



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 지 연 교수 지도
석사학위 청구논문

생리활성 물질을 광학 영상기법으로
탐색 가능한 화학 프로브의 개발

-생체 내 존재하는 다양한 생리활성
물질에 선택적으로 반응하여 형광신호를
나타내는 프로브의 디자인과 합성-

2017

성신여자대학교 대학원
미래응용과학학과
나 여 경

생리활성 물질을 광학 영상기법으로 탐색 가능한 화학 프로브의 개발

-생체 내 존재하는 다양한 생리활성
물질에 선택적으로 반응하여 형광신호를
나타내는 프로브의 디자인과 합성-

이 지 연 교수 지도

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2016년 11월

성신여자대학교 대학원

미래응용과학학과

나 여 경

인 준 서

나여경의 석사학위 논문으로 인준함

2016년 11월

심사위원장 강창수 (서명 또는 인)

심사위원 이지연 (서명 또는 인)

심사위원 채정현 (서명 또는 인)

성신여자대학교 일반대학원

논문개요

화학 프로브는 생물학적 시스템을 연구하는 데 널리 이용되는 저분자 물질로 생체 내 존재하는 효소, 조효소, 이온 등의 다양한 생리활성 물질들과 선택적으로 반응하여 특정한 물질을 분석할 수 있는 유용한 도구이다. 본 논문이 다루고 있는 연구는 크게 세가지 주제로 나누어 볼 수 있는데, 첫째, 여러 가지 치환체를 갖는 thiophene-substituted aza-BODIPY 를 합성하고 이들 형광물질의 분광학적 특성을 분석하였다. 둘째, 특정효소와 선택적으로 반응하여 형광신호 변화를 나타낼 수 있는 활성기반 프로브를 디자인하여 합성하고 이들 프로브의 세포에서의 효소 반응성을 연구하였다. 셋째, 무기염류와 중금속에 선택적으로 반응하여 비색적 또는 형광적 신호를 갖는 화학 센서를 합성하였다.

첫 번째 주제인 aza-BODIPY 기반 형광물질을 연구하기 위하여 본 연구에서는 기존에 알려져 있던 thiophene 치환체를 활용하여 근적외선 영역의 형광신호를 향상시키고자 하였으며, 이를 위하여 thiophene 골격 자체에 methyl 및 bromine group 을 새롭게 도입하여 이들의 형광신호 변화능을 확인하였다. 이들 group 이 치환된 유도체들은 실제로 20-30 nm 가량 장파장 영역으로 형광신호 이동현상을 나타내는 것을 관찰 할 수 있었다.

두 번째 연구 주제에서는 lysosomal cystein protease 에 속하는 asparaginyl endopeptidase(AEP)를 타겟으로 하는 활성기반 프로브를

합성하여 살아있는 세포 및 그 추출물에서의 효소활성 변화를 확인하였다. 본 연구에서는 일반적인 활성기반 프로브의 구조를 변형하여 효소와 직접 반응하는 electrophile 부분에 naphthalimide fluorophore 를 결합시킴으로써 효소와의 직접반응을 통한 구조적인 변화에 따라 형광신호 변화를 나타낼 수 있도록 프로브를 디자인하였다. 세포추출물 및 살아있는 세포에 프로브를 처리한 뒤 SDS-PAGE 를 활용하여 새로 합성된 프로브가 AEP 와 선택적으로 반응하는 것을 확인하였으며, 공 초점 현미경을 사용하여 살아있는 세포에서의 AEP 활성을 형광신호를 통해 관찰할 수 있었다.

세 번째 연구주제인 저분자 형광화학센서를 개발하기 위해서 본 연구에서는 1, 8-naphthalimide 기반 형광물질에 세 가지 서로 다른 구조를 갖는 수용체 부분을 첨가하여 합성 후에 다양한 이온에 대한 이들 형광물질의 신호변화를 관찰하였다. Phenol group 과 같이 산성의 특징을 갖는 센서는 플루오르 이온(F^-)과 시안 이온(CN^-)과 반응하여 비색적인 변화를 보이고, quinoline 처럼 염기적 특성을 갖는 물질을 수은 이온(Hg^{2+})과 선택적으로 결합함으로써 형광신호의 변화를 보이는 것을 관찰하였다. 두 가지 특성을 모두 갖도록 디자인 한 센서는 이들 이온에 각각 반응함으로써 비색적 변화와 형광적 변화를 모두 나타내는 다중결합 화학센서로 작용함을 관찰할 수 있었다.

본 연구를 통해 개발 된 형광센서와 활성기반 프로브는 환경이나 생체 내에 존재하는 중금속 및 음이온을 검출하거나, 치매나 암과 같이 AEP 가

관여하는 것으로 알려져 있는 질병에서의 효소 활성변화를 측정하는데 활용 가능한 매우 유용한 도구가 될 것으로 기대된다.

목 차

논문개요

List of Figures

List of Tables

List of Scheme

I. 서론	1
1. 생체 내 생리활성물질을 탐색할 수 있는 형광화학센서의 개발	1
2. 효소활성 탐색을 위한 활성기반 프로브의 개발	5
II. 결과 및 고찰	9
1. Aza-BODIPY의 합성과 평가	9
2. AEP를 타겟으로 하는 활성기반 프로브의 합성과 평가	11
2.1. Solid phase synthesis technique을 활용한 프로브 합성	11
2.2. RAW 264.7 macrophage 등 세포주를 활용한 효소활성 탐색	15
3. 금속 및 각종 음이온에 선택적으로 반응하는 형광화학센서의 합성과 평가	24
3.1. 1,8-Naphthalimide 기반 형광센서의 합성	24

3.2. 1,8-Naphthalimide 기반 형광센서의	
광학적 특성과 반응 메커니즘	25
Ⅲ. 결론	38
Ⅳ. 실험	40
1. 실험기기 및 시약	40
2. 실험 방법	41
2.1. 합성	41
2.2. Cell imaging	62
2.3. Cell labeling	62
2.4. UV-vis and fluorescence measurements	
with metal ions and anions	63
2.5. ^1H NMR of sensor with F^- , CN^- , and Hg^{2+}	64
참고문헌	65
Abstract	74

List of Figures

Figure 1. Structure of BODIPY and 1, 8-naphthalimide

Figure 2. (좌)활성기반 프로브의 일반적인 구조; (우)활성기반 프로브의 활용 예

Figure 3. 스마트 프로브의 디자인 전략

Figure 4. Normalized absorption and emission spectra

Figure 5. Labeling of AEP in intact cells by AEP-P1, AEP-P2, and Control-T

Figure 6. Labeling of AEP in cell lysate by AEP-P1, AEP-P2, and Control-T

Figure 7. Cell imaging with AEP-P1, AEP-P2, and Control-T in RAW 264.7

Figure 8. Cell imaging with AEP-P1, AEP-P2, and Control-T in NIH 3T3

Figure 9. Mean intensity of AEP-P1, AEP-P2 and Control-T

Figure 10. Metal & anion selectivity test of sensor 1

Figure 11. Sensor 1 titration with F^- , CN^-

Figure 12. Mechanism of sensor 1

Figure 13. Metal & anion selectivity test and mechanism of sensor 2

Figure 14. Job' s plot of sensor 2 with Hg^{2+}

Figure 15. Metal & anion selectivity test of sensor 3 (colorimetric change)

Figure 16. Sensor 3 titration with F^- , CN^-

Figure 17. Mechanisms and job' s plot of sensor 3 with F^- , CN^-

Figure 18. Metal & anion selectivity test of sensor 3 (fluorescent change)

Figure 19. Sensor 3 titration with Hg^{2+}

Figure 20. Mechanisms and job' s plot of sensor 3 with Hg^{2+}

Figure 21. Structure of 4a

Figure 22. Structure of 4b

Figure 23. Structure of 4c

Figure 24. Structure of AEP probe 1

Figure 25. Structure of AEP probe 3

Figure 26. Structure of AEP probe 4

Figure 27. Structure of AEP inhibitor

Figure 28. Structure of product 1

Figure 29. Structure of product 2

Figure 30. Structure of product 3

Figure 31. Structure of product 4

Figure 32. Structure of product 5

Figure 33. Structure of product 6

Figure 34. Structure of product 7

Figure 35. Structure of product 8

Figure 36. Structure of product 9

Figure 37. Structure of product 10

Figure 38. Structure of product 11

Figure 39. Structure of sensor 1

Figure 40. Structure of sensor 2

Figure 41. Structure of sensor 3

List of Tables

Table 1. 대표적인 화학센서의 구조

Table 2. Spectroscopic data of 4a-4c

Table 3. Comparison table for various ions sensors

List of Scheme

Scheme 1. Synthesis of thiophene-substituted aza-BODIPYs
reagents and conditions

Scheme 2. Synthesis of asparaginyl endopeptidase probes

Scheme 3. Synthesis of naphthalimide-based fluorescent probes

Scheme 4. Synthesis of metal & anion sensor 1-3

I. 서론

1. 생체 내 생리활성물질을 탐색할 수 있는 형광화학센서의 개발

화학센서란 분석물질과 센서의 인식부분의 화학적 반응을 통하여 특정물질을 분석 할 수 있도록 하는 물질이다. 분자 내 비 공유 전자쌍 및 다중결합을 가진 화합물에서 전자는 특정 파장의 빛을 흡수함으로써 들뜬 상태가 되었다가 다시 기저 상태로 돌아가면서 에너지를 방출하게 되는데 이때 각 분자의 화학적 특성 및 반응성을 적절히 활용함으로써 특정 물질에 대해서만 형광이나 색상 변화의 형태로 신호도출이 가능한 화학센서의 개발이 가능하다. 형광화학센서는 이와 같은 형광신호 변화를 분석하여 목표 물질의 존재 여부나 그 농도 등에 대한 정보를 얻을 수 있도록 활용할 수 있다.(1)

중금속을 포함한 각종 금속 양이온과 halogen, cyanide, sulfide 와 같은 음이온들은 하천, 해수, 토양, 대기 등의 환경뿐 아니라 각종 생필품 및 식품 등 거의 모든 물질에서 발견될 수 있으며, 생체에 치명적인 독성을 미칠 수 있는 성분들이 대부분이다.(2, 3, 4) 최근에는 구리, 아연 등의 금속 양이온이 퇴행성 뇌질환, 심혈관계 질환의 발병에 직접적인 연관이 있는 것으로 보고되었다.(5, 6)

생체시료 및 각종 환경 유래물질을 이용한 분석법 중 가장 일반적이며 널리 이용되는 방법은 Atomic Absorption Spectrophotometry (AAS), Ultraviolet and Visible Spectrophotometry (UV/VIS), Gas Chromatography (GC), High Performance Liquid Chromatography

(HPLC)와 같은 기기를 활용한 분석법이다. 그러나 이와 같은 기기분석법은 고가의 장비가 요구될 뿐 아니라, 시료의 전처리가 복잡하여 성분확인에 많은 비용과 시간이 소모되므로 다량의 시료 처리 시 부하가 걸리게 되어, 시료를 신속히 분석하기 어렵다. 또한 시료의 분쇄/정제/용해/건조 등의 전처리 과정이 필요하므로 생체 내에서 실시간으로 변화하는 물질의 상태나 농도를 정량 하기에는 한계가 있다.

반면 저분자 형광물질을 활용한 화학 센서 (chemosensor/chemodosimeter)는 전처리 과정이 불필요하고, 감도가 높아 살아있는 세포 및 동물을 포함한 다양한 시료에 적용이 가능하다는 장점이 있어, 국내/외에서 모두 개발이 활발하게 진행되고 있다. 특히 생체 내 신호전달 과정에 직접 관여하는 것으로 알려져 있는 칼슘, 아연, 구리와 같은 금속이온 (7, 8), 노화 및 퇴행성 뇌 질환의 발병과 관련이 깊은 것으로 알려져 있는 활성 산소 (9), 그 외 각종 호르몬 및 수소이온 등의 농도변화를 측정할 수 있는 다양한 종류의 형광물질들 (10)이 활발히 개발되고 있다 (Table 1). 이들 물질은 측정하고자 하는 개별물질에 대한 선택성이 매우 높아 각종 생리활성 반응과정을 생체 내에서 실시간으로 추적하는데 효과적으로 활용이 가능하다.

Table 1. 대표적인 화학센서의 구조 (11-23)

검출 이온	구조	검출 이온	구조
Zn ²⁺		HS ⁻	
Cu ²⁺		F ⁻ , Cu ²⁺	
Hg ²⁺		I ⁻ , Fe ³⁺	
Cd ²⁺		AcO ⁻ , F ⁻ , H ₂ PO ₄ ⁻	
Fe ²⁺			

따라서 본 연구에서는 형광물질 중 boron difluoride dipyrromethene (BODIPY, Figure 1a)와 1,8-naphthalimide (Figure 1b) 골격을 기반으로 하여 각종 이온 및 biothiol 의 농도를 탐색할 수 있는 새로운 저분자 형광물질을 합성하고 이들의 광학적 특성을 검색하는 것을 목표로 하였다. Boron difluoride dipyrromethene (BODIPY) 는 감광제, 화학 센서, 그리고 세포 이미징 등에 다양하게 이용되는 형광단이다.(24-27) BODIPY 는 광 안정성이 뛰어나고 높은 양자 수율을 보이기 때문에 많은 분야에서 활용되고 연구되었다.(28) 특히 Aza-BODIPY 골격을 기반으로 하는 근적외선 형광단은 높은 투과도 및 장파장에서의 신호방출을 통해 세포나 동물 등의 생체에 직접 적용이 용이(3)하기 때문에 다양한 분야로의 응용이 가능하다.

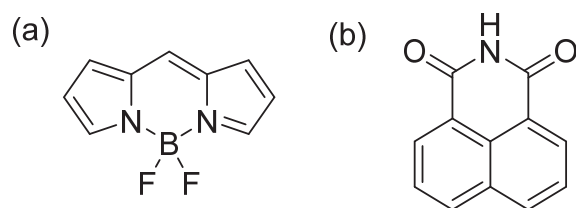


Figure 1. Structure of (a) BODIPY, (b) 1, 8-naphthalimide

2. 효소활성 탐색을 위한 활성기반 프로브의 개발

활성기반 단백질 프로파일링 (activity-based protein profiling)은 특정효소의 활성상태에 따라 효소의 active site 에 공유결합을 이루는 활성기반 프로브 (activity-based probes)를 이용함으로써, 기존의 2D gel 이나 LC-MS 기술이 단백질의 존재 유무나 양에 따라 단백질을 분류해온 것과 달리, 단백질의 기능이나 활성 정도에 따라 단백질을 분류할 수 있다.(29,30)

최근에는 근적외선 형광물질 (NIRF)을 사용함으로써 살아있는 세포나 동물의 질병모델에서 효소 활성을 실시간으로 영상화하는데 사용되기도 하고, 단백질의 구조 및 반응 메커니즘 연구에도 사용될 수 있으며, 세균이나 기생충의 감염 경로 등을 연구하는데 이용되는 등 다양한 분야로의 활용가능성이 두드러진다.(31)

활성기반 프로브는 세가지 구조적 요소로 이루어져 있는데, 1) 효소의 active site와 직접 반응하여 covalent bond를 형성하는 반응성 그룹 (효소 결합부분, electrophile, 일명 warhead), 2) 타겟에 선택적으로 결합할 수 있도록 돕는 선택성 그룹 (효소인식부분, 일명 specificity region), 그리고 3) 타겟의 확인과 분리, 정제 및 영상화에 이용될 수 있는 리포터 그룹 (reporter tag, 형광물질)으로 나뉜다 (Figure 2).

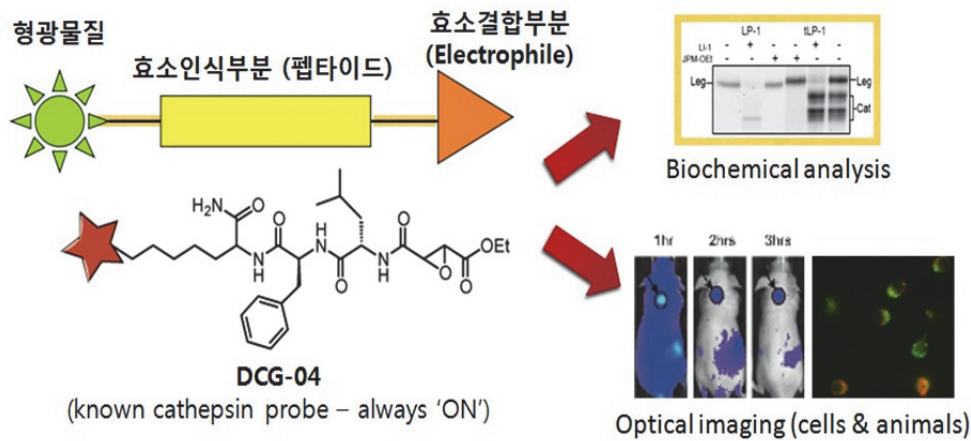


Figure 2. (좌) 활성기반 프로브의 일반적인 구조; (우) 활성기반 프로브의 활용 예 (32, 33)

기존에 개발된 프로브의 가장 큰 단점은 형광 물질이 단순 결합되어 있기 때문에 실제 효소의 활성변화와 무관하게 일정한 세기의 신호가 나타난다는 점이다. 따라서 타겟 효소와 선택적으로 반응하고, 효소활성에 비례하여 형광신호의 파장이나 세기가 변화되면서, 프로브 자체의 물리/생화학적 특성에 큰 영향을 주지 않는 ‘스마트’ 활성기반 프로브를 개발하게 되면 기존 프로브의 한계를 극복하고, 생체 내에서 변화하는 효소 활성을 실시간으로 영상화 하고 정량적으로 분석할 수 있게 된다.

4-Amino-1,8-naphthalimide 계통 형광물질들은 분자 내 dipole moment의 차이가 커서 internal charge transfer (ICT)현상이 용이하게 일어나므로, 이 현상을 이용하게 되면 적절한 구조변화를 통해 absorption 과 emission spectra 를 조절할 수 있다.(34) 즉, 효소와의 결합을 통해 구조변형이 일어나면 형광신호 파장이 이동됨으로써 서로 다른

두 개의 파장에서의 형광신호를 비교하여 활성 정량이 가능하며, 실시간으로 효소의 활성 변화를 모니터링 할 수 있게 된다 (Figure 3).

