



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0104911
(43) 공개일자 2015년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 405/12 (2006.01) A61K 31/352 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07D 311/84 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0026861
(22) 출원일자 2014년03월07일
심사청구일자 2014년03월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

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

임문수
서울특별시 성동구 들레9나길 26-7 102호(성수동2가)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
특허법인충현

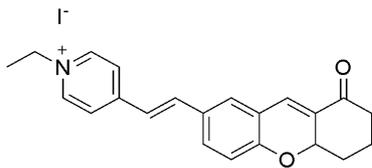
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 암 진단용 마커 및 이를 이용한 암 진단 방법

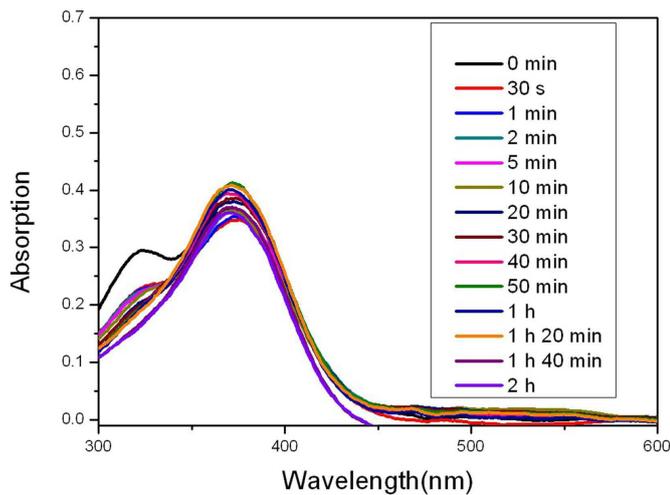
(57) 요약

본 발명은 암 진단용 마커 및 이를 이용한 암 진단 방법에 관한 것으로 하기 [화학식 1]로 표시되고, 살아있는 세포 내에서 티올-함유 아미노산의 티올 수준을 검출하여 정상 세포 및 암 세포를 구별할 수 있으며, 혈액 및 조직 내에서도 티올-함유 아미노산을 측정하여 암의 성장을 인지할 수 있다.

[화학식 1]



대표도 - 도1a



(72) 발명자

한지유

경기도 의정부시 동일로 451-25 102-1402(신곡동, 장암현대1차아파트)

임자윤

서울특별시 마포구 월드컵북로 260 32동 203호(성산동, 성산시영아파트(대우))

이재홍

서울특별시 강남구 삼성로4길 17 503-507(개포동, 주공아파트)

김중훈

서울특별시 서초구 효령로23길 31 101호(방배동, 멤버스빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2009-0081566
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	리더연구자지원_창의적연구지원사업
연구과제명	발광센서재료연구단
기 여 율	0.4/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2013.03.01 ~ 2014.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2013R1A1A2062997
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공분야 기초연구사업
연구과제명	새로운 암치료 작용물질: 과산화수소 인식 고선택성 약물 전달 시스템
기 여 율	0.3/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2013.11.01 ~ 2014.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2012M3A9C7050139
부처명	교육과학기술부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오.의료기술개발사업
연구과제명	줄기세포의 3-D 스페로이드 분화기법을 이용한 독성평가용 간세포생산 및 공급체계 확립
기 여 율	0.3/1
주관기관	고려대학교
연구기간	2013.10.01 ~ 2014.09.30

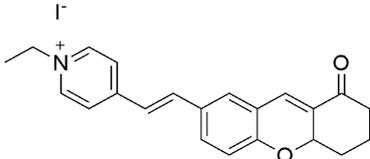
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물:

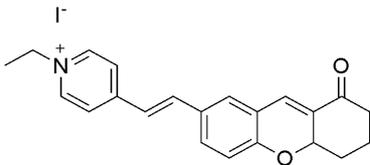
[화학식 1]



청구항 2

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 포함하는 암 진단용 마커:

[화학식 1]



청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화합물은 티올-함유 아미노산을 검출하는 것을 특징으로 하는 암 진단용 마커.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 티올-함유 아미노산은 글루타티온(GSH)인 것을 특징으로 하는 암 진단용 마커.

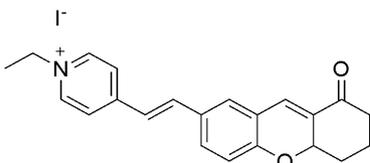
청구항 5

(a) 피검체로부터 분리된 조직 샘플을 제공하는 단계;

(b) 상기 제공된 샘플에 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 첨가하는 단계; 및

(c) 상기 화합물이 첨가된 샘플의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 생체내 티올-함유 아미노산을 검출하여 암을 예측 또는 진단하기 위하여 정보를 제공하는 방법;

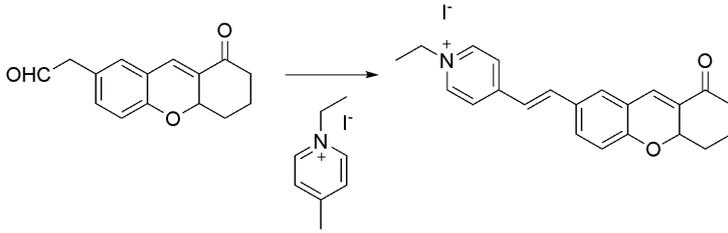
[화학식 1]



청구항 6

하기 [반응식 1]에 따라 하기 [화학식 2]의 화합물과 1-에틸-4-메틸피리디늄 요오드를 에탄올로 교반한 후 피페리딘을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 제조방법;

[반응식 1]



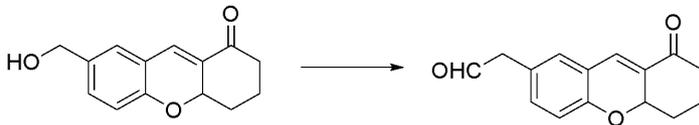
[화학식 2]

[화학식 1].

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 [화학식 2]의 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄(DCM)에 용해된 피리디늄클로로폼메이트(PCC) 현탁액에 하기 [화학식 3]의 화합물을 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 화합물의 제조방법;

[반응식 2]



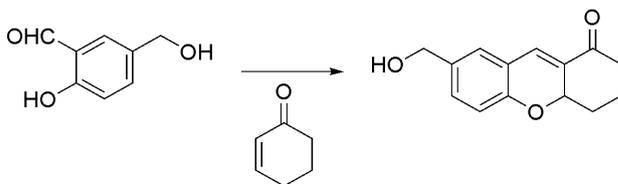
[화학식 3]

[화학식 2].

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 [화학식 3]의 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 테트라하이드로퓨란(THF)에 용해된 2-하이드록시-5-(하이드록시메틸)벤즈알데하이드 용액에 2-사이클로헥센-1-원, 이미다졸 및 탈이온수를 첨가하여 반응함으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 화합물의 제조방법;

[반응식 3]



[화학식 3].

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 살아있는 세포 내에서 티올-함유 아미노산(글루타티온(GSH))의 농도를 검출하여 정상 세포 및 암 세포를 구별할 수 있으며, 혈액 및 조직 내에서도 티올-함유 아미노산을 측정하여 암의 성장을 인지할 수 있는 암 세포 진단을 위한 마커 및 이이를 이용한 암 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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, 이수치가 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 타기관에 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 마커가 개발되었다. 그러나, 티올 검출을 위한 형광 표지자에 관해서는 많이 연구된 바 있지만((a) P. K. Pullella, 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] 또한, 기존 티올 검출을 위한 형광 마커는 다른 단백질 또는 GSH와 유사한 구조인 Cys(시스테인) 및 Hcy(호모시스테인) 간의 교차 반응성에 의한 간섭으로 인해 선명한 측정이 어려운 문제가 있다.

[0006] 따라서, 살아있는 세포, 조직 및 혈전에서 GSH의 검출을 위한 높은 민감도 및 선택도뿐만 아니라 독성이 없는 마커가 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

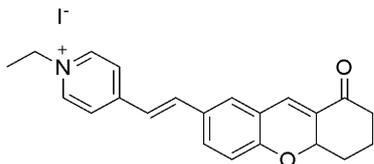
[0007] 본 발명의 목적은 살아있는 세포 내에서 티올-함유 아미노산(글루타티온(GSH))의 농도를 검출하여 정상 세포 및 암 세포를 구별할 수 있으며, 혈액 및 조직 내에서도 티올-함유 아미노산을 측정하여 암의 성장을 인지할 수 있는 암 진단용 마커 제공하는데 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 암 진단용 마커를 이용하여 암을 예측 또는 진단하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 화합물은 하기 [화학식 1]로 표시된다;

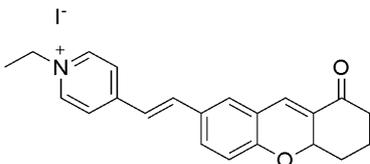
[0010] [화학식 1]



[0011]

[0012] 또한, 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 암 진단용 마커는 하기 [화학식 1]을 포함한다;

[0013] [화학식 1]



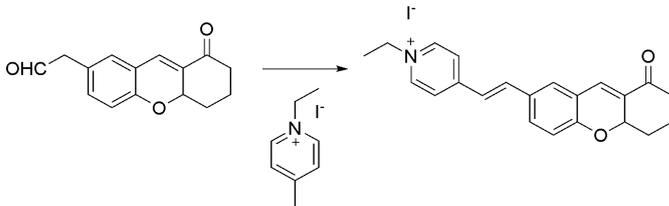
[0014]

[0015] 상기 화합물은 티올-함유 아미노산을 검출할 수 있으며, 티올-함유 아미노산은 글루타티온(GSH), Cys(시스테인) 및 Hcy(호모시스테인)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 들 수 있으나, 바람직하게는 글루타티온(GSH)이다.

[0016] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 생체내 티올-함유 아미노산을 검출하여 암을 예측 또는 진단하기 위하여 정보를 제공하는 방법은 (a) 피검체로부터 분리된 조직 샘플을 제공하는 단계; (b) 상기 제공된 샘플에 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 첨가하는 단계; 및 (c) 상기 화합물이 첨가된 샘플의 형광을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물의 제조방법은 하기 [반응식 1]에 따라 하기 [화학식 2]의 화합물과 1-에틸-4-메틸피리디늄 요오드를 에탄올로 교반한 후 피페리딘을 첨가하여 반응함으로써 제조된다;

[0018] [반응식 1]

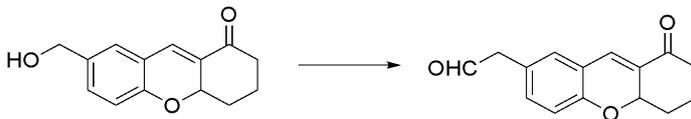


[0019]

[0020] [화학식 2] [화학식 1].

