 (t, $J = 7.5$ Hz, 6 H, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.55 (s, 12 H, $-\text{CH}_3$), 1.80-1.87 (m, 6 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 및 시클로헥실 H), 2.55 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H, 시클로헥실 H), 3.84 (t, $J = 7.2$ Hz, 4 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.90 (s, 4 H, 피리딘- CH_2 -), 3.94 (s, 2 H, 피리딘- CH_2 -), 5.06 (s, 2 H, 피리딘- CH_2 -), 5.73 (d, $J = 12.6$ Hz, 2 H, 알켄-H), 6.90 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, Ph-H), 7.09 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, 피리딘-H), 7.24 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, Ph-H), 7.29 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, Ph-H), 7.43 (d, $J = 7.8$ Hz, 1 H, 피리딘-H), 7.61 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, Ph-H), 7.72 (d, $J = 12.6$ Hz, 2 H, 알켄-H), 7.68-7.74 (m, 4 H, 피리딘-H), 7.84 (t, $J = 7.8$ Hz, 2 H, 피리딘-H), 8.16 (br, -NH-), 8.52 (d, $J = 3.6$ Hz, 2 H, 피리딘-H); ^1H NMR (300 MHz, CD_3CN) δ 0.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 6 H, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$), 1.45 (s, 12 H, $-\text{CH}_3$), 1.74-1.82 (m, 6 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ 및 시클로헥실 H), 2.55 (t, $J = 6.0$ Hz, 4 H, 시클로헥실 H), 3.87-3.86 (m, 10 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$, 4 H 및 피리딘- CH_2 -, 6 H), 4.93 (d, $J = 5.4$ Hz, 2 H, 피리딘- CH_2 -), 5.80 (d, $J = 13.2$ Hz, 2 H, 알켄-H), 7.04-7.13 (m, 4 H, Ph-H), 7.15-7.20 (m, 2 H, 피리딘-H), 7.27-7.35 (m, 4 H, Ph-H), 7.60-7.73 (m, 6 H, 피리딘-H), 7.70 (t, $J = 13.2$ Hz, 2 H, 알켄-H), 7.83 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, 피리딘-H), 8.47 (dxm, $J = 4.8$ Hz, 2 H, 피리딘-H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ 11.9, 20.1, 21.6, 25.8, 29.3, 45.7, 47.7, 53.5, 60.6, 67.8, 94.8, 108.6, 120.4, 122.1, 122.8, 122.9, 123.0, 128.1, 136.9, 137.9, 138.3, 139.8, 143.1, 148.9, 167.6, 168.6; FAB-MS [$\text{C}_{55}\text{H}_{64}\text{IN}_7-\text{I}^+$] 계산치 822.5223, 측정치 822.5227(도 17f 내지 도 17h 참조).

[86] 상기 CTMPA-Zn²⁺복합체의 겔보기 해리 상수의 결정

[87] 형광 분광계는 하기의 방정식을 사용함으로써 계산되는 겔보기 해리 상수(K_d)를 결정하는 데 사용되었고;

[88]

$$K_d = \frac{(R_{\max} - R)[M^{2+}]_{\text{free}}}{(R - R_0)}$$

- [89] 여기서, R 은 두 개의 파장에서의 흡광 비율 또는 형광 강도 비율이며, $R_{\max}$ 는 최대 비율이고, R_0 는 Zn^{2+} 의 미첨가 시의 비율이고, $[M^{2+}]_{\text{free}}$ 는 유리 Zn^{2+} 의 농도이다. 유리 Zn^{2+} 의 농도는 금속 이온 완충액[나이트릴로트라이아세트산(10 mM), $\log K(ZnNTA) = 10.66$ (20°C, 0.1 M KNO_3)]을 사용함으로써 조절되었다.
- [90] 실시예 2: 생체 세포 및 생물 내 아연 이온 검출
- [91] 세포 배양
- [92] C2C12 세포(마우스 근원세포 세포주) 및 NIH3T3 세포(마우스 배아 섬유아세포 세포주)는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)으로부터 얻었고, 배양 배지 [10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린 50 units/mL 및 스트렙토마이신 50 $\mu\text{g/mL}$ 이 첨가된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)] 내에서 유지되었다.
- [93] CTMPA를 이용한 살아있는 세포의 형광 검출
- [94] 배양 배지 내 웰 당 1×10^4 개 세포의 밀도로 24-웰 플레이트 내에 C2C12 세포 및 NIH3T3 세포를 부착시켰다(seed). 24 시간 후에, 세포는 0.1% (v/v) DMSO를 함유하는 배양 배지에서 37°C에서 1 시간 동안 2 μM CTMPA에 의해 처리되었다. DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline, 칼슘과 마그네슘 미첨가)를 이용하여 두 번 세척한 후, 상기 남아있는 프로브를 제거하기 위하여 세포는 0.5 시간 동안 37°C에서 $ZnCl_2$ /소듐 피리치온 용액 2 μM 포함하는 DPBS를 이용하여 추가로 처리되었다. 세척 없이, 세포는 0.5 시간 동안 50 μM TPEN을 이용하여 추가로 처리되었다. 상기 처리된 세포는 공초점 현미경(LSM 510 META, Carl Zeiss, Germany, $\lambda_{\text{ex}} = 543 \text{ nm}$)에 의하여 이미지화되었다.
- [95] CTMPA를 이용한 사멸세포(Apoptotic Cells)의 이미지화
- [96] C2C12 세포 및 NIH3T3 세포를 배양 배지 내 웰 당 1×10^4 개 세포의 밀도로 24-웰 플레이트 내에서 부착시켰다. 24 시간 후에, 세포는 37°C에서 250 μM H_2O_2 존재 하에 1 시간 동안 인큐베이션되었다. 6 시간 후에, 세포는 1 시간 동안 37°C에서 2 μM CTMPA를 이용하여 처리되었다. DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline)를 이용하여 두 번 세척한 후, 세포들을 공초점 현미경에 의하여 이미지화하였다. TPEN 실험을 위하여, 6 시간 동안 250 μM H_2O_2 존재 하에 처리된 세포들은 0.5 시간 동안 37°C에서 50 μM TPEN을 이용하여 인큐베이션되었다. 상기 남아있는 TPEN을 제거하기 위하여 DPBS를 이용하여 두 번 세척한 후, 세포들은 1 시간 동안 37°C에서 2 μM CTMPA를 이용하여 처리되었다. 상기 처리된 세포들은 세척된 후, 공초점 현미경에 의하여 이미지화되었다.

[97] 제브라피쉬 내 아연 이온의 분포 추적

- [98] 제브라피쉬를 28°C로 유지시키고, 최적의 생식 조건을 유지했다. 교배를 위하여, 암 및 수 제브라피쉬를 28°C에서 12시간/12시간 명암주기로 한 탱크 내에 유지시켰고, 다음으로 아침에 광자극을 제공함으로써 산란을 유도하였다. 거의 모든 알들이 즉시 수정되었다. 제브라피쉬의 모든 단계를 E3 배아 배지(15 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 0.15 mM KH₂PO₄, 0.05 mM Na₂HPO₄, 0.7 mM NaHCO₃, 5% 내지 10% 메틸렌 블루; pH 7.5)에서 유지시켰다. 수정 후 24 시간, 36 시간, 48 시간, 72 시간, 및 96 시간이 경과된 제브라피쉬 배아들은 28°C에서 CTMPA가 2 μM 함유된 0.1% (v/v) DMSO를 함유하는 E3 배지 내에서 1 시간 동안 인큐베이션되었다. TPEN 실험을 위하여, 제브라피쉬는 1 시간 동안 28°C에서 E3 배지 내에서 100 μM TPEN에 노출시켜, 제브라피쉬 내 무손상 아연 이온을 제거시켰다. 상기 남아있는 TPEN을 제거하기 위하여 E3 배지를 이용하여 세척한 후, 상기 제브라피쉬는 1 시간 동안 28°C에서 CTMPA를 2 μM 함유하는 E3 배지 내에서 인큐베이션되었다. 상기 처리된 제브라피쉬들은 세척된 뒤, 공초점 현미경에 의하여 이미지화되었다.

[99] CTMPA의 분광학적 성질에 대한 Zn²⁺의 효과

- [100] CTMPA의 TMPA 부위는 아연 배위결합 부위로서 기여하는 3 가지 피리미딘 그룹을 포함한다는 사실 때문에, CTMPA는 상기 증대된 Zn²⁺결합능을 가진다. TMPA 내에 1차 아민 부위는 상기 프로브 내 트리카르보시아닌의 폴리메틴 사슬의 중심부와 연결되고, 그 결과로서, Zn²⁺에 대한 배위결합이 π-전자계의 컨쥬게이션의 정도에 영향을 줄 것이다. 이러한 현상은 흡광 및 발광 스펙트럼에서 최대 파장의 관찰할 수 있는 이동의 결과를 가져온다. 이러한 이유에 근거하여, 상기 Zn²⁺-특이성 형광 프로브 CTMPA는 도 1에 도시화된 과정에 따라 제조되었다. 간단하게, TMPA는 2,6-디클로로메틸피리딘으로부터 22% 수율로 합성되었다. CTMPA는 DMF 중 염화된 트리카르보시아닌 IR-780와 TMPA를 반응시킴으로써 32% 수율로 제조되었다.

- [101] Zn²⁺에 대한 반응(response)을 조사하기 위하여, 10% CH₃CN을 포함하는 HEPES(4(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) 완충액(10 mM, pH = 7.4) 중 CTMPA의 용액이 Zn²⁺의 다양한 농도를 이용하여 적정되었다. 이와 관련하여, 도 2a 내지 도 2d는, 본 실시예에 따른 10% CH₃CN를 포함하는 HEPES 완충액(10 mM, pH = 7.4) 중 Zn²⁺ (0 μM, 0.5 μM, 1.0 μM, 1.5 μM, 2.0 μM, 2.5 μM, 3.0 μM, 3.5 μM, 4.0 μM, 4.5 μM, 및 5.0 μM)를 이용하여 적정한 CTMPA (5.0 μM)의 흡광 및 발광 스펙트럼을 나타낸 것이다. 도 2에 나타난 바와 같이, 본 실시예에 따른 CTMPA의 흡광 스펙트럼에서의 현저한 변화가 Zn²⁺의 첨가에 따라 발생하는 것이 관찰되었다. 청색부터 적색 발광으로의 상기 용액의 색깔의 변화와 관련해서 (도 2a의 삽도), Zn²⁺의 첨가는 약 560 nm에서 분명한 등흡광점(isosbestic point)의 유지와 함께(도 2a) 약 670 nm ($\epsilon = 8.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)에서 CTMPA의 흡광 피크의 급격한(sharp) 감소 및 약 510 nm ($\epsilon = 3.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)

·1)에서 중심이 되는 새로운 밴드의 증가를 초래한다. A_{510nm}/A_{670nm} 의 흡광비율이 Zn^{2+} : CTMPA의 약 1 : 약 1 비율까지 Zn^{2+} 농도의 함수로서 선형적으로 증가되는 것이 발견되었는데, 이것은 약 1 : 약 1 복합체의 형성을 나타낸다(도 2a의 삽도). 이러한 관찰은 CTMPA가 Zn^{2+} 농도의 측정을 위한 비색 센서(colorimetric sensor)로서 기여할 것임을 시사한다.

- [102] 흥미롭게도, CTMPA의 발광 스펙트럼에 있어서 큰 단파장 이동이 또한 Zn^{2+} 의 존재 하에 발생하는 것이 관찰되었다. 특히, 이러한 금속 이온에 대한 반응에 있어서, 약 730 nm [약 670 nm에서 여기(excitation)]에서 CTMPA의 근적외선 발광 밴드의 강도는 감소하고(도 2b), 동시 증가가 약 585 nm [약 510 nm에서 여기(excitation)]의 발광 피크에서 발생한다(도 2c). 상기 흡광 적정 스펙트럼 내 등흡광점에 대응하는 파장 (약 560 nm)이 Zn^{2+} 농도에 따른 형광 강도 비율 I_{590nm}/I_{730nm} 의 의존도를 측정함에 있어서 여기 파장으로 선택되었다. 도 2d에서 나타낸 바와 같이, 상기 발광 스펙트럼에 있어서 약 730 nm에서 상기 근적외선 밴드는 약 590 nm에서 상기 밴드 내 급격한 증가에 따라 감소한다. 상기 관찰은 CTMPA의 특징적인 발광 밴드가 Zn^{2+} 와의 결합에 따른 큰 단파장 이동 (약 140 nm)이 진행됨을 입증한다. CTMPA- Zn^{2+} 복합체를 함유하는 용액에, 강한 Zn^{2+} 킬레이터(chelator)인 *N,N,N',N'*-테트라키스-(2-피리딜메틸) 에틸렌디아민 (*N,N,N',N'*-tetrakis-(2-pyridylmethyl) ethylenediamine, TPEN)의 첨가는 상기 프로브에 대한 Zn^{2+} 의 결합이 가역적인 것을 보여주는 고유색의 회복 및 CTMPA의 형광의 결과를 가져온다. 상기 I_{590nm}/I_{730nm} 비율은 Zn^{2+} 의 1 당량이 첨가될 때까지 Zn^{2+} 농도에 대하여 선형적으로 대응하는 것이 확인되었다(도 2d의 삽도). 상기 조합된 결과는 CTMPA- Zn^{2+} 의 약 1 : 약 1의 복합체가 생성되고 I_{590nm}/I_{730nm} 및 A_{510nm}/A_{670nm} 의 비율이 in vitro Zn^{2+} 농도를 측정하는데 사용될 수 있음을 시사한다. 도 2는 10% CH_3CN 를 포함하는 HEPES 완충액(10 mM, pH = 7.4) 중 Zn^{2+} (0 μM , 0.5 μM , 1.0 μM , 1.5 μM , 2.0 μM , 2.5 μM , 3.0 μM , 3.5 μM , 4.0 μM , 4.5 μM , 및 5.0 μM)를 이용하여 적정한 CTMPA (5.0 μM)의 흡광 및 발광 스펙트럼이다: 도 2a는 흡광 스펙트럼[삽도는 Zn^{2+} 의 첨가 전 및 후에 Zn^{2+} 의 농도 및 색 변화의 함수로서 흡광의 비율 (A_{510nm}/A_{670nm})을 나타냄]; 도 2b는 약 670 nm 이상 영역에서의 발광 스펙트럼($\lambda_{ex} = 670$ nm); 도 2c는 약 510 nm 이상 영역에서의 발광 스펙트럼($\lambda_{ex} = 510$ nm); 도 2d는 약 560 nm 이상 영역에서의 발광 스펙트럼($\lambda_{ex} = 560$ nm)임 [삽도는 Zn^{2+} 의 첨가 전 및 후에 Zn^{2+} 의 농도 및 형광 변화의 함수로서 형광 강도의 비율 (I_{590nm}/I_{730nm})을 나타냄].

[103] CTMPA의 Zn^{2+} 결합 거동

- [104] 종래 연구에서 얻어진 관찰은 전자 주게(electron-donating) 또는 받게(accepting) 메조-치환기가 폴리메틴 염료의 흡수 분광 특성에 대한 효과를 가지나, 이들 치환기가 최대 발광을 현저하게 변화시키지 않음을 의미한다. 실제로, 금속 이온을 위한 상기 언급된 시아닌계 형광 센서는 단지 발광 강도의 증가 및 감소를 나타내지만, 최대 발광 파장에서 약간 또는 거의 이동이 나타나지

않는다. 최근에, 시아닌계 비올계량 Zn^{2+} 형광 프로브가 개시되었는데, 이것은 최대 흡광에서 약간의 Zn^{2+} -촉진된 적색 이동(약 44 nm)을 나타내고, 발광 파장을 나타내지 않았다. 그러나 대조적으로 Zn^{2+} 는 CTMPA의 최대 흡광 및 발광 양쪽 모두에서 큰 단파장 이동을 촉진한다(도 2a 내지 도 2d 참조). 메조 치환기의 전자 주게 또는 받게 특성의 단순한 변형보다 다른 요소가 상기 CTMPA- Zn^{2+} 복합체의 발광 특성에 원인이 되는 것으로 보인다. CTMPA와 Zn^{2+} 의 결합에 의해 일어나는 큰 발광 파장 변화는 폴리메틴 발색단/형광단의 광범위하게 컨쥬게이트된 π -전자계의 붕괴의 결과임이 가능하다(하기 참조). 도 3에서 보여지는 상기 CTMPA- Zn^{2+} 구조에 도시된 것처럼, TMPA 부위 내 상기 2차 아민 질소와 Zn^{2+} 의 복합체화(complexation)가 N-H 탈양성자화를 유도하여 덜 비편재된(delocalized) 디아미노-테트라엔(diamino-tetraene) 그룹과 크로스-콘쥬게이트(cross-conjugated)되는 이민을 형성한다면, 감소된 비편재화가 발생할 것이다. 이러한 변환은 상기 트리카르보시아닌 발색단/형광단 및 상기 풀-푸쉬 π -공액계(pull-push conjugated system)의 상당한 파괴, 및 최대 흡광 및 발광에서 큰 단파장 이동을 일으키는 시아닌의 폴리메틴 π -전자계의 단축(shortening)의 결과를 가져온다.