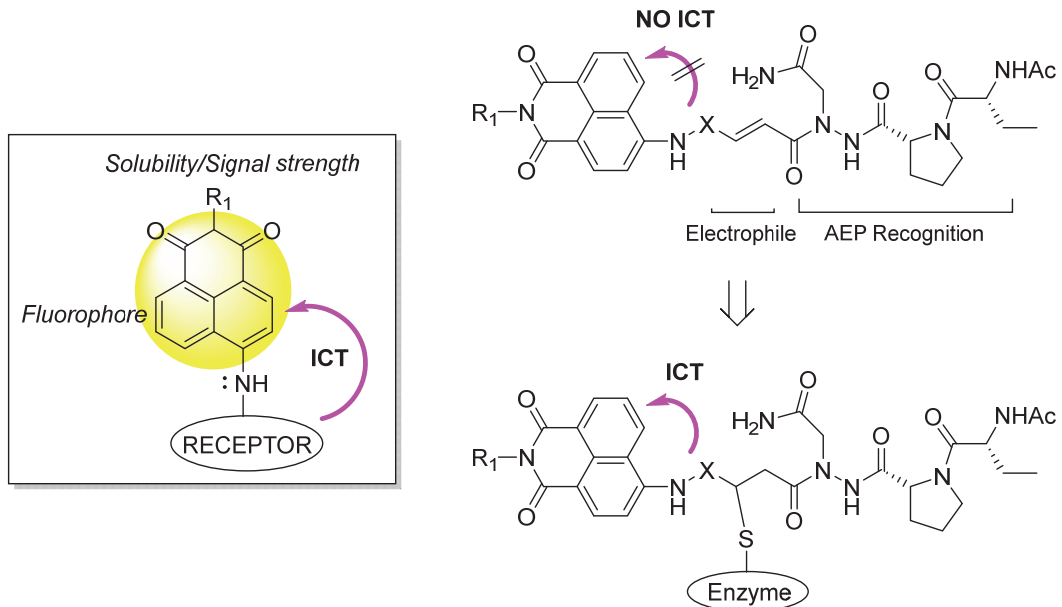


Figure 3. 스마트 프로브의 디자인 전략

본 연구에서는 기존의 프로브 구조와는 차별화되도록 형광물질부분과 효소결합부분을 서로 접합함으로써, 효소와의 반응을 통해 일어나는 구조변화가 형광신호에 영향을 미치도록 디자인된 스마트 프로브를 개발하고자 한다. 그 첫 번째 시도로서 시스테인 단백질효소의 일종인 아스파라진 엔도펩티데이즈 (Asparaginyl endopeptidase, AEP)를 타겟으로 하는 활성기반 프로브를 합성하고 이 프로브의 선택적인 표지능력을 탐색하였다.(35, 36, 37) AEP 는 lysosomal proteases 의 일종으로 면역세포 발현, 염증반응 등에 관여하며, 기생충 감염증, 동맥 경화, 유방암,

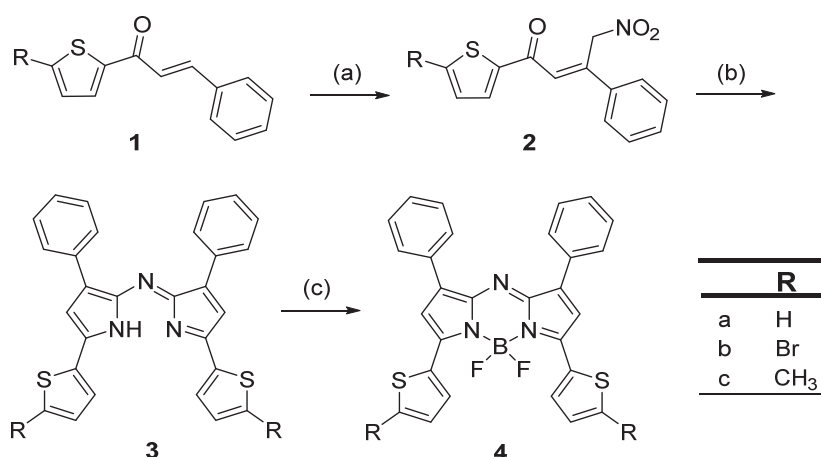
대장암, 전립선 암의 형성과정에도 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.(38, 39, 40, 41) 또한, 최근 들어 AEP 가 tau cleavage 에 직접적으로 관여하며 (42), 알츠하이머병 환자와 동물모델에서 AEP 의 활성이 증가되어 있는 것으로 보고됨으로써 (43) 새로운 알츠하이머병 치료 타겟으로서의 가능성이 제시되었다. 따라서 다양한 질병모델에서 AEP 의 활성을 원활하게 분석하고, 필요에 따라 효소 활성을 쉽게 조절할 수 있는 저분자 저해제와 활성기반 프로브를 개발하게 되면, AEP 가 관여하는 알츠하이머병의 발병과정의 메커니즘을 규명하는데 크게 기여할 수 있을 뿐 아니라, 나아가 새로운 치료타겟으로서 AEP 가 발굴될 가능성이 있다.

II. 결과 및 고찰

1. Aza-BODIPY의 합성과 평가

(본 연구는 최나은, 정수정의 공동참여 하에 수행되었으며 *Bull. Kor. Chem. Soc.* 2015, 36(7), 1747 에 출판되었다. 본 섹션의 내용은 출판내용 중 일부를 발췌 변형하여 작성되었다.)

본 연구에서는 thiophene 으로 치환된 aza-BODIPY 를 합성하여 광학적인 특성을 관찰하였다. Thiophene 고리 부분에 H, Br, CH₃ 의 세 가지 치환된 물질을 새로 합성(Scheme 2)하여 흡광과 방출의 시그널 변화를 측정하였다. 기존에 알려져 있던 thiophene-substituted aza-BODIPY 골격(Scheme 2 의 4a)을 기반으로 새롭게 합성된 물질들은 700nm 이상인 근적외선 영역에서 흡광과 방출의 최고점이 기존물질들보다 20-30nm 가량 이동한 양상을 보인다 (Figure 4, Table 2).



Scheme 1. Synthesis of thiophene-substituted aza-BODIPYs reagents and conditions: (a) CH₃NO₂, DIEA, reflux 18h, quantitative yield; (b) NH₄OAc, n-BuOH, reflux, 24h, 7-15%; (c) BF₃·OEt₂, DIEA, DCE, room

temperature to 60 °C, 10h, 48-65% (정수정과 최나은 합성)

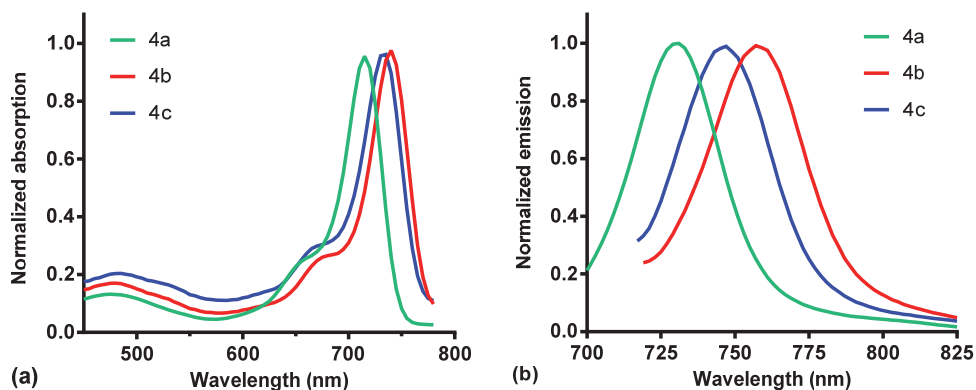


Figure 4. Normalized absorption (a) and emission (b) spectra of compounds 4a-4c in dichloromethane

Table 2. Spectroscopic data of 4a-4c

		4a (R -H)				4b (R -Br)			
Solvent	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (/M cm)	Φ^{a}	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (/M cm)	Φ^{b}	
CH ₂ Cl ₂	715	734	214100	0.47	734	744	144500	0.32	
Toluene	714	726	184500	0.44	730	742	157300	0.26	
CH ₃ CN	710	726	189100	0.46	724	742	95200	0.28	
EtOH	712	726	76100	ND ^c	725	744	28600	ND ^c	
		4c (R -CH ₃)							
Solvent	λ_{abs} (nm)	λ_{em} (nm)	ϵ (/M cm)	Φ^{b}					
CH ₂ Cl ₂	740	756	206100	0.21	a Previously reported in Ref. 44 b 4a was used as standard. c Not determined.				
Toluene	736	748	215400	0.23					
CH ₃ CN	734	746	133600	0.17					
EtOH	734	752	13000	ND ^c					

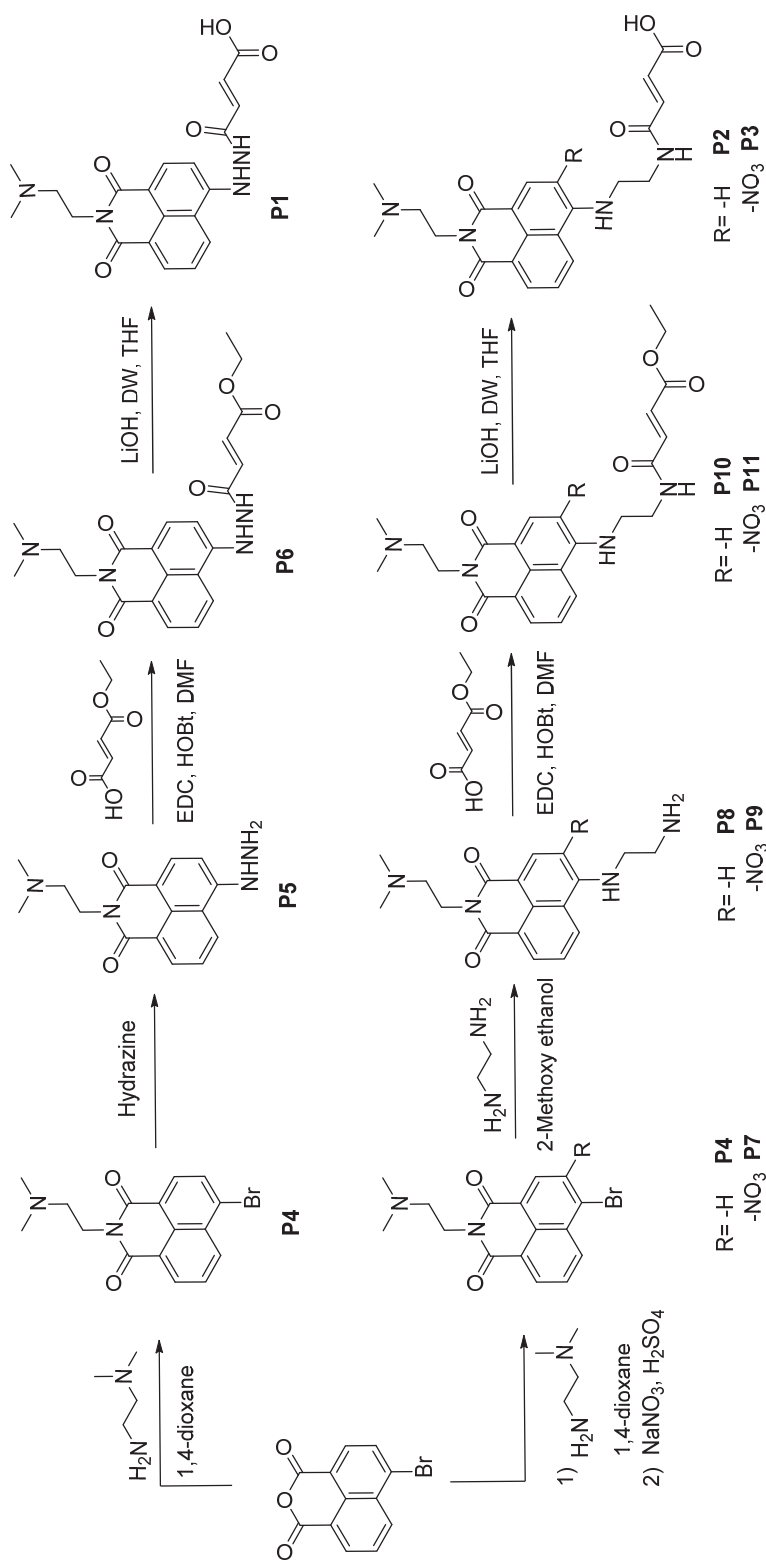
2. AEP 를 타깃으로 하는 활성화기반 프로브의 합성과 평가

2.1. Solid phase synthesis technique 을 활용한 프로브 합성

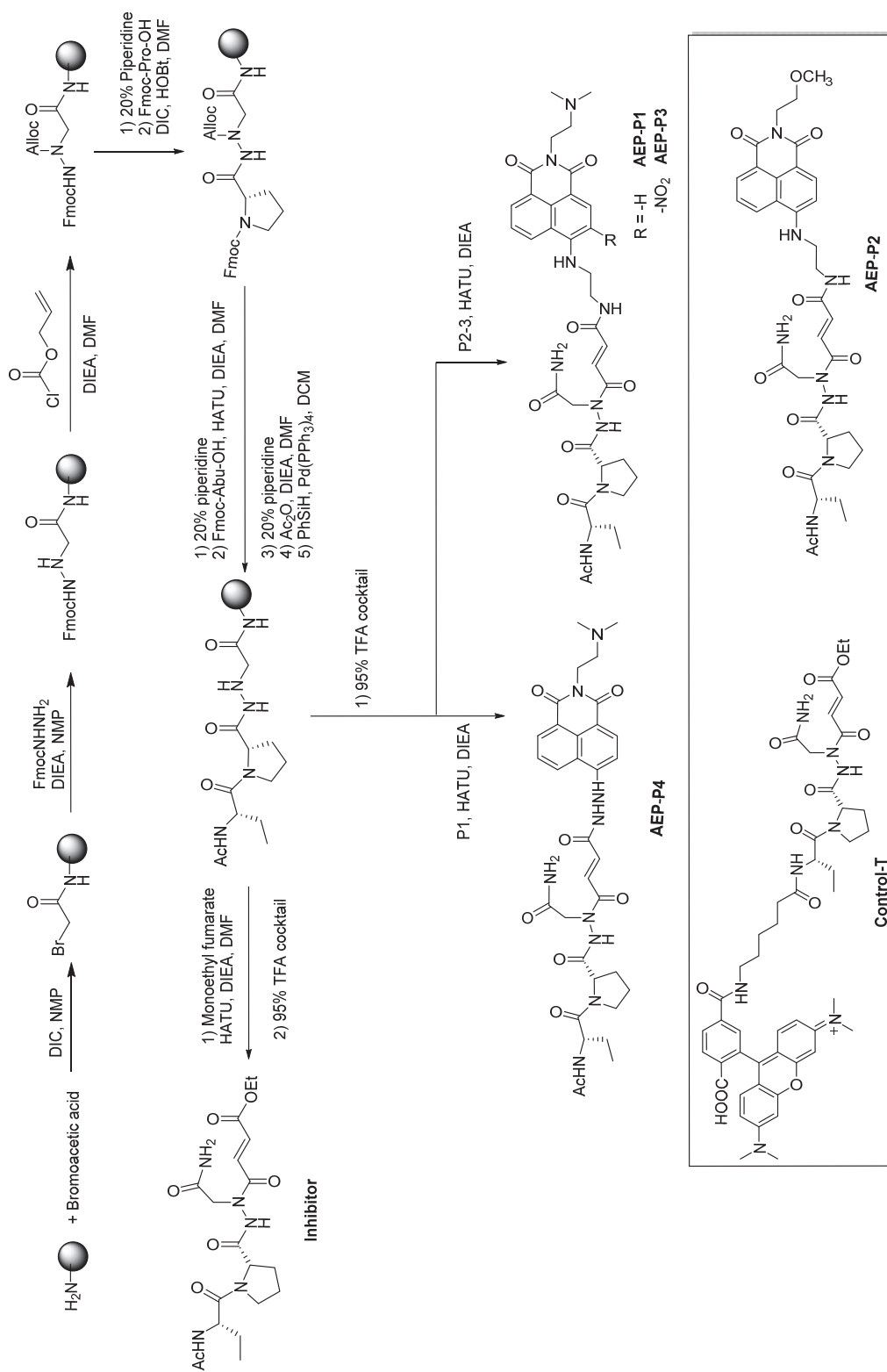
본 연구에서는 기존의 논문을 참고하여 asparaginyloxy endopeptidase(AEP) 를 타깃 하는 활성화기반 탐침물질을 일부 변형하여 링크아마이드 레진을 이용하여 solid phase synthesis technique 을 기반으로 프로브를 합성하였다. AEP 의 active site 에 존재하는 시스테인과 공유 결합하는 친전자체와 legumain 에 선택적으로 결합할 수 있는 Pro-Asn 를 변형하여 펩타이드를 합성하여 HPLC 로 정제하였다. 여기에 분자의 전자분포 변화에 따라 형광신호가 쉽게 변하는 특성을 갖는 naphthalimide 유도체들을 반응시켜 AEP 와의 선택적인 반응을 통해 형광신호가 변화되는 새로운 프로브 (AEP-P1~P4)와 TAMRA 를 이용한 control 물질을 합성하였다 (Scheme 3). (본 논문에 인용 된 AEP-P2 와 Control-T 는 홍종아가 합성한 물질이다.)

형광물질은 구입 가능한 4-bromo-1,8-naphthalic anhydride 시약을 시작으로 합성한다 (Scheme 2). P4,5,7,8,9 는 기존의 논문을 참고하여 P5,8,9 에 cysteine 기와 반응하는 할 수 있도록 monoethyl fumarate 를 결합하고 ester 를 carboxylic acid 로 변환시킨 후에 AEP-P1 과 AEP-P4 는 형광을 나타내는 fluorophore 와 thiol 기와 반응하는 이중결합의 거리를 ethylenediamine 과 hydrazine 을 사용하여 차이를 두었고, AEP-P2 와 AEP-P3 은 electrophilic warhead 와 근접한 위치에 -

NO₂ 기를 첨가하여 전자분포에 변화를 주하고자 하였다. Control probe 는 TAMRA 를 결합시켜 새로 합성된 프로브와 비교하고자 하였다. 합성된 물질의 특성을 살펴보는 실험은 AEP inhibitor, AEP-P1, AEP-2, 그리고 Control-T 에 대해서 이루어졌다.



Scheme 2. Synthesis of naphthalimide-based fluorescent probes



Scheme 3. Synthesis of asparaginyl endopeptidase probes

2.2. RAW 264.7 macrophage 등 세포주를 활용한 효소활성 탐색

살아있는 RAW 264.7 macrophages 에 labeling 하여 AEP 에 타깃 하는 것을 확인 할 수 있다 (Figure 5 의 Leg, Leg 는 legumain 을 약어로 표현함). 또한 AEP-P1 이 AEP-P2 나 Control-T 보다 더 진한 intensity 를 나타내는 것으로 보아 세포투과도가 가장 우수한 것으로 추측해볼 수 있다 (Figure 5). 이와 같은 결과로 미루어보아 기존의 프로브와 달리 warhead 인 michael acceptor 의 right hand side (non-prime site)쪽을 modification 하더라도 효소 인식 효율 면에서는 큰 차이가 없는 것으로 생각된다.