[0021] 상기 [화학식 2]의 화합물은 하기 [반응식 2]에 따라 디클로로메탄(DCM)에 용해된 피리디늄클로로크로메이트(PCC) 현탁액에 하기 [화학식 3]의 화합물을 첨가하여 반응함으로써 제조된다;

[0022] [반응식 2]

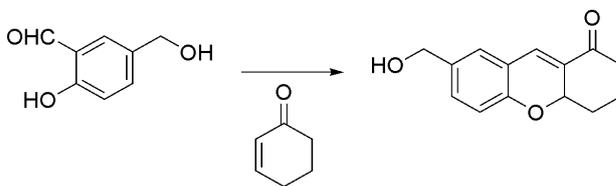


[0023]

[0024] [화학식 3] [화학식 2].

[0025] 상기 [화학식 3]의 화합물은 하기 [반응식 3]에 따라 테트라하이드로퓨란(THF)에 용해된 2-하이드록시-5-(하이드록시메틸)벤즈알데하이드 용액에 2-사이클로헥센-1-원, 이미다졸 및 탈이온수를 첨가하여 반응함으로써 제조된다;

[0026] [반응식 3]



[0027]

[0028] [화학식 3].

발명의 효과

[0029] 본 발명의 암 진단용 마커는 티올에 대하여 우수한 선택도 및 민감도를 보이며 살아있는 세포 내에서 GSH의 농도를 검출하여 정상 세포 및 암 세포를 구별할 수 있으며, 혈액, 종양 및 조직(간)내에서도 GSH를 측정하여 암의 성장을 인지할 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 마커는 전혈, 종양 및 조직에서 민감하고 정확하게 GSH 수준을 검출하며 무독성이므로 암 진단에 사용할 수 있을 뿐만 아니라 암의 병리학에서 광범위한 생물학적 및 임상 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1a는 100 당량의 GSH 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 시간에 따른 흡광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 1b는 GSH의 부재 및 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 여기(점선) 및 발광 스펙트럼이다.

도 2a는 100 당량의 GSH 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2b는 상이한 농도로 GSH를 첨가 후 [화학식 1] 화합물의 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 상이한 pH값 하에서 GSH의 존재(붉은 점) 및 부재(검은 점)에 따른 [화학식 1] 화합물의 형광 강도 비율 (I_{496}/I_{550})의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4a, 4b 및 4c는 PBS 용액 내 각각 100 당량, 1 당량 및 10 당량 Cys의 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5a, 5b 및 5c는 PBS 용액 내 각각 100 당량, 1 당량 및 10 당량 Hcy의 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 DMSO-*d*₆/D₂O(3/1)에서 Cys(1 당량) 및 GSH(1 당량)의 부재 및 존재하에서 [화학식 1] 화합물(5 mM)의 ¹H-NMR 스펙트럼이다(시료 첨가 2시간 후 데이터 측정).

도 7a 및 7b는 상온에서 PBS 용액 내 다양한 시료의 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 형광 스펙트럼이다(시료 첨가 1분(7a) 및 2시간(7b) 후 측정).

도 7c는 상온에서 PBS 용액 내 다양한 시료의 존재하에서 [화학식 1] 화합물의 형광 변화를 나타낸 그래프이다(시료 첨가 1분(파란 막대) 및 2시간(빨간 막대) 동안 [화학식 1] 화합물과 배양 후 측정).

도 8은 GSH만 존재할 때와 Cys 또는 Hcy이 GSH와 같이 존재하는 조건하에서 [화학식 1] 화합물의 496 nm와 550 nm에서 형광세기비율을 비교한 그래프이다.

도 9a는 HeLa, HepG2, Hep3B, Huh7, HPH, 및 BJ에서 상이한 농도(0, 5, 20, 50, 및 100 μM)의 [화학식 1] 화합물에 대하여 540 nm에서 측정된 흡광도 그래프이다.

도 9b는 [화학식 1] 화합물의 상이한 농도에 대한 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다

도 10a-d는 살아있는 HeLa 세포와 [화학식 1] 화합물을 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 및 명시야(bright-field) 이미지이다.

도 10e-h는 살아있는 HeLa 세포를 0.2 mM NEM로 미리 배양하고 [화학식 1] 화합물로 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지이다.

도 10i-l은 살아있는 HeLa 세포를 0.5 mM NEM로 미리 배양하고 [화학식 1] 화합물로 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지이다.

도 10m-p는 살아있는 HeLa 세포를 1 mM NEM로 미리 배양하고 [화학식 1] 화합물로 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지이다.

도 11은 2시간 동안 [화학식 1] 화합물로 처리되기 전에 상이한 NEM 농도로 배양된 HeLa 세포의 B/Y의 정량 분석을 나타낸 그래프이다.

도 12a-f는 살아있는 암 세포주(HeLa, HepG2, Huh7, 및 Hep3B), 인간 일차 간세포(HPH) 및 정상 삼유 아세포 세포주(BJ)를 [화학식 1] 화합물로 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 이미지이다(배율: X200).

도 12g는 [화학식 1] 화합물의 B/Y비율을 정량 분석한 그래프이다(G: 노란색 채널 및 파란색 채널의 평균 형광 강도).

도 12h는 웨스턴 블롯에 의해 총 세포 내 GSH 농도의 정량분석을 나타낸 그래프이다.

도 12i는 지수, 2차 다항식 및 선분(linear fit)의 회귀 모델을 도 12g 및 도 12h에 적용한 세포 내 GSH(μM)의 상이한 세포주 및 식(expression)에서 B/Y 비율에 대한 산포도 데이터를 나타낸 그래프이다.

도 13a-c는 정상 및 이종이식 마우스에서 얻은 스냅 냉동 간 및 종양 조직에 대한 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율 이미지이다.

도 13d는 이중이식 마우스 모델 및 해부된 종양, 조직에 대한 이미지이다.

도 13e는 정상 마우스 및 종양 이중이식 마우스의 전혈에 대한 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율(n = 3 및 n = 5)을 나타낸 그래프이다.

도 14는 상이한 농도에서 GSH 비율인 산포도 데이터에 대한 선형 회귀 모델에 의해 맞춰진 표준곡선이다.

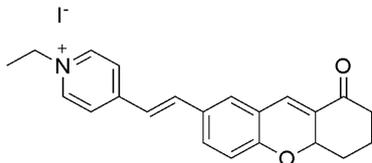
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 살아있는 세포 내에서 티올-함유 아미노산(글루타티온(GSH))의 농도를 검출하여 정상 세포 및 암 세포를 구별할 수 있으며, 혈액 및 조직 내에서도 티올-함유 아미노산을 측정하여 암의 성장을 인지할 수 있는 암 진단용 마커 및 이를 이용한 암 진단 방법에 관한 것이다.

[0033] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0034] 본 발명의 화합물은 하기 [화학식 1]로 표시되며, 이를 포함하여 암 진단용 마커로 이용할 수 있다. 상기 암 세포 진단을 위한 마커는 살아있는 암 세포, 생체내 종양 및 혈액 등에서 티올-함유 아미노산, 예컨대 글루타티온(GSH)의 농도변화를 감지하기 위한 형광 마커이다.

[0035] [화학식 1]



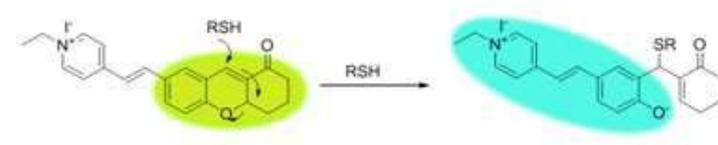
[0036]

[0037] 본 발명에 따른 [화학식 1]은 크로메논(Chromenone) 유도체로서, 마이클 친핵성 첨가에 대한 수용체로서 작용한다.

[0038] 또한, 센서내로 특정 작용기의 도입은 바이오 티올과 센서 사이의 정전기적 인력을 증가시켜 티올 검출의 선택도를 향상시키기 위한 좋은 전략이 될 수 있다. 이에 따라, 본 발명에서는 비닐 링커에 의한 크로메논(Chromenone) 골격에 피리디늄(pyridinium) 잔기를 부착하여 생물학적 티올의 식별을 위한 새로운 형광 마커([화학식 1])를 제안하고 있다.

[0039] 본 발명에 따른 [화학식 1]은 하기 [반응식 4]에 따라 티올의 존재(RSH)하에서, 마이클 첨가에 의해 유도된 크로메논(Chromenone) 잔기의 링 오프닝으로 인하여 크로메논(Chromenone) 형광 채널이 차단되고 페닐피리디닐비닐렌 채널을 활성화시켜, 형광의 정량적 변화를 이끌 수 있다. 이는 다양한 바이오매트릭스(biomatrices)에서 자가 형광의 간섭을 감소시킴으로써 높은 신호/배경 비율을 나타낸다.

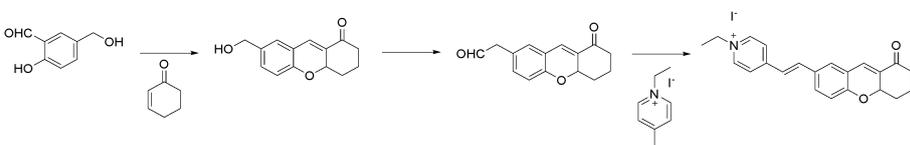
[0040] [반응식 4]



[0041]

[0042] 상기 [화학식 1]의 화합물은 하기 [반응식 A]의 합성과정으로 합성된다.

[0043] [반응식 A]



[0044]

[0045] [화학식 3] [화학식 2] [화학식 1]

[0046] 상기 암 세포 진단을 위한 마커에 포함되는 [화학식 1]의 화합물은 테트라언하이드로퓨란(THF)에 용해된 2-하이드록시-5-(하이드록시메틸)벤즈알데하이드 용액에 2-사이클로헥센-1-원 및 이미다졸을 첨가한 후 탈이온수를 첨가하여 20 내지 30 °C에서 40 내지 55시간 동안 교반하여 [화학식 3]의 화합물을 제조한 후, 디클로로메탄(DCM)에 용해된 피리디늄클로로크롬메이트(PCC) 현탁액에 상기 [화학식 3]의 화합물을 첨가하여 20 내지 30 °C에서 0.5 내지 3시간 동안 교반하여 [화학식 2]의 화합물을 제조한 다음, 상기 [화학식 2]의 화합물과 1-에틸-4-메틸피리디늄 요오드를 에탄올로 교반한 후 피페리딘을 첨가하여 20분 내지 2시간 동안 80 내지 110 °C로 환류 교반하여 제조하였다.

