

BSPE99612-11886-4

해양환경, 바이오분자 탐색용 형광화학센서
개발

Development of Fluorescent Chemical Sensors for
Analysis of Marine Environment and Biomolecules

2019. 02.

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “해양환경, 바이오분자 탐색용 형광화학센서 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019년 02월 28일

연 구 책 임 자: 이 종석

참 여 연 구 원: 이 희승, 이연주,
이지훈, 허수진,
최기영, 성단비,
문보현, 박승일,
김혜경, 정준모,
김준성, 김은아.

보고서 초록

과제고유 번호	PE99612	해당단계 연구기간	2018/01/01 ~ 2018/12/31	단계 구분			
연구사업 명	중사업명						
	세부 사업명						
연구과제명	대과제명	주요사업 (고유임무형사업)					
	세부 과제명	해양환경 바이오분자 탐색용 형광화학센서 개발					
연구책임자	이 종 석	해당단계 참여연구원수	총 : 24명 내부: 06명 외부: 18명	해당단계 연구비	정부: 568,000천원 기업: 천원 계 : 568,000천원		
		총연구기간 참여연구원수	총 : 31명 내부: 07명 외부: 24명	총 연구비	정부: 1,283,000천원 기업: 천원 계 : 1,283,000천원		
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 해양생명공학연구센터		참여기업명				
국제공동연 구							
요약			보고서 면수				
■ 과제배경							
<ul style="list-style-type: none"> 본 과제는 독창적 화학골격을 갖는 저분자 유기형 광물질을 이용하여 해양환경오염 인자인 중금속 또는 특정 단백질에 대해 뛰어난 선택성을 갖는 다양한 형광화학센서 개발을 최종 목표로 2014년 기획연구 수행, 2016년 연구과제수행을 위한 한도외예산을 확보한 후 2017년 시작되었음. 여기서 독창적 화학골격을 갖는 저분자 유기형 광물질은 상품화에 성공한 'epicoconone'처럼 형광특성이 우수한 해양천연물을 기반으로 할 수 있으나 과제의 시작과 동시에 형광유도체 도출, 형광센서 제작, 검증을 수행해야하는 과제의 특성상 합성형 광물질 중심으로 과제를 수행하되 형광천연물의 탐색도 동시에 시도하였음. 							
■ 저분자 유기형 광물질 개발							
<ul style="list-style-type: none"> Thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one 화학골격의 신규 저분자 형광물질 도출 1) BOP[(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate]를 이용한 aza-[3+3] 고리접가반응법과 2) 유기 금(I) 촉매를 이용한 6-endo-dig 고리이성질체 반응법을 개발함. 특히 이를 반응법은 상호보완적이어서 BOP반응법을 통해 합성이 어려운 유도체는 금(I)촉매를 이용한 합성법으로 제조가 가능하고 반대로 금(I)촉매 합성법으로 제조가 불가한 유도체는 BOP반응법으로 획득이 가능함. 지난 2년간의 과제 수행을 통해 한국해양과학기술원 영문 이니셜을 고유이름으로 하는 신규 형광물질이 개발되어 KIOST-Fluor (KF)라는 이름으로 논문, 국내외특허 등에서 학계/산업계에 소개되었음. 							
■ 해양환경 분석용 형광화학센서 개발							
<ul style="list-style-type: none"> 해수에 존재하는 수은, 납 등 중금속 검출을 위한 형광화학센서 개발 분석물질의 특성에 맞는 선택적 인지단을 선정하고 형광단파 화학적 결합 							
■ 바이오분자 탐색용 형광 바이오센서 개발							
<ul style="list-style-type: none"> EMT암세포 표지단백질 vimentin과 F-actin 및 칼슘이온에 대해 각각 선택성을 갖는 형광 바이오센서 분자설계와 세부조정을 수행 							
색인어 (각 5개 이상)	한 글	유기형광물질, 형광화학센서, 단백질, 해양환경분석, 바이오분자					
	영 어	organic fluorescent material, fluorescent chemical sensor, protein, marine environment analysis, biomolecules					

요약문

I. 제목

해양환경, 바이오분자 탐색용 형광화학센서 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 최근 들어 다양한 분야로 응용범위가 확장되고 있는 형광물질을 이용한 형광탐침 연구개발은 자연현상에 대한 기초적 이해를 증진케 하여 생명공학, 환경공학산업을 위한 새로운 도구를 제시할 수 있음.
- 급격한 산업구조의 고도화와 사회구조의 변화에 따라 환경오염 요인에 대한 지속적인 모니터링 방법과 이를 통한 근원적 해결방법 개발이 사회적 요구로서 강하게 대두되고 있음.
- 의료기술의 발전으로 기대수명이 증가함에 따라 신의료 기술에 대한 사회적 수요가 폭발적 증가세를 보이고 있음. 이에 따라 차세대 의료기술 및 생의학 기초연구 소재로서 형광 바이오센서에 대한 관심이 높아지고 있음.
- 본 기관주요사업은 KIOST 중점연구분야별 전략 연구과제 중 하나인 ‘생체기능 제어용 스마트 신소재 발굴 및 응용기술 개발’에 기초한 융합기술개발과제로서 연구원의 미래 해양생물자원 개발 청사진 제시가 가능함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 저분자 유기형광물질 개발
 - 새로운 화학구조를 갖는 저분자 형광물질 도출
 - 유기금속촉매를 이용한 저분자 유기형광물질의 효율적 합성법 개발
 - 구조-물성 관계연구(structure-property relationship study)를 통해 개선된 광물리적 특성을 갖는 물질 도출
- 해양환경 분석용 형광화학센서 개발
 - 해수에 존재하는 수은, 납 등 중금속 검출을 위한 형광화학센서 개발
 - 분석물질의 특성에 맞는 선택적 인지단을 선정하고 형광단과 화학적 결합
 - 해수 샘플에 존재하는 목표 분석물질 검출 및 측정법 확립

- 바이오분자 탐색용 형광 바이오센서 개발
 - 생명현상을 문자단위로 시각화할 수 있는 형광 바이오센서 개발 (F-actin에 선택적으로 결합하는 phalloidin기반 형광프로브,
 - DNA, RNA, 단백질, 지질 등 생체내 특정 바이오물질에 대해 선택성을 갖는 형광 바이오센서 도출
 - 목표 바이오물질에 대한 첨단 검출기법과 영상 추적기술 개발

IV. 연구개발결과

- 화학구조적으로 신규이며 광물리적 물성이 뛰어난 방사파장 400 nm ~ 700 nm사이의 저분자형광물질을 도출하여 'KIOST-Fluor'라고 명명하여 논문게재, 국내외특허 출원을 완료함.
- 납, 수은 등 금속이온과 vimentin, F-actin 등 단백질을 정성/정량분석할 수 있는 형광화학센서의 프로토타입을 도출하였으며 후속연구 진행 중

V. 연구개발결과의 활용계획

- 전 세계적으로 아직 태동기에 머물러 있는 형광물질의 해양과학과 해양생명공학에서의 응용연구에 과감히 진출하여 제반 연구기반 조성과 국내관련 연구의 활성화를 도모하고, 이를 통해 국제적으로 선도적 위치를 점함.
- 정부가 선정한 미래 신성장 동력 중 하나인 해양생명공학 신소재 개발은 높은 경제적 파급효과를 갖고 있으며, 관련 산업발전에 기여할 가능성 이 높음.

S U M M A R Y

I . Title

Development of Fluorescent Chemical Sensors for Analysis of Marine Environment and Biomolecules

II . Purpose and necessity of research

○ Purpose

- Study on the fluorescence probe using fluorescent materials has a wide range of applications. The aim of this project is to provide new tools for biotechnology and environmental engineering industries by promoting a basic understanding of natural events.

○ Necessity of research

- The rapid evolution of industrial and social structure strongly demands the development of fundamental solution to the environmental pollution factors through a new technology.
- As the life expectancy increases, so does the social demand for new medical technology explosively. As a result, interest in fluorescent biosensors as a basic research material for next-generation medical technology and biomedical research is growing.
- This project, one of the strategic research projects of KIOST, can provide convergence technology based on the development of smart new materials for the control of biofunction and its application technology.