- [105] CTMPA에 대한 Zn^{2+} 의 결합 모드 및 상기 결과로 수득되는 스펙트럼 변화의 더 나은 이해를 얻기 위하여, 상기 분광학적 변화의 pH-의존성 연구가 수행되었다. 도 4a는 본 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 pH 프로파일을 나타낸 것이고, 도 4b는 본 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 흡광도 변화를 나타낸 것이고, 도 4c는 본 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 730 nm에서 형광 강도 변화($\lambda_{ex} = 670$ nm)를 나타낸 것이며, 도 4d는 본 실시예에 따른 CH_3CN-H_2O (1 : 9)의 혼합물 중 CTMPA의 I_{590nm}/I_{730nm} 의 형광 강도 비율($\lambda_{ex} = 560$ nm)을 나타낸 것이다. 본 실시예에 따른 CTMPA의 최대 흡광 및 발광에서 큰 청색 이동이 약 10.2 내지 약 11.5 범위의 pH에서 발생하는 것이 관찰되었다(도 4a 내지 도 4d 참조). 이러한 현저한 단파장 이동은 CTMPA 내 상기 NH 그룹의 탈양성자화에 의해 유도되는 상기 트리카르보시아닌의 풀-푸쉬(pull-push) π -공액계의 파괴 때문이다(도 5 참조). 본 실시예에 따른 CTMPA의 메조-치환기 내의 NH의 탈양성자화는 상기 트리카르보시아닌 발색단/형광단 내 π -공액계를 단축시키고, 이는 최대 흡광 및 발광에서 단파장 이동을 나타낸다. 이러한 결과는 Zn^{2+} 의 결합에 의해 증대된 CTMPA의 큰 청색 이동이, 상기 프로브의 NH에 대한 Zn^{2+} 의 배위결합이 NH의 p K_a 를 낮추기 때문에, 약 pH 7.4에서 상기 CTMPA- Zn^{2+} 복합체 내 NH의 탈양성자화에 의해 일어남을 시사한다(도 3 참조). 본 실시예에 따른 CTMPA의 흡광 및 발광 스펙트럼은 약 pH 2.8 내지 약 pH 9.7 사이에서 거의 변하지 않은 상태로 있으며, 따라서, 상기 프로브는 Zn^{2+} 의 인비보(in vivo) 검출에 응용될 수 있을 것으로 예상된다.

- [106] 본원에 따른 CTMPA에 결합하는 상기 Zn^{2+} 의 모드를 더 조사하기 위하여, 1H

NMR 적정 실험이 수행되었다. 본 실시예에 따른 CTMPA의 용액에 Zn^{2+} 의 첨가는 유리된 CTMPA로부터 발생하는 세트(set)에 추가하여 ^1H NMR 시그널의 새로운 세트의 형성의 결과를 가져온다(도 6 및 도 7 참조). 도 6a는 본 실시예에 따른 CTMPA의 Zn^{2+} 유무에 따른 수소 넘버링을 나타낸 것이고, 도 6b는 본 실시예에 따른 Zn^{2+} 를 이용하여 적정 과정 중에서 CD_3CN 내 CTMPA의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것으로서, (i)는 유리 CTMPA의 스펙트럼이며, (ii)는 $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{CTMPA}]$ 의 0.5 : 1의 혼합물의 스펙트럼이고, (iii)는 $[\text{Zn}^{2+}]/[\text{CTMPA}]$ 의 1 : 1의 혼합물의 스펙트럼을 나타낸 것이다. 아울러, 도 7은 본 실시예에 따른 CD_3CN 중 Zn^{2+} 적정 과정에서 CTMPA의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 상기 ^1H NMR 시그널들의 상세한 확인은 표 1에 나타났다. 본 실시예에 따른 CTMPA 대 Zn^{2+} 의 농도 비율($[\text{CTMPA}] : [\text{Zn}^{2+}]$)이 약 1 : 약 0.5 일때, 상기 두 세트의 시그널은 거의 동일한 강도를 가진다. 그러나 상기 농도 비율이 약 1 : 약 1에 도달하면, 상기 CTMPA- Zn^{2+} 복합체의 ^1H NMR 시그널만 관찰된다. Zn^{2+} 의 추가적 당량의 첨가는 상기 ^1H NMR 스펙트럼에서 추가적 변화를 일으키지 않는다. 이러한 결과는 또한 본 실시예에 따른 CTMPA 및 Zn^{2+} 간의 약 1 : 약 1 복합체가 형성된다는 것을 확인시켜 준다. 본 실시예에 따른 CTMPA 용액에 Zn^{2+} 의 약 1 당량의 첨가는 상기 피리딘 양성자 H_1 의 약 8.47 ppm부터 약 9.31 ppm으로의 현저하게 큰 다운필드 변위(downfield shift)를 촉진한다(도 2). 더욱이, Zn^{2+} 배위는 H_5 , H_6 , 및 H_7 양성자의 분명한 다운필드 변위를 일으킨다. 이러한 변화는, 도 6에서 나타내는 바와 같이, 모든 3 개의 피리딘 그룹 및 상기 메조-치환된 질소가 Zn^{2+} 배위에 참여하고 있음을 의미한다. 중요하게, 상기 알켄 양성자 H_{11} 의 화학적 변위는 Zn^{2+} 의 존재 하에 약 5.80 ppm부터 약 5.85 ppm으로 이동하고, 반면에 상기 알켄 양성자 H_{12} 는 이러한 금속 이온의 배위에 의해 약 7.70 ppm부터 약 7.56 ppm으로 업필드 변위(upfield shift)를 나타낸다. 상기 관찰된 알켄-H 화학적 변위는 CTMPA 내 상기 폴리메틴 π -전자계가 Zn^{2+} 와 상기 프로브의 복합체화에 의하여 단축된다는 결론을 더욱 뒷받침해 준다.

[107] [표 1]

[108]

Protons	Signals of free CTMPA	Protons	Signals for CTMPA-Zn ²⁺
H₁	8.47 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 2H)	H₁'	9.31 (d, <i>J</i> = 4.8 Hz, 2H)
H₃	7.71 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H)	H₃'	8.08 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 2H)
H₅	3.85 (s, 4H)	H₅'	4.23 (s, 4H)
H₆	3.85 (s, 2H)	H₆'	4.20 (s, 2H)
H₇	4.93 (d, <i>J</i> = 5.4 Hz, 2H)	H₇'	5.46 (d, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H)
H₉	7.83 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H)	H₉'	8.13 (t, <i>J</i> = 7.5 Hz, 1H)
H₁₁	5.80 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 2H)	H₁₁'	5.85 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 2H)
H₁₂	7.70 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 2H)	H₁₂'	7.56 (d, <i>J</i> = 13.2 Hz, 2H)
H₂, H₄	7.60-7.68 (m, 4H)	H₂', H₄'	7.68-7.75 (m, 4H)
H₈, H₁₀	7.18 (m, 2H)	H₈', H₁₀'	7.54 (m, 2H)
H₁₃, H₁₄	7.04-7.12 (m, 4H)	H₁₃', H₁₄'	7.04-7.13 (m, 4H)
H₁₅, H₁₆	7.27-7.34 (m, 4H)	H₁₅', H₁₆'	7.29-7.35 (m, 4H)

- [109] 상기 CTMPA-Zn²⁺ 복합체의 겉보기(apparent) 해리 상수(K_d)는 Zn²⁺ 농도의 함수로서, 상기 형광 강도 비율 $I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$ 또는 흡광 비율 $A_{510\text{ nm}}/A_{670\text{ nm}}$ 을 플롯팅함으로써 약 1.2 nM임이 측정되었다(도 8a, 도 8b, 도 9a, 및 도 9b 참조). 도 8a는 본 실시예에 따른 CH₃CN-HEPES (1:9) ($\lambda_{\text{ex}} = 560\text{ nm}$) 중 Zn²⁺ 적정을 이용한 CTMPA (1 μM)의 흡광 스펙트럼을 나타낸 것이고, 도 8b는 본 실시예에 따른 CH₃CN-HEPES (1:9) ($\lambda_{\text{ex}} = 560\text{ nm}$) 중 Zn²⁺ 적정을 이용한 CTMPA (1 μM)의 발광 스펙트럼을 나타낸 것이며, 도 9a는 본 실시예에 따른 완충용액 중 CTMPA (1 μM) 대 $\log_{10} C_{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}}$ 의 흡광비율 ($A_{510\text{ nm}}/A_{670\text{ nm}}$)을 나타내는 그래프이고, 도 9b는 본 실시예에 따른 완충용액 중 CTMPA (1 μM) 대 $\log_{10} C_{[\text{Zn}^{2+}]_{\text{free}}}$ 의 형광비율 ($I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$)을 나타내는 그래프이다. 중요하게, 상기 관찰되는 본 실시예에 따른

CTMPA에 대한 Zn^{2+} 친화성은 디(2-피콜릴)아민[di(2-picolyl)amine, DPA] ($K_d = 23$ nm)의 Zn^{2+} 친화정보다 훨씬 크며, 이것은 상기 프로브 내 모든 3 개의 피리딘 질소가 Zn^{2+} 와 킬레이트됨을 추가로 나타낸다. CTMPA- Zn^{2+} 의 나노몰(nanomole) K_d 값은 상기 프로브가 상기 nM 범위 내에 Zn^{2+} 를 검출하는데 적합하다는 것을 시사한다.

[110] CTMPA의 Zn^{2+} 결합 선택성

[111] 종래 개발된 Zn^{2+} 수용체와 달리, CTMPA는 3 개의 피리딘 그룹과 Zn^{2+} 배위 결합 부위로서 작용하는 한 개의 메조-질소를 함유한다. 상기 프로브 내에 다중 배위 결합 부위의 존재는 Cd^{2+} 및 다른 금속 이온에 비하여 CTMPA의 Zn^{2+} 결합 선택성을 증대시킬 것으로 예상된다. 이러한 제안을 조사하기 위하여, 비교 실험이 Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ag^+ , Al^{3+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} 및 Pb^{2+} 를 이용하여 CTMPA (5 μM)의 용액을 처리하고 이어서 Zn^{2+} (5 μM)를 연속적으로 첨가하여 $I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$ 비율 측정에 의해 수행되었다. 도 10에서 나타난 바와 같이, 상기 CTMPA- Zn^{2+} 복합체의 발광 강도 프로파일은 상기 다른 시험된 금속 이온의 존재에 의하여 변화되지 않는데, 이것은 Zn^{2+} 에 대한 CTMPA의 높은 선택성을 나타낸다. 도 10은 CTMPA의 금속 이온 선택성을 그래프로 나타낸 것인데, 10% CH_3CN ($\lambda_{ex} = 570$ nm)를 함유하는 HEPES (10 mM, pH = 7.4) 내 다양한 금속 이온에 대한 CTMPA (5 μM)의 형광 반응을 나타낸 것이다. 회색 막대는 CTMPA의 용액(5 μM)에 다양한 경쟁 금속 이온 (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 의 경우 1,000 μM ; Cd^{2+} 의 경우 10 μM ; 그 외의 다른 금속 이온의 경우 25 μM)의 첨가 후에 $I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$ 비율을 나타낸다. 흑색 막대는 상기 경쟁 금속 이온의 존재 하에 CTMPA의 용액(5 μM)에 Zn^{2+} 의 첨가 후에 $I_{590\text{ nm}}/I_{730\text{ nm}}$ 비율을 나타낸다.

[112] CTMPA를 이용하는 세포 내 Zn^{2+} 의 이미징

[113] CTMPA의 우수한 분광학적 Zn^{2+} 결합 특성 때문에, CTMPA는 생체 세포들 및 생물 내 아연 이온을 검출하는데 적합할 것이다. 이러한 예측을 시험하기 위하여, 상기 CTMPA의 Zn^{2+} 바이오이미징 능력을 살아있는 포유동물 세포를 사용하여 측정하였다. 마우스 C2C12 근원세포(myoblasts) 및 마우스 NIH3T3 배아줄기세포(embryonic fibroblasts)는 1 시간 동안 2 μM CTMPA와 함께 배양되었다(도 11 참조). 도 11은 본 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 외인성 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다. 세척에 의하여 상기 남아있는 프로브의 제거 후에, 상기 세포는 $ZnCl_2$ /피리치온 용액(2 μM)을 이용하여 처리되었고, 0.5 시간 동안 배양되었다. 외인성 아연 이온의 형광 이미징의 결과에서, CTMPA만으로 배양된 세포는 매우 약한 형광을 나타내는 반면, Zn^{2+} 와 함께 처리된 세포들 및 상기 프로브는 강한 형광을 나타내며, 이것은 세포막-투과성 아연 이온 킬레이터 TPEN과의 전배양(pre-incubation)에 의하여 현저하게 약화된(도 11 참조). 도 11은 CTMPA를 이용하여 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 외인성 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다. 상기 이미지에서 세포들은 0.5 시간 동안 $ZnCl_2$

/피리치온 용액($2\ \mu\text{M}$)의 부재(왼쪽) 또는 존재(가운데) 하에서 배양되었고 그리고 나서 $2\ \mu\text{M}$ CTMPA를 이용하여 1 시간 동안 처리되었다. 오른쪽 이미지의 세포들은 ZnCl_2 /소듐 피리치온 용액($2\ \mu\text{M}$)을 이용하여 배양되고 그리고 나서 0.5 시간 동안 $50\ \mu\text{M}$ TPEN을 이용하여 처리되었다. 상기 처리된 세포들은 1 시간 동안 $2\ \mu\text{M}$ CTMPA를 이용하여 배양되었다 ($\lambda_{\text{ex}} = 543\ \text{nm}$, 스케일바 = $20\ \mu\text{m}$). 상기 관찰은 CTMPA가 세포-투과성이고 세포 내 아연 이온을 검출할 수 있음을 나타낸다.

- [114] 유리 아연 이온은 세포사멸 중에 세포 내 금속 단백질로부터 방출된다는 사실 때문에, CTMPA는 또한 이러한 공정을 검출하기 위해 사용되었다. 세포사멸을 유도하기 위하여, C2C12 및 NIH3T3 세포는 $250\ \mu\text{M}$ H_2O_2 를 이용하여 6 시간 동안 배양되었고, 연이어서 CTMPA를 이용하여 1 시간 동안 처리되었다. 형광 현미경 이미지의 분석은 H_2O_2 와 배양된 세포는 밝은 적색 형광을 나타냄을 보여준다 (도 12 및 도 13 참조). 도 12는 본 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 세포사멸 중에 방출된 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 무손상 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이고, 도 13은 본 실시예에 따른 CTMPA를 이용하여 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 사멸세포 중에 방출된 무손상 아연 이온의 형광 이미지를 나타낸 것이다. 형광의 턴-온(turn-on)이 방출된 아연 이온에 대한 CTMPA의 응답의 결과임을 확인하기 위하여, H_2O_2 -처리된 세포는 상기 프로브와의 처리 전에 0.5 시간 동안 $50\ \mu\text{M}$ TPEN를 이용하여 배양되었다. 이러한 경우, 상기 세포의 형광 강도는 현저하게 감소했는데(도 12), 이것은 상기 프로브가 세포사멸 중에 실제로 방출된 아연 이온을 감지함을 나타낸다. 도 12는 CTMPA를 이용하여 세포사멸 중에 방출된 (a) C2C12 및 (b) NIH3T3 세포들 내 무손상 아연 이온의 형광 이미지화를 나타낸 것이다. 세포들은 6 시간 동안 $250\ \mu\text{M}$ H_2O_2 의 부재(왼쪽) 또는 존재(가운데) 하에서 배양되어, 세포사멸을 일으키고, 그리고 나서 $2\ \mu\text{M}$ CTMPA를 이용하여 1 시간 동안 처리되었다. 오른쪽 이미지의 세포들은 $250\ \mu\text{M}$ H_2O_2 를 이용하여 6 시간 동안 배양되었고, 0.5 시간 동안 $50\ \mu\text{M}$ TPEN을 이용하여 처리되었고, 그리고 나서 1 시간 동안 $2\ \mu\text{M}$ CTMPA를 이용하여 배양되었다 ($\lambda_{\text{ex}} = 543\ \text{nm}$, 스케일바 = $20\ \mu\text{m}$).

[115] CTMPA를 사용한 제브라피쉬 내 무손상 Zn^{2+} 의 검출

- [116] CTMPA의 더 흥미로운 응용은 생체 생물 내 Zn^{2+} 의 검출이다. 제브라피쉬는 다양한 생물학적 관련 종들 및 생분자들의 형광 검출을 목표로 하는 유용한 척추동물 모델이다. 결론적으로, 제브라피쉬 발달 과정 중에 무손상 아연 이온의 분포를 추적하는 것에 대한 CTMPA의 적용가능성이 연구되었다. 이러한 노력으로, 발달의 다양한 단계(수정 후 24, 36, 48, 72 및 96 시간(hours post-fertilization, hpf))에서의 제브라피쉬 배아들이 28°C 에서 $2\ \mu\text{M}$ CTMPA에 노출되었다(도 14 참조). 도 14는 본 실시예에 따른 1 시간 동안 CTMPA를 이용하여 배양된 수정 후 (a) 24 시간, (b) 36 시간, (c) 48 시간, (d) 72 시간, 및 (e) 96 시간 경과된 제브라피쉬 내 무손상 아연 이온의 형광 검출 사진이다.

NBD-TPEA 및 ZTRS와 같은 상이한 프로브를 사용하여 관찰했을 때, 밝은 적색 형광점이 상기 배아의 24 hpf 후에 복부의 하부에서 발생하였고, 다중 적색점으로 이루어지는 적색점 밴드들이 48 hpf 후에 상기 복부의 상부로 이동하고 그리고 나서 72 hpf 후에 사라졌다 (도 14 참조). 게다가, 적색점이 상기 난황 주변에 발달되었다. 형광점들이 제브라피쉬 내 무손상 Zn^{2+} 에 대한 상기 프로브의 응답에서 형성된 것임을 확인하기 위하여, 배아는 약 0.5 시간 동안 약 100 μM TPEN에 노출되었고, 그리고 나서 CTMPA를 이용하여 처리되었다. 제브라피쉬 내 적색 형광이 상기 TPEN 전처리 프로토콜에 노출되었던 배아 내에서는 거의 검출할 수 없었는데 (도 15 참조), 이것은 상기 적색점은 실제로 피쉬 내 내인성 아연 이온으로부터 기인된 결과임을 의미한다.