[0047] 이러한 화합물의 구조는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS 분석 등을 통하여 확인할 수 있다.

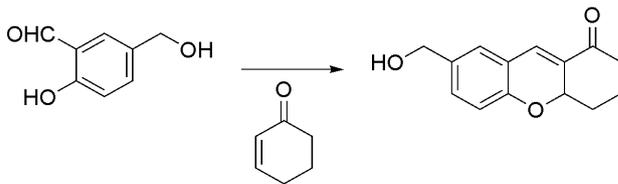
[0048] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0049] <실시예>

[0050] **합성예 1. [화학식 1]로 표시되는 화합물의 합성**

[0051] 1-1. [화학식 3]으로 표시되는 화합물의 합성

[0052] [반응식 3]



[0053]

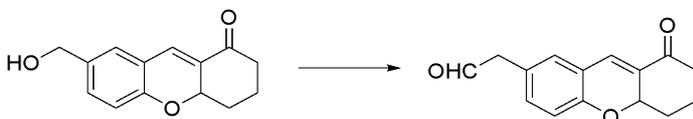
[0054] [화학식 3]

[0055] THF(3 ml)에 용해된 2-하이드록시-5-(하이드록시메틸)벤즈알데하이드(600 mg, 4 mmol) 용액에 1.5 당량의 2-사이클로헥센-1-원(576 mg, 6 mmol) 및 1.5 당량의 이미다졸(408 mg, 6 mmol)을 첨가한 후 탈이온수(3 ml)와 혼합한 다음 상기 혼합물을 상온(25 °C)에서 교반하였다. 반응이 종료되면(TLC로 확인), 최종 혼합물을 1M HCl(20 ml)로 처리하고, 에틸아세테이트로 추출한 후 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공하에서 농축하였다. 상기 농축액을 실리카겔 플래쉬 크로마토그래피(Hexane/EtOAc = 100% to 30%)로 정제하여 노란색 고체인 [화학식 3]의 화합물 460 mg(수율: 50%)을 얻었다.

[0056] ¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): δ 1.64-1.75(m, 1H), 1.95-2.11(m, 2H), 2.33-2.61(m, 3H), 4.60(s, 1H), 4.95-4.99(m, 1H), 6.86(d, J=8.3Hz, 1H), 7.21(s, 1H), 7.24-7.27(m, 1H), 7.39(s, 1H); ¹³C-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 18.14, 29.81, 39.02, 64.78, 74.91, 116.32, 122.28, 128.76, 130.76, 131.27, 131.65, 134.96, 155.56, 197.86; ESI-MS: m/z=229.05[M-H]⁻.

[0057] 1-2. [화학식 2]로 표시되는 화합물의 합성

[0058] [반응식 2]



[0059]

[0060]

[화학식 3]

[화학식 2]

[0061]

디클로로메탄(DCM)(50 ml)에 용해된 피리딘늄클로로크로메이트(Pyridiniumchlorochromate, 646 mg, 3 mmol) 현탁액에 [화학식 3]의 화합물(460 mg, 2 mmol)을 첨가한 후 상온(25 °C)에서 교반하고 TLC로 확인하였다. 반응이 종료되면, 실리카겔이 끈적한 부산물을 흡착시키고 혼합물을 여과한 후 물로 세척하였다. 유기층을 Na₂SO₄로 건조한 다음 진공하에서 농축하였다. 상기 농축액을 실리카겔 플래쉬 크로마토그래피(Hexane/EtOAc = 100% to 70%)로 정제하여 노란색 고체인 [화학식 2]의 화합물 460 mg(수율: 80%)을 얻었다.

[0062]

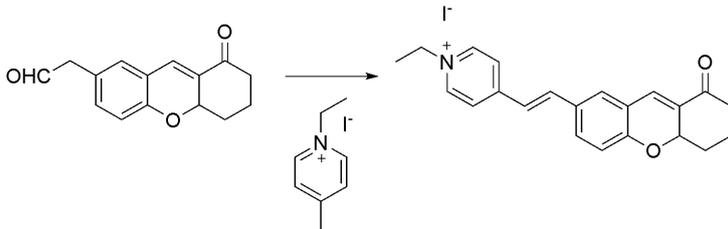
¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): δ 1.68-1.80(m, 1H), 2.00-2.18(m, 2H), 2.37-2.67(m, 3H), 5.11-5.16(m, 1H), 6.99(d, J=8.4Hz, 1H), 7.42(d, J=2.2Hz, 1H), 7.73(d, J=1.9Hz, 1H), 7.79(dd, J=8.4Hz, 1H), 9.88(s, 1H); ¹³C-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 18.11, 29.81, 39.01, 75.69, 117.03, 122.29, 130.14, 131.23, 131.46, 131.87, 133.69, 160.86, 190.48, 197.24; ESI-MS: m/z=227.05[M-H]⁻.

[0063]

1-3. [화학식 1]로 표시되는 화합물의 합성

[0064]

[반응식 1]



[0065]

[0066]

[화학식 2]

[화학식 1]

[0067]

[화학식 2]의 화합물(82 mg, 0.36mmol)과 1-에틸-4-메틸피리디늄 요오드(76 mg, 0.3 mmol)를 에탄올(20 ml)로 교반한 후 피페리딘(0.02 ml)을 첨가하여 1시간 동안 환류 교반한 다음 진공으로 증발시켰다. 생성된 고체를 CH₂Cl₂로 용해시킨 후 유기층을 물로 3번 세척한 다음 무수 MgSO₄로 건조시키고 진공하에서 농축하였다. 상기 농축액을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(MeOH/ CH₂Cl₂ =5% to 8%)로 정제하여 밝은 갈색 고체인 [화학식 1]의 화합물 56 mg(수율: 40%)을 얻었다.

[0068]

¹H-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 1.70(t, J=7.3Hz, 3H), 2.08-2.16(m, 1H), 2.35-2.45(m, 2H), 2.49-2.64(m, 3H), 4.81(q, J=7.2Hz, 2H), 5.05-5.09(m, 1H), 6.93(d, J=8.5Hz, 1H), 7.07(d, J=16.2Hz, 1H), 7.37-7.38(m, 1H), 7.49(d, J=1.6Hz, 1H), 7.58-7.61(m, 1H), 7.68(d, J=8.2Hz, 1H), 8.06(d, J=6.6Hz, 2H), 9.00(d, J=6.6Hz, 2H). ¹³C-NMR(CDCl₃) δ (ppm): 17.14, 18.11, 29.82, 39.05, 56.94, 75.30, 117.41, 122.92, 123.90, 127.46, 128.13, 130.08, 130.36, 131.47, 132.68, 141.06, 144.09, 154.54, 157.19, 197.58. HRMS(FAB) m/z calcd for C₂₂H₂₂NO₂⁺ [M]: 332.1651. Found 332.1651.

[0069]

시험예 1. [화학식 1] 화합물의 분광특성

[0070]

도 1a는 PBS 용액 내 100 당량의 GSH 존재하에서 [화학식 1] 화합물(20 μM)의 시간에 따른 흡광 변화를 나타낸 그래프이며, 도 1b는 PBS 용액(pH=7.4, 10 mM)내 GSH(1 mM, 100 당량)의 부재 및 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 여기(점선) 및 발광(실선) 스펙트럼이다(GSH 첨가 2시간 후 측정)(Ex = 372 nm, Em = 550 nm 및 496 nm. Slit: 5 nm/ 5 nm).

[0071]

도 2a는 100 당량의 GSH 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이며 (삽입도: 시간 함수로서 형광 강도 비율(I₄₉₆/I₅₅₀)변화를 나타낸 그래프), 도 2b는 상이한 농도로 GSH(0-200 당량) 첨가 2시간 후 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 형광 변화를 나타낸 그래프이다(삽입도: GSH 농도의 함수로서

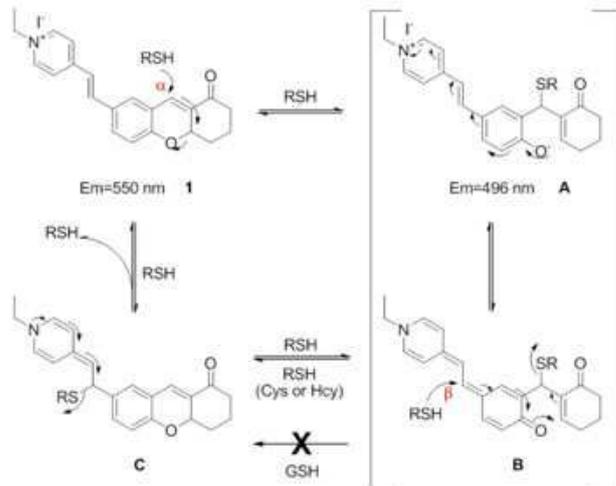
형광 강도 비율(I_{496}/I_{550})변화를 나타낸 그래프; PBS 용액(pH=7.4, 10 mM), $\lambda_{ex} = 372 \text{ nm}$, Slit: 5 nm/ 5 nm).