III. Scope of the study

○ Development of fluorescent small molecule

- Derivation of novel fluorescent small molecule
- Development of efficient synthetic method for fluorescent small molecule

using a metal catalyst

- Derivation of fluorescent molecules with improved photophysical properties through structure–property relationship study
- Development of fluorescent chemical sensor for analysis of marine environment
 - Development of fluorescent chemical sensor for detection of heavy metals such as mercury and lead present in seawater
 - Selecting selective recognition units that match the properties of the analytes and identifying the fluorescent moieties and chemical bonds
 - Establishment of methods for detecting and measuring target analytes in seawater samples
- Development of fluorescent biosensor for biomolecules
 - Development of fluorescence biosensor capable of visualizing biological events at molecular level (phalloidin-based fluorescence probe which is selectively binding to F-actin)
 - Derivatization of fluorescent biosensors with selectivity for specific biomaterials such as DNA, RNA, protein, lipid
 - Development of advanced detection method and image tracking technology for target biomaterials

IV. Results

- A series of novel fluorescent molecules of a wavelength of 400 nm to 700 nm with excellent optical and physical properties, was derived and named as 'KIOST-Fluor'
- A prototype of a fluorescent chemical sensor capable of qualitative/quantitative analysis of metal ions such as lead, mercury, vimentin, and F-actin has been derived.

V. Future plan

- The application of fluorescent materials to ocean science and marine biotechnology is still in the early stage. Therefore, this project will promote the establishment of the research infrastructure and facilitate the fluorescence-based ocean research in korea.
- Development of new materials in marine biotechnology, one of the future growth engines selected by the government, has a high economic impact and is likely to contribute to the development of related industries.

KEYWORDS

유기형 광물질, 형광화학센서, 단백질, 해양환경분석, 바이오분자
organic fluorescent material, fluorescent chemical sensor, protein, marine environment analysis, biomolecules

목 차

표 목 차 XIII

그림 목 차 XIV

제 1 장 연구개발과제의 개요	1
제 1 절 연구의 목표	1
제 2 절 연구의 세부 목표 및 내용	1
제 3 절 연구개발의 개요	2
1. 연구개발 개요	2
2. 핵심기술	2
제 2 장 국내외 기술 개발 현황	3
제 1 절 국내외 기술동향 및 수준	3
제 2 절 국내외 지식재산권 분석	5
제 3 절 국내외 시장현황	8
제 3 장 연구 수행 내용 및 성과	9
제 1 절 유기형광물질 개발	9
1. BOP ((benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluoro-phosphate)를 이용한 thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one 합성	9
2. 금(I) 촉매 chloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]gold(I) (Ipr AuCl)를 이용한 thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one 합성	12
제 2 절 형광화학센서 개발	16
1. 수소이온농도(pH) 센서 개발	16
2. 납(Pb ²⁺) 센서 개발	17
3. 수은(Hg ²⁺) 센서 개발	19
4. Cationic polydiacetylene 기반의 수은센서 개발	19
5. Hydroxylamine 기능화 polydiacetylene 기반의 heptanal 비색센서 개발	21
6. Caged-biotin 형광 유도체와 avidin을 이용한 chemodosimeter 개발	24
제 3 절 형광바이오센서 개발	27
1. F-actin, vimentin 선택적 형광바이오센서 개발	27
2. Caged-artificial peroxidase를 이용한 chemodosimeter 개발	29
3. Thienopyridinone library 기반 human serum albumin 형광 센서 개발	32
4. Ca ²⁺ 이온센서 개발	36
제 4 절 실험방법 및 화합물 데이터	37
1. 기기 및 시약	37
2. 합성	38
3. 광물리적 특성 시료 측정 방법	64

4. Solvatochormic effect 실험방법	71
5. KF-9와 Fluorescein의 광안정성 비교 실험방법	73
6. KF-1 ~ KF-29의 NMR 스펙트럼 데이터	74
 제 4 장 목표 달성도	104
 제 5 장 연구개발성과의 활용계획	106
 제 6 장 연구개발과제의 대표적 연구 실적	107
 제 7 장 참고문헌	111

C O N T E N T S

Tables	XIII
Figures	XIV
Chapter 1. Overview of the Research	1
Sector 1. Objective of research	1
Sector 2. Scope of the study	1
Sector 3. Overview of the Research	2
1. Overview	2
2. Key technology	2
Chapter 2. Trends of Industry and Research	3
Sector 1. Trends of Technology	3
Sector 2. Analysis of Intellectual Properties	5
Sector 3. Status of Global Market	8
Chapter 3. Contents and the Results	9
Sector 1. Development of fluorescent organic molecules	9
1. Synthesis of thieno[3,2- <i>b</i>]pyridine-5(4 <i>H</i>)-one using BOP ((benzotriazol-1-yl) y)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluoro-phosphate)	9
2. chloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]gold(I) (Ipr AuCl) cataly zed synthesis of thieno[3,2- <i>b</i>]pyridine-5(4 <i>H</i>)-one	12
Sector 2. Development of fluorescent chemical sensor	16
1. pH sensor	16
2. Pb ²⁺ sensor	17
3. Hg ²⁺ sensor	19
4. Cationic polydiacetylene-based Hg ²⁺ sensor	19
5. Heptanal ratiometric sensor based on hydroxylamine-functionalized polydiacetyl ene	21
6. Chemodosimeter using caged-biotin fluorescent analog and avidin	24
Sector 3. Development of fluorescent biosensor	27
1. F-actin, vimentin specific fluorescent biosensor	27
2. Chemodosimeter using caged-artificial peroxidase	29
3. Fluorescent sensor for detection of human serum albumin from thienopyridinone library	32
4. Ca ²⁺ ion sensor	36

Sector 4. Experimental procedures and characterization	37
1. Apparatus and reagents	37
2. Synthetic procedures	38
3. Photophysical properties	64
4. Solvatochormic effects	71
5. Photostability of KF-9 and fluorescein	73
6. NMR spectra of KF-1 ~ KF-29	74
 Chapter 4. Research Activities	104
 Chapter 5. Future Plan	106
 Chapter 6. Representative Research Achievements	107
 Chapter 7. References	111

표 목 차

표1. KF의 광물리적 성질	10
표2. KF-2와 KF-22, KF-24에 대한 solvatochromic effect	71
표3. KF-28과 KF-29에 대한 pH 테스트	72