- [117] 생체 표면에 분포된 신경소구(neuromasts) 내에서 발현되는 메탈로티오네인(metallothioneins)들이 Zn^{2+} 항상성(homeostasis)에 있어 중요한 역할을 하는 것이 이전에 보여졌다. 중요하게, CTMPA를 사용함으로써, 본 발명자들은 외인성 아연 이온들을 이용한 처리 없이 제브라피쉬의 신경소구 내 형광 시그널을 관찰할 수 있었다(도 14e). 제브라피쉬의 신경소구 내 상기 프로브의 형광 강도는 TPEN을 이용한 전처리에 의해 현저하게 감소되었고, 이것은 상기 새로운 프로브가 신경소구 내 무손상 아연 이온을 선택적으로 검출할 수 있다는 결론을 뒷받침하는 것이다(도 15). 도 16은 본 실시예에 따른 (A) 측면 및 (B) 등쪽면 영역에서의 그룹화시킨 생체에 따른 신경소구의 분포를 도시화한 이미지로서, 상안와 영역 (supraorbital region)은 시각교차 앞 (preoptic, PO), 및 상안와 (supraorbital, SO) 신경소구를 포함한다. 미골-두개골 영역 (caudal-cranial region)은 귀 (otic, O), 후두부 (occipital, OC), 등 (dorsal, D) 및 중간열 (middle, MI) 신경소구를 포함하며, 후부 (posterior, P) 신경소구는 트렁크(trunk) 영역 내 놓여진 것이다. NBD-TPEA 및 ZTRS와 같은 상이한 아연 프로브를 사용할 때, 이러한 현상은 관찰되지 않았음을 주목해야 한다. CTMPA는 Zn^{2+} 에 대한 매우 높은 결합 친화성을 가지고, CTMPA는 자가형광을 억제하는 장파장 발광을 나타내기 때문에, 이러한 프로브는 제브라피쉬의 신경소구 내 무손상 아연 이온을 감지하는 특유의 능력을 가진다.

- [118] 상기 언급된 연구는 장파장 발광 최대를 가지는 신규 형광 Zn^{2+} 센서로서 CTMPA의 개발을 가져온다. 이러한 노력으로, 본 발명자들은 CTMPA가 다른 금속 이온들에 비하여 Zn^{2+} 에 대한 고감도 및 고선택성, 및 나노몰 범위에서 검출 한계를 가짐을 입증하였다. CTMPA가 Zn^{2+} 와 복합체를 형성할 때 발생하는 상기 현저한 흡광 및 발광 파장 이동은 상기 센서를 내인성 유리 아연 이온의 바이오이미지화를 위해 이상적으로 적합하게 만든다. 제브라피쉬의 신경소구 내 무손상 아연 이온의 형광 검출을 위하여 CTMPA를 사용함으로써 이러한 유리한 특색이 입증되었다. 이러한 흥미로운 결과는 CTMPA가 Zn^{2+} 생물학 이해를 목표로 하는 연구에 있어 밝은 미래를 가질 것임을 의미한다.

- [119] 본 발명자들이 고안한 전략은, 금속 이온 배위결합에 의한 시아닌

발색단/형광단의 π -전자계의 콘쥬게이션 길이의 변조(modulation)에 의존하는, 고감도 및 고선택성, 비울계량적 시아닌계 금속 이온 센서의 형성에 적용할 수 있을 것이다. 특히, 시아닌 염료의 π -전자계 내 명백한 변화를 기반으로 하는 접근은 인비보(in vivo) 이미지화 적용을 위한 시아닌계 형광 프로브의 다른 유형을 고안하기 위한 기초로서 기여할 것이다.

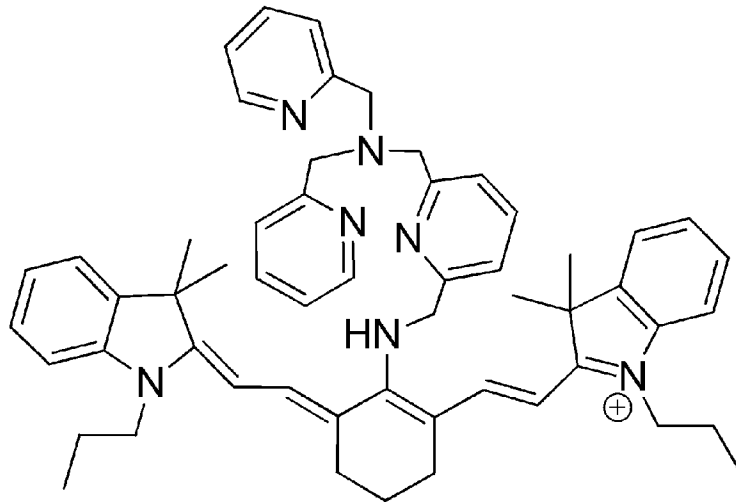
[120] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

[121] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기의 화학식 1로서 표시되는 화합물을 포함하는 시아닌계 형광 프로브:

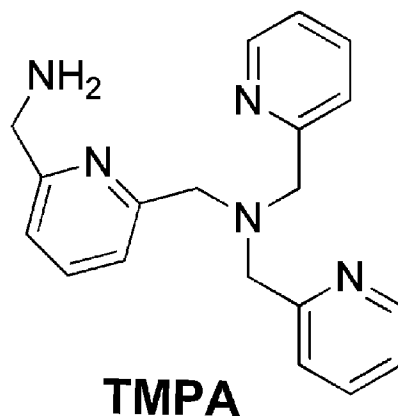
[화학식 1]



CTMPA

- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 시아닌계 형광 프로브가 아연 이온(Zn^{2+}) 검출용으로 사용되는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물이 아연 이온(Zn^{2+})과 반응하여 착물을 형성하는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와 반응하여 최대 발광 파장에서 청색에서 적색으로 변화가 나타나는 것인,
시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와의 반응에 의해 발광 파장 및 흡광 파장에서 단파장 이동을 나타내는 것인,
시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물은 상기 Zn^{2+} 와의 반응에 의해 최대 발광 파장에서 730 nm에서 590 nm으로 단파장 이동이 나타나는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 7] 제 1 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물 내의 피리딘 및

- 메조-치환되는 질소가 상기 Zn^{2+} 와 반응하여 배위결합하는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 8] 제 3 항에 있어서,
상기 화학식 1로서 표시되는 화합물과 상기 Zn^{2+} 가 1 : 1의 비율로 복합체를 형성하는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 시아닌계 형광 프로브가 생체 내 내인성 아연 이온(Zn^{2+})을 검출하는, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 시아닌계 형광 프로브가 아연 이온을 nM 범위 내에서 검출하는 것인, 시아닌계 형광 프로브.
- [청구항 11] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항의 시아닌계 형광 프로브를 이용하는, 생체 내 아연 이온의 검출방법.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서,
상기 검출방법은 생체 내 내인성 아연 이온의 분포를 이미지화할 수 있는 것인, 생체 내 아연 이온의 검출방법.
- [청구항 13] 하기 화학식 2로서 표시되는 TMPA를 염화 트리카르보시아닌과 반응시키는 것을 포함하는, 시아닌계 형광 프로브의 제조방법:
[화학식 2]

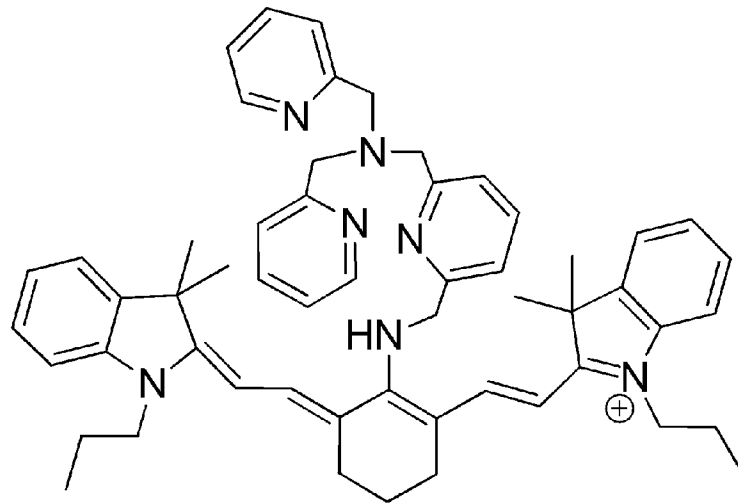


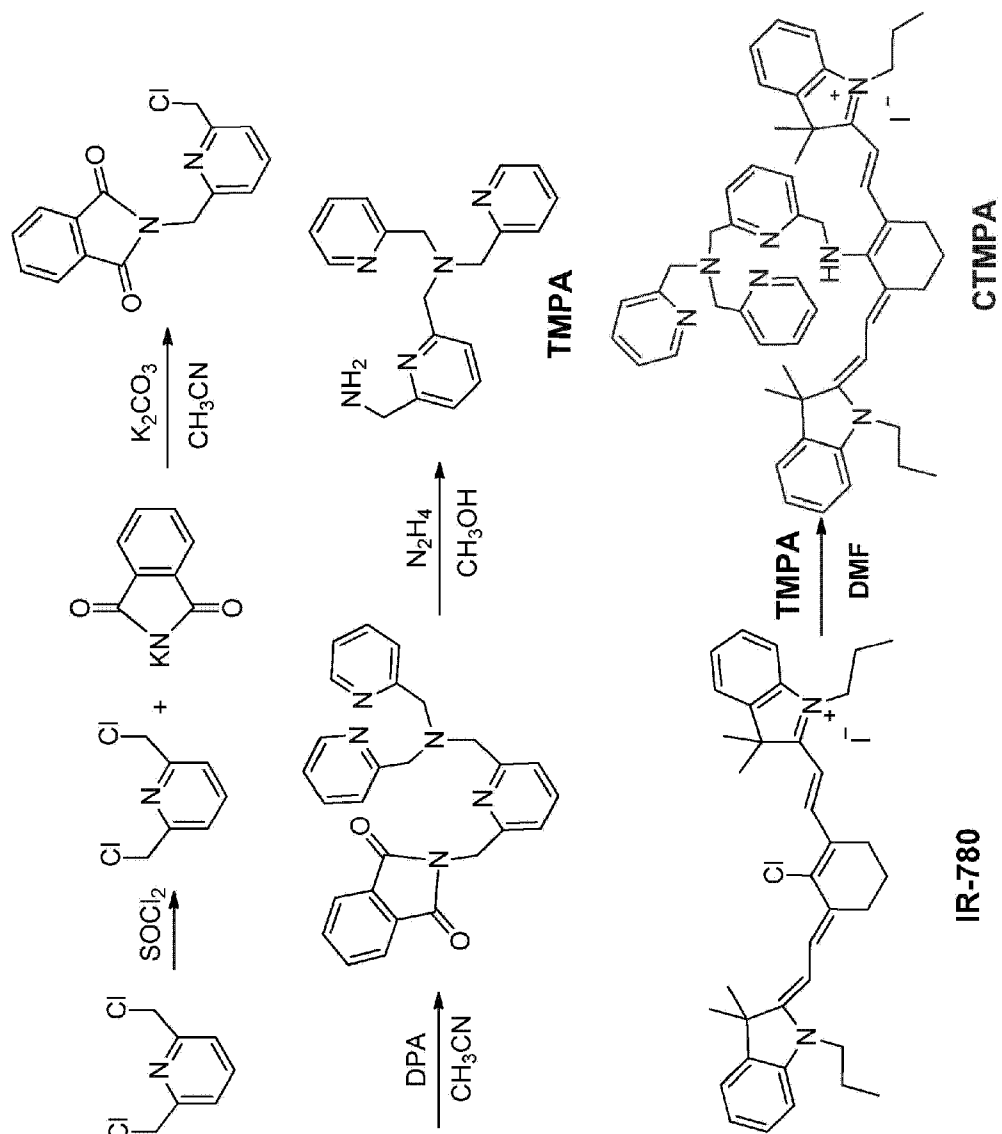
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서,
상기 TMPA와 상기 염화 트리카르보시아닌은 아르곤 분위기 하에서 70°C 내지 100°C에서 가열하여 반응시키는 것인, 시아닌계 형광 프로브의 제조방법.
- [청구항 15] 제 13 항에 있어서,
상기 시아닌계 형광 프로브를 정제시키는 것을 추가 포함하는 것인, 시아닌계 형광 프로브의 제조방법.
- [청구항 16] 제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 따른 시아닌계 형광 프로브를 포함하는, 형광 센서.

[청구항 17]

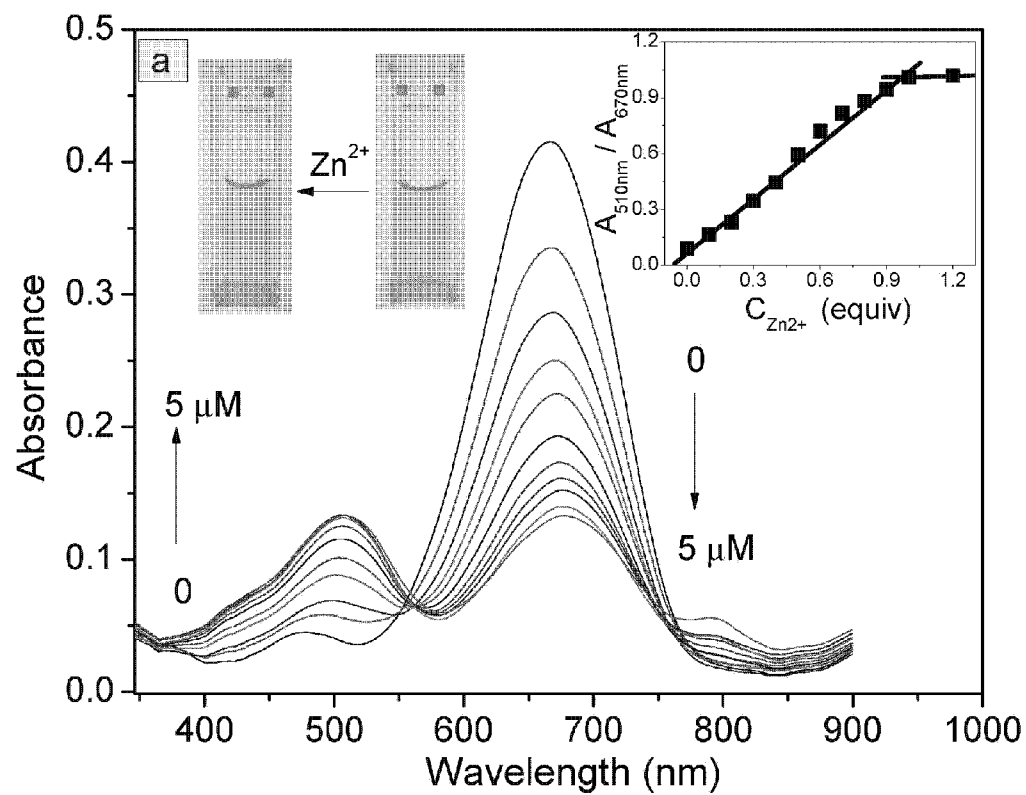
하기의 화학식 1로서 표시되는 시아닌계 화합물:

[화학식 1]

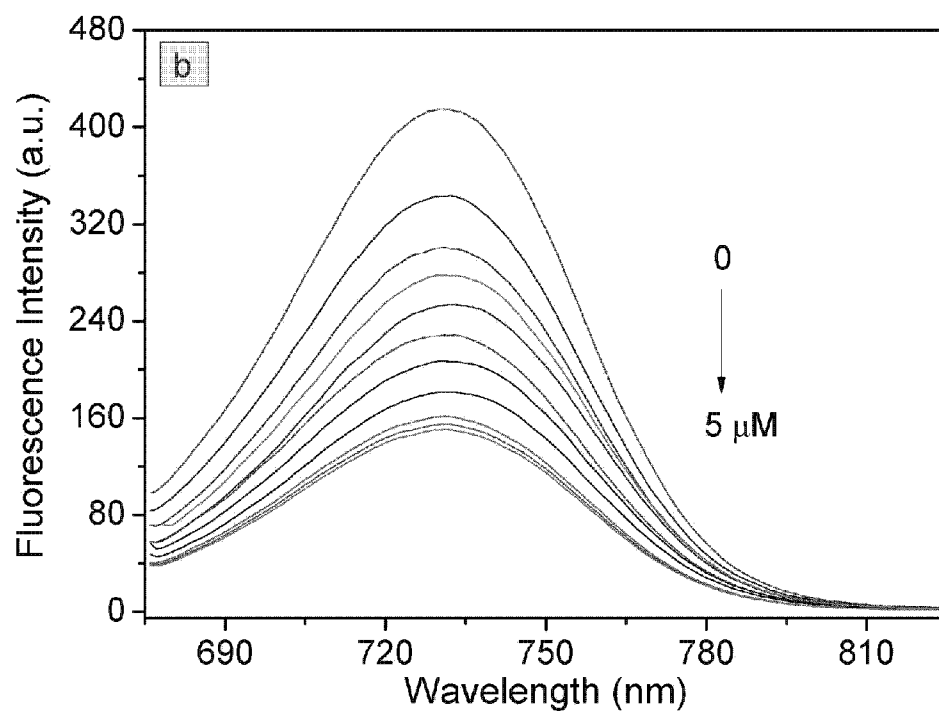
**CTMPA**



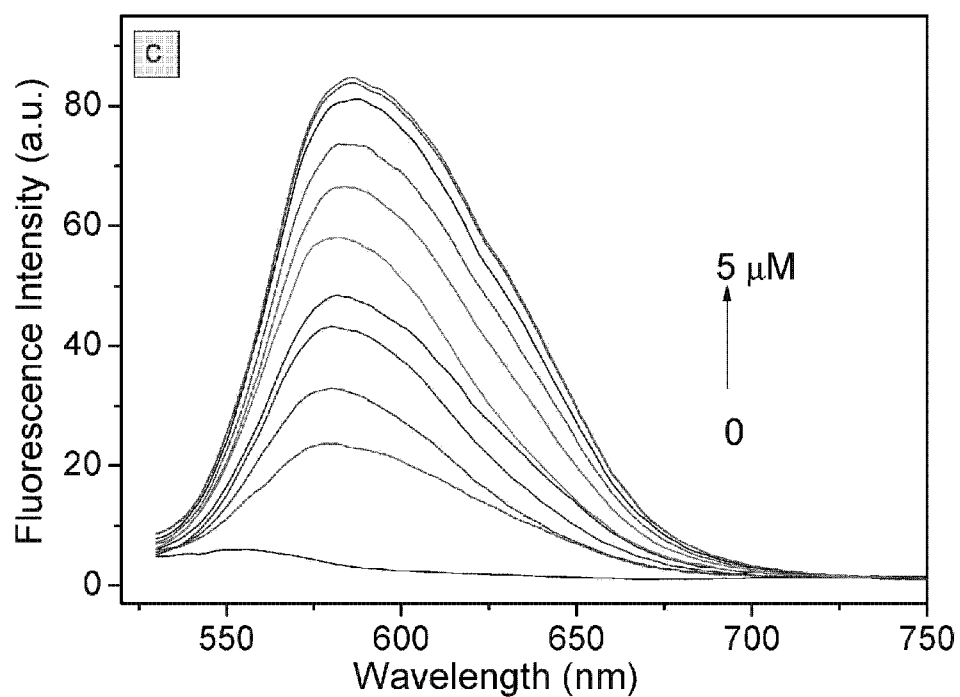
[Fig. 2a]