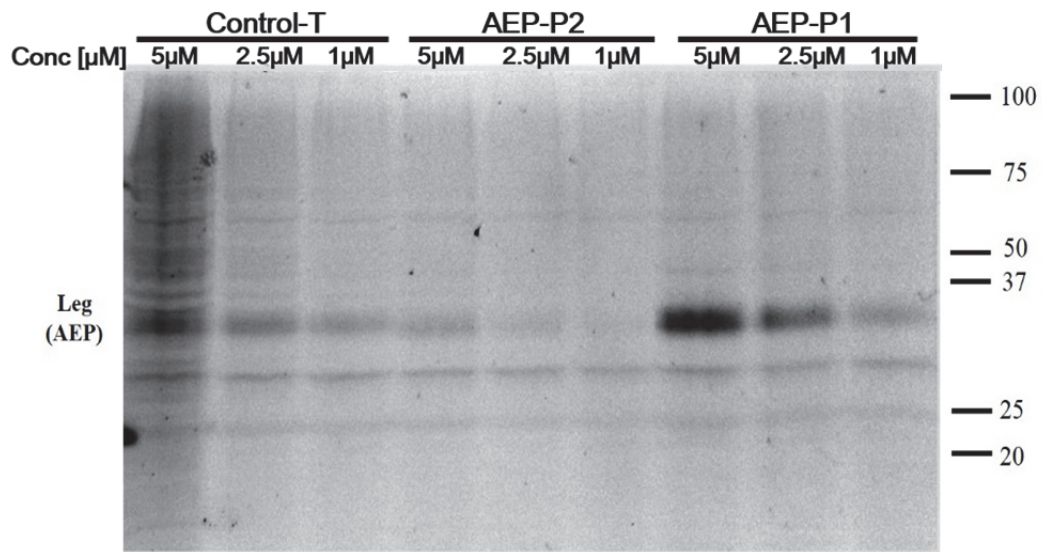


Figure 5. Labeling of AEP in intact cells by AEP-P1, AEP-P2, and Control-T

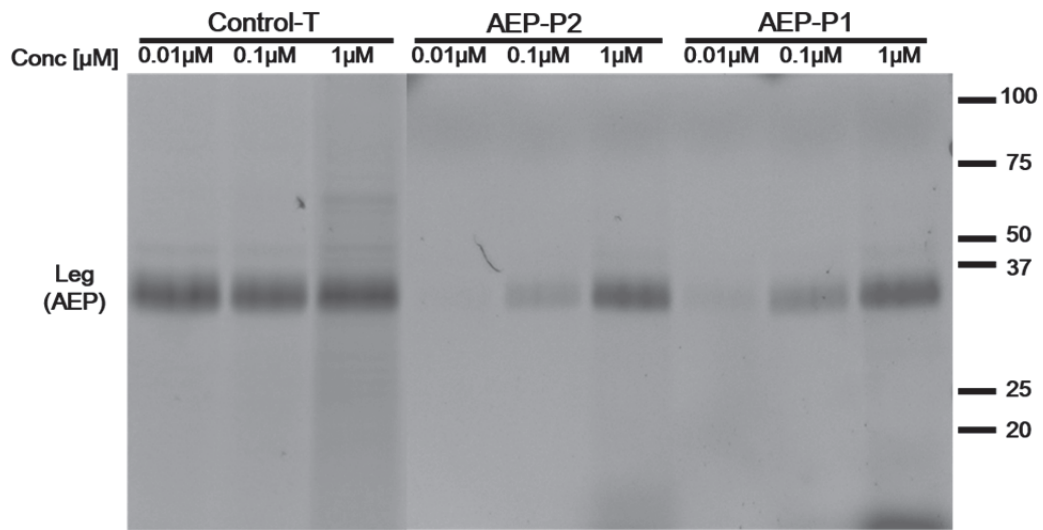


Figure 6. Labeling of AEP in lysate by AEP-P1, AEP-P2, Control-T (본 실험은 홍종아가 수행하였음)

RAW 264.7 macrophages 의 세포추출물 (RAW lysate)을 이용하여 프로브 labeling 실험결과 세 개의 서로 다른 농도에서의 labeled band intensity 를 비교해볼 때, 새로 확보된 smart probe 들은 선택적으로 농도에 비례하여 AEP 와 반응하였으며, 표지효율 면에서는 control probe 와 유사하거나 (AEP-P1) 약간 떨어진 반응성 (AEP-P2)을 보이는 것으로 확인되었다 (Figure 6).

RAW 264.7 과 NIH 3T3 두 종류의 세포를 사용하여 실제로 프로브들이 살아있는 세포에서 어떻게 효소와 반응하는지를 형광현미경을 활용한 영상화 실험을 통해 관찰하였다. AEP-P1 과 AEP-P2 는 fluorophore 로 naphthalimide 구조를 사용하였기 때문에 녹색형광신호를 나타내며, Control-T 는 rhodamine 을 base 로 하기 때문에 적색형광신호를 나타낸다. 합성한 프로브들이 lysosomal cysteine protease 에 속하는 AEP 를 타깃 하는 물질이기 때문에 lysosome 선택적인 형광물질인 lyso-tracker 를 이용하여 이들 형광신호가 겹쳐지는지를 확인하였다 (Figure 7,8). Figure 7 은 RAW 264.7 세포를 이용하여 실험을 진행하여 프로브가 legumain 과 반응하여 형광신호를 나타내는 것을 형광 현미경을 통하여 확인 할 수 있었다. AEP-P1 과 AEP-P2 를 처리한 well 에는 lysotracker red 를 처리하여 프로브의 green signal 을 green field 로 확인하고 lysotracker red 의 red signal 을 red field 로 확인하여 merge 한 사진에서 프로브가 lysosome 을 타깃 하는 것을 확인한다. Control-T 를 처리한 well 에는 lysotracker green 을 함께 처리하여 각각의 field 로 이미징하여 확인하였다.

이 후 NIH 3T3 세포를 이용한 실험에선 추가적으로 AEP inhibitor 와 세포 내 thiol (-SH) 기를 억제하는 NEM 을 처리함으로써 AEP probe 에 의한 형광신호가 저해되는지를 확인하고자 하였다 (Figure 8). 세포에 inhibitor 를 처리하여 프로브의 작용이 억제 되는 것을 확인하고, NEM 이 세포 내 존재하는 Glutathione 등의 -SH 기와 반응을 검사하여 합성한

프로브가 legumain 의 cysteine 에 대한 선택성을 확인하려 하였다. 각 well 당 서로 다른 구역을 3 개 촬영한 뒤 intensity 값을 구하여 평균과 표준편차를 정리하여 표로 나타내었다 (Figure 9). AEP-P1 의 경우 AEP inhibitor 처리 유무 에 따라 약 2.5 배의 차이를 보임으로써 해당 프로브가 AEP 선택적인 형광신호를 나타내고 있음을 확인하였다.

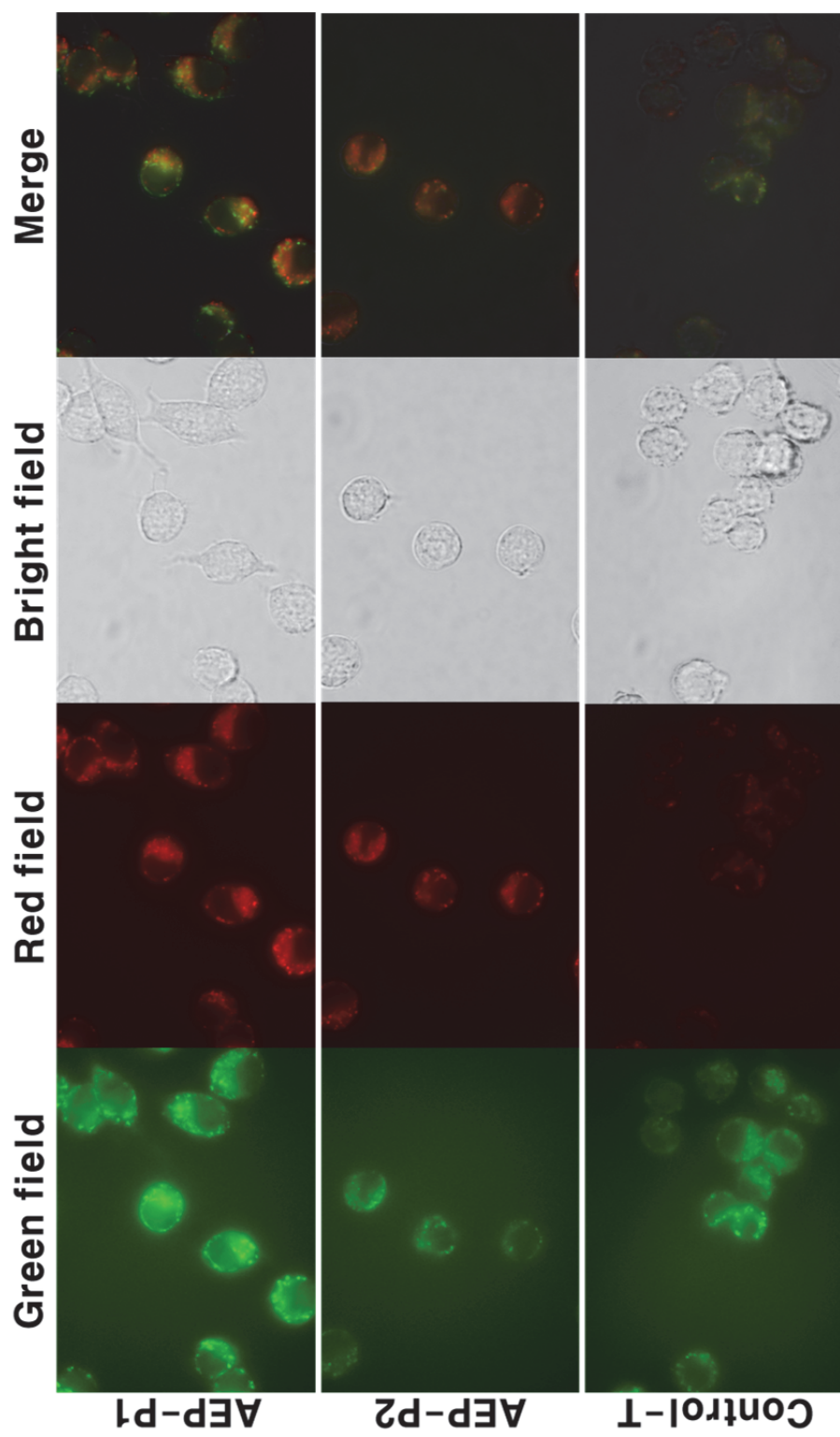
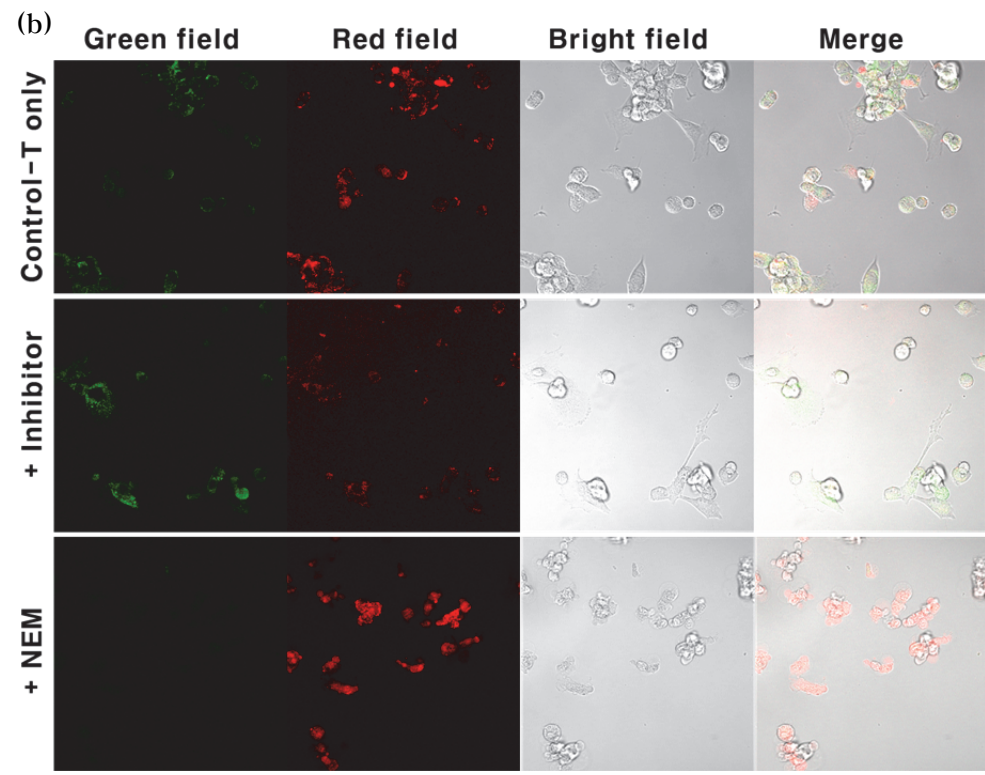
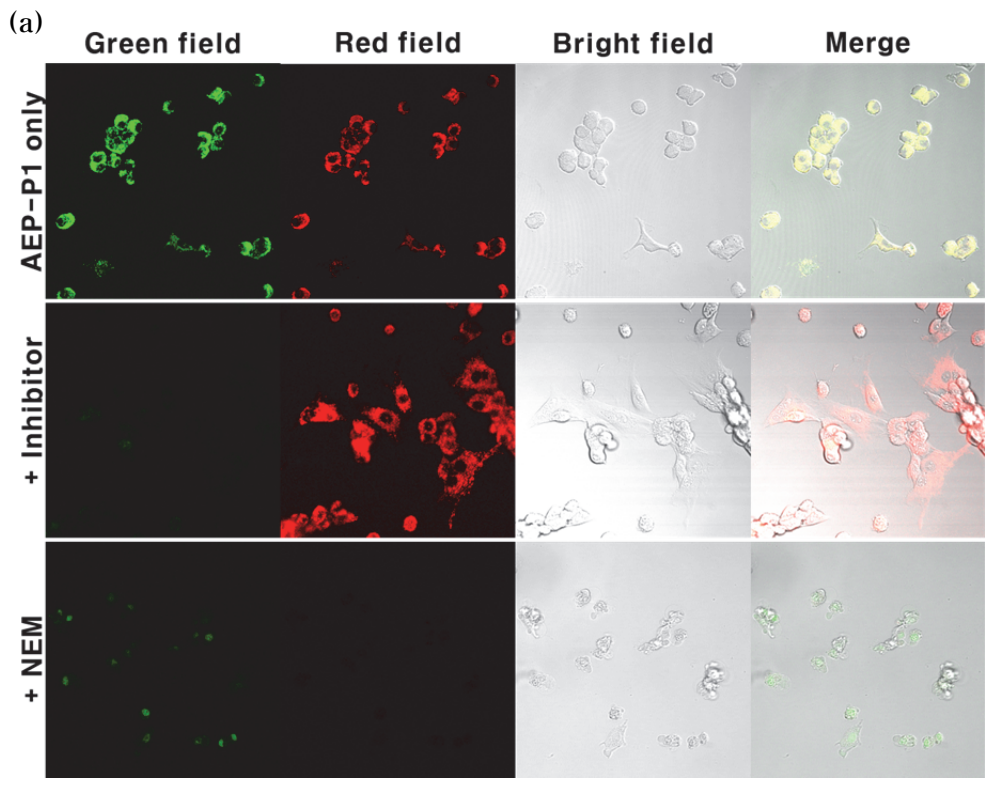


Figure 7. Cell imaging with AEP-P1, AEP-P2, Control-T (Raw 264.7 cell)



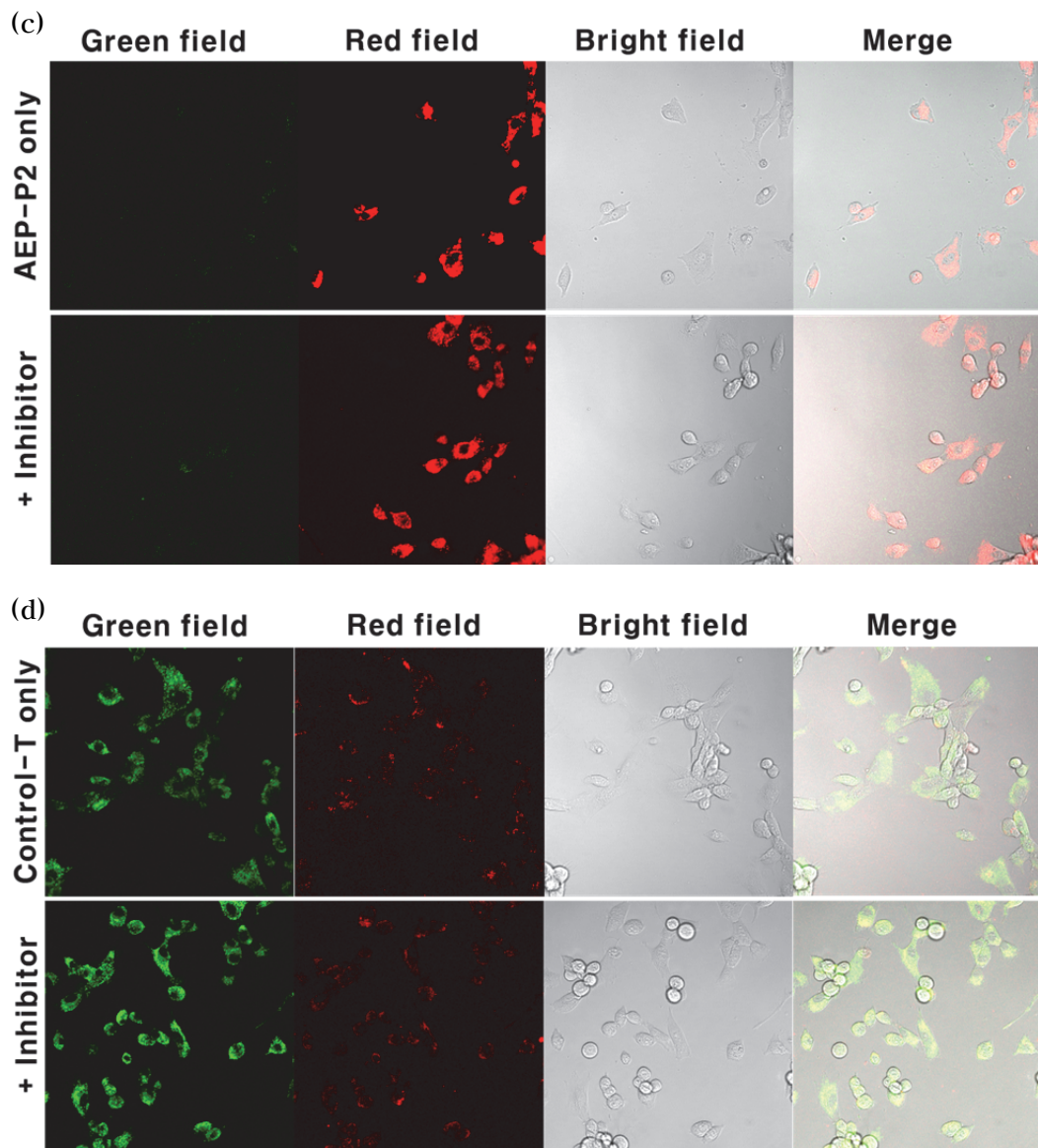


Figure 8. Cell imaging with AEP-P1, AEP-P2, Control-T (NIH 3T3 cell)