- [0072] 본 발명의 실시예에 따라 제조된 [화학식 1] 화합물의 분광특성은 가상의 생리학적 조건(10 mM 인산 완충 식염수(PBS), pH 7.4)하에서 관찰한다.
- [0073] 티올의 부재에서, [화학식 1]의 화합물은 372 nm에서 하나의 주요 흡수피크와 321 nm에서 숄더피크(shoulder peak)를 나타내었으며(도 1a), 372 nm에서 여기(점선)될 때 550 nm에서 강하게 발광(실선)된다(도 1b). 도 1a에 도시된 바와 같이, [화학식 1]의 화합물에 GSH 100 당량을 첨가하고 2시간 후 321 nm에서 흡수 피크의 강도는 서서히 감소하였다. 동시에, 최대 발광 피크는 496 nm로 블루 시프트되고, 형광 강도의 비율(I_{496}/I_{550})은 0.52에서 1.50으로 서서히 변화였다(2.88배)(도 2a).
- [0074] 도 2b에 도시된 바와 같이, 형광 적정 분석법으로 [화학식 1]의 화합물(10 μM)을 다양한 농도의 GSH로 처리한 결과 $3.75 \times 10^{-6} \text{ M}$ 의 계산된 검출 한계로 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550}) 및 GSH의 농도(0 내지 1.5 mM 범위) 사이의 좋은 선형성이 관찰되었다.
- [0075] **시험예 2. pH에 따른 [화학식 1] 화합물의 형광 반응성**
- [0076] 도 3은 상이한 pH값 하에서 GSH(100 당량)의 존재(붉은 점) 및 부재(검은 점)에 따른 [화학식 1] 화합물의 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550})의 변화를 나타낸 그래프이다(GSH 첨가 2시간 후 측정).
- [0077] 도 3에 도시된 바와 같이, GSH가 존재하지 않는 경우에 [화학식 1] 화합물의 형광 스펙트럼은 pH 4 내지 11에서 크게 변하지 않았지만, GSH가 존재하는 경우에 [화학식 1] 화합물의 형광 스펙트럼은 pH 4 내지 11, 특히 pH 7 내지 10에서 큰 변화를 보였다.
- [0078] 이러한 결과는 [화학식 1]의 화합물이 생리적 pH 범위에서 GSH를 검출하는데 이용될 수 있다는 것을 나타낸다.
- [0079] **시험예 3. Cys 및 Hcy에 대한 [화학식 1] 화합물의 형광 변화**
- [0080] 도 4a, 4b 및 4c는 PBS 용액(pH=7.4, 10 mM)내 각각 100 당량, 1 당량 및 10 당량 Cys의 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이다(삽입도: 시간 함수에 따른 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550}) 변화를 나타낸 그래프; $\lambda_{ex} = 372 \text{ nm}$, Slit: 5 nm/ 5 nm).
- [0081] 도 5a, 5b 및 5c는 PBS 용액(pH=7.4, 10 mM)내 각각 100 당량, 1 당량 및 10 당량 Hcy의 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 시간에 따른 형광 변화를 나타낸 그래프이다(삽입도: 시간 함수에 따른 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550}) 변화를 나타낸 그래프; $\lambda_{ex} = 372 \text{ nm}$, Slit: 5 nm/ 5 nm).
- [0082] 도 4a에 도시된 바와 같이, [화학식 1] 화합물의 수용액에 Cys 100 당량을 첨가함에 따라 550 nm에서 최대 발광 피크가 1분 이내에 496 nm로 블루-시프트되었고, 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550})은 동일한 시간(1분 이내)에 3.08배(0.52에서 1.61로)증가하였다. 그 후, 550 nm에서 발광 피크의 강도가 점차 증가하는 동안 496 nm의 발광 피크 강도는 점차 감소되어, 상기 두 발광 비율(I_{496}/I_{550})은 40분에 1.61에서 0.57로 감소되었다. 이와 같은 형광의 특이한 변화는 Cys 1 당량 및 10당량에서도 관찰되었다(도 4b 및 도 4c). 즉, Cys 1 내지 100 당량의 넓은 범위에 걸쳐 관찰되었다.
- [0083] 또한, [화학식 1] 화합물의 수용액에 Hcy 100 당량을 첨가함에 따라 550 nm에서 최대 발광 피크가 5분 이내에 496 nm로 블루-시프트되었고, 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550})은 5분 이내에 0.52에서 1.73로 증가하였다(도 5a). 그 후, 형광 강도 비율(I_{496}/I_{550})은 2시간에 걸쳐 근소하게 감소하였다.
- [0084] 형광 변화에서 Hcy의 영향은 Cys와 마찬가지로 농도와 독립적이다. 구체적으로, Hcy의 낮은 농도(1 당량 및 10 당량)의 첨가는 시간이 지나더라도 유사한 형광 변화를 보인다(도 5b 및 도 5c).

[0085] **시험예 4. 반응 메카니즘 제안**

[0086] 상이한 티올-함유 아미노산(바이오 티올)의 존재에서 [화학식 1] 화합물의 고유한 형광 변화에 기초하여 하기 [반응식 5]의 메카니즘을 제안한다.

[0087] [반응식 5]



[0088]

[0089] 티올이 [화학식 1] 화합물 용액('1' 로 표시됨)에 첨가되면, 크로메논(Chromenone) 백본의 α 위치를 먼저 공격하고, 페놀레이트 A를 유도하여, 컨쥬게이트된 피리디늄 모이어티를 가진 새로운 도너-억셉터 시스템을 생성함으로써 496 nm에서 방출하게 만든다. 이 상태에서, 각각의 친핵성에 기초하여 반응속도는 Cys>Hcy>>GSH 순서이다.

[0090] 페놀레이트 도너(phenolate donor)에서 피리디늄 억셉터(pyridinium acceptor)로 π-전자의 쌍의 순차적 이동에 따라 p-퀴논-메티드(p-quinone-methide) 유형 공명구조 B가 형성되어 β 위치에서 티올에 의하여 공격을 받을 수 있다. 이는 구조적 변화에 의하여 구조 C를 생성하고, 496 nm에서 550 nm로 발광 피크를 이동시킨다.

[0091] Cys, Hcy, GSH의 친핵성 및 첫 번째 부가적으로 유도된 입체 효과 향상을 고려해 보면, 반응성 순서는 Cys>Hcy>> GSH 일 것이다.

[0092] 도 6에 도시된 바와 같이, 이러한 가정된 메카니즘은 ¹H NMR에 의해 증명되었으며, 이 밖에도 ESI-MS를 통해서도 증명하였다.

[0093] **시험예 5. 티올-함유 아미노산에 대한 [화학식 1] 화합물의 선택도 평가**

[0094] 도 7a 및 7b는 상온에서 PBS 용액(pH=7.4, 10 mM)내 다양한 시료(Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tau, Thr, Trp, Tyr, Val, K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Zn²⁺, Ca²⁺, H₂O₂, Cys, Hcy 및 GSH)의 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 형광 스펙트럼이며(λ_{ex} = 372 nm, Slit: 5 nm/ 5 nm)(Cys 100 당량, Hcy 100 당량 및 GSH 100 당량을 제외한 모든 시료는 200 당량이며, 시료 첨가 1분(7a) 및 2시간(7b) 후 측정). 도 7c는 상온에서 PBS 용액(pH=7.4, 10 mM)내 다양한 시료(1. only, 2. Ala, 3. Arg, 4. Asn, 5. Asp, 6. Gln, 7. Glu, 8. Gly, 9. His, 10. Ile, 11. Leu, 12. Lys, 13. Met, 14. Phe, 15. Pro, 16. Ser, 17. Tau, 18. Thr, 19. Trp, 20. Tyr, 21. Val, 22. K⁺, 23. Mg²⁺, 24. Na⁺, 25. Zn²⁺, 26. Ca²⁺, 27. H₂O₂, 28. Cys, 29. Hcy 및 30. GSH)의 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 μM)의 형광 변화를 나타낸 그래프이다(Cys 100 당량, Hcy 100 당량 및 GSH 100 당량을 제외한 모든 시료는 200 당량이며, 시료 첨가 1분(파란 막대) 및 2시간(빨간 막대) 동안 [화학식 1] 화합물과 배양 후 측정, λ_{ex} = 372 nm, Slit: 5 nm/ 5 nm).

[0095] 티올-함유 아미노산에 대한 [화학식 1] 화합물의 선택도를 평가하기 위해 수용액(10 mM PBS 완충액, pH 7.4) 상에서 생물학적으로 관련된 시료에 노출시 [화학식 1] 화합물의 형광 강도 및 형광 강도 비율(I₄₉₆/I₅₅₀) 변화를 모

니터하였다(도 7).

- [0096] 구체적으로 도 7a 및 도 7b에 도시된 바와 같이, Cys, Hcy 및 GSH를 제외한 나머지 시료(Ala, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Tau, Thr, Trp, Tyr, Val, K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , H_2O_2)는 형광 스펙트럼에서 변화가 없었으며, Cys, Hcy 및 GSH에서만 즉각적으로 변화하는 형광 스펙트럼을 관찰하였다.
- [0097] 또한 도 7c에 도시된 바와 같이, Cys, Hcy 및 GSH를 제외한 나머지 시료는 I_{496}/I_{550} 변화가 거의 없었으나, Cys, Hcy 및 GSH는 1분 후 각각 1.61, 1.50, 및 0.85의 I_{496}/I_{550} 값을 나타내었으며, 이 값은 2시간 후 각각 0.57, 1.56, 및 1.50로 변경되었다.
- [0098] 이러한 결과는 [화학식 1] 화합물이 Cys, Hcy, 및 GSH를 식별하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0099] **시험예 6. [화학식 1] 화합물과의 결합을 위해 GSH와 경쟁하는 Cys 및 Hcy의 능력 측정**

- [0100] 도 8은 GSH만 존재할 때와 Cys 또는 Hcy이 GSH와 같이 존재하는 조건하에서 [화학식 1] 화합물의 496 nm와 550 nm에서 형광세기비율을 비교한 그래프이다.
- [0101] GSH의 세포 내 농도는 Cys의 30배 이상 및 Hcy의 80배 이상인 것으로 보고되어 있다. 따라서 Cys(30 μ M) 또는 Hcy(15 μ M)의 존재하에서 [화학식 1] 화합물(10 mM)의 형광 변화를 GSH(1 mM)로 테스트하였으며, 그 결과는 [화학식 1] 화합물이 Cys 및 Hcy에서 최소한의 간섭과 생물학적 관련 농도에서 GSH를 감지할 수 있음을 보여준다(도 8).

[0102] **시험예 7. 생존능 및 살아있는 세포에서 GSH의 정량적 측정**

- [0103] 도 9a는 HeLa, HepG2, Hep3B, Huh7, HPH, 및 BJ에서 상이한 농도(0, 5, 20, 50, 및 100 μ M)의 [화학식 1] 화합물에 대하여 540 nm에서 측정된 흡광도 그래프이며, 도 9b는 [화학식 1] 화합물의 상이한 농도에 대한 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다(24시간 동안 처리되고, MTT 분석이 수행됨).
- [0104] 도 10에서 (a-d) 살아있는 HeLa 세포의 공초점 형광 및 명시야(bright-field) 이미지는 2시간 동안 [화학식 1] 화합물(5 μ M)과 배양한 것을 나타내었다: (a) 위상 콘트라스트 영상, (b) 노란색 채널 형광, (c) 파란색 채널 형광, (d) (b) 및 (c)에서 생성된 비율 이미지; (e-h) 살아있는 HeLa 세포의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지는 30분 동안 0.2 mM NEM과 미리 배양된 후 2시간 동안 [화학식 1] 화합물(5 μ M)과 배양한 것을 나타내었다: (e) 위상 콘트라스트 영상, (f) 노란색 채널 형광, (g) 파란색 채널 형광, (h) (f) 및 (g)에서 생성된 비율 이미지; (i-l) 살아있는 HeLa 세포의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지는 30분 동안 0.5 mM NEM과 미리 배양된 후 2시간 동안 [화학식 1] 화합물(5 μ M)과 배양한 것을 나타내었다: (i) 위상 콘트라스트 영상, (j) 노란색 채널 형광, (k) 파란색 채널 형광, (l) (j) 및 (k)에서 생성된 비율 이미지; (m-p) 살아있는 HeLa 세포의 공초점 형광 및 위상 콘트라스트 이미지는 30분 동안 1 mM NEM과 미리 배양된 후 2시간 동안 [화학식 1] 화합물(5 μ M)과 배양한 것을 나타내었다: (m) 위상 콘트라스트 영상, (n) 노란색 채널 형광, (o) 파란색 채널 형광, (p) (n) 및 (o)에서 생성된 비율 이미지이다(배율: X200).
- [0105] 도 11은 2시간 동안 [화학식 1] 화합물(5 μ M)로 처리되기 전에 상이한 NEM 농도로 배양된 HeLa 세포의 B/Y의 정량 분석을 나타낸 그래프이다.