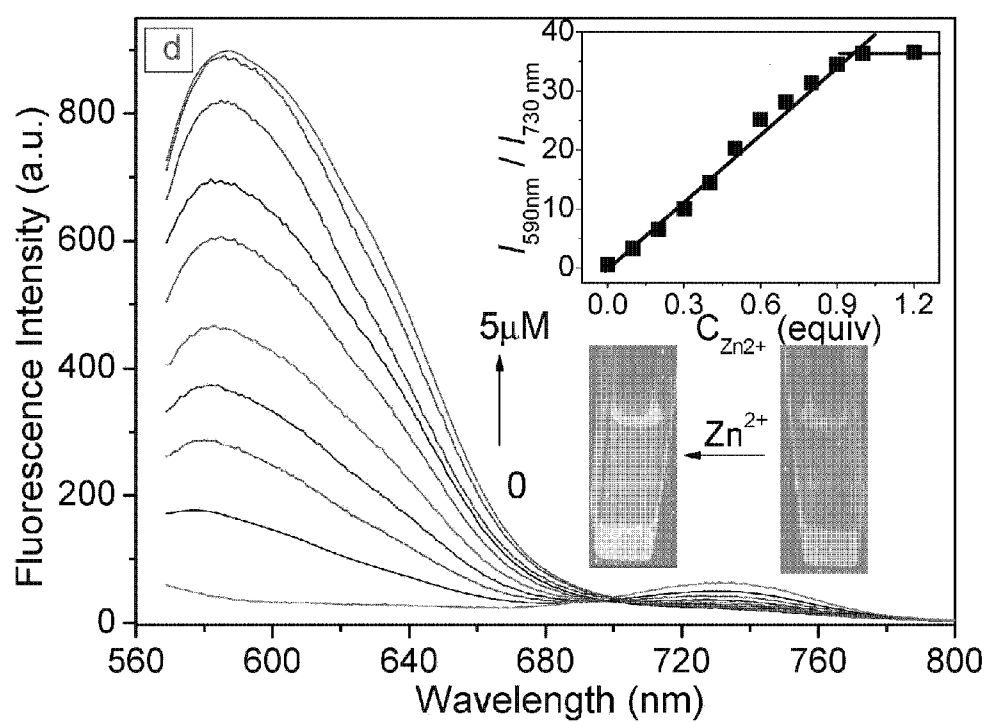
[Fig. 2b]



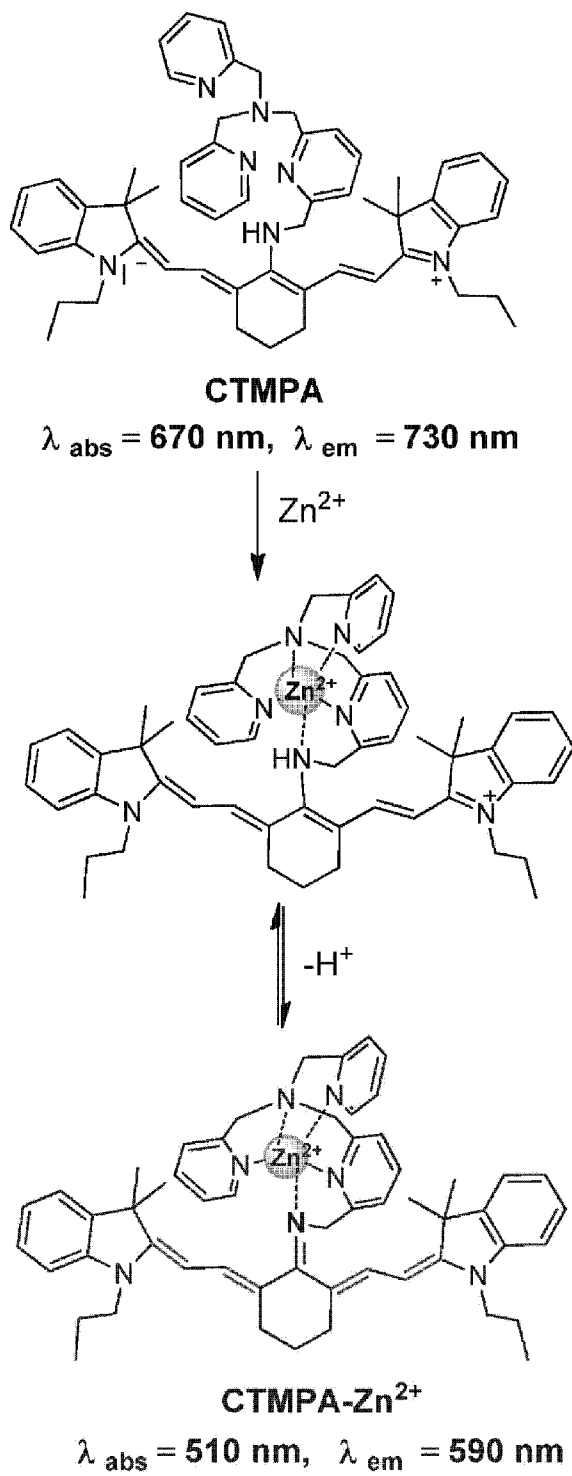
[Fig. 2c]



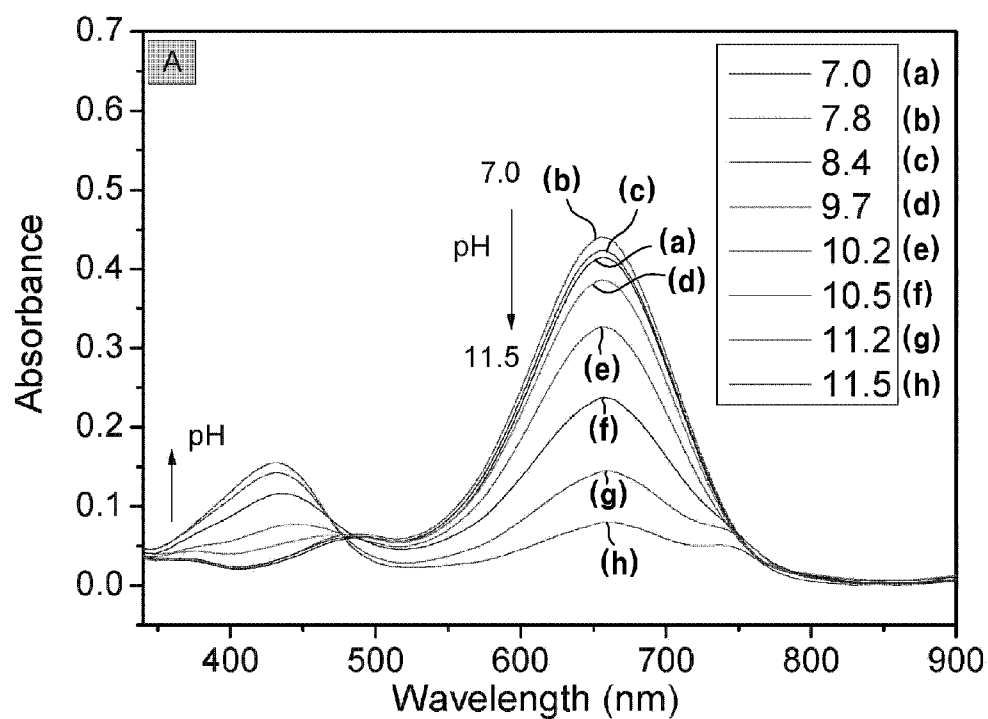
[Fig. 2d]



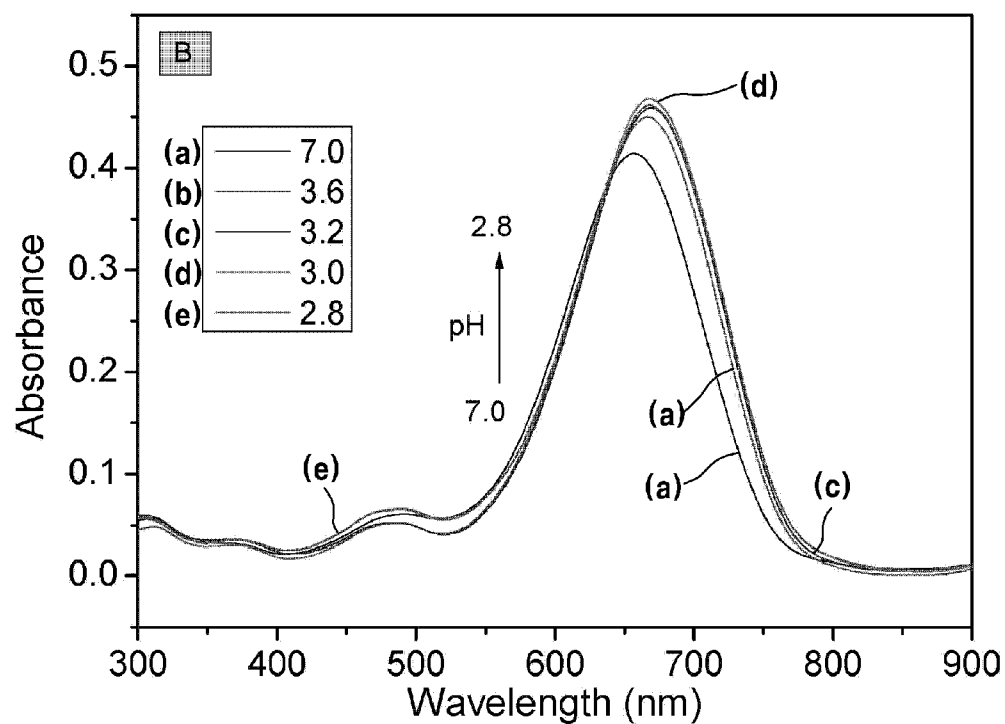
[Fig. 3]



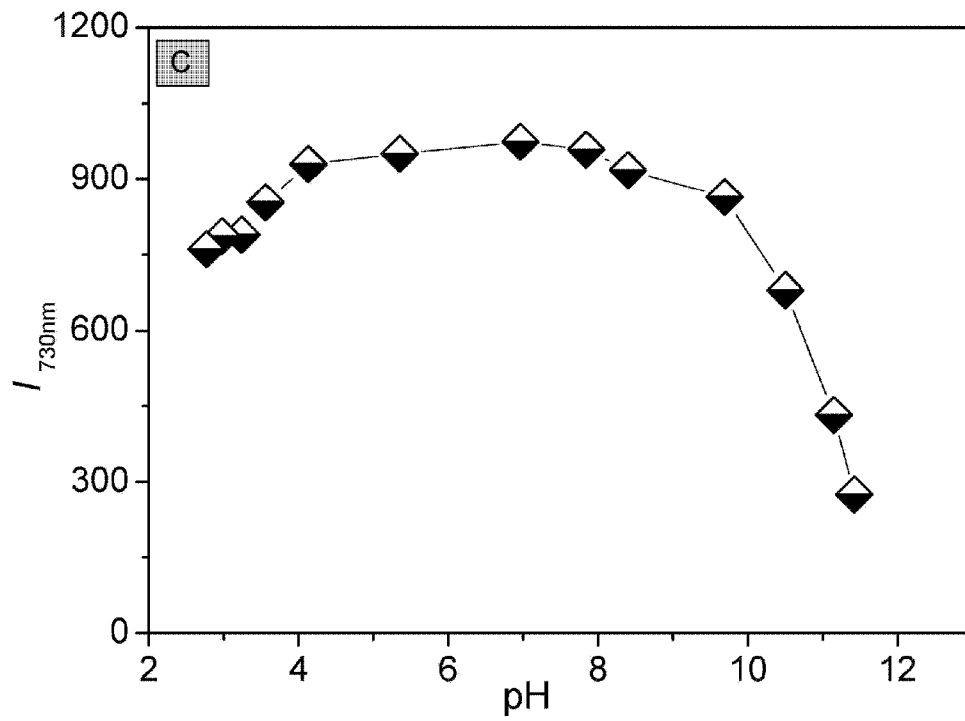
[Fig. 4a]



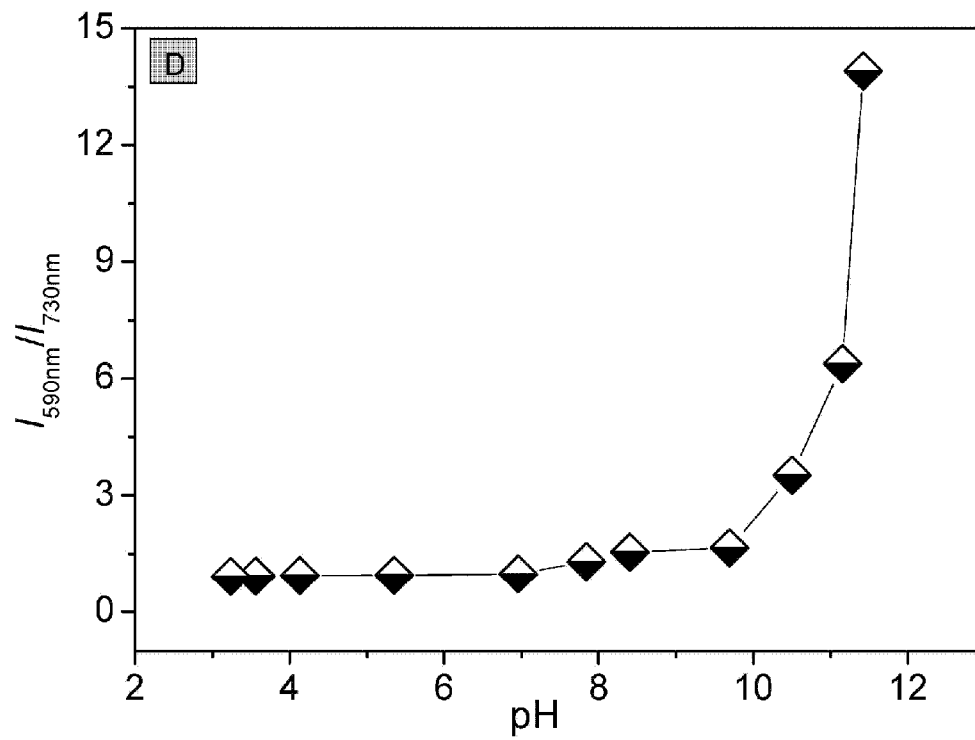
[Fig. 4b]



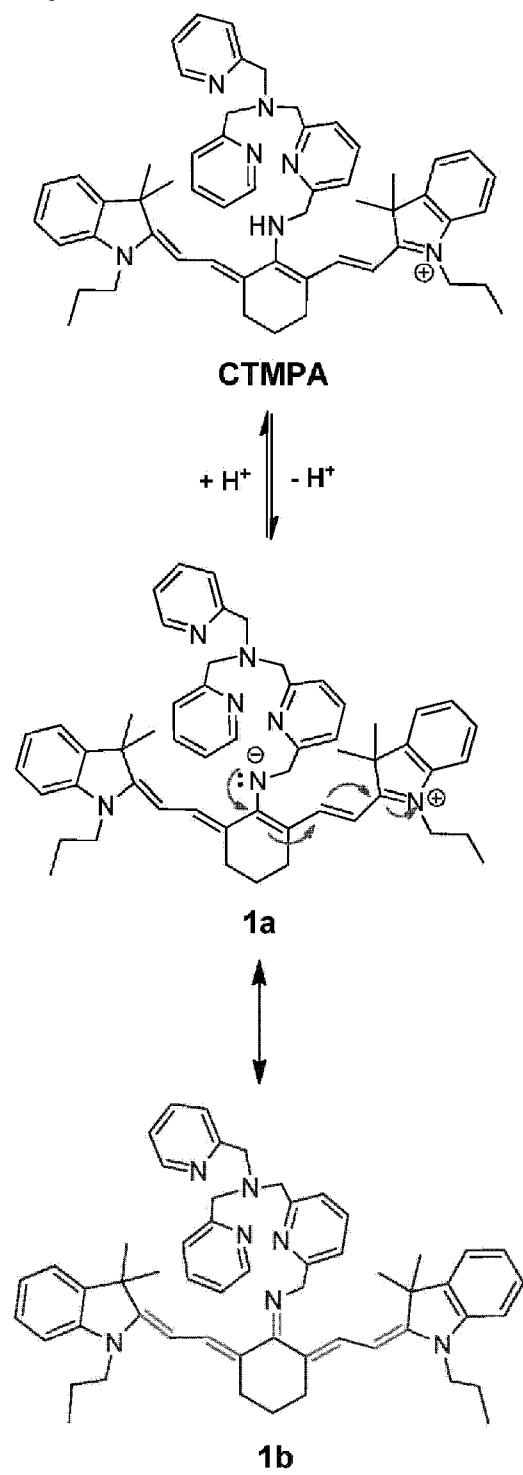
[Fig. 4c]