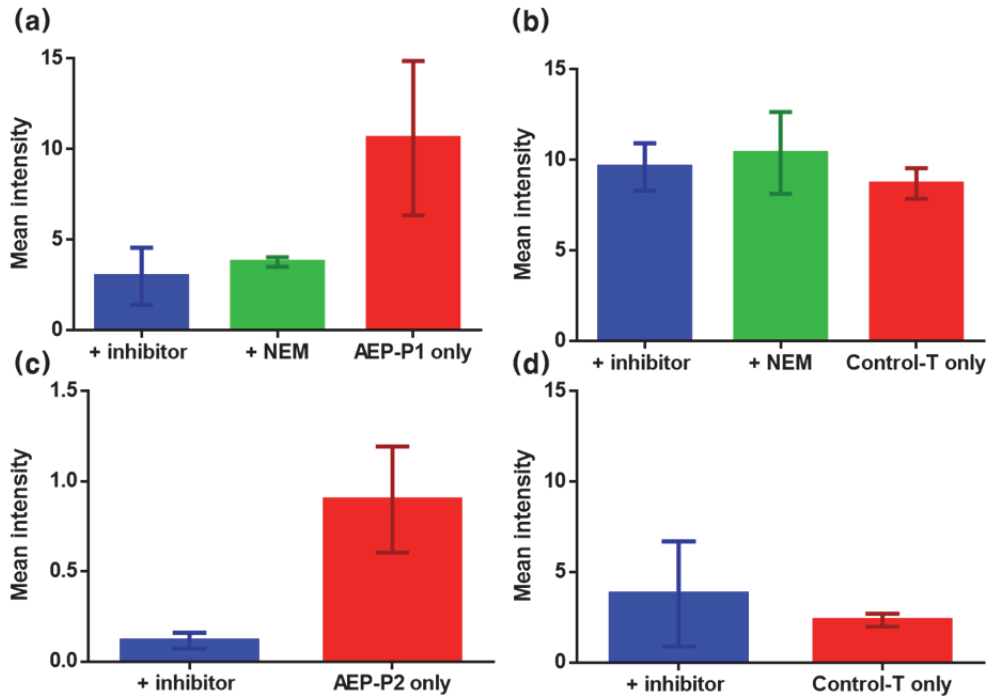


Figure 9. Mean intensity of AEP-1, AEP-2 and Control -T

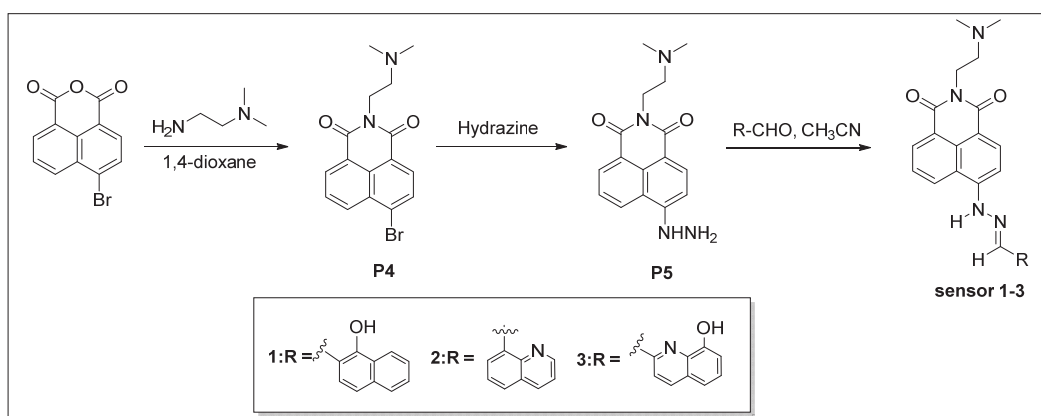
위의 그래프는 Figure 8 의 이미지에서 mean intensity 값을 구하여 비교하였다. 각 well 당 세 부분을 촬영하였고 그 평균과 표준편차를 그래프로 나타내었다. (a)왼쪽부터 inhibition 후 AEP-P1 처리, NEM 처리 후 AEP-P1 처리, 프로브만 처리한 것을 비교하였다. Inhibitor 를 처리하지 않은 well 의 intensity 가 처리한 well 에 약 2.5 증가한 것을 확인할 수 있다. (b)는 (a)에서 AEP-P1 대신 Control-T 을 처리하였다. (c)는 AEP-P2 를 (d)는 Control-T 를 처리하였다. (c) AEP-P2 도 AEP-P1 과 유사한 양상을 보여준다. (NEM 의 세포 독성이 강하여 세포가

괴사하여 signal 을 정확히 산출하기에 어려움이 있어 live cell imaging 에
사용이 용이하지 않은 것으로 판단되었다. 때문에 AEP-P2 와 control 을
이용하여 실행한 이미징에선 NEM 을 처리하지 않고 실험을 진행하였다.)

3. 금속 및 각종 음이온에 선택적으로 반응하는 형광화학센서의 합성과 평가

(본 연구는 홍종아, 정유진과 공동으로 수행하였으며 해당 결과는 *RSC Adv.* 2016, 6, 84908 에 출판되었다. 본 섹션의 내용은 해당 출판내용 중 일부를 발췌 변형하여 작성되었다.)

3.1. 1,8-Naphthalimide 기반 형광센서의 합성



Scheme 4. Synthesis of metal & anion sensor 1-3 sensor 1 (1-hydroxy-2-naphthaldehyde), sensor 2 (quinoline-8-carboxaldehyde), sensor 3 (8-hydroxy-2-quinolinecarboxaldehyde) (홍종아, 정유진과 공동으로 합성함)

P4 와 P5 의 합성은 위에 기술한 내용과 같고 P5 에 서로 다른 4 가지 물질 (sensor 1: 1-hydroxy-2-naphthaldehyde, sensor 2: quinoline-8-carboxaldehyde, sensor 3: 8-hydroxy-2-quinolinecarboxaldehyde) 을 이용하여 4 가지의 sensor 를 합성하였다.

3.2. 1,8-Naphthalimide 기반 형광센서의 광학적 특성과 반응 메커니즘.

3.2.1 Sensor 1 의 광학적 특성과 메커니즘

(Sensor 1 과 관련된 광학적 특성 실험은 홍종아가 수행하였다.)

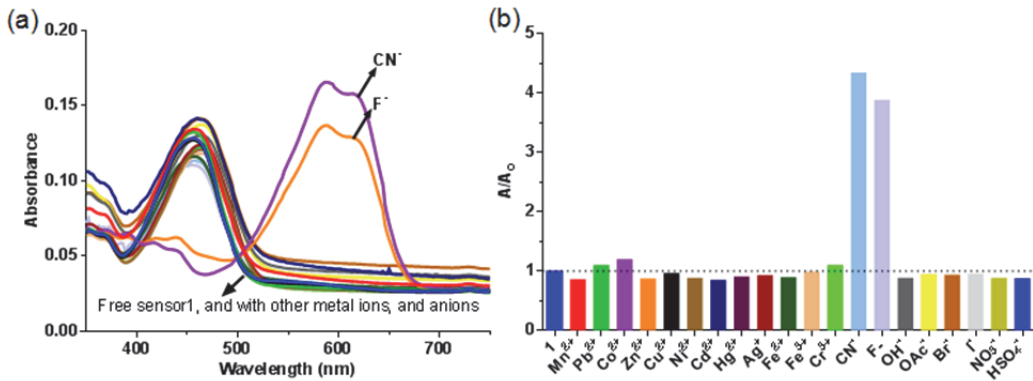


Figure 10. Metal & anion selectivity test Changes in the UV-vis absorption of (a) sensor 1 ($5 \mu\text{M}$) in the presence of various ions ($100 \mu\text{M}$) in CH_3CN ; (b) Absorption response at 586 nm to various ions at $100 \mu\text{M}$ (20 eq.) A_0 represents the absorbance of free sensor 1, whereas A represents absorbance of sensor 1 in the presence of ions.

Sensor 1 의 광학적 특성을 살펴보기 위해서 다양한 anions (F^- , Cl^- , Br^- , I^- , CN^- , NO_3^- , HSO_4^- , OAc^- , OH^-) 과 metal ions (Mn^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cr^{2+}) 를 MeCN 용매 조건에서 실험하였다. Figure 10 에서 보여지듯 sensor 1 은 F^- 와 CN^- 이온에 반응하여 최대 흡광의 범위가 465 nm 에서 586 nm 로 변하고 육안으로 노란색에서 짙은 녹색으로 변하는 것을 확인 할 수 있다.

Sensor 1 의 detection 범위를 측정하기 위해서 F^- , CN^- 를 이용하여 titration 실험을 진행하였다. Figure 11 에서 보여지듯 sensor 1 은 두 anion 에서 비슷한 양상을 보이며 4 당량($20 \mu\text{M}$) 까지 점차적인 신호의

증가를 확인 할 수 있고, 586nm 에서 signal 이 최대 약 4 배 가량 증가하였다.

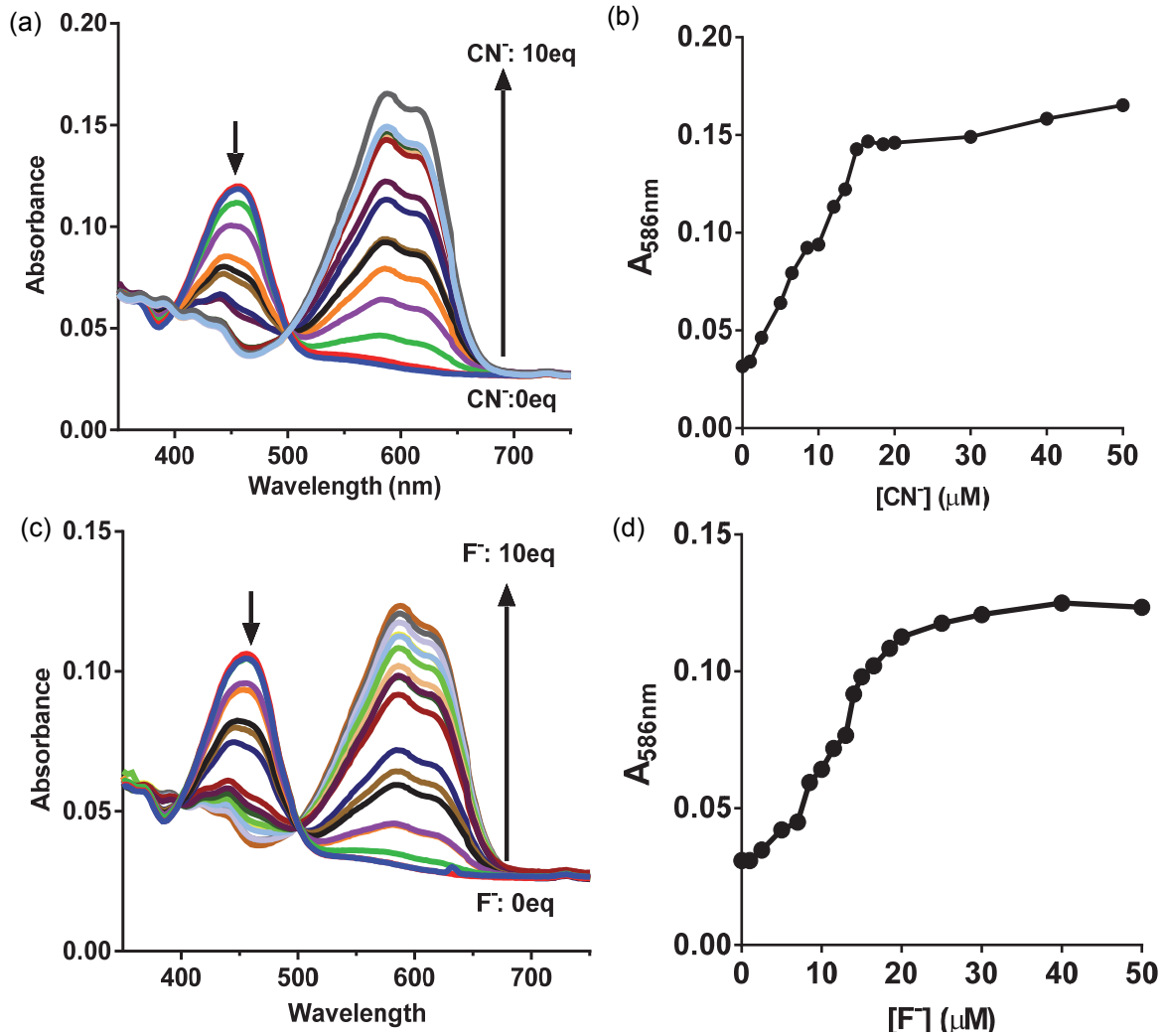


Figure 11. Sensor 1 titration with F^- , CN^- (a) Absorbance titration of sensor 1 ($5 \mu M$) upon addition of CN^- at $2.5 \mu M$ to $50 \mu M$; (b) Absorbance at 586 nm from the titration of CN^- ; (c) Absorbance titration of sensor 1 ($5 \mu M$) upon addition of F^- at $2.5 \mu M$ to $50 \mu M$; (b) Absorbance at 586 nm from the titration of F^- .

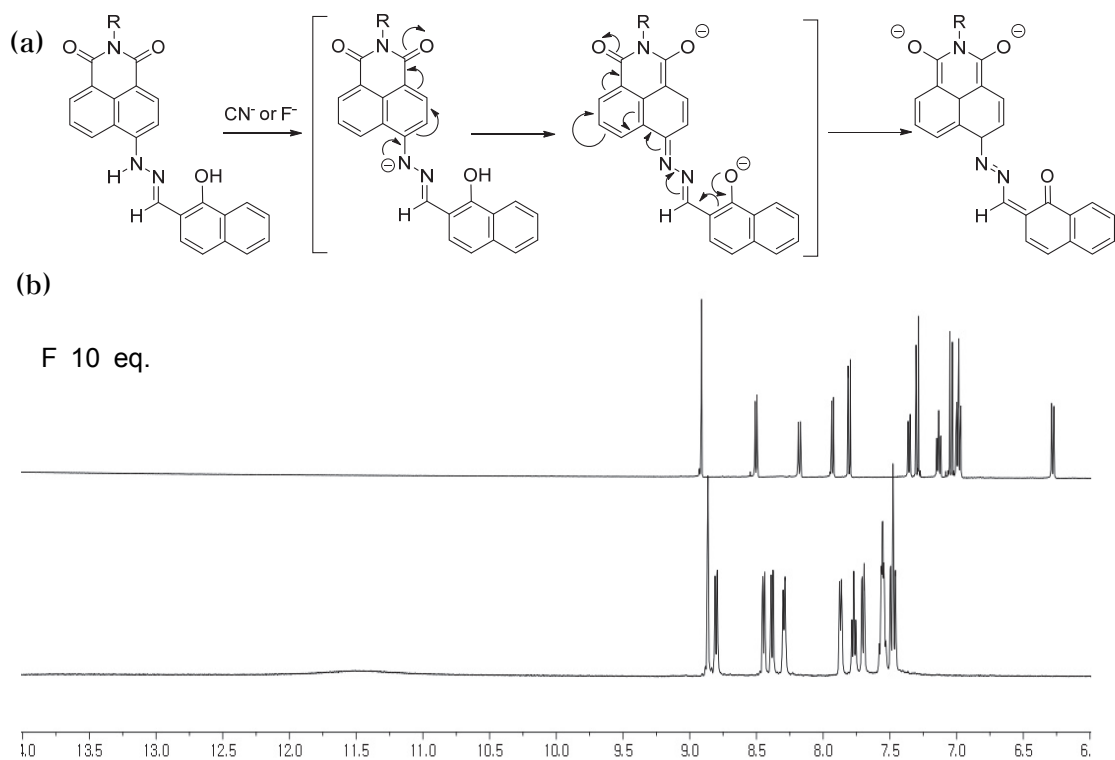


Figure 12. (a) Proposed mechanism of sensor 1; (b) ^1H NMR spectra of 1 in $\text{DMSO}-d_6$ in the presence of excess TBAF.

Hydrazone N-H 는 acidic 하고 pH 조절이나 anion 을 탐지한다고 알려져 있다. 그러므로 Figure 12a 와 같이 sensor 1 에 F^- 또는 CN^- 를 첨가했을 경우 phenolic -OH 와 hydrazone N-H 의 탈 양성자화 작용으로 확장된 conjugation 을 예상해볼 수 있다. 탈 양성자화 작용으로 인하여 전자밀도가 증가하여 aromatic proton 이 upfield 로 이동한 것을 ^1H NMR 을 통하여 증명할 수 있다 (Figure 12b).

3.2.2 Sensor 2 의 광학적 특성과 메커니즘

Sensor 1 은 acidic N-H 와 phenolic -OH 가 존재하기 때문에 여러 가지 이온이 첨가되었을 때 내제되어있는 형광신호가 효과적으로 quenching 된다. Sensor 2 는 이와 다르게 hydroxynaphthalene 을 quinoline 그룹으로 변화를 주었다. 때문에 Sensor 1 과 같은 확장된 conjugation 은 이루어질 수 없어 비색적인 변화를 관찰 할 수 없다 (Figure 13a). 그런데 다양한 이온을 첨가한 뒤 형광 신호가 증가하는 변화를 측정 할 수 있었다 (Figure 13b). Sensor 2 자체로도 약간의 형광 신호를 갖고 있는데 F^- , CN^- , OH^- 등의 anion 을 첨가하였을 때 hyarazone 의 N-H 가 deprotonation 되면서 강한 형광 신호를 나타내게 된다. 또한 금속이온 중 수은 이온에 선택적으로 반응하여 강함 형광신호를 나타낸다. 이는 수은 이온의 결합으로 인해 회전을 하지 못하는 구조가 되어 photoinduced electron transfer (PET) process 를 막아서 형광신호가 증가하는 것으로 보여진다 (Figure 13c). 분광학적 분석으로 job' s plot 을 그려 반응 비율을 살펴보는 실험도 함께 진행하여 1:1 반응비율을 알아볼 수 있었다 (Figure 14).