- [0106] 4종의 상피성 암 세포주[HeLa 세포(자궁 경부암), HepG2, Huh7 및 Hep3B 세포(간암)], 정상 인간 일차 간세포(HPH) 및 정상 인간 섬유아세포(BJ)에서 MTT 분석은 [화학식 1] 화합물이 매우 낮은 독성이며(도 9b), 세포 생존에 영향을 주지 않고 바이오 마커로 사용 가능성이 있다고 나타내었다. 구체적으로 도 9b에 도시된 바와 같이, 제어 세포는 복합조건(compound condition)없이 100% 살아있으며, [화학식 1] 화합물로 처리된 세포의 86% 이상은 100 μ M 농도에서 24시간 배양 후 살아있다. 이는 [화학식 1] 화합물이 모든 세포주에 대한 세포독성에 영향을 주지 않음을 나타낸다.

- [0107] 세포 내 GSH 및 실험 과정에서 자동산화물 겪어야 하는 극단적인 불안정성은 살아있는 세포에서 GSH 수준을 측정하는데 매우 힘들게 한다. 따라서 세포 내 GSH 농도의 비교 분석 전에, HeLa 세포를 사용하여 [화학식 1] 화

합물의 포화농도의 지속시간을 최적화하였다.

- [0108] 도 10d에 도시된 바와 같이, [화학식 1] 화합물 5 mM은 2시간 동안 HeLa 세포와 배양될 때 우수한 세포 투과성이 있고, 1.04의 B/Y(파란색/노란색) 발광 비율로 노란색 및 파란색 발광 채널에서 모두 강하게 형광되었다.
- [0109] [화학식 1]의 화합물과 GSH의 반응을 방해하는 다른 단백질 여부를 확인하기 위하여, HeLa 세포는 티올 특이 결합 시약인 *N*-ethylmaleimide(NEM)로 미리 배양되었다.
- [0110] B/Y 비율은 살아있는 세포에서 정량적 형광의 변화가 [화학식 1]의 화합물과 세포 내 GSH의 반응에 의해 발생한다는 것을 제안한 농도 의존적 방법에 따라 NEM 처리에 의해 현저하게 감소한다(도 10 및 도 11). 도 11의 그래프는 [화학식 1]의 화합물 비율의 최소 검출 한계가 0.5일 것이라고 보여준다.
- [0111] 이러한 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율은 세포독성 없이 비교적 짧은 잠복기 후 살아있는 세포에서 세포 내 GSH 농도를 보고할 수 있음을 나타낸다.

[0112] **시험예 8. [화학식 1] 화합물을 이용한 암 세포 진단**

- [0113] 도 12a-f는 살아있는 암 세포주(HeLa, HepG2, Huh7, 및 Hep3B), 인간 일차 간세포(HPH) 및 정상 삼유 아세포 세포주(BJ)를 [화학식 1] 화합물(5 μ M)로 2시간 동안 배양한 후의 공초점 형광 이미지이며(배율: X200), 도 12g는 [화학식 1] 화합물의 B/Y비율을 정량 분석한 그래프이다(G: 노란색 채널 및 파란색 채널의 평균 형광 강도).
- [0114] 4개의 상이한 암종 세포주(HeLa 세포, HepG2 세포, Huh7 세포 및 Hep3B 세포)를 사용하여 [화학식 1]의 화합물이 다양한 바이오매트릭스(biomatrices)에서 암 조직의 검출에 실제 사용될 수 있는지 여부를 확인한다.
- [0115] 먼저, [화학식 1]의 화합물은 공초점 현미경 이미지에 의해 결정된 것으로서 테스트된 모든 세포주에서 양호한 적응력을 보인다(도 12).
- [0116] 세포주의 B/Y비율은 HepG2(1.50) > HeLa(1.04) > Huh7(0.86) > Hep3B(0.82) > HPH(0.53) > BJ(0.53)이다(도 12g). 예컨대, 정상 세포에 비하여 암 세포의 B/Y비율이 더 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0117] 구체적으로, 미성숙 간세포 또는 태아 간의 전구세포인 헤파토플라스트마(hepatoblastoma) HepG2 세포주의 B/Y비율은 간세포 암종 Huh7 및 Hep3B 세포보다 상당히 높으며, 정상 세포인 HPH 및 BJ 세포주의 B/Y 값은 모든 암 세포주보다 상당히 낮다($P < 0.05$).
- [0118] 이러한 데이터는 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율 값이 세포분화상태 및/또는 조직 타입 사이를 구별(정상 세포와 암 세포의 구별)할 수 있을 것이라고 제안한다.

[0119] **시험예 9. B/Y 비율을 이용한 GSH 농도 확인**

- [0120] 도 12h는 웨스턴 블롯에 의해 총 세포 내 GSH 농도의 정량분석을 나타낸 그래프이다. 상기 값은 GAPDH로 정규화되었으며, 수치는 3번 반복 실시한 3번의 독립된 실험의 평균의 표준편차(SD)로 나타내었다($P < 0.05$).
- [0121] [화학식 1] 화합물로부터 얻은 B/Y 비율 값으로 살아있는 세포에서의 GSH 농도를 추정할 수 있다.
- [0122] 사실상 세포 내 GSH 농도를 측정하기 위해서, 웨스턴 블롯 분석(western blot analysis)은 각각의 세포주에서 추출된 단백질 샘플로 수행된다. 웨스턴 블롯 데이터는 모든 6개의 상이한 세포주(암 세포 및 정상 세포)에서 세포 내 GSH(μ M/g protein)의 단백질 수준이 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율과 우수한 상관관계에 있다는 것을 확인시켜 주었다(도 12g 및 도 12h). 그러나 정상 세포(BJ 및 HPH) 및 암 세포 사이의 GSH 농도의 통계적 의미는 웨스턴 블롯의 정량 분석이 약하다.
- [0123] 따라서 B/Y 비율이 웨스턴 블롯에 비해 세포 내 GSH 농도를 검출하는 것에 더 민감하다는 것을 확인하였다.

[0124] **시험예 10. B/Y 비율 및 회귀 모델을 이용한 GSH 농도 확인**

- [0125] 도 12i는 지수, 2차 다항식 및 선분(linear fit)의 회귀 모델을 도 12g 및 도 12h에 적용한 세포 내 GSH(μ M)의 상이한 세포주 및 식(expression)에서 B/Y 비율에 대한 산포도 데이터를 나타낸 그래프이다. 도 12i의 데이터

터는 3번의 독립된 실험의 평균의 표준편차(SD)로 나타내었다. 이는 B/Y 비율 및 웨스턴 블롯의 쌍 비교를 실시하고, 정상 및 암 세포 사이의 중요성을 보고하였다. *(P < 0.05)

[0126] 회귀 모델 분석을 지수 및 선형 회귀 적합(linear regression fit)과 비교하여 나타낸, 2차 다항 회귀가 모든 6개의 상이한 세포주의 웨스턴 블롯 분석 값 및 [화학식 1] 화합물 B/Y 비율의 산포도 데이터에 가장 적합하다(도 12i)

[0127] 최소 제곱법 분석(Least squares analysis)은 하기 수학적 식 1로 표시된 바와 같이 데이터에 대한 최적선을 위해 사용된다. 이 수학적 식 1에 따르면, 정상 세포인 HPH 및 BJ에서 GSH의 세포 내 농도는 암 세포에 비해 1.4배 낮다(각각 1.65 대 2.38 $\mu\text{M/g}$ 단백질).

[0128] [수학적 식 1]

[0129]
$$y = 0.9752x^2 - 0.1706x + 1.4626 \quad (P < 0.05, r^2 = 0.9749)$$

[0130] 상기와 같은 결과는 HepG2 세포가 일반적인 사람 간보다 약 2.0배 높은 GSH 농도를 보이는 이전 연구와 잘 일치한다. 상기 HepG2의 GSH 농도는 3.40 μM 이다.

[0131] 이와 함께, [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율이 2차 다항식 상관관계로 다른 살아있는 세포에서 세포 내 GSH 농도를 성공적으로 나타낼 수 있다.

[0132] **시험예 11. 생체 조직 및 전혈에서의 GSH 농도 측정**

[0133] 도 13은 정상 및 이종이식 마우스에서 얻은 스냅 냉동 간 및 종양 조직에 대한 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율 이미지이다(조직은 2시간 동안 2 mM [화학식 1] 화합물과 배양된 것이다, 배양: $\times 200$). 도 13a는 정상 마우스의 간; 13b는 종양 이종이식 마우스의 간; 13c는 이종이식 마우스의 종양 조직이다.

[0134] 도 13d는 이종이식 마우스 모델 및 해부된 종양, 조직에 대한 이미지이며, 도 13e는 정상 마우스 및 종양 이종이식 마우스의 전혈에 대한 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율($n = 3$ 및 $n = 5$)을 나타낸 그래프이다. 상기 데이터는 3번의 독립된 실험의 평균 표준편차(SD)로 나타내었다. *(P < 0.05).

[0135] 도 14는 상이한 농도(5 μM [화학식 1] 화합물을 함유한 증류수 10, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 및 500 $\mu\text{M/L}$)에서 GSH 비율인 산포도 데이터에 대한 선형 회귀 모델에 의해 맞춰진 표준곡선이다. 상기 표준곡선은 3번의 독립된 실험의 평균(SEM)의 평균 표준편차에 의해 제조되며, 하기 수학적 식 2에 의해 설명된 바와 같이 베스트 라인이다.