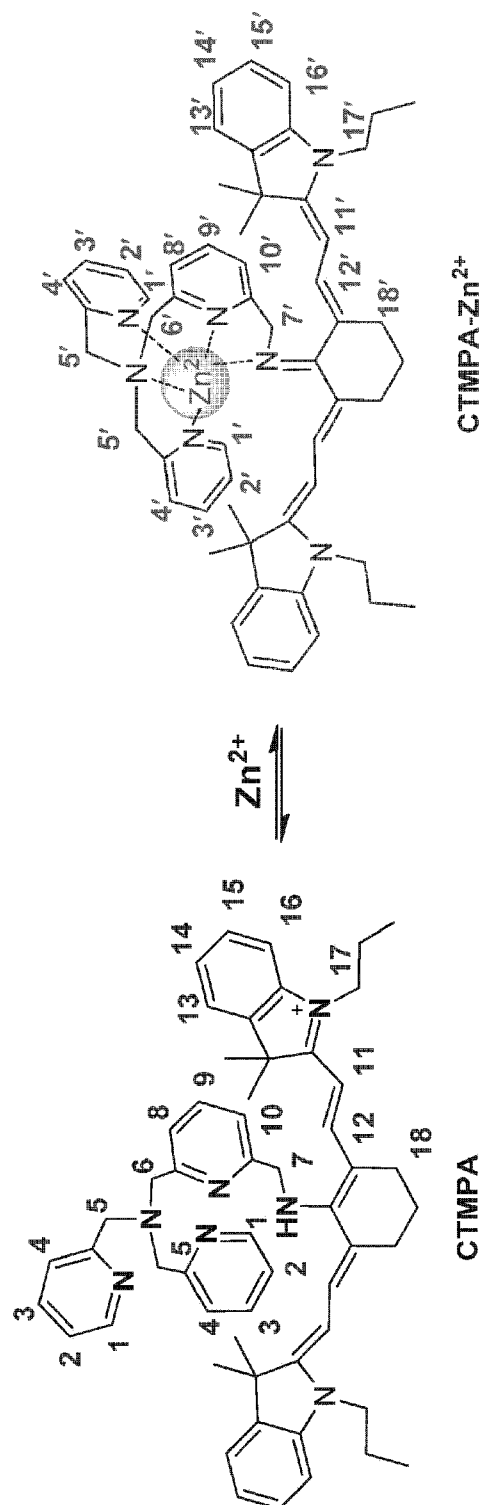
[Fig. 4d]



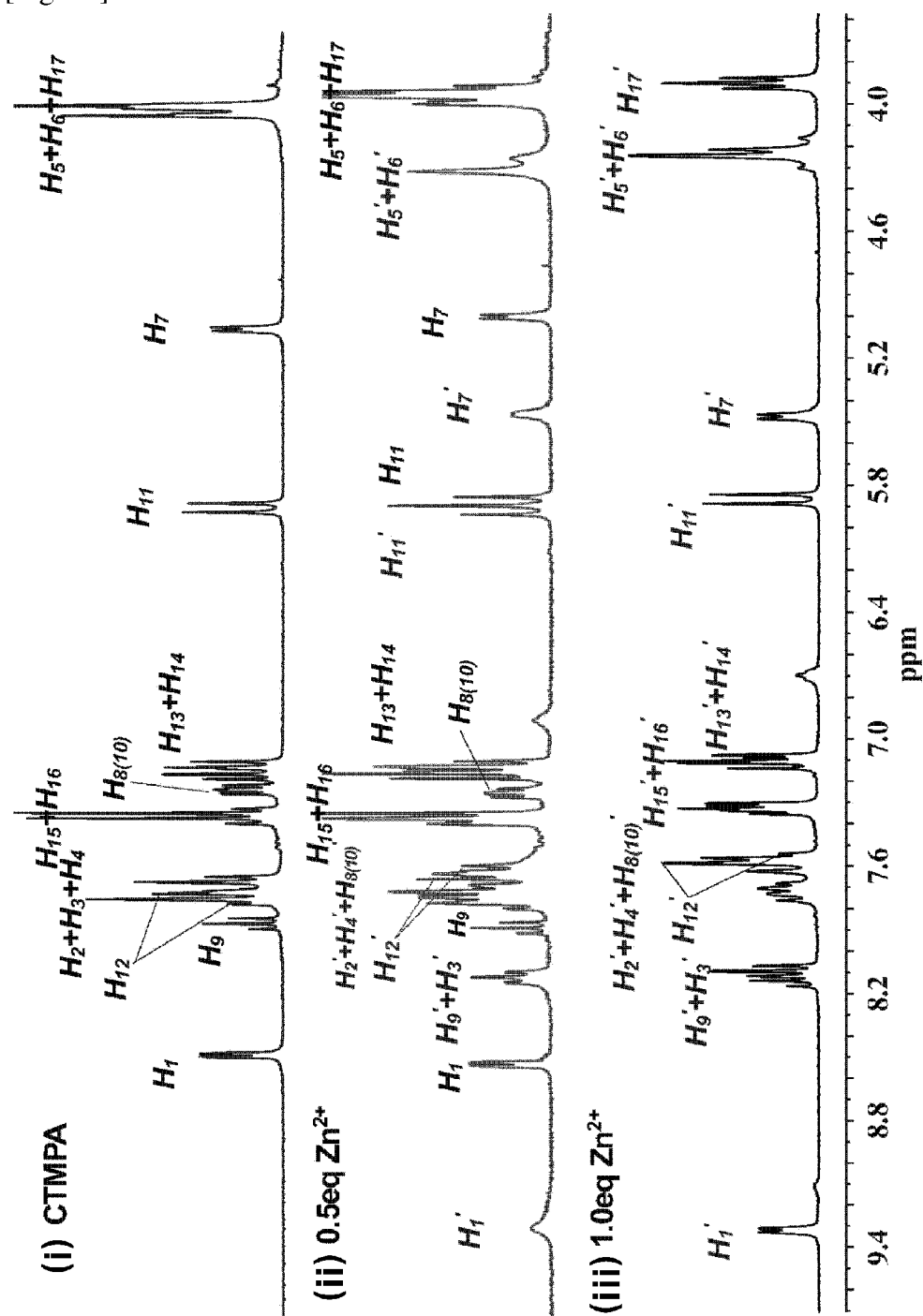
[Fig. 5]



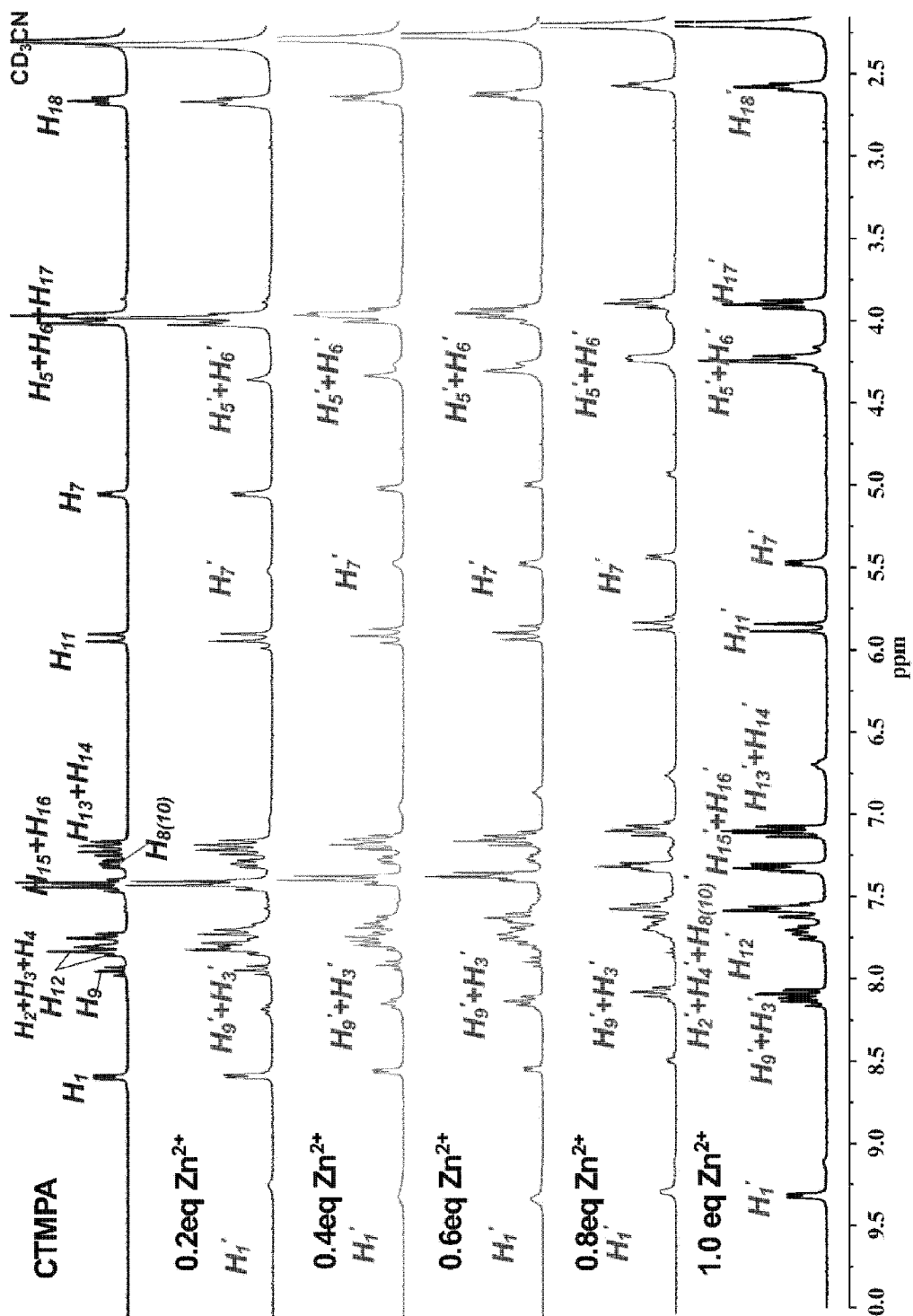
[Fig. 6a]



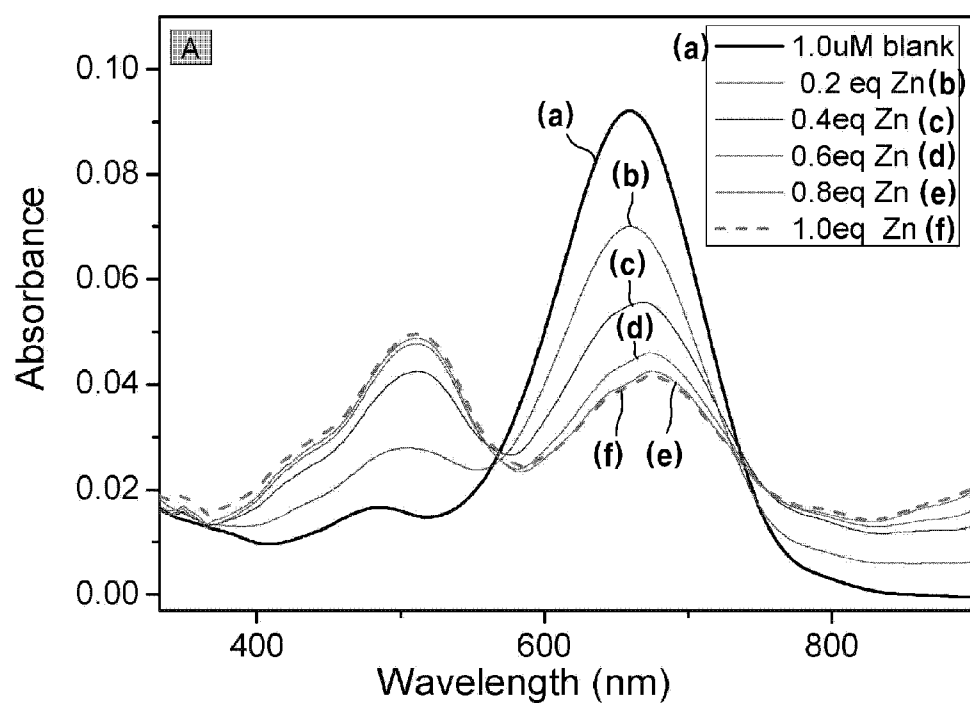
[Fig. 6b]



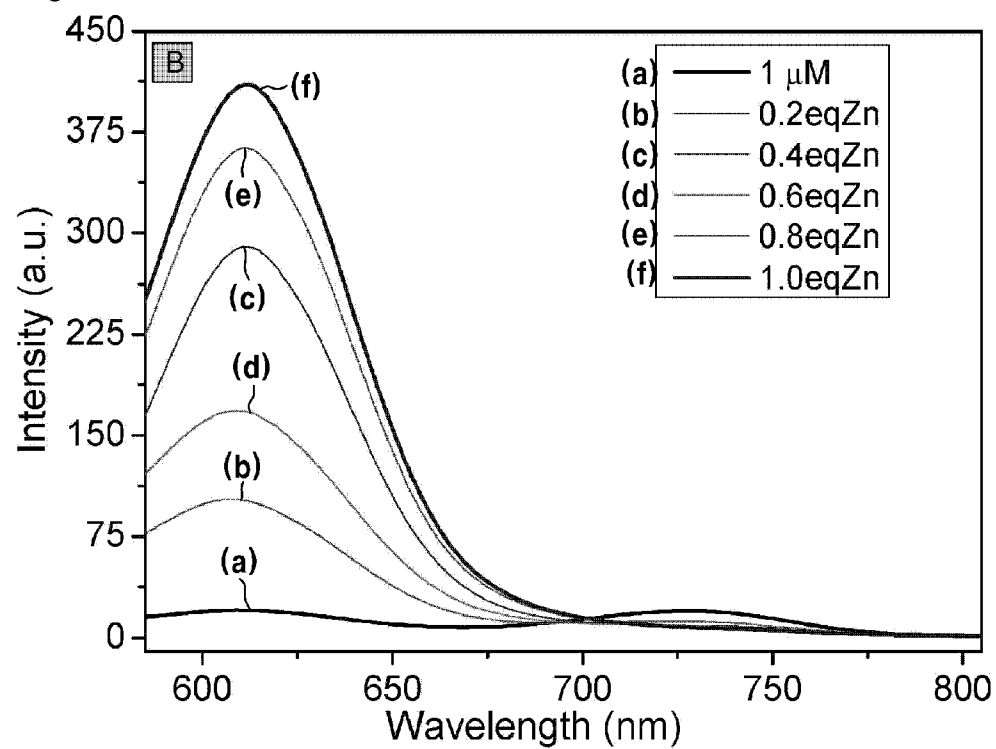
[Fig. 7]



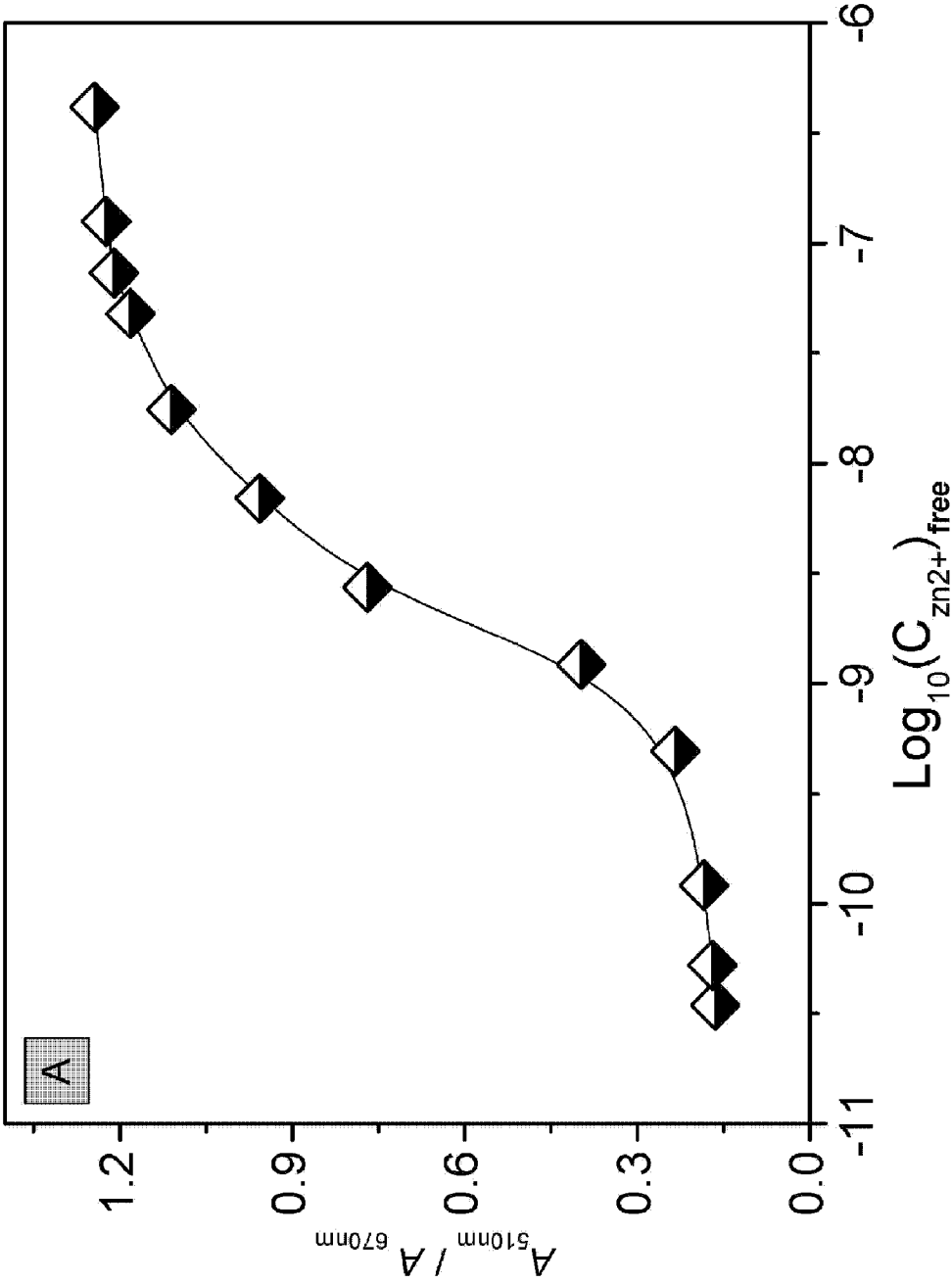
[Fig. 8a]