그 림 목 차

그림1. 연구개발 개요	2
그림2. 형광단 관련 특허를 중심으로 작성된 특허맵	7
그림3. 형광 화학센서 관련 특허를 중심으로 작성된 특허맵	8
그림4. KF형광단의 합성전략	9
그림5. KF형광단의 합성	9
그림6. 합성된 KF 대표유도체들의 화학구조와 각 화합물들의 흡수파장, 형광파장, 양자수득율	10
그림7. 대표 KF유도체들의 다양한 형광파장	10
그림8. Normalized emission spectra of KF-22 (left) and KF-24 (right) in different solvents (10 μ M)	11
그림9. BOP 반응을 통해 얻어진 다양한 형광물질을 이용한 KIOST로고(좌), 전체 형광물질을 파장별로 나열해서 찍은 사진(우)	12
그림10. IprAuCl를 촉매로하는 2-pyridone 합성	12
그림11. IprAuCl를 이용한 KF 유도체의 합성	13
그림12. 금촉매를 이용한 고리이성질체화반응을 통해 합성된 KF유도체들의 광물리적 성질	
13	
그림13. 대표 형광물질	13
그림14. Thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one 형광단의 합성법	14
그림15. 용매화와 이에 따른 형광에너지 분산	15
그림16. 선별된 4종의 화합물 구조와 이들의 기초물성	15
그림17. 화합물4의 다양한 금속이온용액에 대한 형광안정성 테스트	16
그림18. 화합물4의 산화성 용액에서의 형광물성 변화	16
그림19. pH-Dependent fluorescence spectra of KF-28 (1 μ M, left) and KF-29 (10 μ M, right)	17
그림20. 납(Pb ²⁺) 센서의 설계와 합성	18
그림21. 2-(4-hydroxy-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-b]pyridin-5(4H)-one의 금속이온에 대한 선택성	18
그림22. 감도 개선을 위한 신규 납 (Pb ²⁺) 센서의 합성루트	19
그림23. 합성중인 수은 (Hg ²⁺) 센서	19
그림24. Cationic PDA의 counteranion exchange를 이용한 수은이온 검출 모식도	19
그림25. (a) Diacetylene 단량체 합성법, (b) Cationic PDA 합성 모식도	20
그림26. 다양한 농도의 수은에서 파장에 따른 PDA-1의 (a) 흡광도 및 (c) 형광세기의 변화; 수은의 농도에 따른 특정 파장에서 (b) 흡광도 및 (d) 형광세기의 변화	20
그림27. (a, b) 다양한 중금속에 의한 흡광도 변화: (c) 수은에 의한 PDA-1의 색 변화 ..	21
그림28. Hydroxylamine 으로 기능화 된 PDA 기반 heptanal 검출 모식도	22
그림29. Hydroxylamine 및 quaternary ammonium을 갖는 diacetylene monomer 합성법	
22	
그림30. (a) 다양한 농도의 heptanal에서 PDA의 흡광도 변화, (b) heptanal 농도에 따른	

543, 637 nm에서 흡광도 비의 변화 그래프	23
그림31. a) 다양한 carbon chain을 갖는 aldehyde에 대한 PDA liposome의 흡광도 변화; b) 색변화를 통한 선택적인 heptanal 검출	23
그림32. Caged-biotin 형광 유도체 기반 화학센서 모식도	24
그림33. 환경감응 형광단을 갖는 biotin-형광 유도체 합성법	25
그림34. Streptavidin 존재 유무에 따른 biotin-형광 유도체의 형광 스펙트럼 (a) DANSYL 유도체, (b) SBD 유도체	25
그림35. Silyl 유도체를 포함하는 caged-biotin 유도체의 합성법	26
그림36. ^1H NMR spectrum of 12 in CDCl_3	26
그림37. 천연물 phalloidin기반 F-actin 표지시약의 합성	27
그림38. Withaferin A기반 F-actin 형광표지시약 합성과 NMR데이터	28
그림39. Withaferin A-KF 결합체의 관찰결과 (연세대학교 제공)	29
그림40. Withaferin A와 KF의 가수분해를 통한 분해를 방지하기 위한 신규유도체 합성	29
그림41. Caged-artificial peroxidase 기반 chemodosimeter 개발 모식도	30
그림42. $\text{Pd}(0)$ 이온에 선택적으로 감응하는 인지단으로 protection된 caged-bpmp ligand 합성법	30
그림43. BPMP ligand의 금속 이온 결합 자리인 hydroxyl group protection에 따른 artificial peroxidase 활성 비교 a) H-bpmp ligand 사용, b) A-bpmp ligand 사용	31
그림44. $\text{Pd}(0)$ 이온에 의한 caged-bpmp ligand의 artificial peroxidase 활성 영향 비교	32
그림45. Blood protein 스크리닝에 이용한 14 개의 thienopyridinone derivative 구조	32
그림46. Blood protein에 대한 9b의 형광 변화 확인 결과	33
그림47. 9b 물질을 이용한 HSA/BSA 구분 확인 실험 a) pH 영향 확인, b) 유기용매 (DMSO) 비율 영향 확인	33
그림48. 9b 물질을 이용한 human serum albumin 정량 확인 및 검출 한계	34
그림49. 9b 물질의 HSA 선택성 확인 실험 결과	34
그림50. HSA에 대한 binding constant 확인 실험 결과	35
그림51. a) Job's plot 실험 결과 및 b) 9b 물질의 HSA binding site 확인 실험 결과	35
그림52. Artificial urine을 이용한 실제 시료 내 HSA 검출 가능성 확인 실험 결과	36
그림53. Calcium specific chelator인 BAPTA를 인지단으로 도입한 Ca^{2+} 이온센서의 설계 37	
그림54. KF-1 ~ KF-27의 광물리적 특성과 도표 데이터	64
그림55. KF-2에 대한 solvatochromic effect 그래프	72
그림56. KF-28과 KF-29에 대한 pH 테스트 및 형광사진	73
그림57. KF-9와 Fluorescein의 광안정성 비교	73
그림58. KF-1의 ^1H NMR 스펙트럼	74
그림59. KF-1의 ^{13}C NMR 스펙트럼	74
그림60. KF-2의 ^1H NMR 스펙트럼	75
그림61. KF-2의 ^{13}C NMR 스펙트럼	75
그림62. KF-3의 ^1H NMR 스펙트럼	76
그림63. KF-3의 ^{13}C NMR 스펙트럼	76

그림64. KF-4의 1H NMR 스펙트럼	77
그림65. KF-4의 13C NMR 스펙트럼	77
그림66. KF-5의 1H NMR 스펙트럼	78
그림67. KF-5의 13C NMR 스펙트럼	78
그림68. KF-6의 1H NMR 스펙트럼	79
그림69. KF-6의 13C NMR 스펙트럼	79
그림70. KF-7의 1H NMR 스펙트럼	80
그림71. KF-7의 13C NMR 스펙트럼	80
그림72. KF-8의 1H NMR 스펙트럼	81
그림73. KF-8의 13C NMR 스펙트럼	81
그림74. KF-9의 1H NMR 스펙트럼	82
그림75. KF-9의 13C NMR 스펙트럼	82
그림76. KF-10의 1H NMR 스펙트럼	83
그림77. KF-10의 13C NMR 스펙트럼	83
그림78. KF-11의 1H NMR 스펙트럼	84
그림79. KF-11의 13C NMR 스펙트럼	84
그림80. KF-12의 1H NMR 스펙트럼	85
그림81. KF-12의 13C NMR 스펙트럼	85
그림82. KF-13의 1H NMR 스펙트럼	86
그림83. KF-13의 13C NMR 스펙트럼	86
그림84. KF-14의 1H NMR 스펙트럼	87
그림85. KF-14의 13C NMR 스펙트럼	87
그림86. KF-15의 1H NMR 스펙트럼	88
그림87. KF-15의 13C NMR 스펙트럼	88
그림88. KF-16의 1H NMR 스펙트럼	89
그림89. KF-16의 13C NMR 스펙트럼	89
그림90. KF-17의 1H NMR 스펙트럼	90
그림91. KF-17의 13C NMR 스펙트럼	90
그림92. KF-18의 1H NMR 스펙트럼	91
그림93. KF-18의 13C NMR 스펙트럼	91
그림94. KF-19의 1H NMR 스펙트럼	92
그림95. KF-19의 13C NMR 스펙트럼	92
그림96. KF-20의 1H NMR 스펙트럼	93
그림97. KF-20의 13C NMR 스펙트럼	93
그림98. KF-21의 1H NMR 스펙트럼	94
그림99. KF-21의 13C NMR 스펙트럼	94
그림100. KF-22의 1H NMR 스펙트럼	95
그림101. KF-22의 13C NMR 스펙트럼	95
그림102. KF-23의 1H NMR 스펙트럼	96
그림103. KF-23의 13C NMR 스펙트럼	96
그림104. KF-24의 1H NMR 스펙트럼	97

그림105. KF-24의 ^{13}C NMR 스펙트럼	97
그림106. KF-25의 ^1H NMR 스펙트럼	98
그림107. KF-25의 ^{13}C NMR 스펙트럼	98
그림108. KF-26의 ^1H NMR 스펙트럼	99
그림109. KF-26의 ^{13}C NMR 스펙트럼	99
그림110. KF-26의 ^{19}F NMR 스펙트럼	100
그림111. KF-27의 ^1H NMR 스펙트럼	100
그림112. KF-27의 ^{13}C NMR 스펙트럼	101
그림113. KF-27의 ^{19}F NMR 스펙트럼	101
그림114. KF-28의 ^1H NMR 스펙트럼	102
그림115. KF-28의 ^{13}C NMR 스펙트럼	102
그림116. KF-29의 ^1H NMR 스펙트럼	103
그림117. KF-29의 ^{13}C NMR 스펙트럼	103