[0136] [수학적 식 2]

[0137]
$$y = 0.0011x + 0.9068, r^2 = 0.9145$$

[0138] 암환자의 임상시료에서 높은 농도의 GSH가 검출되지만, 전혈 또는 특정 대상 조직에서의 GSH 측정은 상대적으로 적게 보고되어 있다. 이전 연구는 간암 및 재생 간 조직의 GSH 수준이 정상 조직에 비해 더 높은 것으로 나타났다.

[0139] 따라서 정상 조직, 이종이식 마우스 및 이종이식 종양 조직으로부터 얻은 스냅 냉동 간을 사용하여 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율을 비교하였다.

[0140] 모든 검사 조직의 공초점 형광 이미지는 예상대로 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율이 이종이식 간보다 정상 간에서 낮은 것으로 나타났다(도 13a-c).

[0141] 또한, 전혈을 이용하여 [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율을 확인하였다.

[0142] 전혈 1 중량부를 증류수 30 중량부로 희석한 희석된 전혈의 농도가 5 μM 일 때, [화학식 1] 화합물의 B/Y 비율은 정상 마우스에 비해 종양 이종이식 마우스에서 상대적으로 높았다(P < 0.05)(도 13e). 정상적인 혈액(도 13e)에서 초록색 코드 번호)과 비교하여 종양에서 GSH의 B/Y 비율에 근거하면, 종양 혈액에서 GSH의 비율은 정상적인 혈액 보다 약 1.5배 높다.

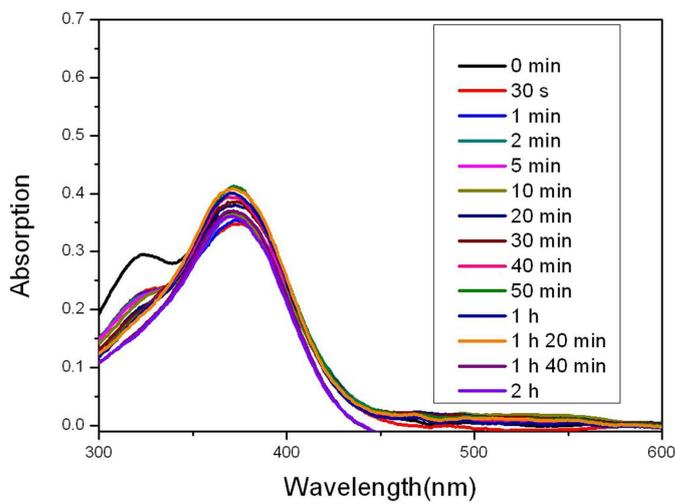
[0143] 또한, 표준 곡선으로부터 추정된 종양 이종이식 마우스 전혈의 평균 GSH 농도는 [화학식 1] 화합물의 농도에 상

관없이 정상 마우스(3.2 mM/L)보다 상대적으로 높았다(18.7 mM/L)(도 14).

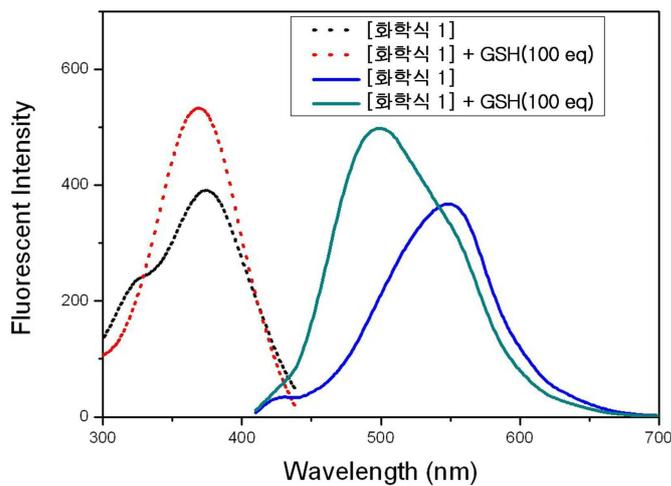
- [0144] 이러한 결과는 전혈의 GSH 농도가 종양 조직의 글루타티온 S-전이효소(GST) 활성과 강하게 연관된 것으로 이전 임상 연구 결과와 일치한다.
- [0145] 인간 전혈에서 GSH의 평균 농도는 1.02 mM이고, 이는 [화학식 1]의 화합물이 소량의 희석된 인간 전혈에서 GSH를 측정하기에 충분히 민감하다는 것을 추측할 수 있다.
- [0146] 본 발명에 따른 형광 마커인 [화학식 1]의 화합물은 암 조직 성장의 결과로서 간에서 증가된 GSH 식(expression)의 이미지를 제시하는 최초의 연구이다.
- [0147] 또한, 높은 B/Y 비율은 암 또는 종양을 진단하는 [화학식 1] 화합물의 잠재적 사용을 제안한다.