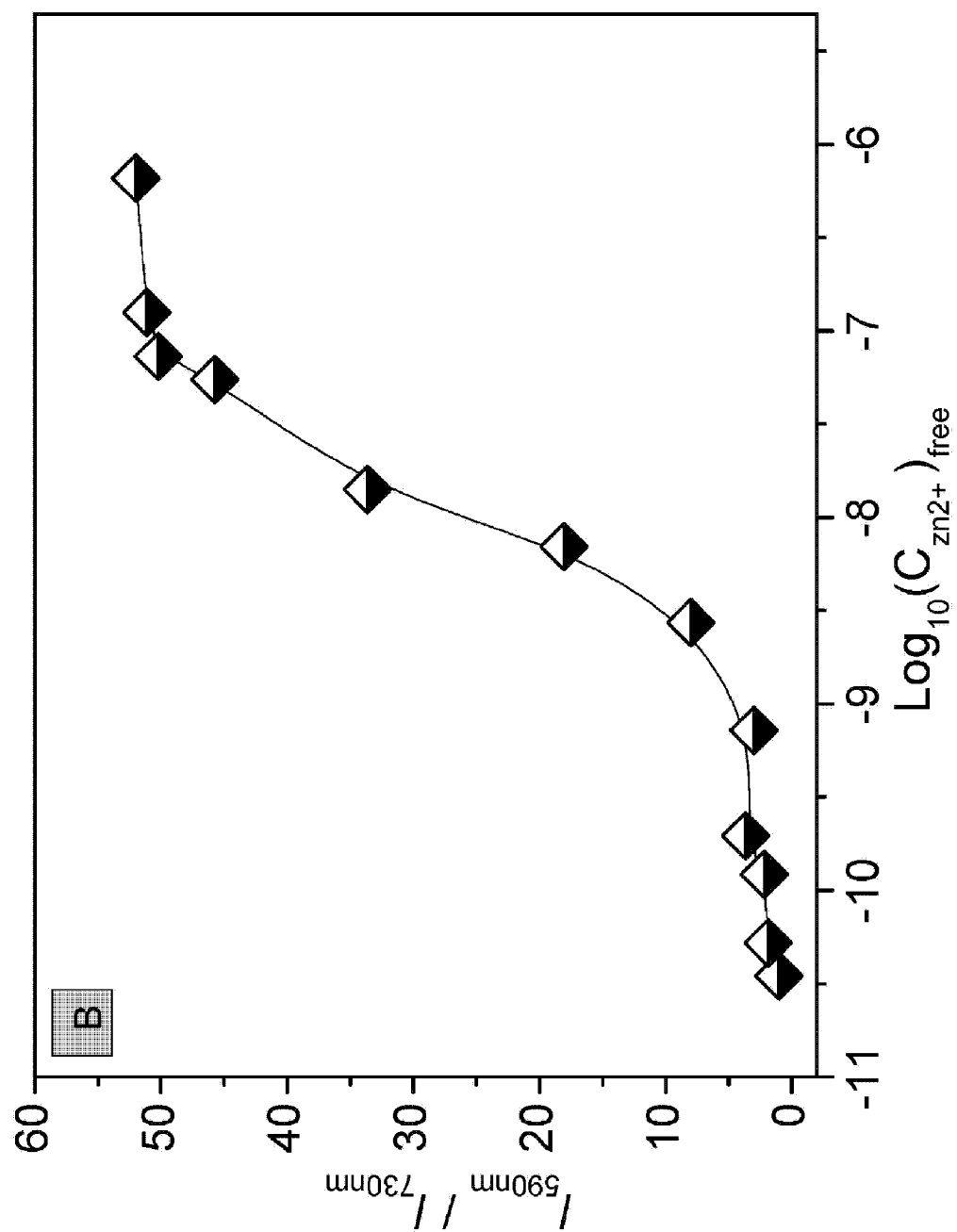
[Fig. 8b]



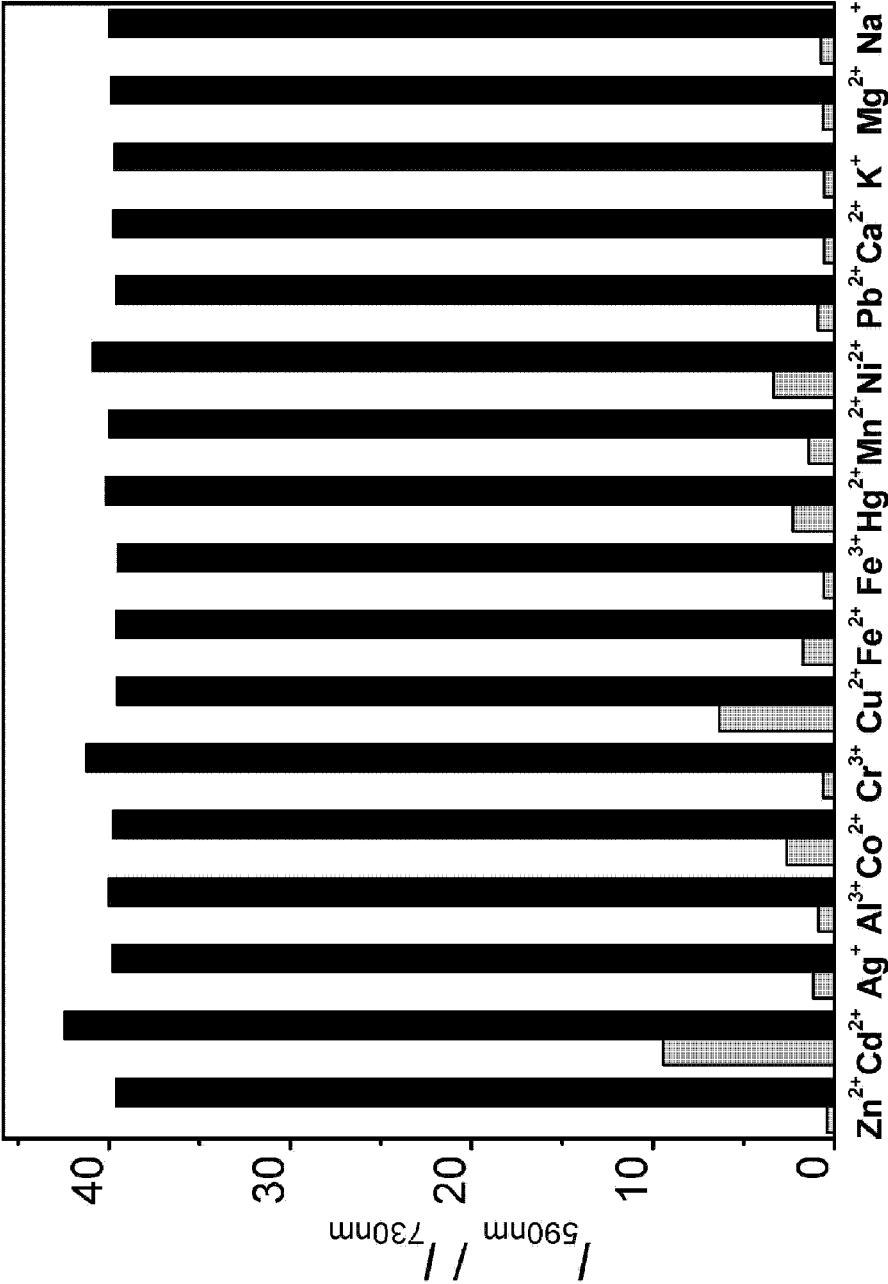
[Fig. 9a]



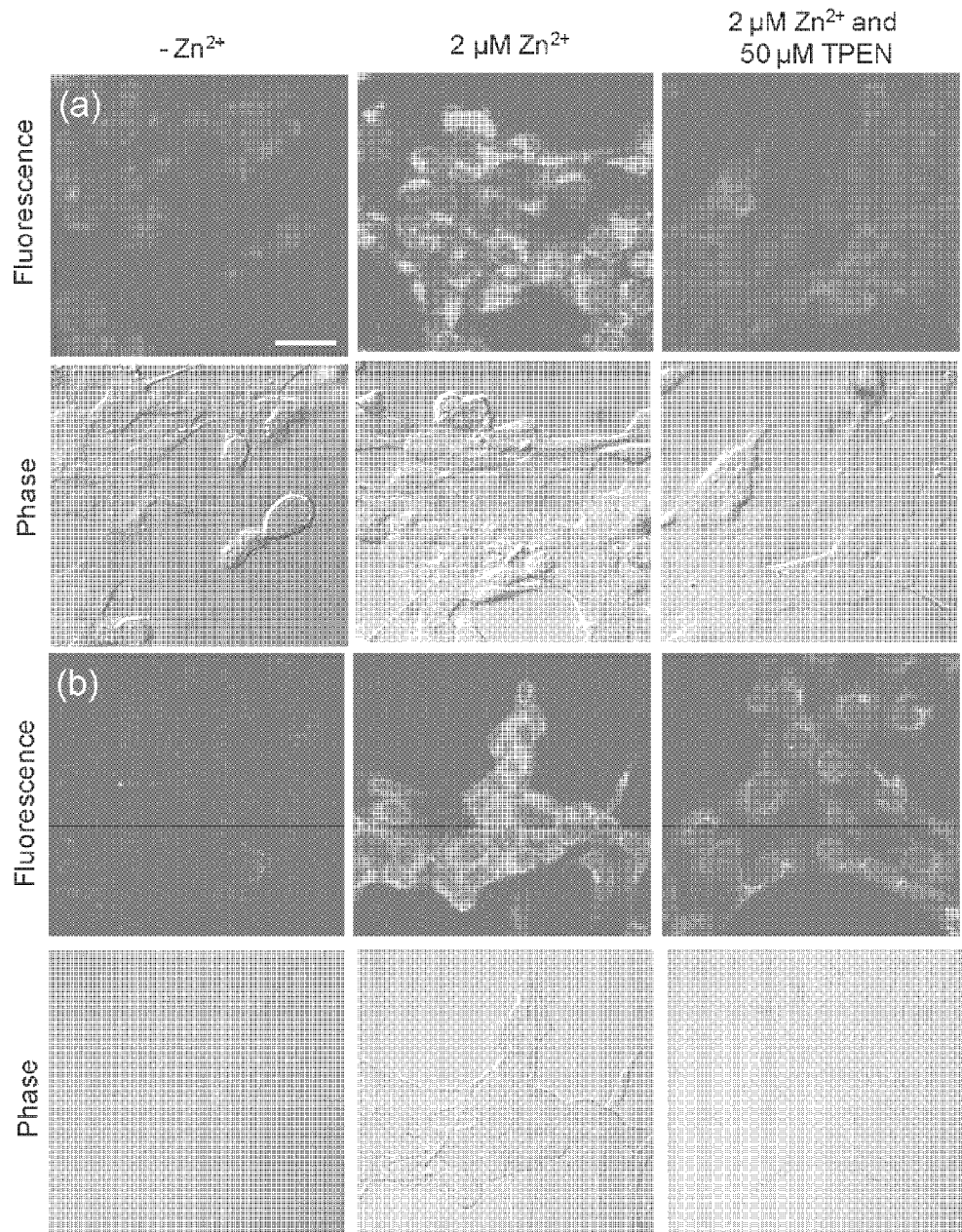
[Fig. 9b]



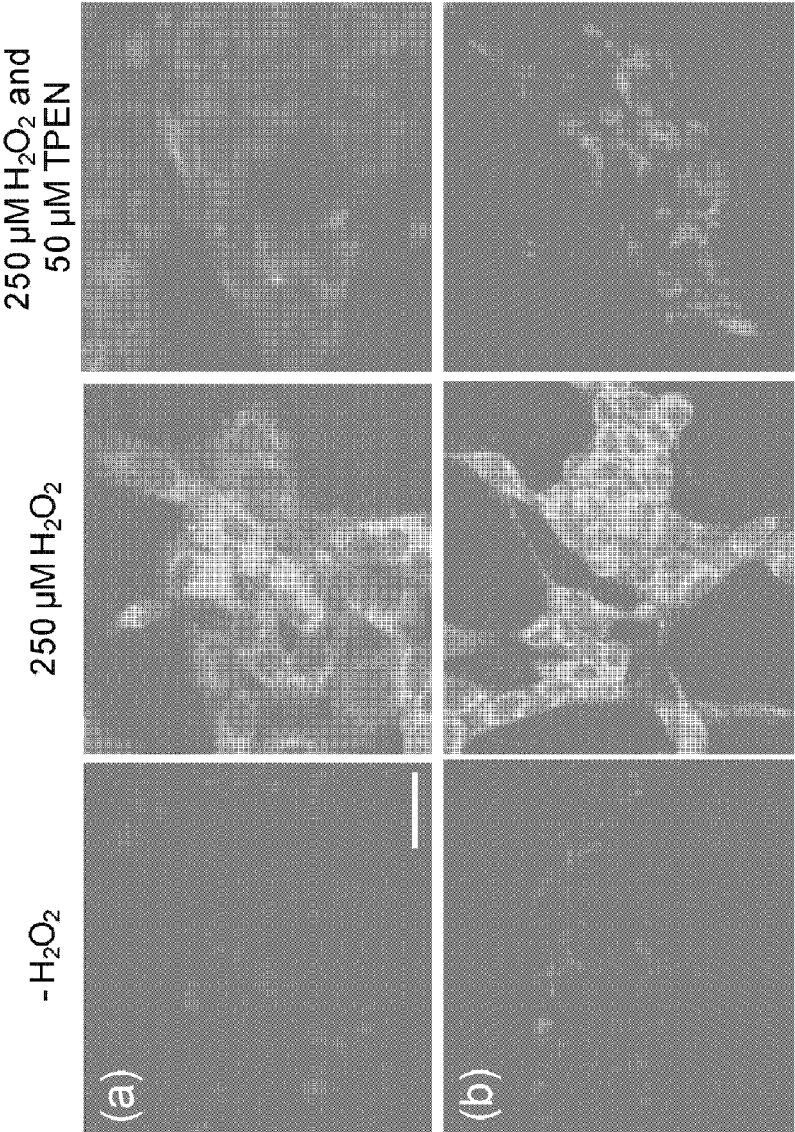
[Fig. 10]



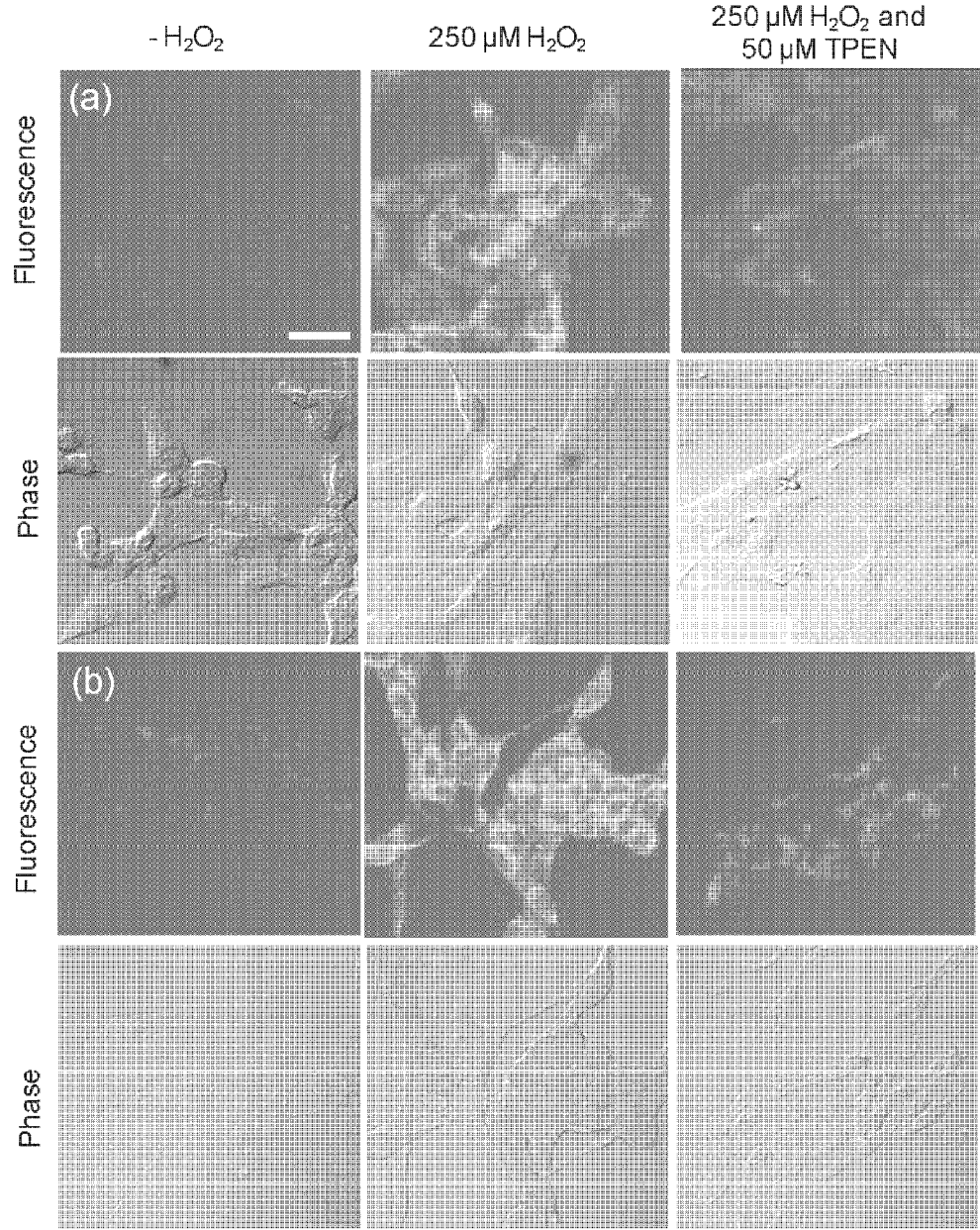
[Fig. 11]