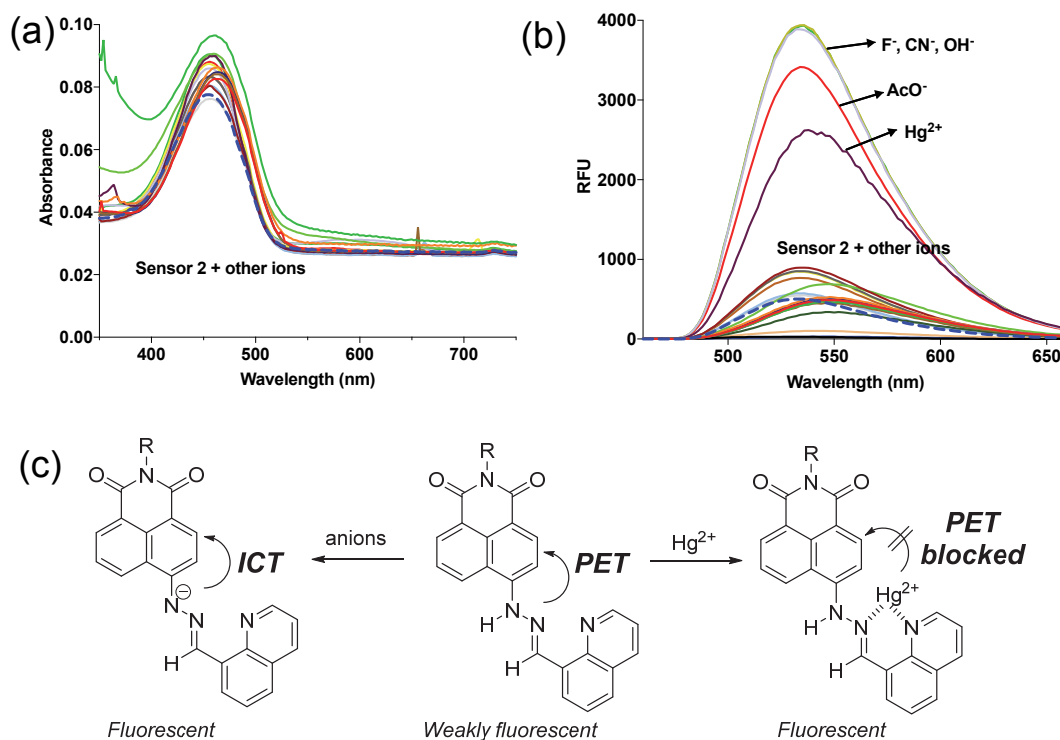


Figure 13. Absorption (a) and emission (b) profile of sensor 2 ($5 \mu\text{M}$) in the presence of various ions ($100 \mu\text{M}$) in MeCN; (c) the proposed sensing mechanism for sensor 2.

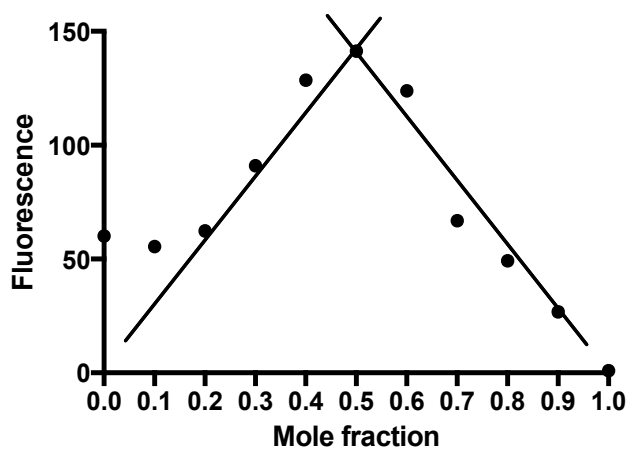


Figure 14. Job's plot showing 1:1 stoichiometry of Hg^{2+} : sensor 2 responses

3.2.3 Sensor 3 의 광학적 특성과 메커니즘

(sensor 3 의 F^- 와 CN^- 의 광학적 특성 및 NMR 과 관련된 실험은 홍종아가 수행하였음.)

Sensor 3 는 sensor 1과 sensor 2의 hydroxyl 그룹과 quinoline 그룹을 동시에 갖도록 디자인하여 sensor 1의 비색적인 변화와 sensor 2의 형광 신호의 변화 이 두가지 특성을 모두 가진 dual-mode sensor다. 비색적인 변화로는 F^- 와 CN^- aion을 첨가하였을 때 596nm 흡광의 신호 변화를 측정하였고 sensor 1과 비교하였을 때 흡광도의 크기가 크진 않지만 육안으로 노란색에서 청색으로 변화한 것을 확인 할 수 있다 (Figure 15a). 형광적인 변화로는 수은 이온을 첨가하였을 때 535nm에서 형광신호가 증가 하는 것을 관찰 할 수 있다 (Figure 18a).

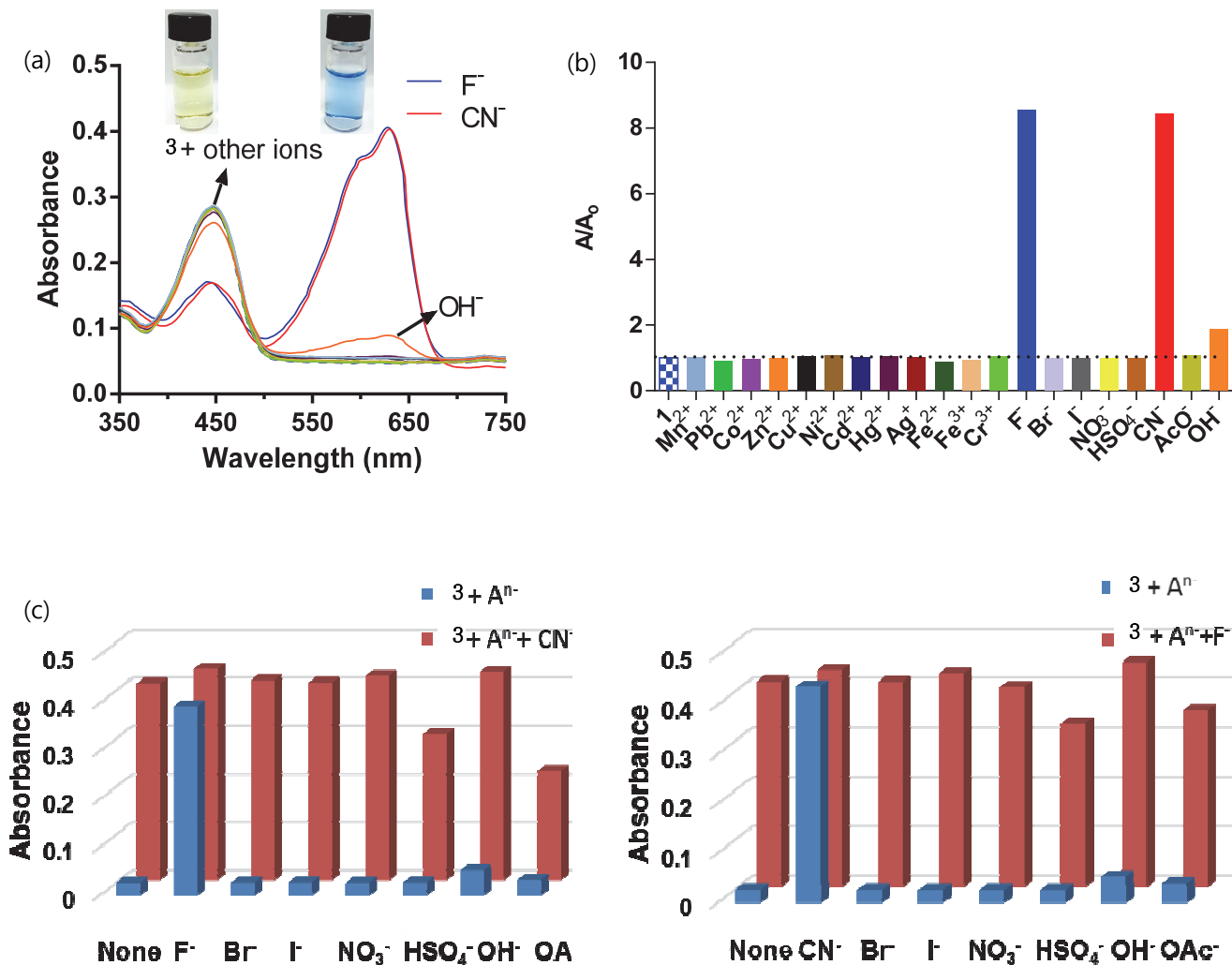


Figure 15. Changes in the UV-vis absorption of (a) sensor 3 (5 μM) in the presence of various ions (100 μM) in CH_3CN ; (b) Absorption response at 628 nm to various ions at 100 μM (20 eq.) A_0 represents the absorbance of free sensor 3, whereas A represents absorbance of 1 in the presence of ions; Competitive selectivity of 3 (5 μM) toward (c) CN^- (50 μM), and (d) F^- (50 μM) in the presence of other anions (50 μM)

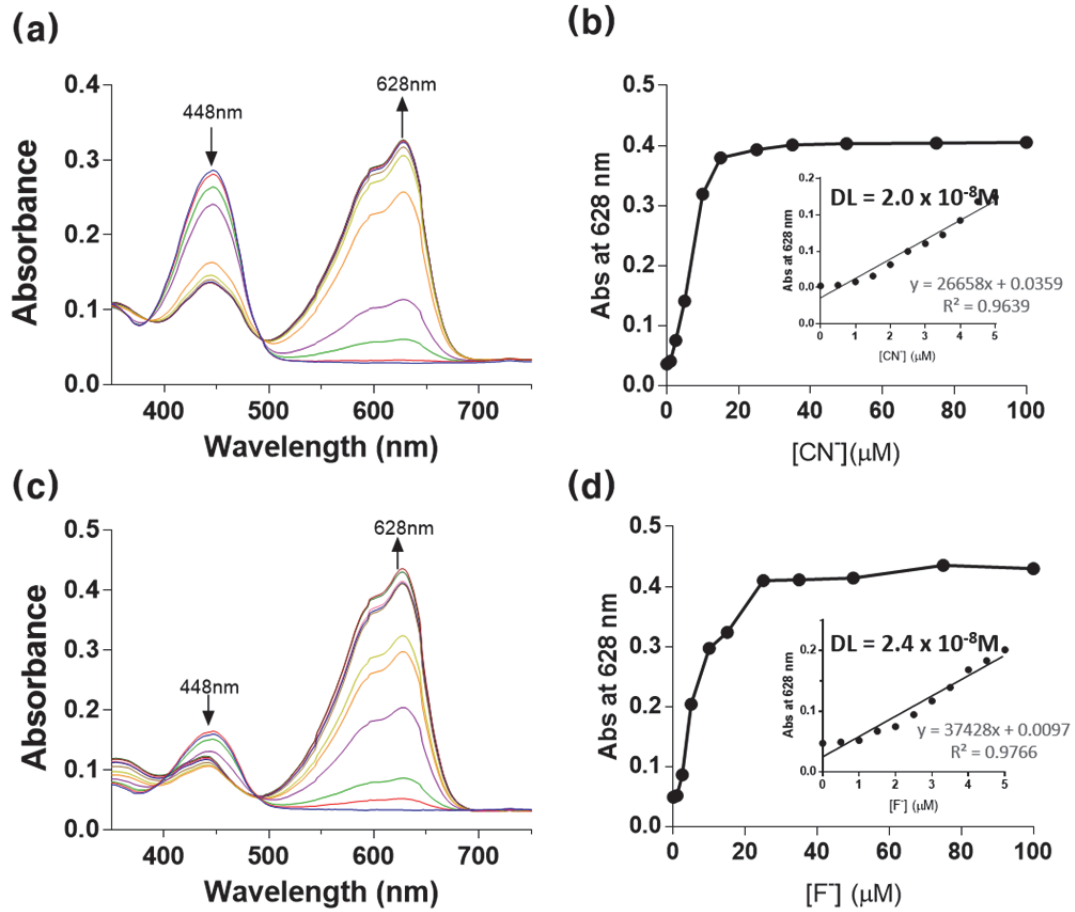


Figure 16. (a) Absorbance titration of sensor 3 ($5 \mu\text{M}$) upon addition of CN^- at $2.5 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$; (b) Absorbance at 628 nm from the titration of CN^- ; (c) Absorbance titration of sensor 3 ($5 \mu\text{M}$) upon addition of F^- at $2.5 \mu\text{M}$ to $100 \mu\text{M}$; (d) Absorbance at 628 nm from the titration of F^- ; Insets: Detection limit measurements of 3 ($5 \mu\text{M}$) toward each anion. (본 실험은 홍중아가 수행하였음)

sensor 3에 F^- , CN^- 를 첨가하였을 때 628nm에서 최대 흡광을 보이며 대략 anion의 농도가 $20 \mu M$ 까지 증가하고 그 이후엔 유지하는 것을 관측하였다. sensor 3의 F^- , CN^- 에 대한 detection limit은 각각 $2.4 \times 10^{-8} M$ 와 $2.0 \times 10^{-8} M$ 로 측정되었다 (Figure 16b, 16d). 최근에 개발된 chromogenic sensor들의 detection limit을 비교해 보았을 때 sensor 3는 매우 낮은 detection limit을 가졌을 뿐만 아니라, F^- 와 CN^- 에 대한 선택성이 높아 육안으로 색 변화를 쉽게 확인 할 수 있다는 점을 알 수 있다.

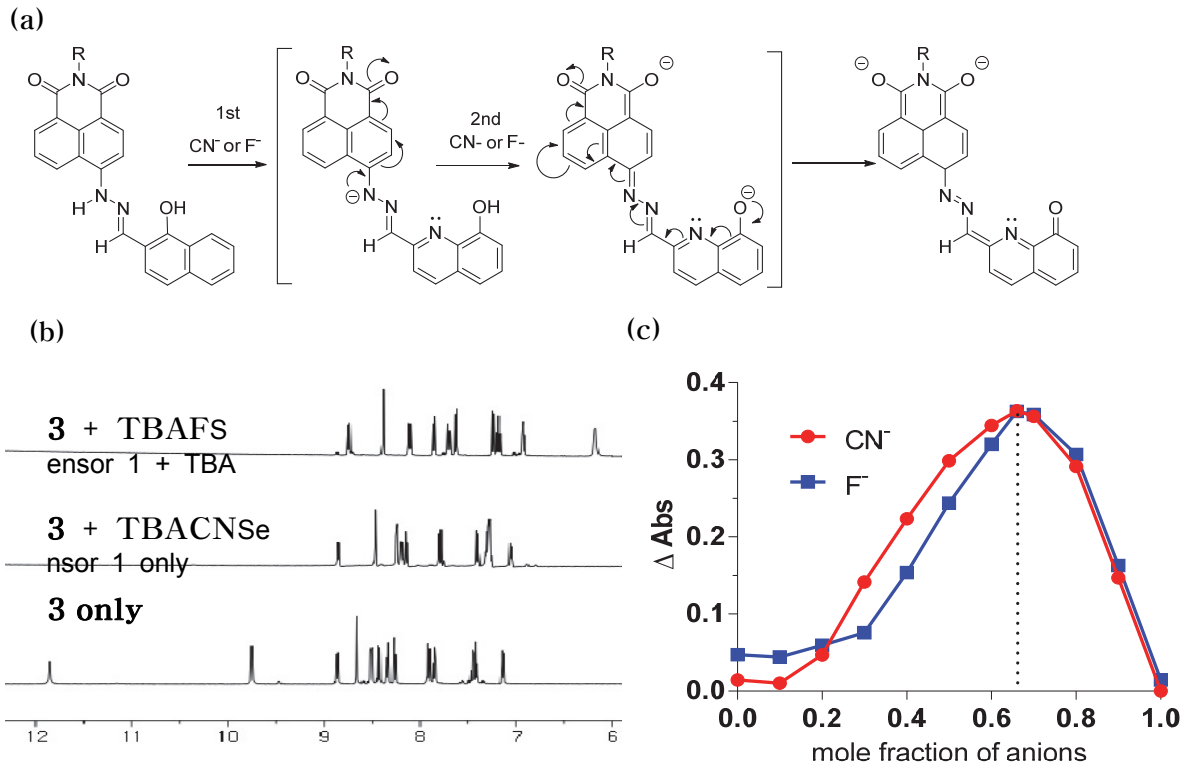


Figure 17. (a) Proposed mechanism for sensor 3; (b) ¹H NMR spectra of 3 in DMSO-*d*₆ in the presence of excess TBAF or TBAFSe; (c) Job's plot analysis of sensor 3 with F⁻ and CN⁻ showing 1:2 stoichiometry of sensor 3:anions

Sensor 1 과 유사하게 Figure 17a 와 같이 sensor 3 에 F^- 또는 CN^- 를 첨가했을 경우 phenolic $-OH$ 와 hydrazone $N-H$ 의 탈 양성자화 작용으로 확장된 conjugation 을 예상해볼 수 있다. 이러한 가설을 1H NMR 에서 aromatic proton 이 upfield 로 이동한 것을 통하여 탈 양성자화 작용으로 인하여 전자밀도가 증가하였다고 증명할 수 있다 (Figure 17b). 또한 분광학적 분석으로 job' s plot 을 그려 반응 비율을 살펴보는 실험도 함께 진행하여 F^- 와 CN^- 두 이온이 sensor 와 2:1 로 반응한다는 것을 알아볼 수 있다 (Figure 17c).