도면

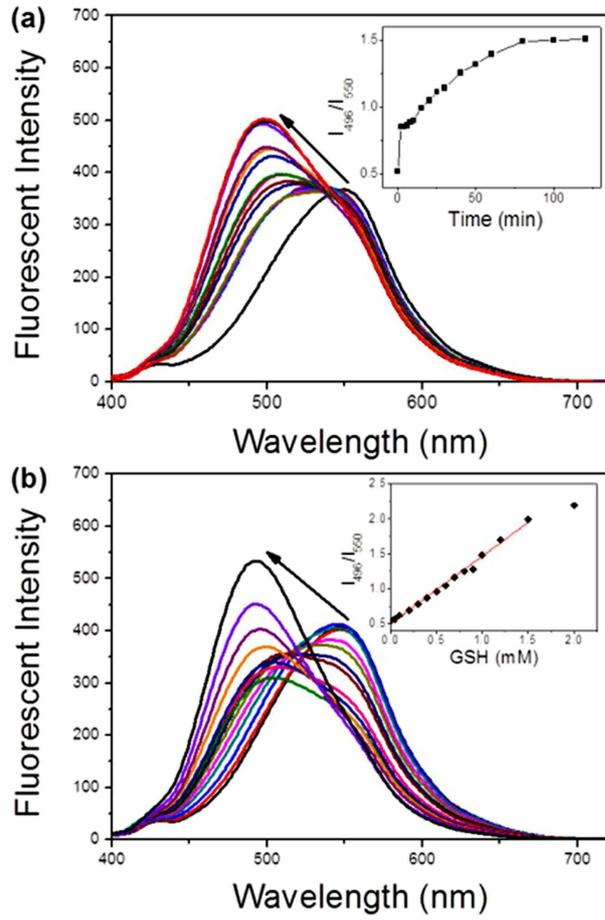
도면1a



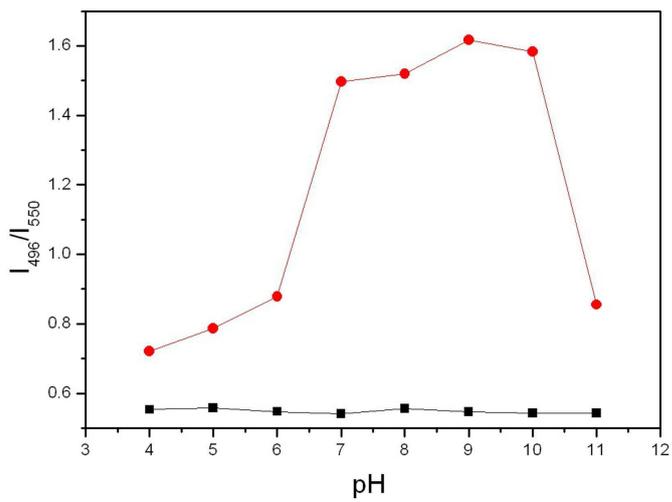
도면1b



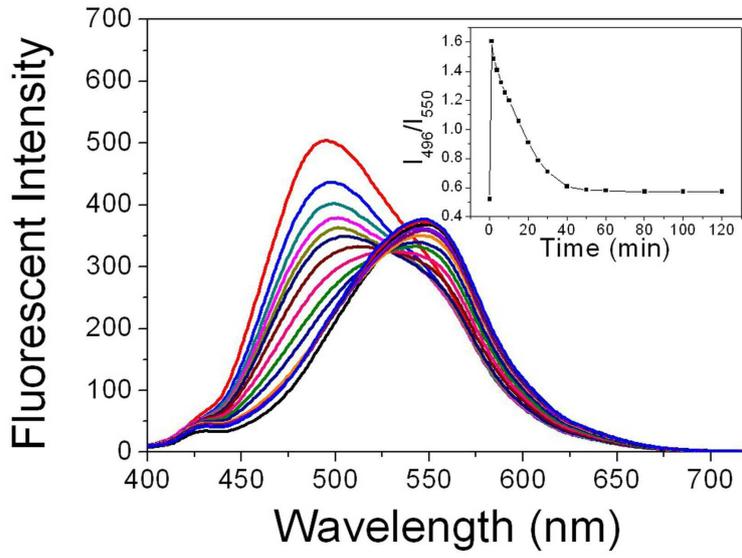
도면2



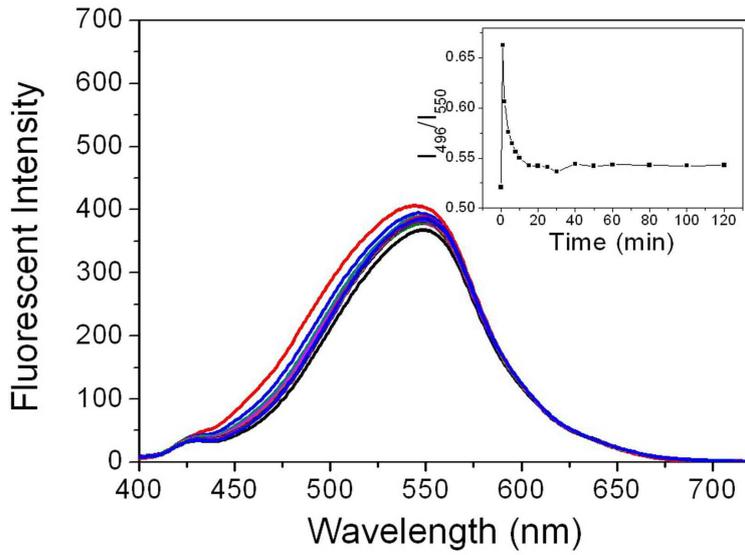
도면3



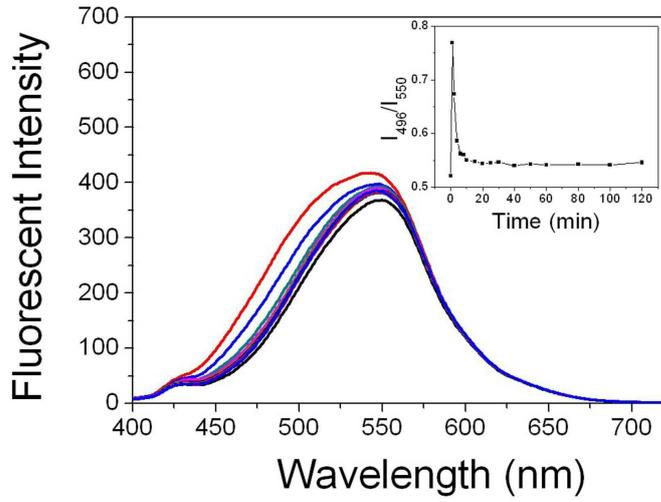
도면4a



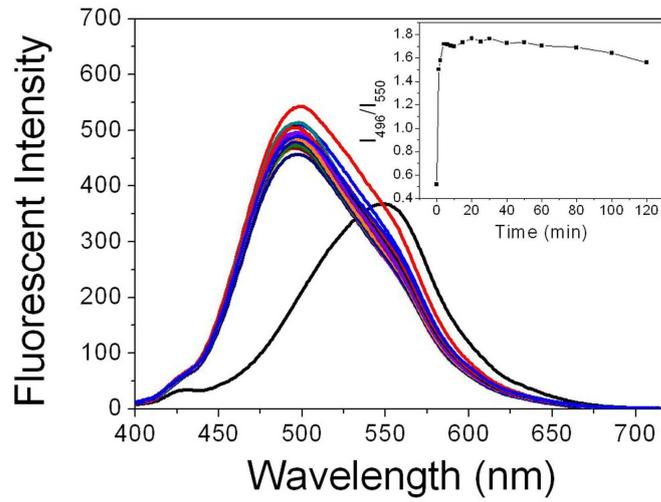
도면4b



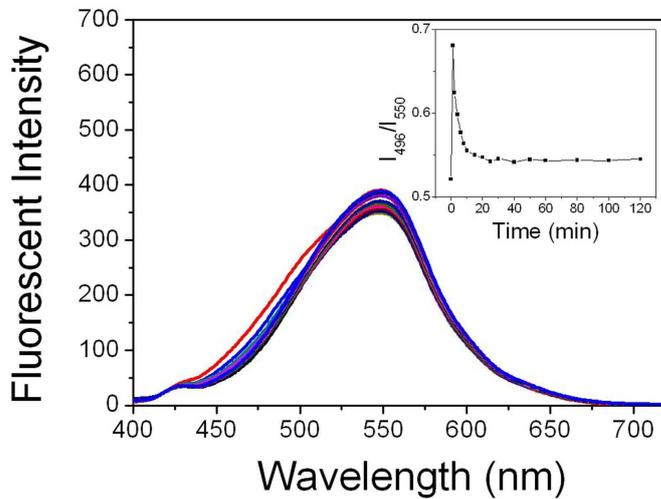
도면4c



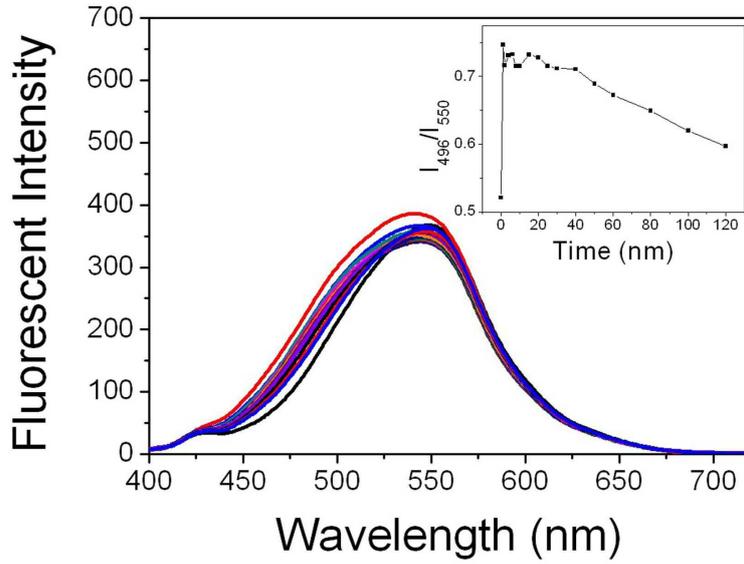
도면5a



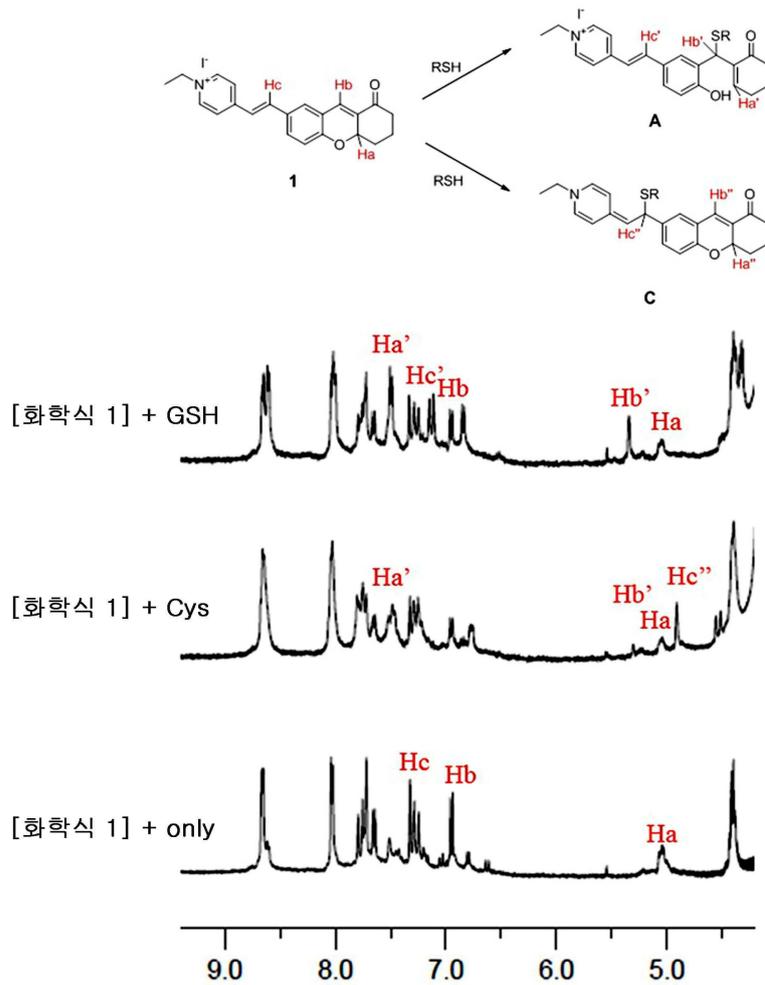
도면5b