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구의 목표

- 독창적 화학골격을 갖는 저분자 유기형광물질 발굴과 개발
- 수은, 납, 칼슘 등 금속이온 또는 vimentin, F-actin 등 특정 단백질에 대해 뛰어난 선택성을 갖는 다양한 형광화학센서 도출

제 2 절 연구의 세부 목표 및 내용

세부목표	연구내용 및 방법
유기형광물질 개발	<ul style="list-style-type: none">• 형광물질 도출과 효율적 합성법 확립<ul style="list-style-type: none">- BOP ((benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluoro-phosphate)를 이용한 thienopyridinone 합성- 금(I) 촉매 chloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]gold(I) (Ipr AuCl) (67)을 이용한 thienopyridinone 합성• 구조-물성 상관관계연구를 통한 최적의 형광물질 도출
환경분석용 화학센서 개발	<ul style="list-style-type: none">• 분석대상 중금속이온에 대한 센서 설계 및 제작<ul style="list-style-type: none">- 해수에 존재하는 수은, 납 등 중금속 검출을 위한 형광화학센서 개발- 분석물질의 특성에 맞는 선택적 인지단을 선정하고 형광단과 화학적 결합- 해수 샘플에 존재하는 목표 분석물질 검출 및 측정법 확립• 분석대상 수은, 납 등 중금속이온에 대한 센서 제작 및 검증
형광바이오센서 개발	<ul style="list-style-type: none">• 형광물질에 비오틴을 결합, 응용• 형광바이오센서 응용, 검증<ul style="list-style-type: none">- 생명현상을 분자단위로 시각화할 수 있는 형광 바이오센서 개발- EMT암세포 표지단백질 vimentin과 F-actin 및 칼슘이온에 대해 각각 선택성을 갖는 형광 바이오센서 도출- 목표 바이오물질에 대한 첨단 검출기법과 영상 추적기술 개발

제 3 절 연구개발의 개요

1. 연구개발 개요

- 분석물질이 인지단에 선택적으로 결합함에 따라 변하는 형광세기/파장을 이용한 정량분석과 바이오분자의 시각화가 가능한 형광화학센서 개발

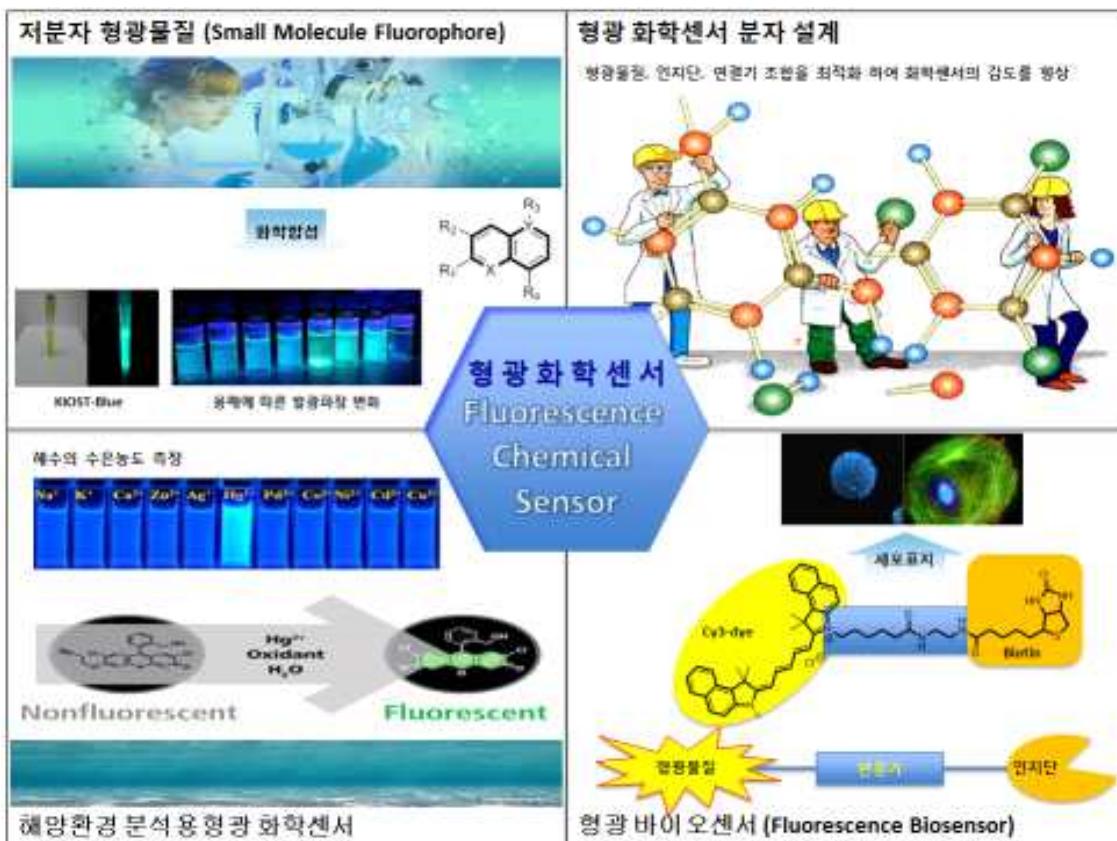


그림1. 연구개발 개요

2. 핵심기술

- 저분자형광물질: 방사파장 400 nm ~ 700 nm사이의 신규 저분자형광물질 제조를 위한 효율적 화학합성기술
- 선택적 인지단 (recognition unit): 목표 분석물질에 대한 선택성이 뛰어난 인지단의 합성설계와 제조법