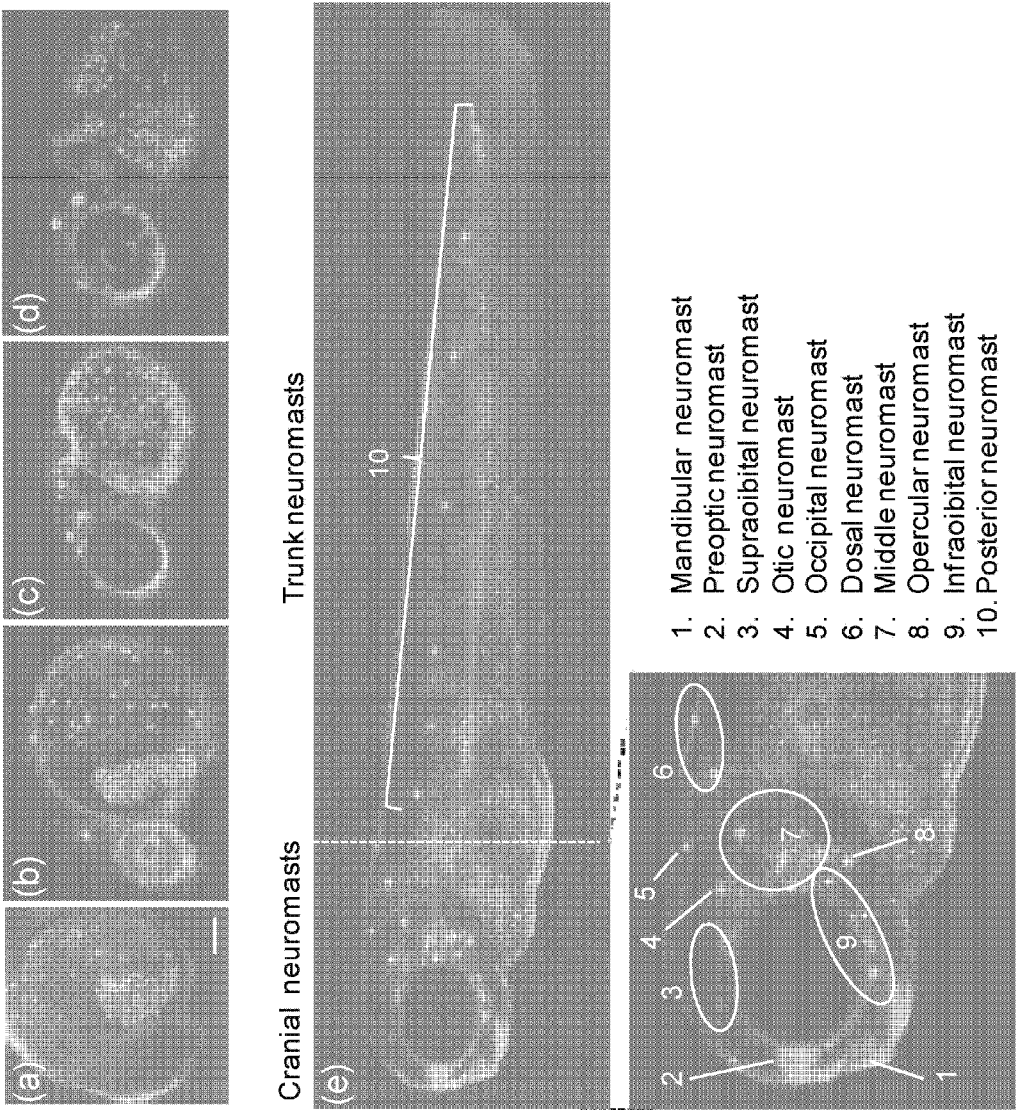
[Fig. 12]



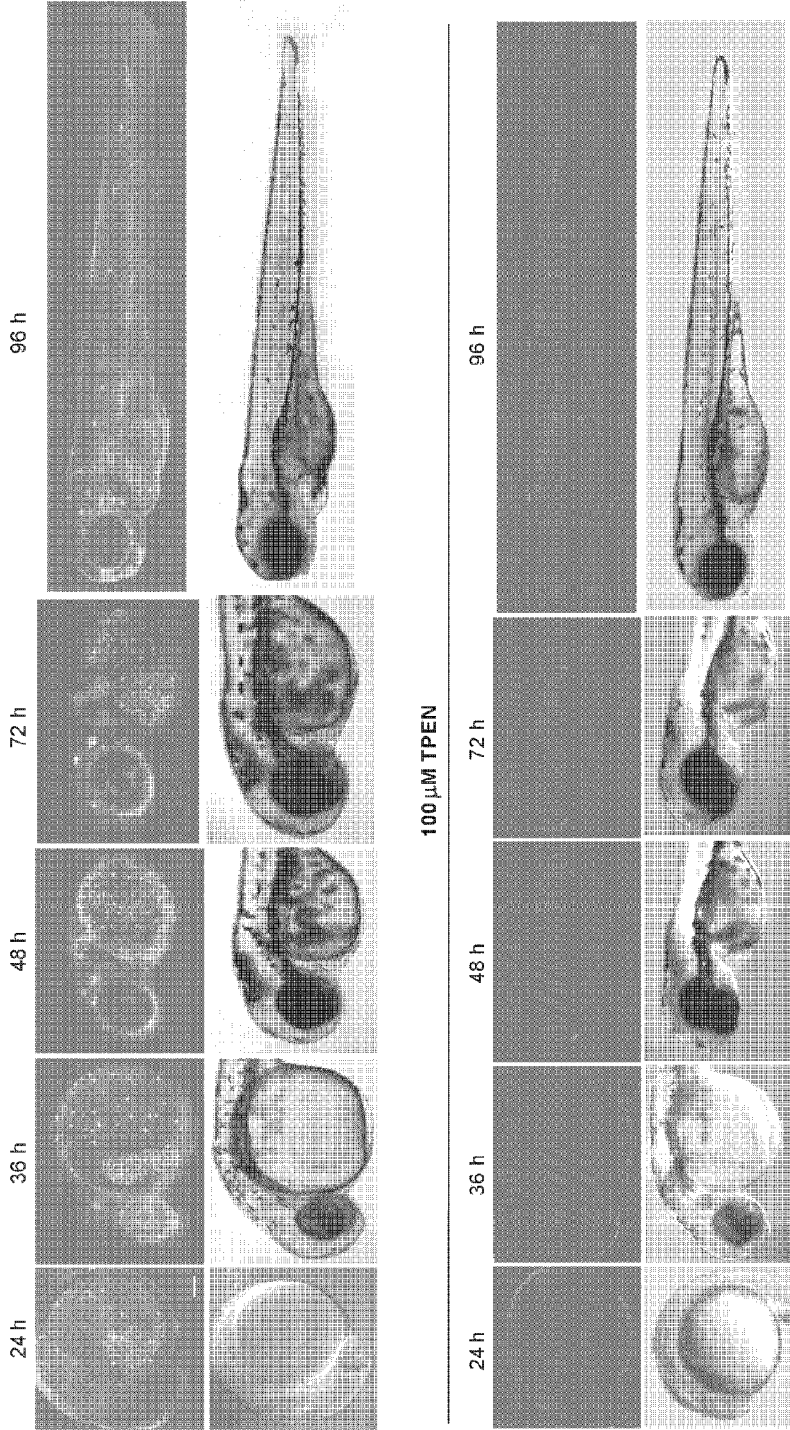
[Fig. 13]



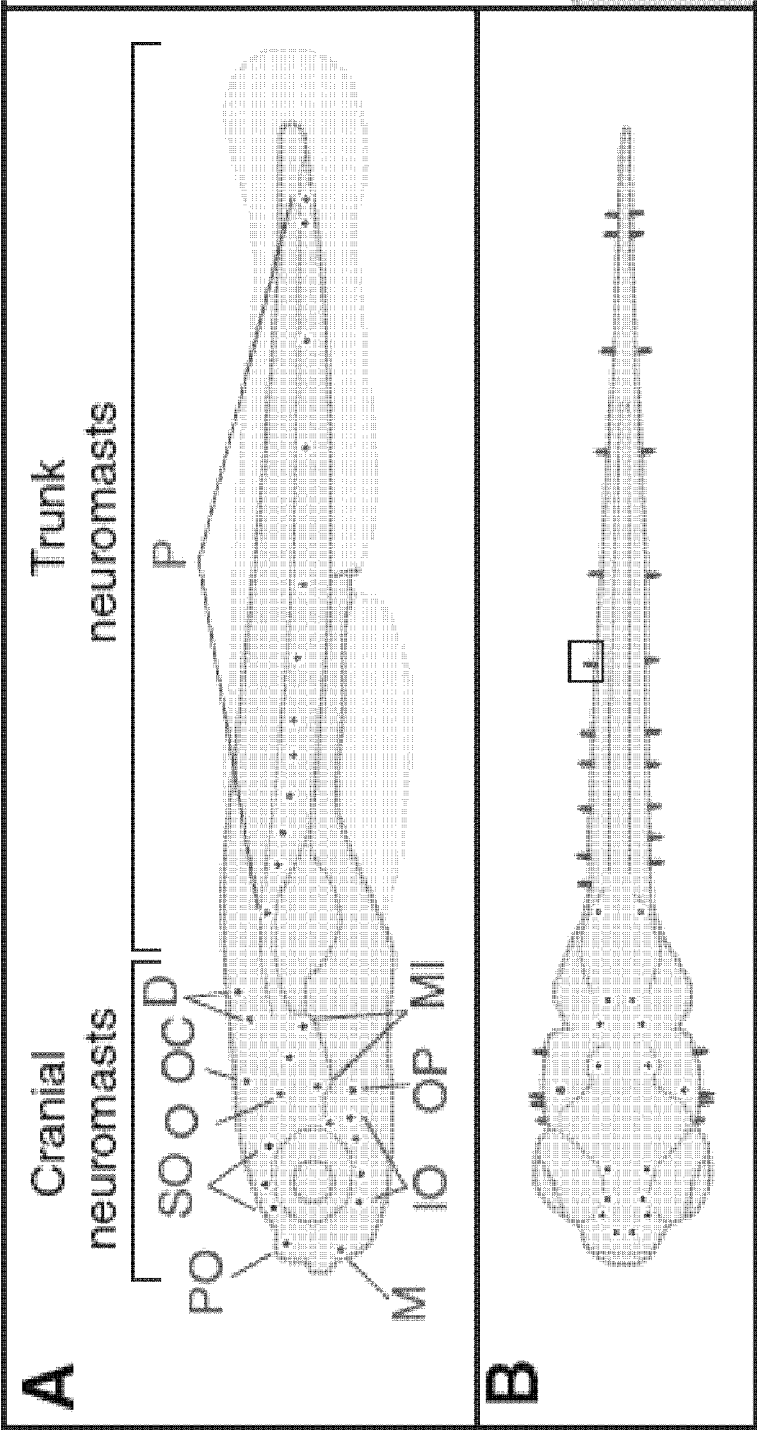
[Fig. 14]



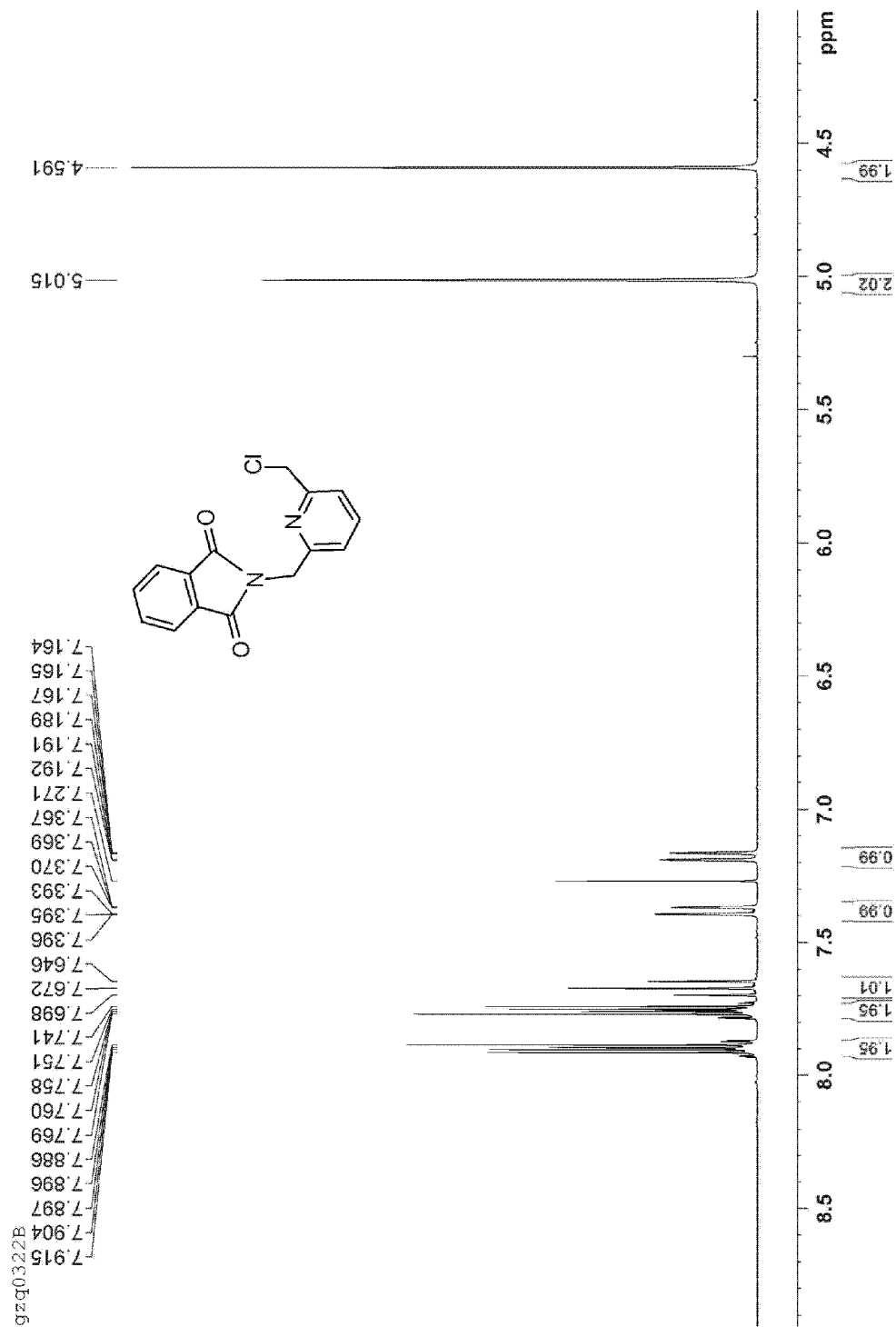
[Fig. 15]



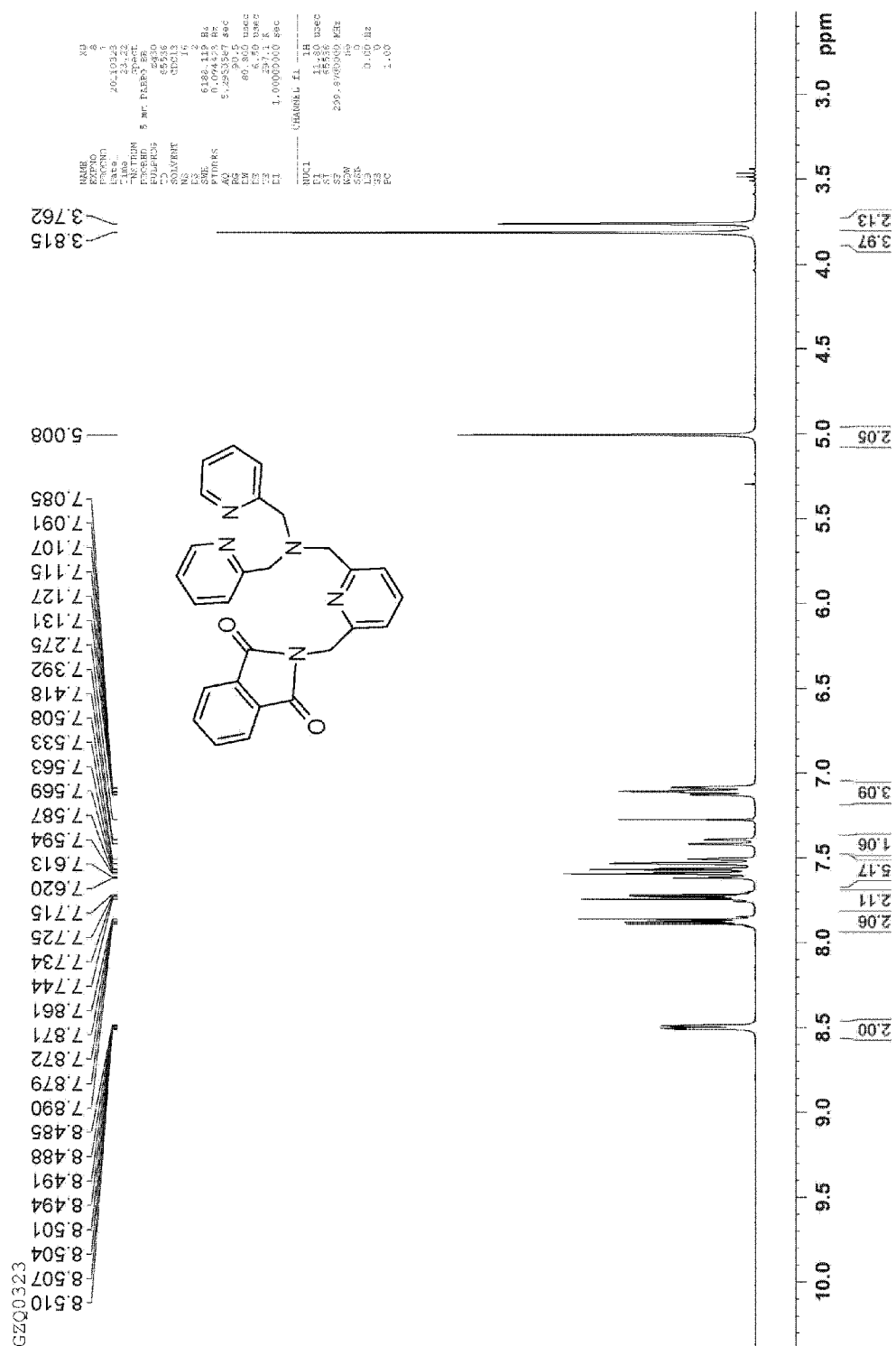
[Fig. 16]