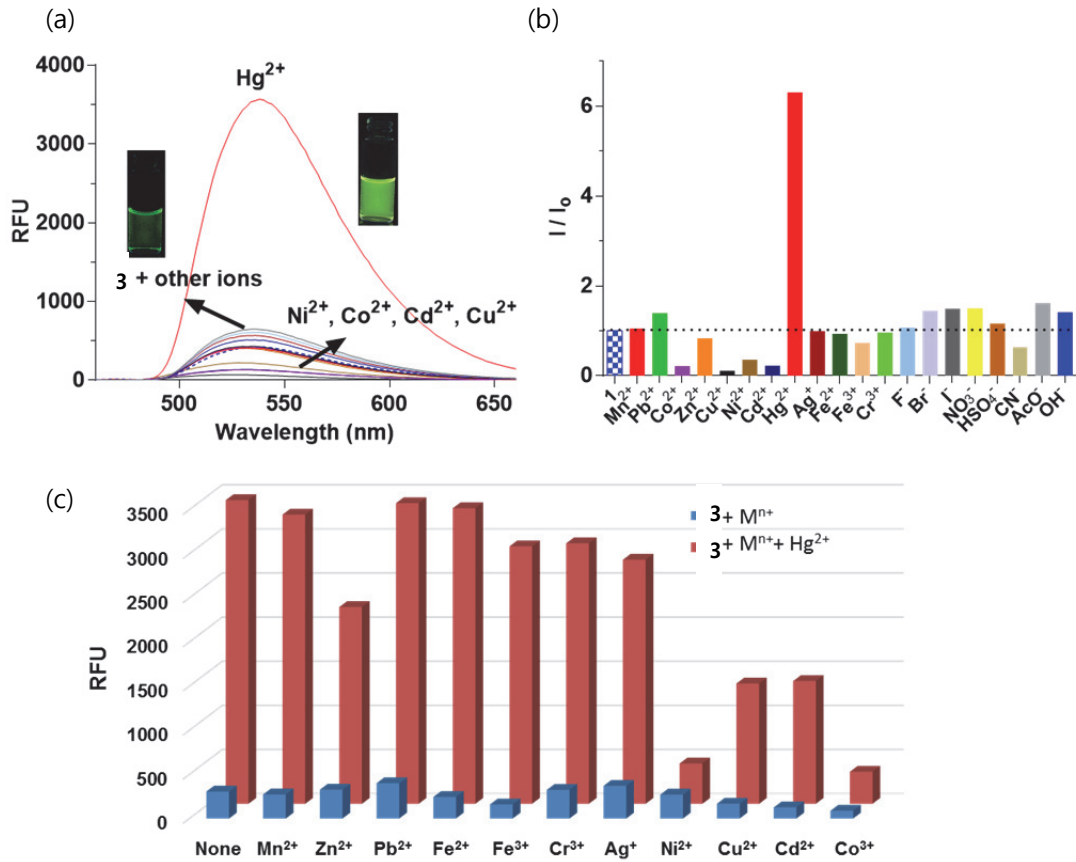


Figure 18. Emission (a) and selectivity (b) profile of sensor 3 (5 μ M) in the presence of various ions (100 μ M) in CH₃CN; (c) Competitive selectivity of 3 (5 μ M) toward (c) Hg²⁺ (50 μ M), and in the presence of other anions (10 μ M)

Sensor 3에 대하여 다양한 이온을 처리한 뒤 형광 신호의 변화에 대한 실험을 진행하였을 때 수은 이온에 대하여 선택성을 관찰하였다. (Figure 18a,b) 수은 처리 후 수은을 처리하기 전보다 8배 정도의 신호 증가를 보이고 원래 sensor 3의 emission wavelength가 515nm에서 최대값을 갖는 것과 비교하여 535nm에서 최대값을 보여 20nm정도 이동한 것을 보였다.

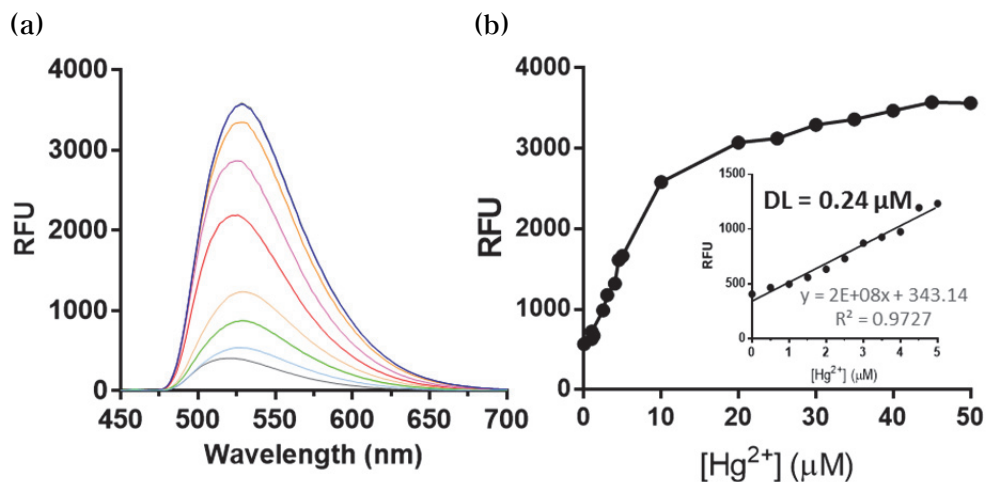


Figure 19. (a) Fluorescence titration of sensor 3 (5 μM) upon addition of Hg^{2+} at 1 μM to 50 μM ; (b) Emission at 535 nm from the titration of Hg^{2+} ; Inset: Detection limit measurements of 3 (5 μM) toward Hg^{2+} .

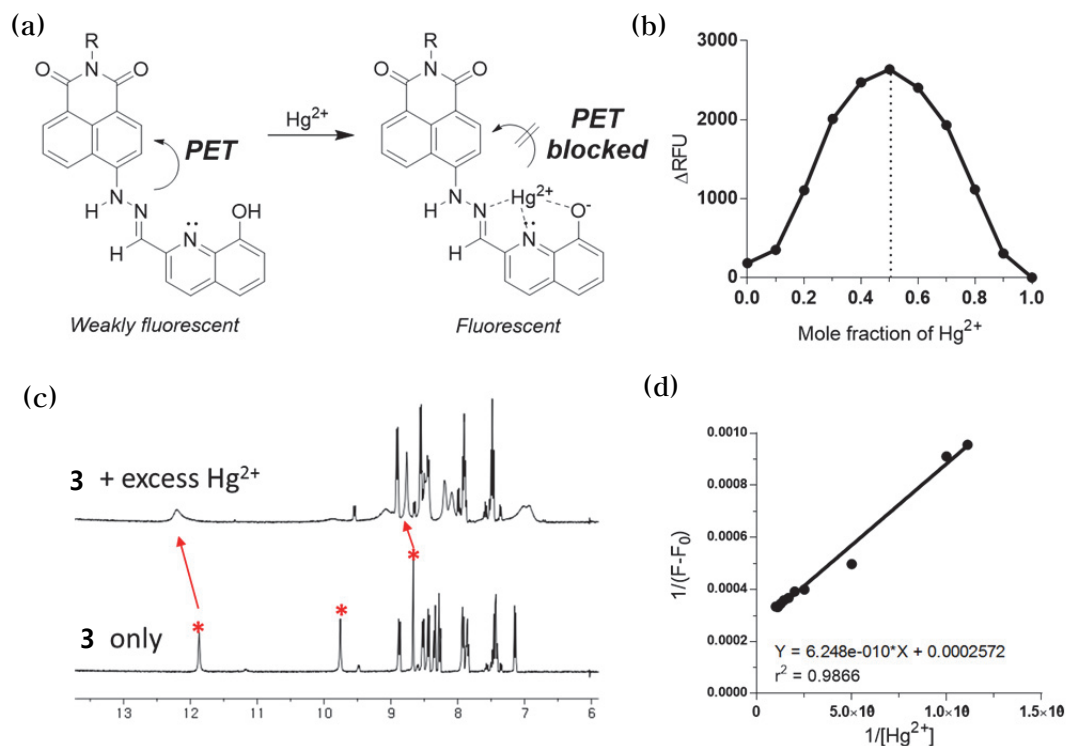


Figure 20. (a) Proposed mechanism of sensor 3 for sensing Hg^{2+} ; (b) Job's plot analysis of sensor 3 showing 1:1 stoichiometry of sensor 3: Hg^{2+} ; (c) ^1H NMR of 3 in the absence and presence of excess Hg^{2+} ; (d) Benesi-Hildebrand plot of 3

Sensor 3을 이용하여 농도에 따라 수은의 적정실험을 진행하였고 sensor 1, 2 와 유사하게 20 μ M 농도까지 가파른 상승 곡선을 측정하였다. Sensor 3의 수은 이온에 대한 detection limit은 Figure 19b에 기술되어 있는 것과 같이 2.4×10^{-7} M이고다른 형광센서와 비교하여 작은 값을 갖는다. 그리고 sensor 3에서 설명한 것처럼 수은이온이 결합함으로써 분자회전이 제한되어 PET process를 막기 때문에 형광신호가 증가하는 것으로 보여지며 NMR에서 수은 첨가 후 차이를 볼 수 있다 (Figure 20a,c). sensor 3와 수은 이온의 결합 비율은 1:1로 job' s plot을 그려 확인하였다 (Figure b).

Ⅲ. 결론

본 연구는 크게 세 부분으로 나누어지는데 첫째 aza-BODIPY 골격을 활용한 새로운 근적외선 형광물질의 합성 및 평가, 둘째 효소활성을 탐색할 수 있는 새로운 활성기반 프로브의 합성 및 평가, 그리고 각종 이온에 반응하여 형광신호 변화를 나타내는 화학센서의 합성과 메커니즘 연구로 정리해볼 수 있다.

첫 번째 연구 주제인 aza-BODIPY 유도체의 경우 기존에 합성된 물질에 전자분포가 다른 종류의 치환체를 첨가함으로써 형광신호의 변화를 유도하고자 하였으며, 실제로 기존의 물질보다 20-30nm 정도의 형광신호 이동을 관찰할 수 있었다.

두 번째 연구 주제인 AEP 선택적 활성기반 프로브는 잘 알려진 형광물질인 naphthalimide 구조를 활용하여 AEP 의 active site 에 존재하는 cysteine 과 선택적으로 반응함으로써 형광신호 변화를 나타내는 새로운 활성기반 프로브를 합성하였다. 기존의 활성기반 프로브들이 펩타이드 인식부분에 형광물질을 결합시킴으로써 신호가 일정하게 유지되었던 반면, 새롭게 개발된 프로브는 효소와의 반응부위에 형광물질을 결합시켜 효소와의 공유결합을 통한 선택적인 형광신호 변화를 유도하고자 하였다. 본 연구를 통해 개발된 프로브는 기존의 프로브와 동등한 정도의 선택성 및 세포투과성을 유지하였을 뿐만 아니라 세포영상화 실험결과 실제 형광신호도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 추후에 보다 다양한 세포주 및 AEP 가 과

발현된 질병모델들을 활용한 영상화 실험을 통해 본 연구에서 개발된 새로운 활성기반 프로브의 특성을 집중적으로 연구해 볼 필요가 있다.

세 번째 연구 주제인 naphthalimide 기반 형광센서 개발을 통해 양이온인 수은과 음이온인 F^- , CN^- 에 선택적으로 반응함으로써 양이온에서는 형광신호변화를 음이온에서는 비색적 반응을 나타내는 다중센서를 확보할 수 있었다. 1,8-Naphthalimide 의 기본골격에 hydrazone 과 phenolic 치환체로 구조적 변화를 줌으로써 음이온에 반응해서는 deprotonation 을 통한 extended conjugation 현상이 일어나 장파장대에서 강한 흡광현상을 보였으며, 양이온인 수은에 반응해서는 PET 차단현상을 통해 선택적인 형광신호를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이들 센서는 음이온과 양이온에 대하여 서로 다른 반응 메커니즘을 통해 특이적인 광학현상을 나타내므로 환경, 의료, 기계 등 다양한 분야에 활용이 가능할 것으로 보인다.

IV. 실험

1. 실험기기 및 시약

1.1 실험기기

^1H NMR 과 ^{13}C NMR 스펙트럼은 Varian-500 (500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C) 분광계로부터 얻어졌다. NMR 용매로는 CDCl_3 , $\text{DMSO}-d_6$ 를 사용하였으며, chemical shift 는 표준물질인 tetramethylsilane 으로부터 ppm 단위로 기록하였으며 데이터는 chemical shift multiplicity (s=singlet, d=doublet, t=triplet, m=multiplet), coupling constant (Hz), integration 의 순으로 기록하였다. High Performers Liquid Chromatography(HPLC)는 Hewlett Packard Series 1100 모델로, column 은 Agilent XDB-C18 모델을 사용하였다. 질량분석기(MS)는 Electrospray ionization (ESI) 방식의 Agilent Technologies 6130 모델을 사용하여 수행하였다. Flash column chromatography 는 Merck 제품의 Silica gel 60(Merck-Millipore)을 사용하였다. 자외선-가시광선 분광광도 측정은 Spectramax M5 multimode micro plate reader 를 사용하였다. Cell imaging 은 EVOS FL imaging system 을 사용하였다. Cell & lysate labeling 실험에서 전기영동과 gel imaging 은 Bio-Rad 제품을 사용하였다(ChemiDoc MP system, Mini-protean tetra cell systems, PowerPac Basic Power supply).

1.2. 시약

반응에 사용된 시약은 Aldrich-Sigma, Fisher Chemical, Alfa Aesar, TCI, Acros 등을 구입하여 정제 없이 사용하였다. water 는 3 차 증류수를 사용하였다.

2. 실험 방법

2.1. 합성

Thiophene-substituted aza-BODIPY

4a-c 는 기존에 알려진 합성법을 참고하여 그대로 합성하였다. (45)

4a

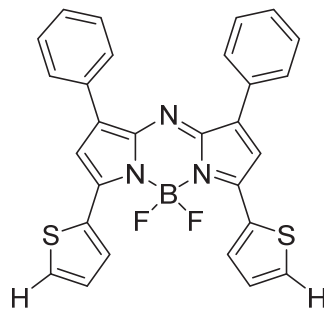


Figure 21. Structure of 4a

5,5-difluoro-1,9-diphenyl-3,7-di(thiophen-2-yl)-5H-4,5,14-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine. Spectroscopic data of 4a (46)

4b

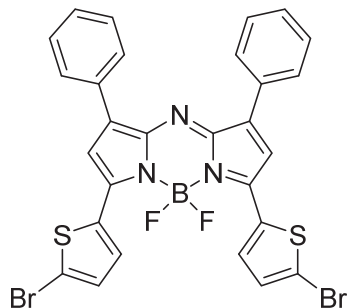


Figure 22. Structure of 4b

3,7-bis(5-bromothiophen-2-yl)-5,5-difluoro-1,9-diphenyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine.

Spectroscopic data of 4b (47)

4c

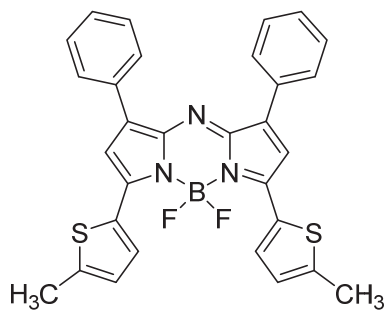


Figure 23. Structure of 4c

5,5-difluoro-3,7-bis(5-methylthiophen-2-yl)-1,9-diphenyl-5H-414,514-dipyrrolo[1,2-c:2',1'-f][1,3,5,2]triazaborinine ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ : 8.18 (d, $J = 4$ Hz, 2H), 8.03–8.05 (m, 4H), 7.47–7.38 (m, 6H), 7.10 (s, 2H), 6.94 (d, $J = 2.4$ Hz, 2H), 2.61

(s, 6H).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 149.169, 147.939, 145.450, 142.046, 133.646 (t, $J_{\text{C-F}} = 7.6\text{Hz}$), 132.321, 131.997, 130.910, 129.165, 128.736, 128.507, 118.248, 15.932; ESI-MS m/z [$\text{M} + \text{H}$] $^+$ 538.1.

활성기반 프로브의 합성

AEP Probe 1

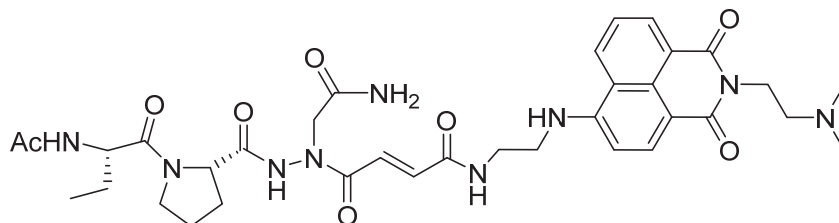


Figure 24. AEP Probe 1 (AEP-P1)

(E)-4-(2-(((S)-2-acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-(2-amino-2-oxoethyl) hydrazinyl)-N-(2-((2-(2-(dimethylamino) ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo [de]isoquinolin-6-yl) amino) ethyl)-4-oxobut-2-enamide. Solid phase peptide synthesis(SPPS)를 활용하여 합성하였다. Rink amide MBHA resin(500 mg, 0.325 mmol, 1 eq)을 DMF 용매에서 15 분간 팽윤시킨다. 20% piperidine / DMF 용액으로 15 분씩 3 번 처리하여 아미노산을 보호하고 있는 Fmoc group 을 제거한다. 반응 후 레진을 DMF(x3),

DCM(x3)으로 세척한다. Bromo acetic acid (0.67 g, 4.875 mmol, 15 eq)를 NMP(4 mL)에 용해하여 레진에 넣은 뒤 DIC(0.9 mL)를 넣고 1 시간 반응한다. 반응 후 레진을 DMF(x3), DCM(x3)으로 세척한다. Fmoc NHNH₂(250 mg, 0.975 mmol, 3 eq)를 NMP(2 mL)에 용해하여 레진에 넣은 뒤 DIEA(170 μ L, 0.975 mmol, 3 eq)를 넣고 over night 반응한다. 반응 후 레진을 DMF(x3), DCM(x3)으로 세척하고 Fmoc quantification 하여 레진에 loading 양을 측정한다. (0.2 mmol/g) 레진을 DMP 용매에서 15 분간 팽윤시킨다. Allyl chloroformate(42.52 μ L, 0.4 mmol, 4 eq)를 NMP 1 mL 에 혼합하여 레진에 넣은 뒤 DIEA(69.86 μ L, 0.4 mmol, 4 eq)를 넣고 1 시간 반응한다. 반응 후 레진을 DMF(x3), DCM(x3)으로 세척한다. 20% piperidine / DMF 용액으로 15 분씩 3 번 처리하여 아미노산을 보호하고 있는 Fmoc group 을 제거한다. Fmoc-Pro-OH(202.42 mg, 0.6 mmol, 6 eq)과 HOBt(81.072 mg, 0.6 mmol, 6 eq)를 DMF(1.2 mL)에 혼합하여 레진에 넣은 뒤 DIC(93.96 μ L, 0.6 mmol, 6 eq)을 넣고 over night 반응한다. 위와 같은 방법으로 Fmoc-Abu-OH 를 커플링하여 합성한다. Ac capping 한 뒤 Alloc 을 제거한다. 95% TFA cocktail (v/v, TFA:DW:TIS=95:2.5:2.5)을 이용하여 1 시간 처리한 뒤 레진을 거르고, TFA cocktail(x3), ACN:DW=1:1(x3) 씻어준다. 거른 용액과 세척 용액을 회전증발농축기를 이용하여 농축한 뒤 HPLC 로 prep 한다. eppendorf tube 에 peptide(5 mg, 0.016 mmol, 1 eq)을 DMSO 에 녹여준다. 여기에 product 2(7.21 mg, 0.017 mmol, 1.1

eq), HATU(12.92 mg, 0.034 mmol, 2.2 eq), 그리고 DIEA(27.48 μ L, 0.16 mmol, 10 eq)을 넣어준 뒤 빛을 차단하여 반응한다. 반응 후 HPLC 로 prep 한다. 수득률: 17%