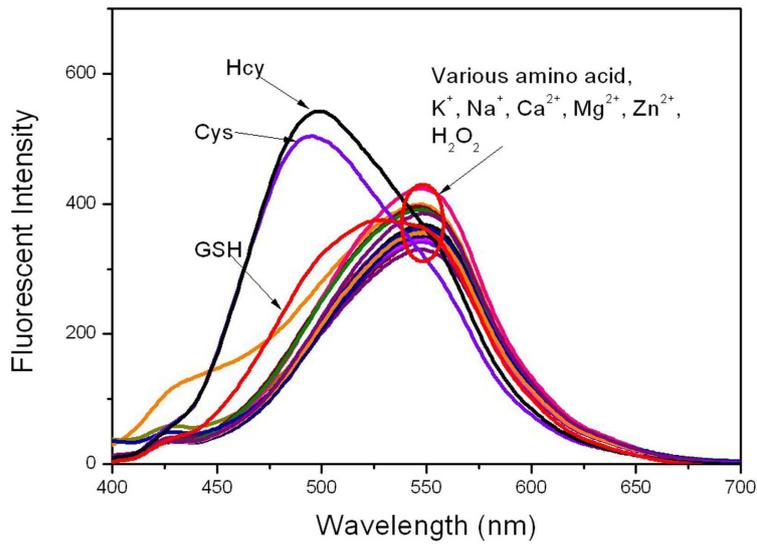
도면5c



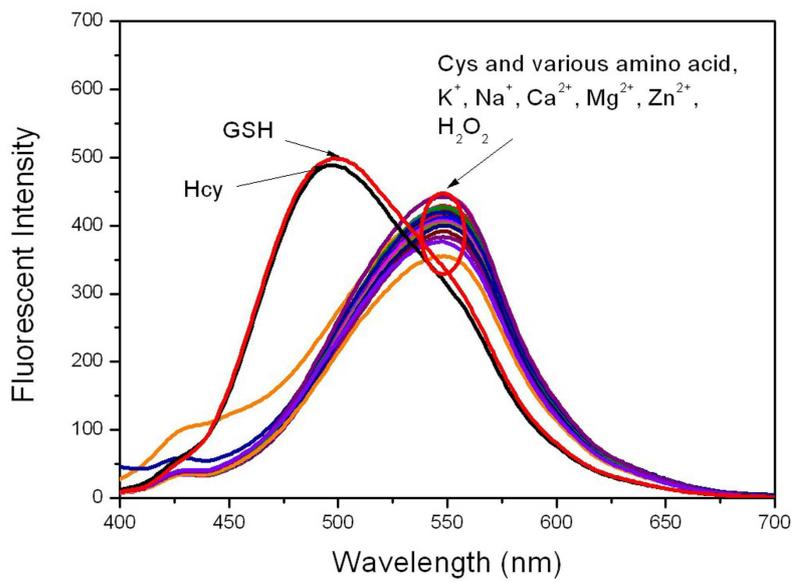
도면6



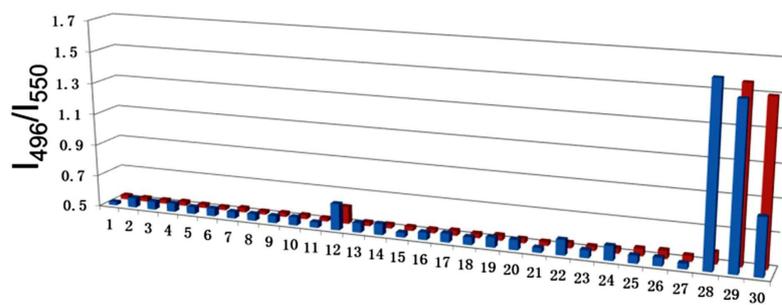
도면7a



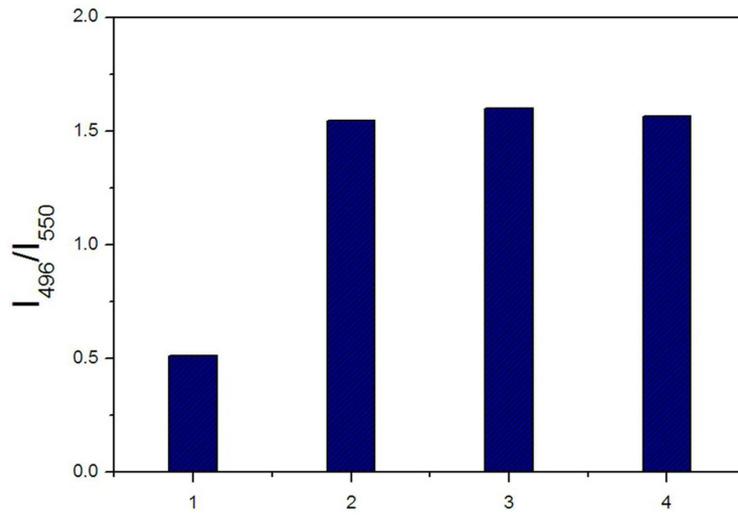
도면7b



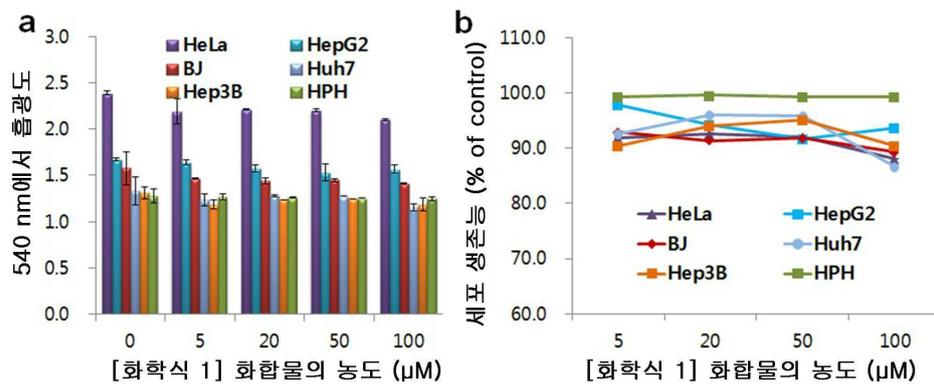
도면7c



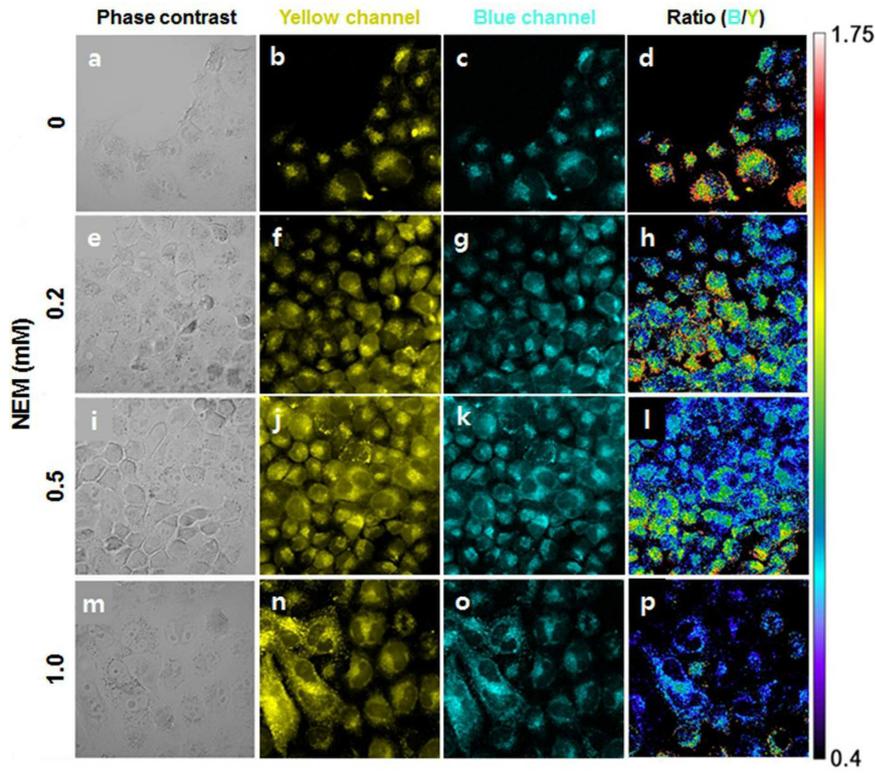
도면8



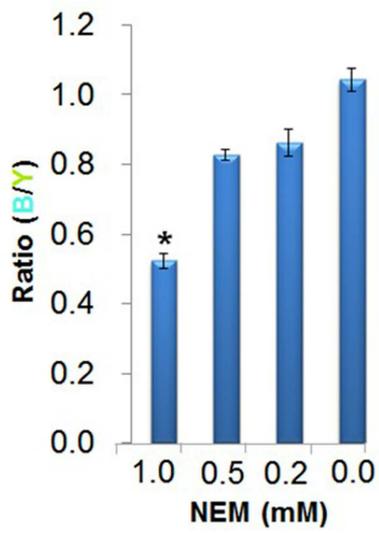
도면9



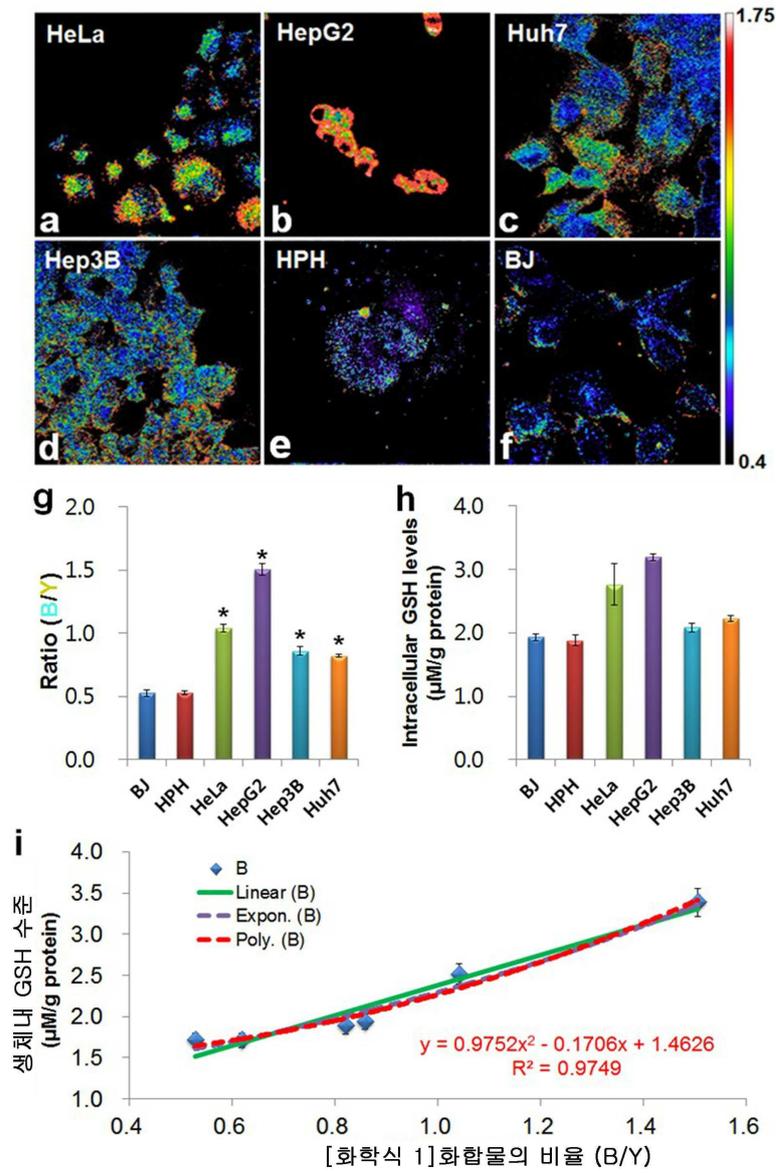
도면10



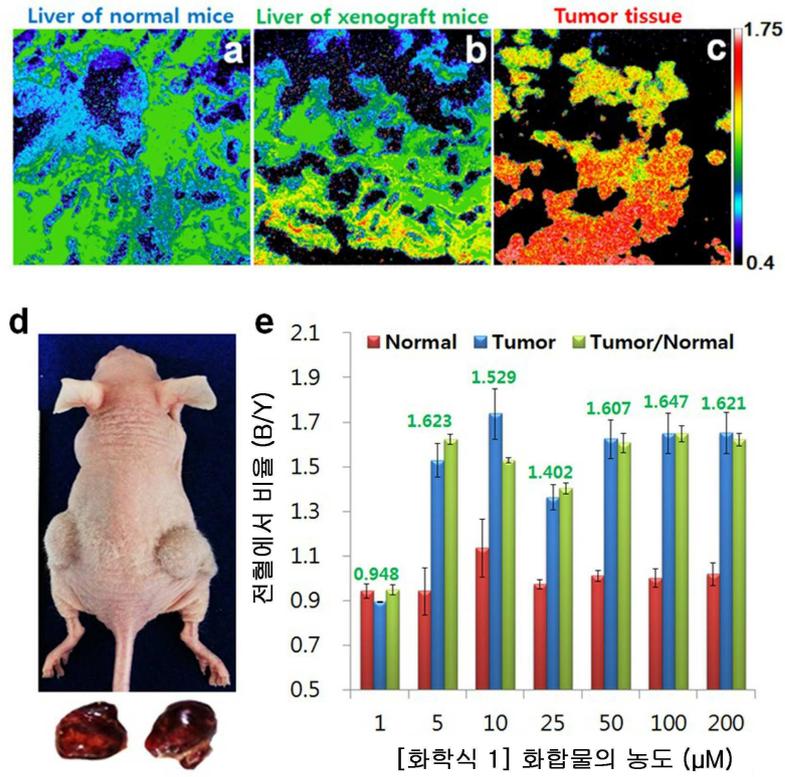
도면11



도면12



도면13



도면14