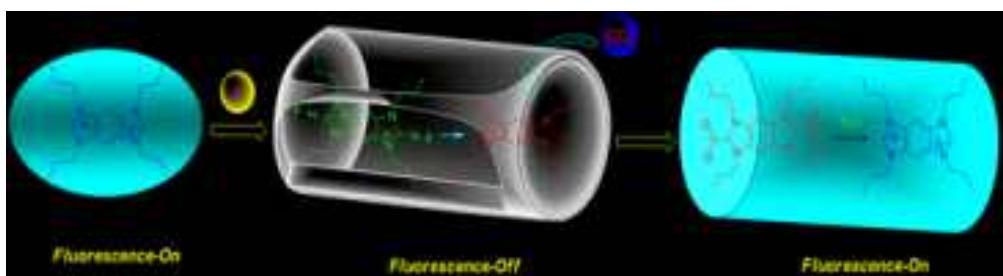
제 2 장 국내외 기술 개발 현황

제 1 절 국내외 기술동향 및 수준

- 형광소재를 나노메디신에서 검출(sensing)과 살아있는 세포의 단일 분자 연구 또는 응용하려는 시도가 활발히 진행되고 있으며, 다중광자 여기를 이용한 조직의 광학적흡수를 통해 내생적 형광단을 여기 시킬 수 있음. 국내의 형광 검출 연구는 상당한 수준에 와 있는데 앞으로는 근자외선과 가시광 형광에 대한 연구와, 공간정보를 줄 수 있는 형광공명에너지전이(FRET)의 연구 등 아직 미 개척분야에 대한 집중적인 개발연구를 추진하여 형광 검출기술을 선도해 나갈 것을 권고함.
- PubMed Central 및 Web of Science (Thomson Reuters)를 이용한 논문발표 동향 분석결과 2000년대 들어 형광화학탐침, 화학센서, 바이오센서에 대한 논문 수는 폭발적으로 증가하여 2014년에 17만 건을 넘어섬. 논문주제는 주로 신규 형광물질 합성과 개발, 세포염색, 특정 금속이온 또는 분자의 검출과 FRET, PCT, PET 등의 광물리학적 기초연구 및 응용이 주를 이룸. 특히 형광 분자센서의 경우 지난 10년간 발표 논문수가 약 2배 증가한 것으로 분석됐음. 반면 지난 10년간 해양과학분야에서 형광분자센서 관련 논문은 불과 218편으로 생명공학, 물질검출 등 분야와 비교하여 형광분자센서는 해양과학분야에서 아직 활발히 진행되지 않고 있음을 알 수 있음.
- DB Engineering Village에서 1991~2012년 기간의 ‘fluorescence detection’ 을 검색해보면, 국제학술지에 게재된 논문건수가 미국이 1위(7368건), 다음은 독일, 일본, 프랑스, 영국 순이고, 한국은 10위(707건)임. 국내의 형광검출 관련 연구는 KAIST, KIST, 서울대, 고려대, 연세대, 이화여대 등에서 활발하며, 소형 형광검출 칩 개발, 광다이오드와 LED를 이용한 집적형광 검출 하이브리드 디바이스 특성평가, 디지털 마이크로 미러 디바이스를 이용한 공초점 형광 검출 연구 등을 들 수 있음.
- 네 개의 형광-발산 채널과 여러 개 인식 요소를 조합해서 만든 분자가 이스라엘 과학자들에 의해 개발됨. 이 분자 센서를 이용하면 다양한 약물을 빠르게 식별이 가능함. 연구팀은 오줌에서 채취한 시료로부터, 약물의 양과 종류를 초고속으로 분석할 수 있다고 주장했으며 이결과는 독일 화학회지에 보고됨.



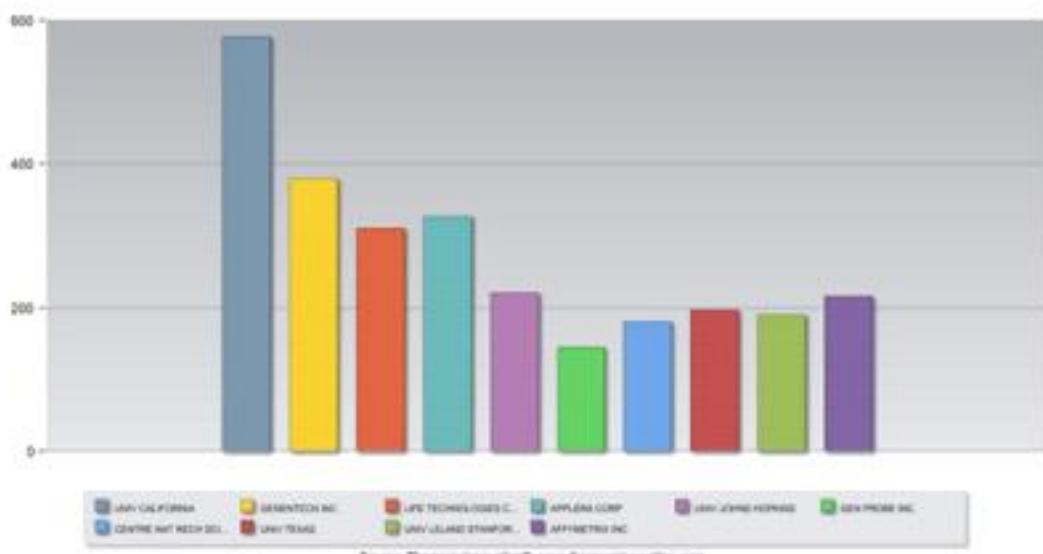
- 여러 개의 입력 신호에 의해 형광을 나타낼 수 있는 분자 센서 개발은 컴퓨터 및 분석 기기에 응용될 수 있어서 많은 관심을 받고 있는 연구 분야임. 이런 센서들은 전자 논리 게이트와 회로의 기능을 모방할 수 있으며, 세포의 이미징, 화학물질 센싱(chemosensing), 디지털 분자 표지들에 응용가능함. Na^+ , H^+ , Zn^{2+} 이온들을 동시에 확인할 수 있는 분자 개발은 이 분야에서 미래 발전 가능성이 좋은 분야임. 특히 고감도의 고속탐지력을 가진 마이크로어레이 센싱 기기 같은 분자 크기의 분석 시스템을 개발할 수 있다는 가능성을 보여줌.
- 아주대 화학과 · 에너지시스템학과 김환명 교수팀이 세포 내부의 산성도(pH)를 정밀하게 측정할 수 있는 형광분자센서를 최초로 개발. 면역시스템 등에 관여하는 생체조직의 산성도 변화는 암이나 신경질환 등의 질병과 관련이 있어서 최근 의약학계에서 많은 관심을 두고 있으나 이 분야 연구는 걸음마 수준임. 김 교수팀이 개발한 센서는 세포조직 안으로 쉽게 녹아들어 가는 유기물질로 여기에 적외선 영역의 빛을 쏘여주면 정도에 따라 다른 색깔의 형광색을 내 산성도 변화를 관찰 가능함.
- 이화여대 윤주영 교수 연구팀은 불소 음이온(F^-)이 형광물질인 tetrapropyl benzobisimidazolium 염을 활성화하여 비형광물질 N-heterocyclic carbene을 형성하는데, 이는 다시 이산화탄소(CO_2)와 반응하면 형광을 띠는 imidazolium carboxylate를 생성하는 현상을 이용하여 형광이산화탄소센서를 개발하였음.



제 2 절 국내외 지식재산권 분석

- Thomson Reuters에서 제공하는 ‘Thomson Innovation’을 이용하여 형광단 (fluorophore)에 대한 1995년부터 2014년까지의 특허를 검색한 결과 2001년을 기점으로 뚜렷한 증가세를 보이지만 지속적인 증가 대신 2004년 이후로는 정체되는 경향을 보임. 이는 신규물질의 발굴이 최근 들어 정체되었음을 보여주는 증거임.
- 형광단에 대한 특허는 아래의 표에서와 같이 캘리포니아 대학, 스텐포드 대학, 존스홉킨스 대학, 텍사스 대학 등 학교에서 많이 출원하였으나 Genentech, Life Technologies, Applera 등 관련 기업에 의해 출원되는 특허도 많이 있음. 형광단 관련 최다 특허 출원국은 약 60%를 차지하고 있는 미국이 단연 수위를 차지하고 있으며 다음으로 유럽특허청이 차지함.

Top Assignees



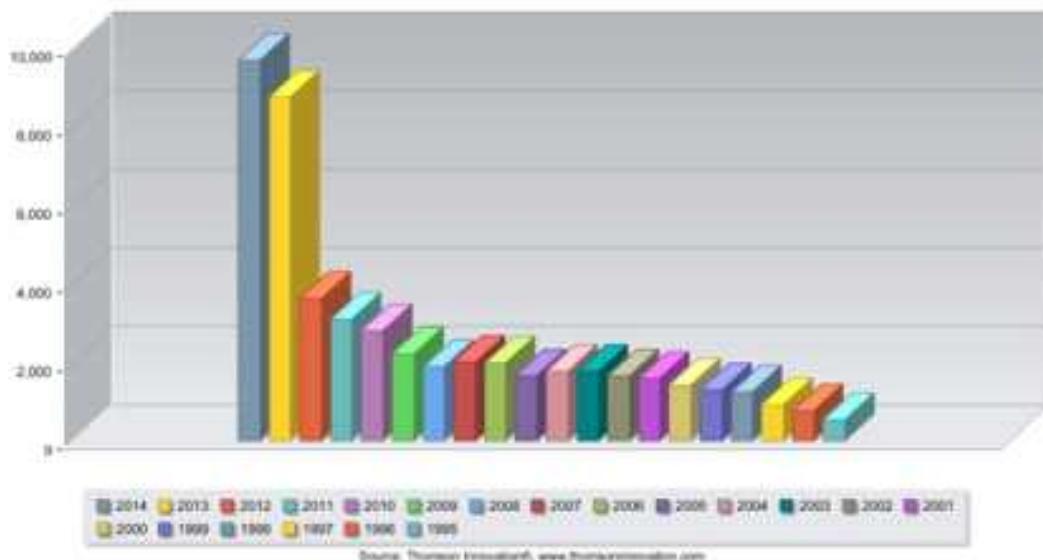
- 검색된 형광단 관련 특허 중 해양관련 특허로 검색범위를 좁혔을 때 다음과 같은 4개의 검색결과를 얻음.