AEP Probe 3

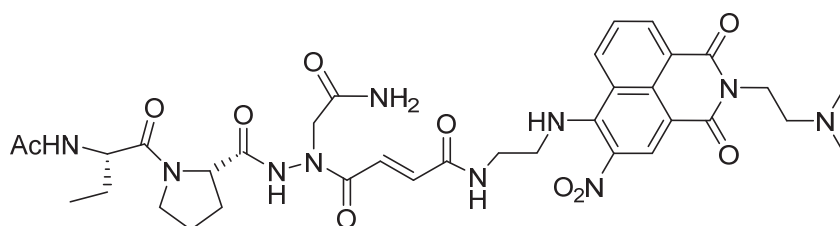


Figure 25. AEP Probe 3 (AEP-P3)

(E)-4-(2-(((S)-2-acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-(2-amino-2-oxoethyl)hydrazinyl)-N-(2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)-4-oxobut-2-enamide. AEP Probe 1 과 동일하게 합성한다. Product 2 대신 product 3 와 반응시킨다. 수득률: 4%

AEP Probe 4

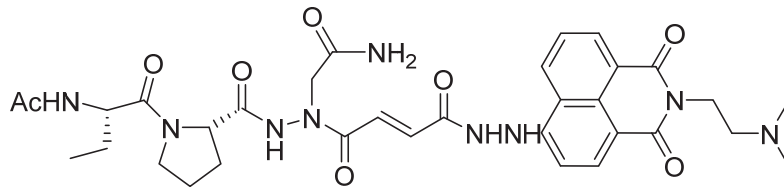


Figure 26. AEP Probe 4 (AEP-P4)

2-(2-(((S)-2-acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-((E)-4-(2-(2-(2-(dimethylamino) ethyl)-1, 3-dioxo-2, 3-dihydro-1H-benzo [de]isoquinolin-6-yl)hydrazinyl)-4-oxobut-2-enoyl) hydrazinyl) acetamide. AEP Probe 1 과 동일하게 합성한다. Product 2 대신 product 1 과 반응시킨다. 수득률: 3%

AEP inhibitor

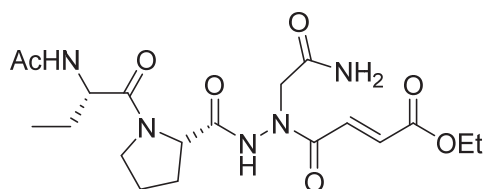


Figure 27. AEP inhibitor

ethyl(E)-4-(2-(((S)-2-acetamidobutanoyl)-L-prolyl)-1-(2-amino-2-oxoethyl) hydrazinyl)-4-oxobut-2-enoate. AEP Probe 1 과 Alloc 제거까지 동일하게 합성한다. 그리고 Monoethyl

fumarate(43.239 mg, 0.3 mmol, 3 eq)과 HATU(114.06 mg, 0.3 mmol)를 DMF 에 용해하여 레진에 넣어준 뒤 DIEA(104.51 μ L, 0.6 mmol, 6 eq)를 넣고 over night 반응 한다. 95% TFA cocktail 로 full cleavage 한 뒤 HPLC 로 Prep 하여 정제한다.

Product 1

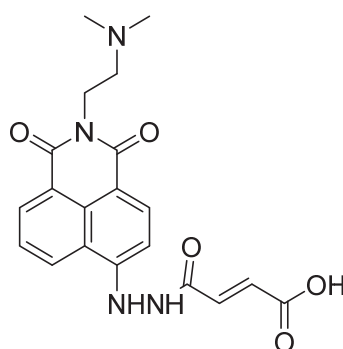


Figure 28. Product 1

(*E*)-4-(2-(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)hydrazinyl)-4-oxobut-2-enoic acid. 둥근 바닥 플라스크(RBF)에 Product 6(20 mg, 0.04715 mmol, 1 eq), THF(1 mL)를 첨가하여 ice bath 에서 교반한다. LiOH(3.353 mg, 0.14 mmol, 3 eq)을 DW 에 용해하여 RBF 에 dropwise 로 천천히 넣는다. RT 에서 over night 반응 한 뒤 1M HCl 10 방울을 첨가한다. 반응 후 HPLC 로 Prep 하여 정제한다. Yield: 52% ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.82 - 9.77 (m, 1H), 8.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 8.48 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 8.31 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.20

(s, 1H), 7.79 – 7.75 (m, 1H), 6.92 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.89 (s, 1H),
6.68 (d, $J = 15.6$ Hz, 1H), 4.15 – 4.12 (m, 1H), 3.33 (s, 10H), 2.21
(s, 2H), 1.24 (s, 4H).

Product 2

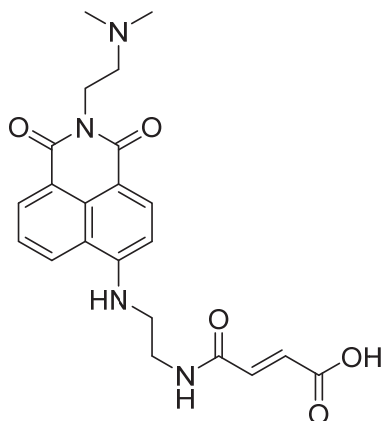


Figure 29. Product 2

(*E*)-4-((2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid. RBF에 Product 10(20 mg, 0.044 mmol, 1 eq), THF(1 mL)를 첨가하여 ice bath에서 교반한다. LiOH(3.16 mg, 0.134 mmol, 3 eq)을 DW에 용해하여 RBF에 dropwise로 천천히 넣는다. RT에서 over night 반응 한 뒤 1M HCl 10방울을 첨가한다. 반응 후 HPLC로 Prep하여 정제한다. Yield: 68% ¹H NMR (500 MHz, dmsO) δ : 8.60 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 8.41 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 8.23 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.85 (t, J = 5.3 Hz, 1H), 7.69 – 7.64 (m, 1H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 6.66 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 6.38 (d, J = 15.5 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 3.49 (dd, J = 17.8, 8.0 Hz, 4H), 2.55 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.24 (s, 6H).

Product 3

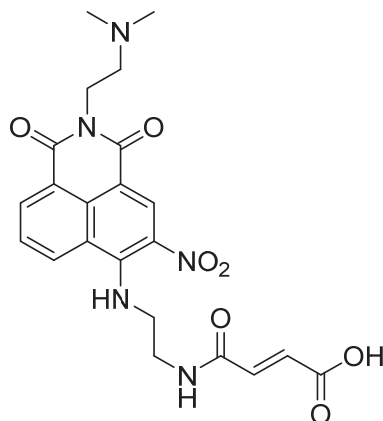


Figure 30. Product 3

(*E*)-4-((2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobut-2-enoic acid. RBF에 Product 11(50 mg, 0.1 mmol, 1 eq), THF(1 mL)를 첨가하여 ice bath에서 교반한다. LiOH(7.23 mg, 0.3 mmol, 3 eq)을 DW에 용해하여 RBF에 dropwise로 천천히 넣는다. RT에서 over night 반응 한 뒤 1M HCl 50방울을 첨가한다. 반응 후 HPLC로 Prep하여 정제한다. Yield: 48% ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.99 (s, 1H), 8.77 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 8.43 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.95 – 7.91 (m, 1H), 7.71 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.69 (d, *J* = 15.7 Hz, 1H), 5.50 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 4.23 – 4.20 (m, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.29 – 3.27 (m, 2H), 3.07 (s, 2H), 2.55 (s, 6H).

Product 4

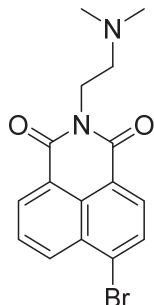


Figure 31. Product 4

6-bromo-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1H-benzo[de] isoquinoline-1,3(2H)-dione. 4-Bromo-1,8-naphthalic anhydride (3 g, 10.83 mmol, 1 eq)에 N,N-Dimethylethylenediamine (1.42 ml, 13.00 mmol, 1.2 eq)를 1,4-dioxane 100mL 에서 140°C 가열 환류하여 4 시간 반응한다 (*Org. Biomol. Chem.* 2013, 11, 378-382). 반응 후 ice bath 에서 냉각하여 결정이 생기면 감압 여과하여 염을 얻는다. 수득률: 95%. Cream-colored solid. ESI-MS: m/z calcd for $C_{16}H_{15}BrN_2O_2 + H^+ [(M+H^+)]: 347.0$. Anal. Calcd for $C_{16}H_{15}BrN_2O_2$ (346.03). 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 8.60 – 8.55 (m, 2H), 8.35 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.23 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.00 (dt, $J = 33.2, 16.6$ Hz, 1H), 4.15 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 2.55 – 2.35 (m, 2H), 2.20 (s, 6H).

Product 5

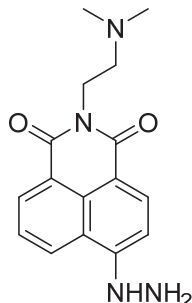


Figure 32. Product 5

2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-hydrazinyl-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. Product 4(3g, 8.67mmol, 1eq)에 hydrazine(25ml, 과량)을 첨가하여 130℃ 가열 환류하여 2 시간 반응한다 (*J. Org. Chem.* 2005. 70. 10875-10878). 반응 후 ice bath 에서 냉각하여 결정이 생기면 감압 여과하여 염을 얻는다. 수득률: 87%. Orange solid. ESI-MS: m/z calcd $C_{16}H_{18}N_4O_2+H^+[(M+H^+)]:299.1$. Anal. Calcd for $C_{16}H_{18}N_4O_2(298.14)$. 1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ : 9.14 (s, 1H), 8.61 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.41 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 8.28 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 7.65 – 7.59 (m, 1H), 7.24 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.14 – 4.10 (m, 2H), 2.49 – 2.45 (m, 2H), 2.20 (s, 6H).

Product 6

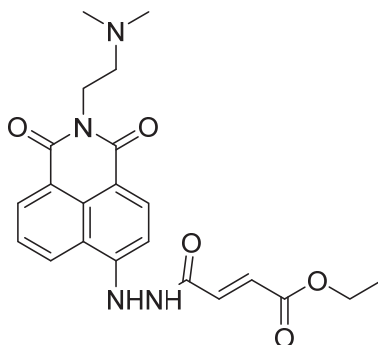


Figure 33. Product 6

ethyl(*E*)-4-(2-(2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)hydrazinyl)-4-oxobut-2-enoate. 첫 번째 25 mL RBF 에 Ethyl hydrogen fumarate(48.28 mg, 0.335 mmol, 1 eq), EDC · HCl(77.06 mg, 0.402 mmol, 1.2 eq), 그리고 HOBt(54.31 mg, 0.402 mmol, 1.2 eq)를 DMF 에 녹여서 1 시간 동안 반응한다. 두 번째 RBF 에 Product 5 를 용매 DMF 에 녹여서 0°C로 준비한다. 첫 번째 RBF 에서 반응 한 물질을 두 번째 RBF 에 dropwise 로 천천히 넣는다. RT 에서 2 시간 반응 후 column 하여 분리한다. 수득물: 34%, ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 9.63(s, 1H), 9.07(s, 3H), 7.93(dd, *J*= 18.4, 7.3 Hz, 4H), 7.66 (d, *J*= 8.1 Hz, 1H), 7.32 – 7.20 (m, 6H), 7.04 (dd, *J*= 15.5, 9.8 Hz, 3H), 6.56 (d, *J*= 8.2 Hz, 2H), 4.37 – 4.25 (m, 8H), 4.17 (dd, *J*= 14.1, 7.0 Hz, 2H), 2.91 (s, 4H),

2.53 (s, 11H), 1.38 (t, $J = 7.1$ Hz, 5H), 1.30 – 1.20 (m, 7H), 0.87 (dd, $J = 159.9, 9.0$ Hz, 3H).

Product 7

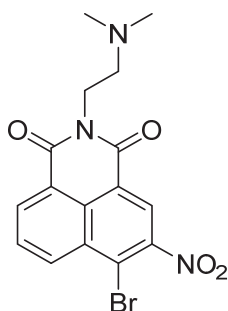


Figure 34. Product 7

6-bromo-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-nitro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. Product 4 (1 g, 2.89 mmol, 1 eq) 에 H_2SO_4 10 mL, NaNO_3 (0.24 g, 2.85 mmol, 1 eq) 을 넣고 ice bath 에서 30 분, 실온에서 3 시간 교반한다. 반응 후 차가운 DW 100 mL 에 천천히 붓는다. Sodium carbonate 를 중화시킨 후 filtration 한다. 수득률: 74%. Brown solid. ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.81 (s, 1H), 8.76 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H), 8.70 (d, $J = 7.3$ Hz, 1H), 8.16 – 8.12 (m, 1H), 4.15 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 2.55 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.23 (s, 6H).

Product 8

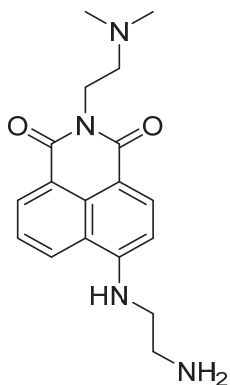


Figure 35. Product 8

6-((2-aminoethyl)amino)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. Product 4(346.03 mg, 1 mmol, 1 eq)와 Ethylenediamine(133.56 μ L, 2 mmol, 2 eq)을 methoxyl ethanol(8 mL)에 녹여서 130 $^{\circ}$ C 가열 환류하여 over night 반응한다 (*scientific reports/5:8488/DOI: 10.1038/srep08488*). 반응 후 column 하여 분리한다. 수득률: 86%

Product 9

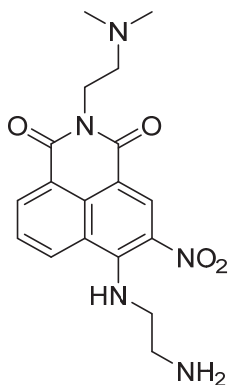


Figure 36. Product 9

6-((2-aminoethyl)amino)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-nitro-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione. Product 7(392.21 mg, 1 mmol, 1 eq)와 Ethylenediamine(133.56 μ L, 2 mmol, 2 eq)을 methoxyl ethanol(3 mL)에 녹여서 130 $^{\circ}$ C 가열 환류하여 1 시간 반응한다 (*scientificreports/5:8488/DOI: 10.1038/srep08488*). 반응 후 ice bath 에서 냉각하여 결정이 생기면 감압 여과하여 염을 얻는다. 수득률: 58%

Product 10

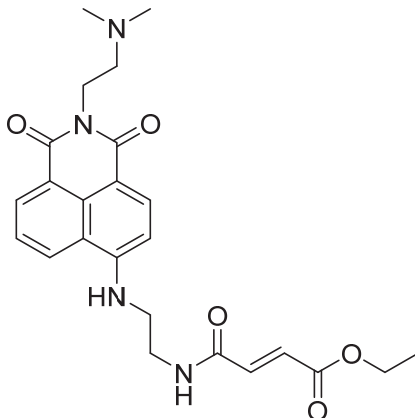


Figure 37. Product 10

ethyl(*E*)-4-((2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobut-2-enoate. 첫 번째 RBP 에 Ethyl hydrogen fumarate(72.06 mg, 0.5 mmol, 1 eq), EDC · HCl(115.02 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq), 그리고 HOBt(81.06 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq)를 DMF 에 녹여서 RT 에서 1 시간 동안 반응한다. 두 번째 RBF 에 Product 8(72.06 mg, 0.5 mmol, 1 eq) 용매 DMF 에 녹여서 0°C로 준비한다. 첫 번째 RBF 에서 반응 한 물질을 두 번째 RBF 에 dropwise 로 천천히 넣는다. RT 에서 1 시간 반응 후 column 하여 분리한다. 수득률: 47%,

Product 11

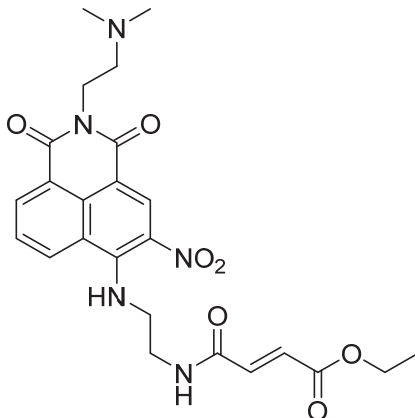


Figure 38. Product 11

ethyl(*E*)-4-((2-((2-(2-(dimethylamino)ethyl)-5-nitro-1,3-dioxo-2,3-dihydro-1H-benzo[de]isoquinolin-6-yl)amino)ethyl)amino)-4-oxobut-2-enoate. 첫 번째 RBP 에 Ethyl hydrogen fumarate(72.06 mg, 0.5 mmol, 1 eq), EDC · HCl(115.02 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq), 그리고 HOBt(81.06 mg, 0.6 mmol, 1.2 eq)를 DMF 에 녹여서 RT 에서 1 시간 동안 반응한다. 두 번째 RBF 에 Product 9(185.7 mg, 0.5 mmol, 1 eq) 용매 DMF 에 녹여서 0℃로 준비한다. 첫 번째 RBF 에서 반응 한 물질을 두 번째 RBF 에 dropwise 로 천천히 넣는다. RT 에서 over night 반응 후 column 하여 분리한다. 수득률: 55%,

1.8-Naphthalimide-based fluorescent sensor

sensor 1

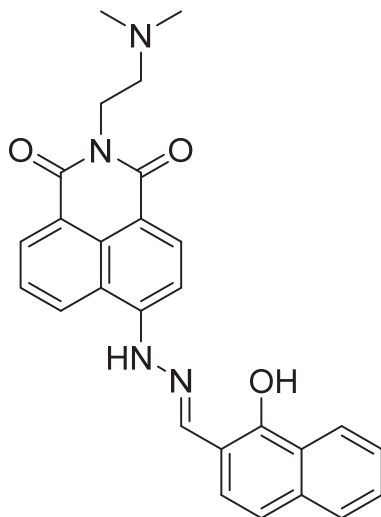


Figure 39. Sensor 1

(E)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-(2-((1-hydroxynaphthalen-2-yl)methylene)hydrazinyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione product 5 (120 mg, 0.4 mmol, 1 eq)에 1-hydroxy-2-naphth-aldehyde(82.65 mg, 0.48 mmol, 1.2 eq)와 ethanol 15 mL 을 첨가한뒤 80℃에서 5 hr 가열환류한 뒤 column 하여 분리한다.

sensor 2

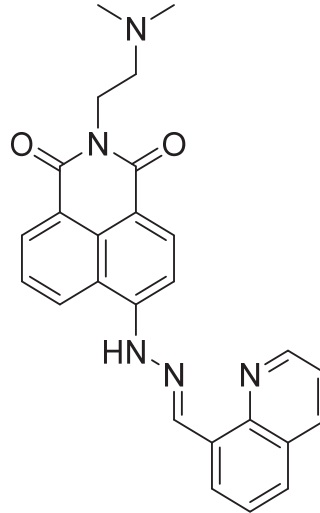


Figure 40. Sensor 2

(E)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-(2-(quinolin-8-ylmethylene)hydrazinyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione product 5 (298.35 mg, 1 mmol, 1 eq)에 quinoline-8-carboxaldehyde(157.17 mg, 1 mmol, 1 eq)과 ethanol 30 mL 을 첨가하여 90℃에서 3 hr 가열환류한 뒤 column 하여 분리한다.

sensor 3

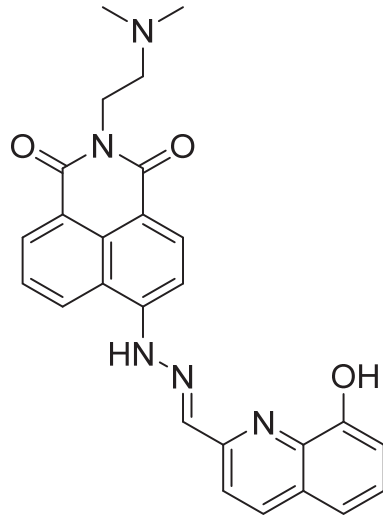


Figure 41. Sensor 3

(E)-2-(2-(dimethylamino)ethyl)-6-(2-((8-hydroxyquinolin-2-yl)methylene)hydrazinyl)-1H-benzo[de]isoquinoline-1,3(2H)-dione product 5 (100 mg, 0.335 mmol, 1 eq)에 8-hydroxy-2-quinoline-carboxaldehyde (59.2 mg, 0.335 mmol, 1 eq)와 ethanol 10 mL 을 첨가하고 90°C 에서 4 hr 가열환류한 뒤 column 하여 분리한다.