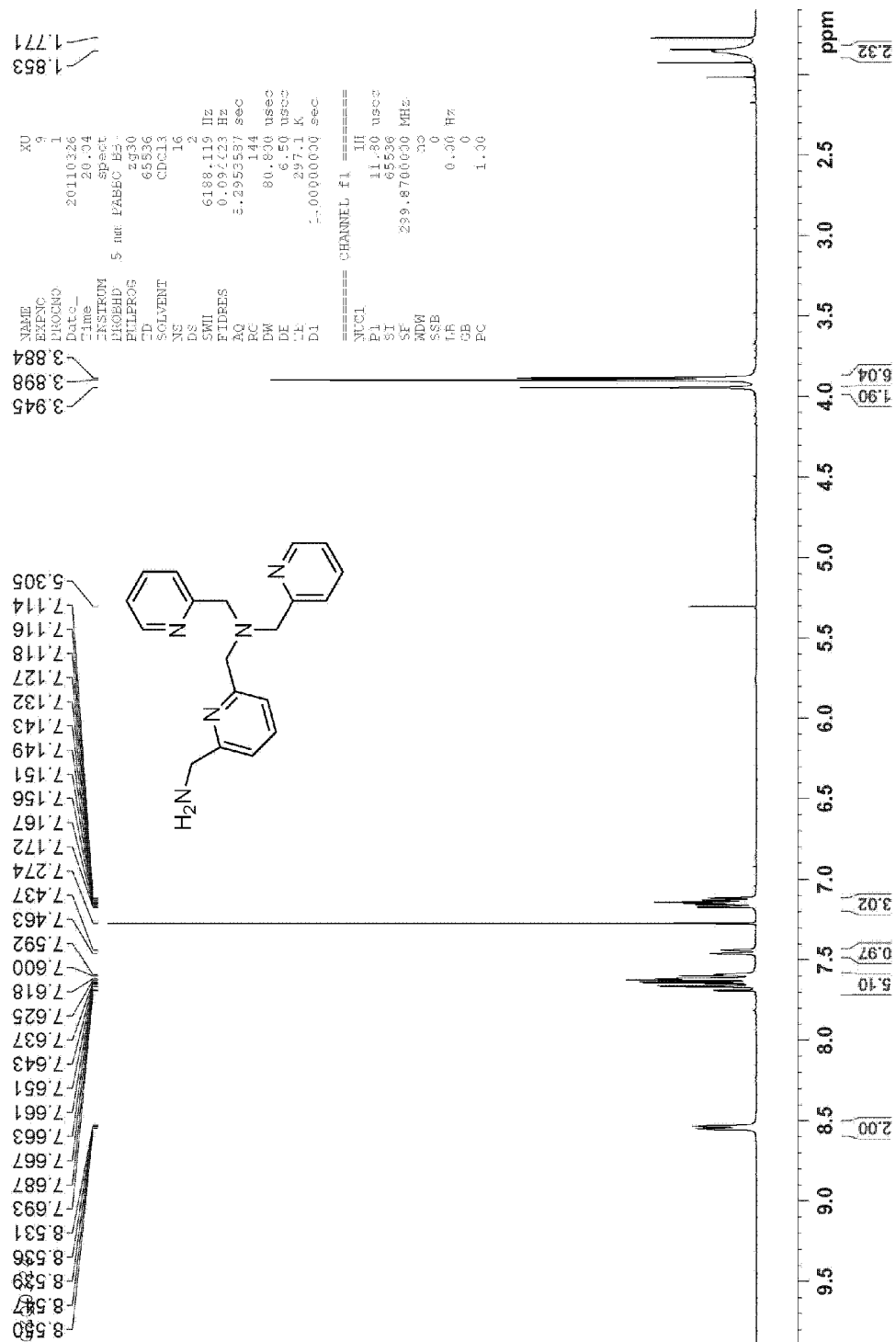
[Fig. 17a]



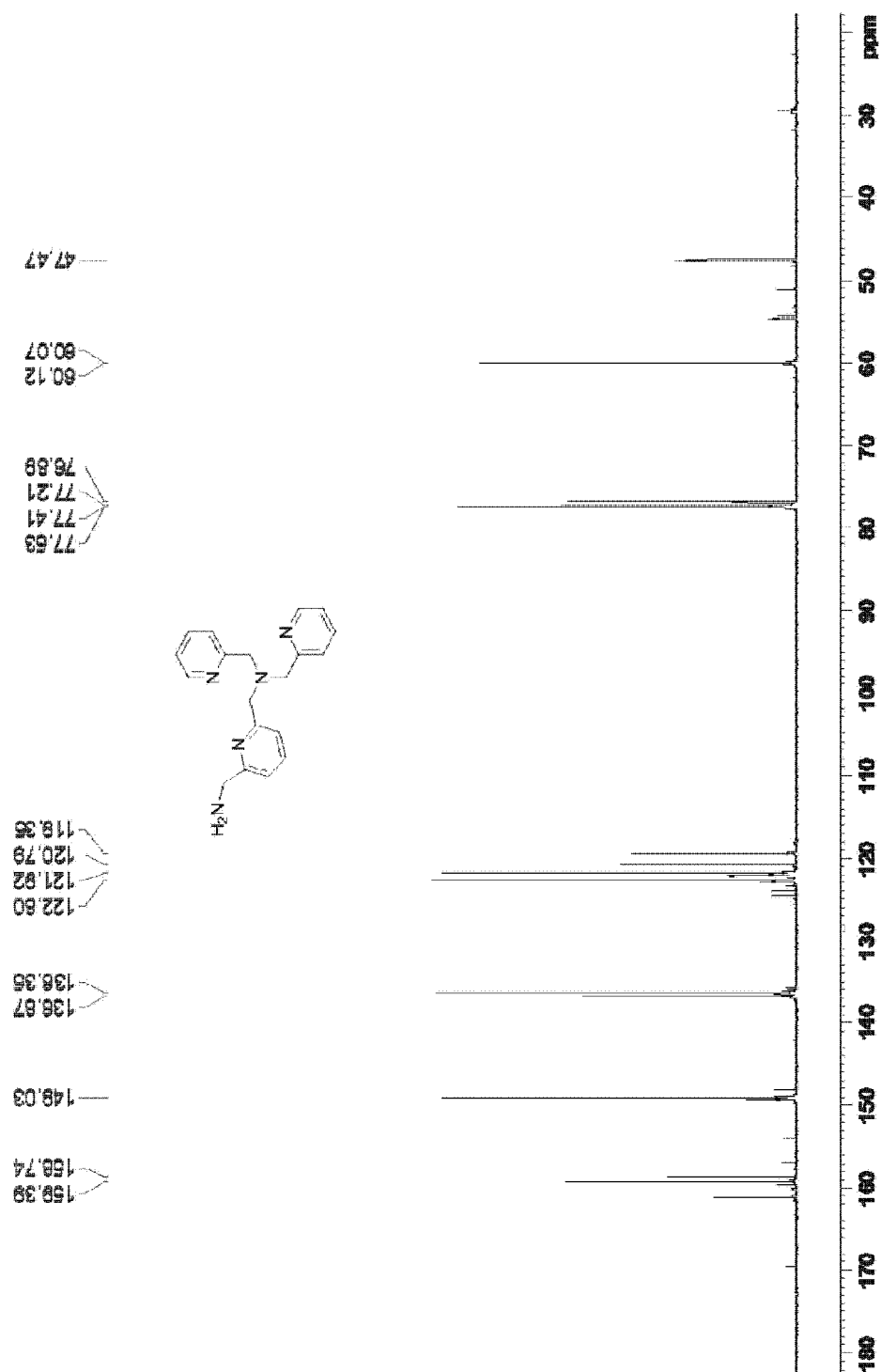
GZQ0323



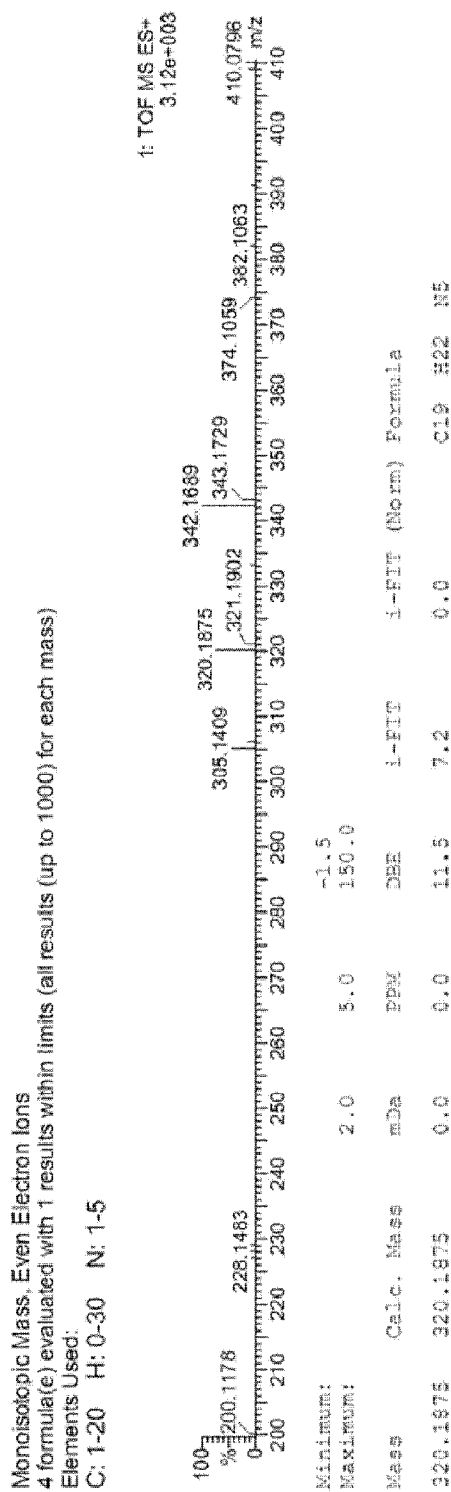
[Fig. 17c]



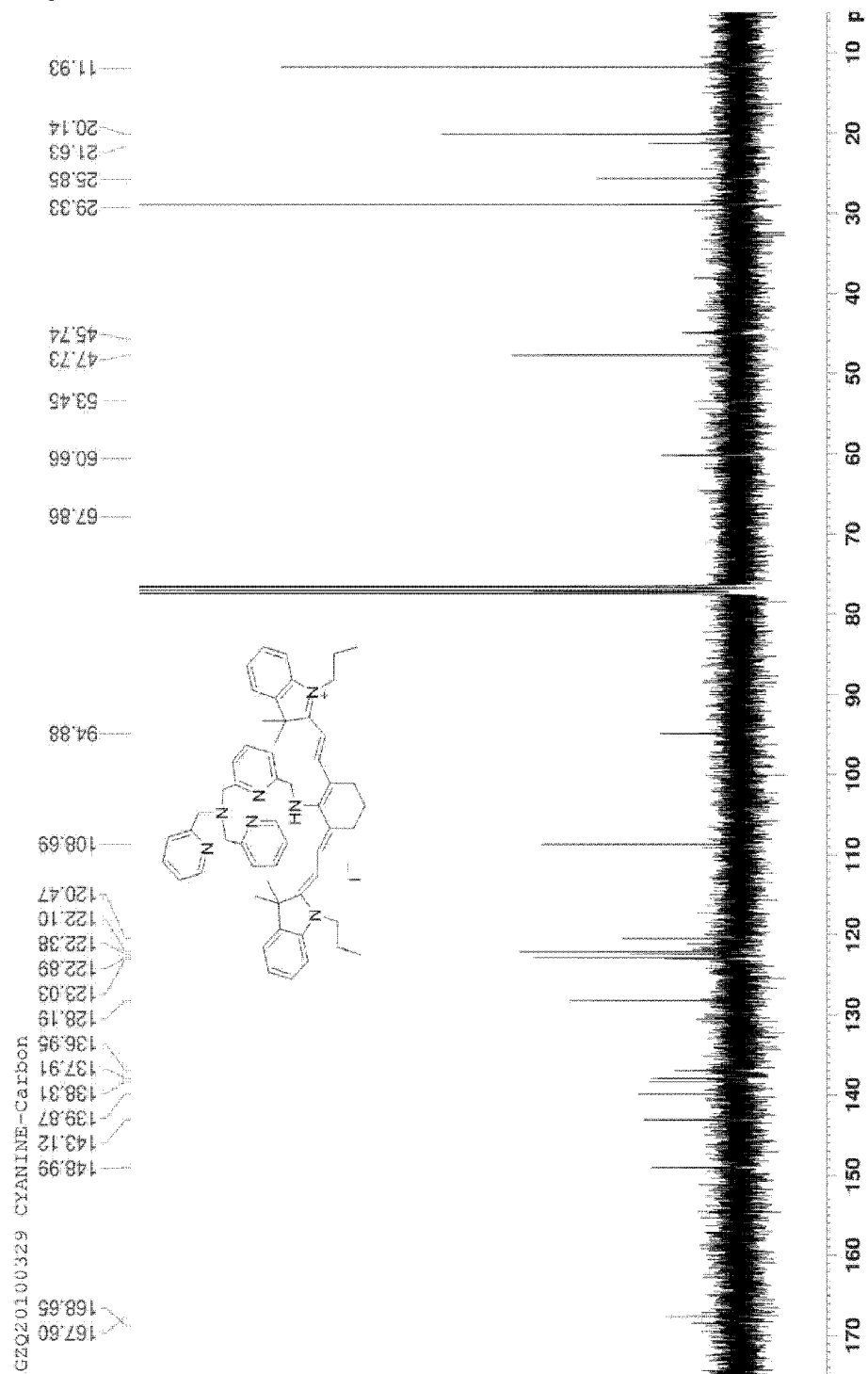
[Fig. 17d]



[Fig. 17e]



[Fig. 17h]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006288**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 33/50(2006.01)i, C07D 401/14(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/50; C12Q 1/02; C07D 403/14; C07D 401/14; G01N 33/52; G01N 21/64

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: phosphor, probe, zinc, sensor, cyanin, CTMPA, TMPA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XU et al., Fluorescent chemosensors for Zn ²⁺ , Chemical Society Reviews, 2010, vol. 39, pages 1996-2006 See pages 1996-2000, 2005; figures 2, 3.	1-17
A	CHEN et al., A near-infrared fluorescent sensor for detection of cyanide in aqueous solution and its application for bioimaging, Chemical Communications, 2010, vol. 46, pages 8953-8955 See pages 8953-8955; structure 1.	1-17
A	US 2010-0285515 A1 (NAGANO et al.) 11 November 2010 See paragraphs [0008]-[0015], [0021]-[0039]; chemical formulas 4-7.	1-17
A	BEITAT et al., Syntheses, emission properties and intramolecular ligand exchange of zinc complexes with ligands belonging to the tmpa family, Dalton Transactions, 2011, vol. 40, pages 5090-5101 See pages 5090-5100.	1-17
A	LIU et al., Responsive polymers-based dual fluorescent chemosensors for Zn ²⁺ ions and temperatures working in purely aqueous media, Analytical Chemistry, 2011, vol. 83, no. 7, pages 2775-2785 See abstract, pages 2775-2783.	1-17



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 SEPTEMBER 2013 (10.09.2013)

Date of mailing of the international search report

11 SEPTEMBER 2013 (11.09.2013)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2013/006288

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	GUO et al., A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms, Biomaterials, 2012 (November 2012), vol. 33, no. 31, pages 7818-7827 See abstract, pages 7818-7826; structures 1, 2.	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2013/006288

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2010-0285515 A1	11/11/2010	US 8507677 B2 WO 2008-099914 A1	13/08/2013 21/08/2008

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/50(2006.01)i, C07D 401/14(2006.01)i, G01N 33/52(2006.01)i, G01N 21/64(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/50; C12Q 1/02; C07D 403/14; C07D 401/14; G01N 33/52; G01N 21/64 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 형광, 프로브, 아연, 센서, 시아닌, CTMPA, TMPA		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	XU 외 2명, Fluorescent chemosensors for Zn ²⁺ , Chemical Society Reviews, 2010년, 39권, 페이지 1996-2006 페이지 1996-2000, 2005; 도면 2, 3 참조.	1-17
A	CHEN 외 9명, A near-infrared fluorescent sensor for detection of cyanide in aqueous solution and its application for bioimaging, Chemical Communications, 2010년, 46권, 페이지 8953-8955 페이지 8953-8955; 구조 1 참조.	1-17
A	US 2010-0285515 A1 (NAGANO 외 2명) 2010.11.11 단락 [0008]-[0015], [0021]-[0039]; 화학식 4-7 참조.	1-17
A	BEITAT 외 9명, Syntheses, emission properties and intramolecular ligand exchange of zinc complexes with ligands belonging to the tmpa family, Dalton Transactions, 2011년, 40권, 페이지 5090-5101 페이지 5090-5100 참조.	1-17
A	LIU 외 1명, Responsive polymers-based dual fluorescent chemosensor for Zn ²⁺ ions and temperatures working in purely aqueous media, Analytical Chemistry, 2011년, 83권, 7호, 페이지 2775-2785 요약, 페이지 2775-2783 참조.	1-17
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2013년 09월 10일 (10.09.2013)		국제조사보고서 발송일 2013년 09월 11일 (11.09.2013)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 장봉호 전화번호 +82-42-481-3353 

C (계속). 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	GUO 외 3명, A cyanine-based fluorescent sensor for detecting endogenous zinc ions in live cells and organisms, Biomaterials, 2012 (2012년 11월), 33권, 31호, 페이지 7818-7827 요약, 페이지 7818-7826; 구조 1, 2 참조.	1-17

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2013/006288

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

US 2010-0285515 A1

2010/11/11

US 8507677 B2

2013/08/13

WO 2008-099914 A1

2008/08/21