Publication Number	Title -DWPI	Assignee/Applicant
US20140113327A1	Detecting concentration of target organisms in water samples, preferably saline water, brackish water, fresh water, marine water, and their combinations by adding tagged reagent to water sample and determining concentration bacterium	Environmental Technology Solutions LLC,Mesa,US Environmental Technology Solutions LLC,Mesa,AZ,US
WO2012016215A2	New isolated, synthetic or recombinant nucleic acid comprising specific nucleic acids,	TAXON BIOSCIENCES INC.,US ASHBY Matthew,US

	their sequences, amplification primer pairs or hybridization probes, useful for detecting, identifying, quantifying or indicating presence of hydrocarbon	DIMSTER-DENK Dago,US
EP1423478B1	New fluorescent natural dye compound from a marine organism useful in e.g. photochemotherapy of skin cancers	COUNCIL OF SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH,New Delhi 100 001,IN,00263390
US6916492B2	Bioactive semi-purified extract useful in e.g. paints, inks comprises proteinaceous fluorescent dye obtained from female gonads of marine organism <i>Holothuria scabra</i>	Council of Scientific & Industrial Research,New Delhi,IN

- 형광 화학센서(fluorescent chemical sensor)에 대한 1995년부터 2014년까지의 특허 검색결과 2013년부터 급격한 증가세를 보임.

Patent Publishing Trends



- 형광 화학센서에 대한 특허는 아래의 표에서와 같이 캘리포니아 대학, 텍사스 대학 등 학교에서 많이 출원하였으나 Genentech, Life Technologies, Applera, Fujifilm, Konikle philips전자 등 관련 기업에 의해 출원되는 특허도 많이 있음. 특히 국내기업인 삼성전자의 특허출원도 상위권에 위치하고 있음.
- 검색된 형광 화학센서 관련 특허 중 해양관련 특허로 검색범위를 좁혔을 때 한국기초과학지원 연구원에서 출원한 구리이온 검출관련 기술 1건의 검색결과를 얻음.

Publication Number	Title -DWPI	Assignee/Applicant
WO2014200164A1	Composition for manufacturing fluorescent chemical sensor for	KOREA BASIC SCIENCE INSTITUTE,KR

	detecting copper ions in water from river, lake and ocean, bio-samples e.g. plasma, serum and urine and serum in cells, has ultra-high sensitivity and high selectivity
--	---

- 검색된 형광 화학센서 또는 형광단 관련 특허를 중심으로 특허맵을 작성하였을 때 연구활동이 왕성하게 일어나고 있는 분야는 형광물질을 이용한 생명공학/생의학 분야였음.



그림2. 형광단 관련 특허를 중심으로 작성된 특허맵



그림3. 형광 화학센서 관련 특허를 중심으로 작성된 특허맵

- 논문분석과 특허분석을 종합한 결과 유기 형광화학 탐침, 형광 화학센서 연구 개발은 생명공학 분야에서 활발하게 이루어지고 있지만 해양분야는 아직 도입 단계로 판단됨. 따라서 국가별 기술격차가 크지 않으며 기술적 선점을 통한 해당 분야 선도가 얼마든지 가능한 분야임.

제 3 절 국내외 시장현황

- 바이오 이미지용 형광물질 글로벌 시장규모에 대한 자료는 조사 기관 및 방법에 따라 차이가 있음.
- BCC research사의 최근 조사에 의하면 바이오 이미지용 형광물질의 시장규모는 2007년 56억 달러를 넘어 2008년에는 58억 달러에 이를 것으로 예상하고 있으며 전체 시장규모는 연간 10.2%씩 성장하여 2013년에는 95억 달러정도의 규모가 될 것으로 예상함.
- 이 보고서에 따르면, 2009년 글로벌 시장규모가 약 25,329백만불이며 2009년~2016년 동안 연평균 성장을 12.5%를 보일 것으로 예측하였으므로, 이므로, 2023~2029년까지도 글로벌 시장규모가 연평균 12.5%의 성장률로 성장하는 것으로 예측할 수 있음.
- 국내시장 규모는 2023년부터 글로벌 시장의 1.0%를 차지할 것으로 예상되며 이 수치는 2029년까지 유지되는 것으로 예상됨.

제 3 장 연구 수행 내용 및 성과

제 1 절 유기형광물질 개발

1. BOP ((benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino) phosphonium hexafluoro-phosphate)를 이용한 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one 합성

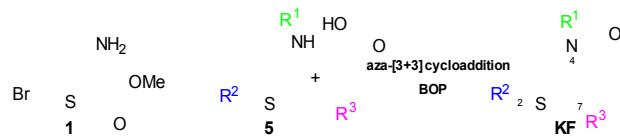


그림4. KF형 광단의 합성전략

- BOP 시약을 사용하면 3-amino-5-arylthiophene과 다양한 α,β -unsaturated carboxylic acid 간의 aza-[3+3] 고리첨가반응을 유도할 수 있다는 것을 발견 하였음. 이를 통해 약 70개 정도의 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one유도체를 확보하였으며 이들을 KIEST-fluor(KF)라 명명함(그림4). 합성은 크게 3가지 루트로 진행되는데 R^3 가 아세틸, 벤조일기 일 경우 중간체5는 aza-[3+3] 고리 첨가반응을 통해 형광물질 KF를 생성(A루트), 반면 R^3 가 에스터인 경우는 중 간체6을 다시 약염기인 K_2CO_3 로 처리해야만 KF를 얻을 수 있음(B루트). 마지막으로 R^3 가 수소 또는 메틸기인 경우 브롬화반응을 통해서만 KF를 합성할 수 있다는 것을 규명했음(C루트).

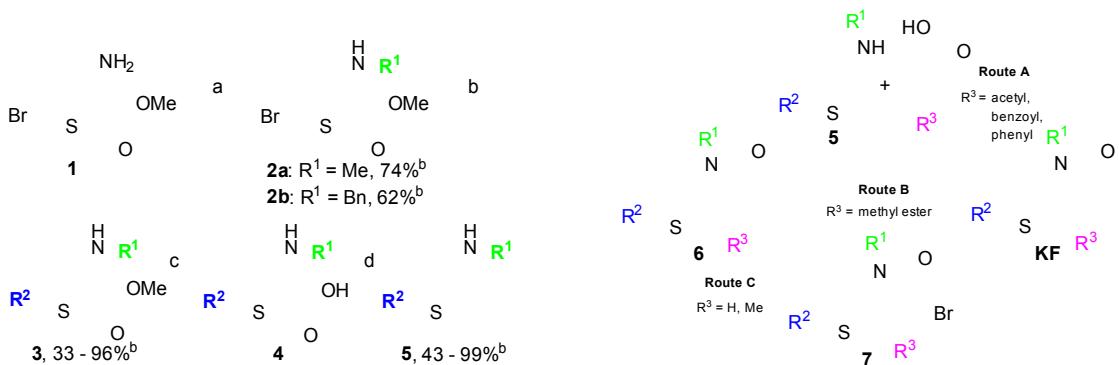


그림5. KF형 광단의 합성

- 합성된 KF 유도체들은 R^1 위치에 H, 메틸, 벤질기, R^2 위치에 전자주개 치환기가 도입된 폐닐기, R^3 위치에는 수소, 메틸, 에스터 등이 도입된 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one유도체들임 (그림6).