2.2. Cell imaging

세포의 종류는 RAW 264.7 과 NIH 3T3 cell 을 KCLB 에서 구입하여 사용하였고, 8 well chambered coverglass 에 각 well 당 20,000 수의 세포를 하루 전 플레이팅 한 뒤 실험을 진행하였다. 처음 배지를 제거한 뒤 새 배지 200 μ L 씩 채워준다. RAW 264.7 cell 의 경우 AEP-P1, AEP-P2, Control-T 를 각 well 에 5 μ M(5 mM, 0.2 μ L) 50 분 처리 한 뒤 lysotracker 1 μ M(1 mM, 0.2 μ L) 5 분 처리 후 PBS 로 세척하고 촬영하였다. NIH 3T3 cell 의 경우 inhibitor 50 μ M(50 mM, 0.2 μ L) 처리한 뒤 한 시간 반 동안 배양기에 보관한다. AEP-P1, AEP-P2, Control-T 를 각 well 에 5 μ M(5 mM, 0.2 μ L) 처리한 뒤 lysotracker 100 nM(100 μ M, 0.2 μ L) 처리 후 PBS 로 세척하고 촬영한다. AEP-P1 을 촬영할 때는 프로브 처리 10 분 전에 NEM 50 μ M(50 mM, 0.2 μ L)을 처리한 뒤 프로브를 동일하게 진행하였다.

2.3. Cell labeling

세포의 종류는 RAW 264.7 을 사용하였고, 24 well plate 에 각 well 당 400,000 수의 세포를 하루 전 플레이팅 한 뒤 실험을 진행하였다. 처음 배지를 제거 한 뒤 새 배지를 300 μ L 씩 채워준다. 프로브의 농도에 따라 0.3 μ L 씩 (1 mM, 2.5 mM, 5 mM)을 처리하고 배양기에서 1 시간 보관한다. 1 시간 후 배지를 제거한 뒤 PBS 를 사용하여 세척한다. sample buffer 를 각 well 에 50 μ L 씩 넣어준 후 파이펫을 이용하여 sample

buffer 가 세포에 잉키도록 하여 마이크로 튜브에 모아준다. 각각의 튜브를 98°C에서 3 분마다 섞어주면서 10 분간 가열한다. gel 을 준비한 뒤 각 홈에 20 μ L 씩 로딩하여 전기영동 한다.

2.4. UV-vis and fluorescence measurements with metal ions and anions

sensor 의 stock solution 은 10 mM 을 만들어 사용하였다. sensor 1.5 mg 은 DMSO 1.10 mL, sensor 2.5 mg DMSO 1.14 mL, sensor 3 2.4 mg 529.60 μ L 를 사용하였다. 2 μ L 10 mM sensor solution 을 4 mL MeCN, 9:1 MeCN 용액, 그리고 10 mM HEPES buffer (pH7.4) 각 용매에 5 μ M 농도로 희석하여 실험하였다. $MCl_2 \cdot xH_2O$ (M=Mn²⁺, Co²⁺, Ni²⁺ 1 mmol), MCl_2 (M=Pb²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺ 1 mmol), MSO_4 (M=Fe²⁺, Cu²⁺ 1 mmol), AgNO₃ (1 mmol), CrCl₃ (1 mmol), Zn(NO₃)₂ (1 mmol), TBAM (M=CN⁻, F⁻, Cl⁻, B⁻, I⁻, NO₃⁻, HSO₄⁻ 1 mmol), NaOH(1 mmol), NaOAc(1 mmol), and Fe₂(SO₄)₃(1 mmol) 각각 10 mM 수용액을 만들었다. 각 수용액을 0.2 μ L 씩 200 μ L 의 sensor 가 희석되어있는 용매에 처리하여 흡광과 형광을 micro plate reader 기를 사용하여 RT 에서 측정하였다. 또한 Job's plot 과 detection limits 측정하였다(15).

2.5. ^1H NMR of sensor with F^- , CN^- , and Hg^{2+} .

마이크로 튜브에 sensor 와 TBAF, TBACN, 또는 HgCl_2 0.1 mmol 을 DMSO- d_6 600 μL 에 용해하여 NMR 튜브에 옮겨 ^1H NMR 을 측정한다.

참고문헌

- (1) Lavis, L.; Raines, R. (2014) Bright Building blocks for Chemical Biology, *ACS Chem. Biol.*, **9**, 855-866
- (2) Beer, P.; Gale, P. (2001) Anion Recognition and Sensing: The State of the Art and Future Perspectives, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 486-516
- (3) Ghosh, A.; Mukherjee, K.; Ghosh, S.; Saha, B. (2013) Sources and toxicity of fluoride in environment, *Res. Chem. Intermed.*, **39**, 2881-2915
- (4) Kuling, K.; Ballantyne, B. (1991) Cyanide toxicity, US Department of Health & Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- (5) Chang, C. (2015) Searching for harmony in transition-metal signaling, *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 744-747
- (6) Jomova, K.; Valko, M. (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease, *Toxicology*, **283**, 65-87
- (7) Park, Y.; Apodaca, D.; Pullen, J.; Adivincula, R. (2010) Highly Sensitive and Selective “Turn-on” Calcium Cation Sensing from a Dendritic Terthiophene Tetraethylene Glycol (TEG) Molecule, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 13084-13094

- (8) Carter, K.; Young, A.; Palmer, A. (2014) Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems, *Chem. Rev.*, **114**, 4564-4601
- (9) Dasuri, K.; Zhang, L.; Keller, J. (2013) Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis, *Free Rad. Biol. Med.*, **62**, 170-185
- (10) Biju, V. (2014) Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 744-764
- (11) Hirano, T.; Kikuchi, K.; Urano, Y.; Nagano, T. (2002) Improvement and Biological Applications of Fluorescent Probes for Zinc, AnAFs, *J. AM. Chem. Soc.*, **214**, 6555-6562
- (12) Wang, J.; Xiao, Y.; Zhang, Z.; Qian, X.; Yang, Y.; Xu, Q. (2005) A pH-resistant Zn(II) sensor derived from 4-aminonaphthalimide: design, synthesis and intracellular applications, *J. Mater. Chem.*, **15**, 2836-2839
- (13) Wu, Y.; Peng, X.; Guo, B.; Fan, J.; Zhang, Z.; Wang, J.; Cui, A.; Gao, Y. (2005) Boron dipyrromethene fluorophore based fluorescence sensor for the selective imaging of Zn(II) in living cells, *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 1387-1392

- (14) Qian, Y.; Zhang, L.; Ding, S.; Deng, X.; He, C.; Zhu, H.; Zhao, J. (2012) A Fluorescent Probe for Rapid Detection of Hydrogen Sulfide in Blood Plasma and Brain Tissues in Mice, *Chem. Sci.*, **3**, 2920-2923
- (15) Saha, T.; Sengupta, A.; Hazra, P.; Talukdar, P. (2014) *In vitro* sensing of Cu⁺ through a green fluorescence rise of pyranine, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **13**, 1427-1433
- (16) Lim, C.; Han, J.; Kim, C.; Kang, M.; Kang, D.; Cho, B. (2011) A copper(I)-ion selective two-photon fluorescent probe for *in vivo* imaging, *Chem. Commun.*, **47**, 7146-7148
- (17) Cao, X.; Lin, W.; Wan, W. (2012) Development of a near-infrared fluorescent probe for imaging of endogenous Cu⁺ in live cell, *Chem. Commun.*, **48**, 6247-6249
- (18) Yang, H.; Song, H.; Zhu, Y.; Yang, S. (2012) Single chemosensor for multiple analytes: chromogenic and fluorogenic detection for fluoride anions and copper ions, *Tetrahedron Lett.*, **53**, 2026-2029
- (19) Zhou, Y.; Chu, K.; Zhen, H.; Fang, Y.; Yao, C. (2013) Visualizing Hg²⁺ ions in living cells using a FRET-based Fluorescent Sensor, *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, **106**, 197-202

- (20) Liu, Z.; Zhang, C.; He, W.; Yang, Z.; Gao, X.; Guo, Z. (2010) A highly sensitive ratiometric fluorescent probe for Cd²⁺ detection in aqueous solution and living cells, *Chem. Commun.*, **46**, 6138-6140
- (21) Beltran, O.; Mena, N.; Yanez, O.; Caballero, J.; Vargas, V.; Nunez, M.; Cassels, B. (2013) Design, synthesis and cellular dynamics studies in membranes of a new coumarin-based “turn-off” fluorescent probe selective for Fe²⁺, *Eur. J. Med. Chem.*, **67**, 60-63
- (22) Jung, H.; Singh, N.; Lee, D.; Jang, D. (2010) Single sensor for multiple analytes: chromogenic detection of I⁻ and fluorescent detection of Fe³⁺, *Tetrahedron Lett.*, **51**, 3962-3965
- (23) Cunlough, T.; Kruger, P.; Jensen, P.; Tierney, J.; Ali, H.; Hussey, G. (2005) Colorimetric “Naked Eye” Sensing of Anions in Aqueous Solution, *J. Org. Chem.*, **70**, 10875-10878
- (24) Sun, Z.; Liu, F.; Chen, Y.; Tam, P.; Yang, D. (2008) A Highly Specific BODIPY-Based Fluorescent Probe for the Detection of Hypochlorous Acid, *Org. Lett.*, **10**, 2171-2174
- (25) Lee, J.; Kang, N.; Kim, Y.; Samanta, A.; Feng, S.; Kim, H.; Vendrell, M.; Park, J.; Chang, Y. (2009) Synthesis of a BODIPY Library and Its Application to the Development of Live Cell

- Glucagon Imaging Probe, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 10077-10082
- (26) Qu, X.; Liu, Q.; Ji, X.; Chem, H.; Zhou, Z.; Shen. (2012) Enhancing the Stokes' shift of BODIPY dyes via through-bond energy transfer and its application for Fe³⁺-detection in live cell imaging, *Chem. Commun.*, **48**, 4600-4602
- (27) Loudet, A.; Brgess, K. (2007) BODIPY Dyes and Their Derivatives: Syntheses and Spectroscopic Properties, *Chem. Rev.*, **107**(11), 4891-4932
- (28) Frangioni, J. (2003) *In Vivo* near-infrared fluorescence imaging, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **7**(5), 626-634
- (29) Falgoutret, J.; Black, C.; Cromlish, W.; Desmarais, S.; lamontagne, S.; Mellon, C.; Riendeau, D.; Rodan, S.; Tawa, P.; Wesolowski, G.; Bass, K.; Venkatraman, S.; Percival, D. (2004) An activity -based probe for the determination of cysteine cathepsin protease activities in whole cells, *Anal. Biochem.*, **335**, 218-227
- (30) Yee, M.; Fas, S.; Stohlmeyer, M.; Wandless, T.; Cimprich, K. (2005) A Cell-permeable, Activity-based Probe for Protein and Lipid Kinases, *J. Biol. Chem.*, **280**(32), 29053-29059
- (31) Marshall, M.; Rasmussen, J.; Tan, I.; Aldrich, M.; Adams, K.; Wang, X.; Fife, C.; Maus, E.; Smith, L.; Sevcik-Muraca, E.

- (2010) Near-Infrared Fluorescence Imaging in Humans with Indocyanine Green: A Review and Update, *Open Surg Oncol J.*, **2**(2), 12-25
- (32) Greenbaum, D.; Medzihradszky, K.; Burlingame, A.; Bogyo, M. (2000) Epoxide electrophiles as activity-dependent cysteine protease profiling and discovery tools, *Chemistry & Biology*, **7**(8), 569-581
- (33) Lee, J.; Bogyo, M. (2010) Development of Near-Infrared Fluorophore(NIRF)-Labeled Activity-Based Probes for *in Vivo* Imaging of Legumain, *ACS Chem. Biol.*, **5**(2), 233-243
- (34) La, Y.; Hong, J.; Jeong, Y.; Lee, J. (2016) A 1,8-naphthalimide-based chemosensor for dual-mode sensing: colorimetric and fluorometric detection of multiple analytes, *RSC Adv.*, **6**, 84098-84105
- (35) Chen, J.; Dando, P.; Rawlings, N.; Brown, M.; Young, N.; Stevens, R.; Hewitt, E.; Watts, C.; Barrett, A. (1997) Cloning, Isolation, and Characterization of Mammalian Legumain, an Asparaginyl endopeptidase, *J. Biol. Chem.*, **272**(12), 8090-8098
- (36) Abe, Y.; Shirane, K.; Yokosawa, H.; Matsushita, H.; Mitta, M.; Kato, I.; Ishii, S. (1993) Asparaginyl Endopeptidase of Jack Bean Seeds, *J. Biol. Chem.*, **268**(5), 3525-3529

- (37) Shirahama-Noda, K.; Yamamoto, A.; Sugihara, K.; Hashimoto, N.; Asano, M.; Nishimura, M.; Hara-Nishimura, I. (2003) Biosynthetic Processing of Cathepsins and Lysosomal Degradation Are Abolished in Asparaginyl Endopeptidase-deficient Mice, *J. Biol. Chem.*, **278**(35), 33194-33199
- (38) Sajid, M.; McKerrow, J.; Hansell, E.; Mathieu, M.; Lucas, K.; Hsieh, I.; Greenbaum, D.; Bogyo, M.; Salter, J.; Lim, K.; Franklin, C.; Kim, J.; Caffrey, C. (2003) Functional expression and characterization of *Schistosoma mansoni* cathepsin B and its *trans*-activation by an endogenous asparaginyl endopeptidase, *Mol. Biochem. Parasitol.*, **131**, 65-75
- (39) Liu, C.; Sun, C.; Huang, H.; Janda, K.; Edgington, T. (2003) Overexpression of Legumain in Tumors Is Significant for Invasion/Metastasis and a Candidate Enzymatic Target for Prodrug Therapy, *Cancer Res.*, **63**, 2957-2964
- (40) Choi, S.; Reddy S.; Devlin, R.; Mena, C.; Chung, H.; Boyce, B.; Roodman, D. (1999) Identification of Human Asparaginyl Endopeptidase (Legumain) as an Inhibitor of Osteoclast Formation and Bone Resorption, *J. Biol. Chem.*, **274**(39), 27747-27753
- (41) Manoury, B.; Hewitt, E.; Morrice, N.; Dando, P.; Barrett, A.; Watts, C. (1998) An asparaginyl endopeptidase processes a

microbial antigen for class II MHC presentation, *Nature*, **396**, 695-699

(42) Basurto-Islas, G.; Grundke-Iqbal, I.; Tung, Y.; Liu, F.; Iqbal, K. (2013), Activation of Asparaginyl Endopeptidase Leads to Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer Disease, *J. Biol. Chem.*, **288**(24), 17495-17507

(43) Zhang, Z.; Song, M.; Liu, X.; Kang, S.; Kwon, I.; Duong, D.; Seyfried, N.; Hu, W.; Liu, Z.; Wang, J.; Cheng, L.; Sun, Y.; Yu, S.; Levey, A.; Ye, K. (2014) Cleavage of tau by asparagines endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease, *Nat. Med.*, **20**(11), 1254-1262

(44) Zhang, X.; Yu, H.; Xiao, Y. (2012) Replacing Phenyl Ring with Thiophene: An Approach to Longer Wavelength Aza-dipyrromethene Boron Difluorid (Aza-BODIPY) Dyes, *J. Org. Chem.*, **77**(1), 669-673

(45) La, Y.; Choi, N.; Chung, S.; Lee, J. (2015) Thiophene-substituted Aza-BODIPYs as Near-Infrared Fluorophores, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **36**(7), 1747-1747

(46) Gresser, R.; Hartmann, H.; Wrackmeyer, M.; Leo, K.; Riede, M. (2011) Synthesis of thiophene-substituted aza-BODIPYs and

their optical and electrochemical properties, *Tetrahedron*, **67**(37), 7148-7155

(47) Bellier, Q.; Dalier, F.; Jeanneau, E.; Maury, O.; Andraud, C. (2012) Thiophene-substituted aza-bodipy as a strategic synthon for the design of near-infrared dyes, *New J. Chem.*, **36**(3), 768-773

Abstract

Development of chemical probes for the detection of ion levels and enzyme activity in biological systems

Yeo-Kyung La

Department of Next-generation applied Science

Graduate School of

Sungshin University

Small molecule chemical probes that can detect various bioactive molecules, such as ions, enzymes and cofactors are of great interest to many scientists in the field of chemistry and biology, since these probes can serve as a valuable tool to study various biochemical processes in living organisms and environment. In this study, we aim to design and synthesize such chemical probes to study ion levels and enzyme activity. First, we

developed several thiophene-substituted aza-BODIPYs, and evaluated their optical properties. All synthesized aza-BODIPYs showed a significant bathochromic shift (20–30 nm) compared to previously developed NIR fluorophores. Second, we developed activity-based probes that can show enhanced fluorescent signals upon reacting with a specific enzyme. These probes selectively labeled asparaginyl endopeptidase in cell extracts and intact live cells compared to a previously developed control probe, but also demonstrated specific signal enhancement in live cell imaging experiments. Third, we developed 1,8-naphthalimide chemosensors for dual-sensing of multiple analytes. These sensors contain a hydrazone linker with a bicyclic receptor group that can show chromogenic signals toward anions and fluorogenic signals toward metal ions. We believe that these sensors respond to anions and cations by two distinct mechanisms, thus enabling dual-mode detection of multiple analyte.