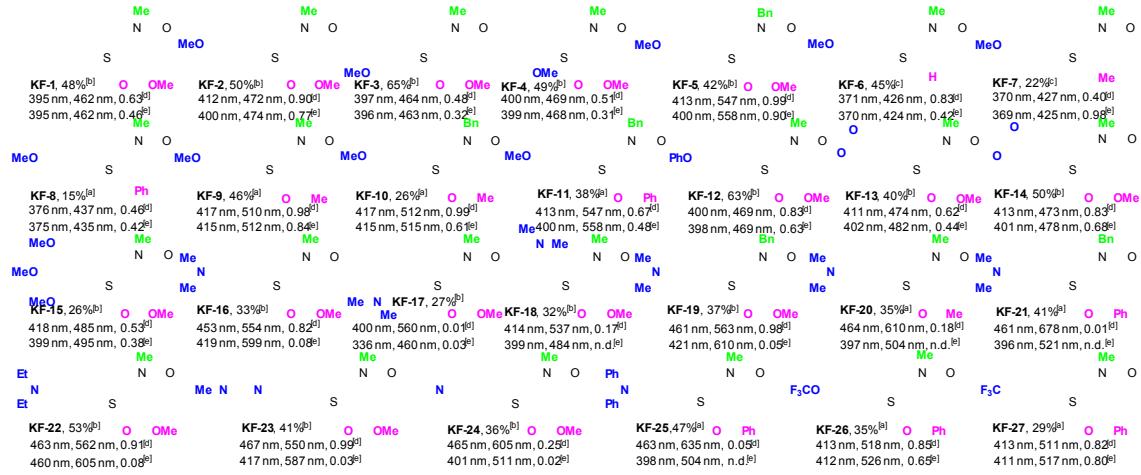


그림6. 합성된 KF 대표유도체들의 화학구조와 각 화합물들의 흡수파장, 형광파장, 양자수득율

- 형광단의 광물성(photophysical property) 측정

- 합성된 형광물질은 파란색부터 붉은색까지 가시광선 영역에서 다양한 형광파장을 보여주었음(그림7). 따라서 원하는 형광파장을 갖는 KF유도체를 선택하여 목표분석물질에 대해 선택적으로 감응하는 형광화학센서를 설계하는데 있어 중요한 계기가 마련되었음.



그림7. 대표 KF유도체들의 다양한 형광파장

- 합성된 형광물질의 흡수파장, 형광파장, 몰흡광계수, 양자수득율, 밝기, Stoke's shift를 dichloromethane과 acetonitrile 용매에서 10 마이크로몰 놓도로 측정하여 표1에 정리하였음(표1). 이 결과 R² 폐닐기의 para 위치에 알킬아미노기 또는 메톡시기가 있으면서 R¹위치에는 벤질기 R³위치에는 전체 화합물의 이중결합 길이를 증가시키는 벤조일, 에스터기가 도입되었을 때 형광밝기, 형광파장이 증가함.

표1. KF의 광물리적 성질

10 μM in dichloromethane (DCM)							10 μM in acetonitrile (MeCN)							Lifetime ^c (ns)
λ _{ex}	λ _{em}	ε	Φ _F ^a	brightness	Stoke's shift	λ _{abs}	λ _{ex}	λ _{em}	ε	Φ _F ^{a,b}	brightness	Stoke's shift		
395	462	7,600	0.65	4,800	68	392	395	462	17,600	0.46	8,100	70	2.33	
412	472	16,000	0.9	14,400	72	396	400	474	10,400	0.77	8,000	78	2.30	
397	464	46,000	0.48	22,100	70	394	396	463	35,100	0.32	11,200	69	2.59	
400	469	21,000	0.51	10,700	71	396	399	468	15,100	0.31	4,700	72	1.31	
416	474	40,000	0.99	39,600	70	400	414	477	23,600	0.9	21,200	77	2.06	
371	426	29,000	0.83	24,000	48	376	370	424	26,000	0.42	10,900	48	2.42	
370	427	39,000	0.4	16,000	51	374	369	425	37,000	0.98	36,300	51	0.63	
376	437	28,000	0.46	13,000	51	384	375	435	30,000	0.42	12,600	51	4.69	
417	510	13,300	0.98	13,000	92	412	415	512	7,300	0.84	6,100	100	1.51	
417	512	38,000	0.99	38,000	86	420	415	515	15,000	0.61	9,100	95	1.94	
413	547	9,400	0.67	6,300	131	406	400	558	19,700	0.48	9,500	152	5.30	
400	469	12,300	0.83	14,800	71	396	398	469	31,300	0.65	19,800	73	2.83	
411	474	4,400	0.62	2,700	70	400	402	482	36,300	0.44	16,000	82	1.72	
413	473	28,600	0.83	23,700	71	398	401	478	18,800	0.68	12,800	80	2.15	
418	485	24,700	0.53	13,100	85	398	399	495	11,300	0.38	4,300	97	1.36	
453	554	29,100	0.82	23,900	120	428	419	599	22,800	0.08	1,800	171	2.07	
400	560	11,800	0.01	100	164	396	336	460	3,300	0.03	100	64	2.64	
414	537	17,700	0.17	3,000	131	402	399	484	27,400	n.d.	n.d.	82	1.23	
461	563	21,800	0.98	21,400	127	432	421	610	40,300	0.05	2,000	178	1.86	
464	610	27,200	0.18	4,900	162	440	397	504	23,800	n.d.	n.d.	64	0.71	
461	678	35,200	0.01	400	232	438	396	521	11,100	n.d.	n.d.	83	1.01	
463	562	36,900	0.91	33,600	120	436	460	605	38,200	0.08	3,100	169	6.59	
467	550	23,900	0.99	23,700	130	418	417	587	27,800	0.03	800	169	1.50	
465	605	31,200	0.25	7,800	151	448	401	511	28,300	0.02	600	63	2.25	
463	635	34,600	0.05	1,700	197	430	398	504	26,600	n.d.	n.d.	74	0.99	
413	518	9,900	0.85	8,400	118	394	412	526	11,000	0.65	7,200	132	4.77	
413	511	6,900	0.82	5,700	113	388	411	577	10,000	0.8	8,000	179	1.66	

- 용매의 극성에 따라 형광파장이 변화하는 현상을 지칭하는 solvatochromic effect를 측정함(그림7). KF-22의 경우 비극성용매에서 극성용매로 갈수록 형광파장이 길어지는 반면(positive solvatochromism, 그림8. 좌), KF-24는 비극성용매 영역에서는 형광파장이 길어지지만 극성용매에서는 다시 파장이 짧아지는 특성을 보였음(negative solvatochromism, 그림8. 우)).

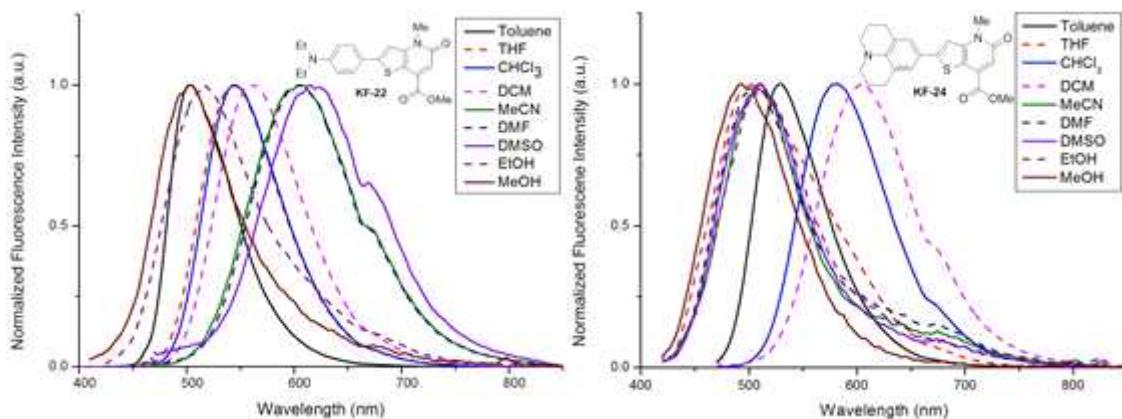


그림8. Normalized emission spectra of KF-22 (left) and KF-24 (right) in different solvents (10 μM)

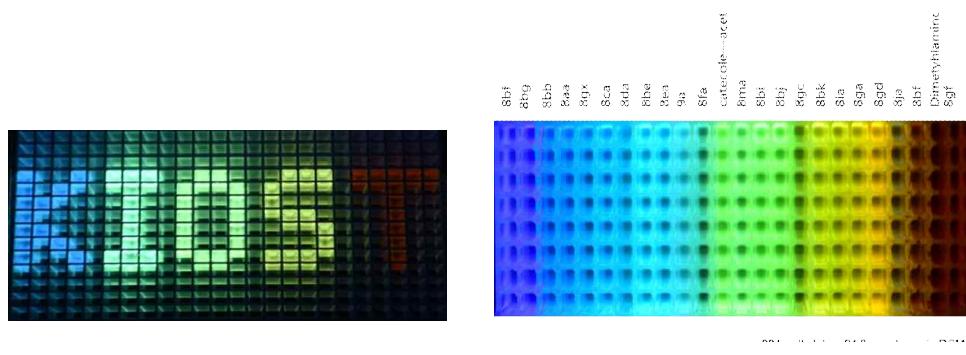


그림9. BOP 반응을 통해 얻어진 다양한 형광물질을 이용한 KIOST로고(좌), 전체 형광물질을 과장별로 나열해서 찍은 사진(우)

2. 금(I) 촉매 chloro[1,3-bis(2,6-diisopropylphenyl)imidazol-2-ylidene]gold(I) (Ipr AuCl)를 이용한 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one 합성

- 금(I) 촉매를 이용한 *N*-alkenyl alkynylamides의 고리이성질체화 반응을 통해 다양한 2-pyridone을 합성함 (그림10).

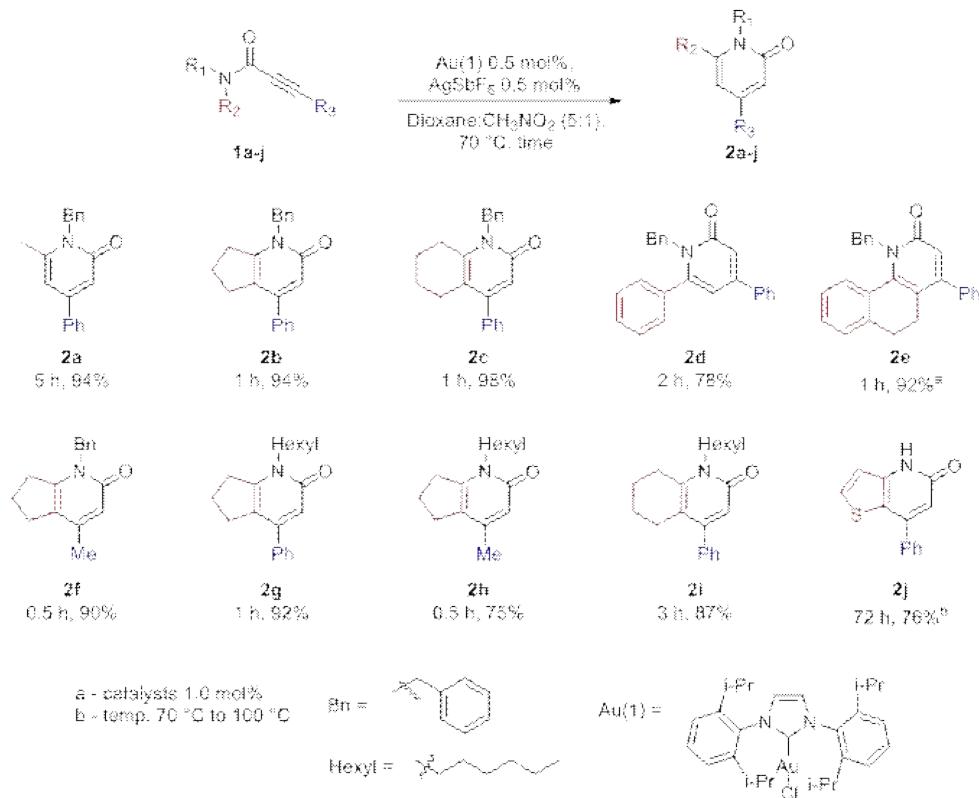


그림10. IprAuCl를 촉매로하는 2-pyridone 합성

- 이 합성법을 다시 *N*-thiophen-3-yl alkynylamides에 적용하여 다양한 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one 형광단을 합성함 (그림11).

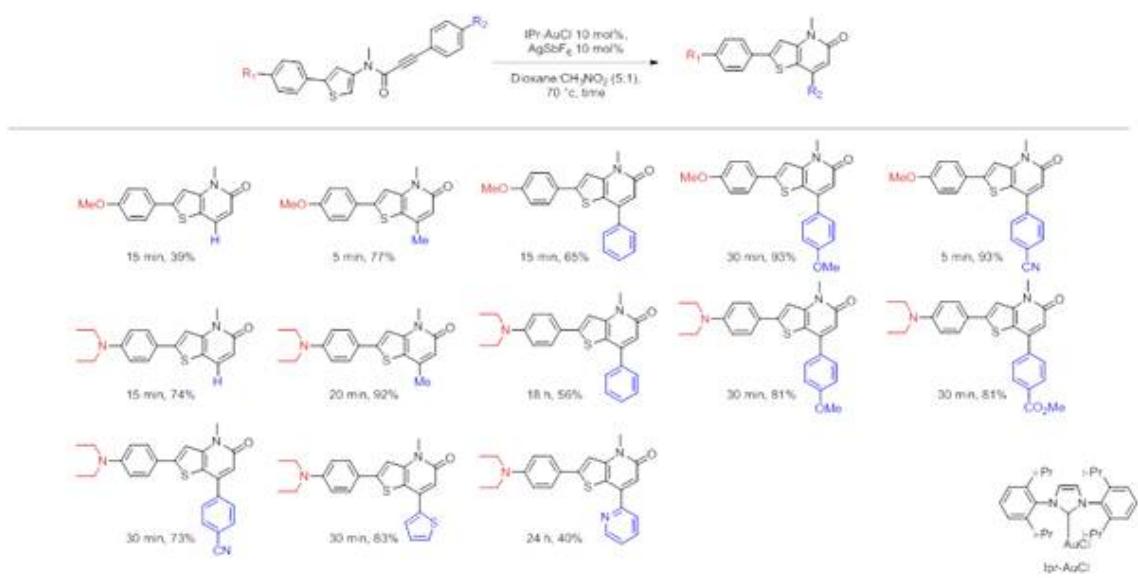


그림11. IPrAuCl를 이용한 KF 유도체의 합성

- 금촉매를 통한 고리이성질체(cycloisomerization)반응을 이용하여 합성된 KF형 광단의 광물리적 성질들을 측정함 (그림12).

cpd	in dichloromethane (DCM)					in acetonitrile						
	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	brightness _s	Stoke's shift	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	bright ness	Stoke's shift
1	370	426	24,200	0.79	19,100	56	370	423	10,700	0.47	5,000	53
2	370	426	27,600	0.99	27,300	56	365	424	25,800	0.78	20,100	59
3	378	436	22,600	0.56	12,700	58	376	435	26,500	0.42	11,100	59
4	377	435	29,000	0.31	9,000	58	376	433	18,800	0.25	4,700	57
5	384	474	22,400	0.70	15,700	90	382	482	13,800	0.78	10,800	100
6	400	469	16,400	0.86	14,100	69	396	482	17,800	0.81	14,400	86
7	398	467	31,100	0.97	30,200	69	395	478	47,100	0.94	44,300	83
8	408	491	81,400	0.98	79,800	83	407	516	84,200	0.80	67,400	109
9	404	484	28700	0.98	28,100	80	404	504	48,100	0.99	47,600	100
10	418	544	19,800	0.70	13,900	126	417	599	44,500	0.03	1,300	182
11	422	559	29,000	0.70	20,300	137	418	615	31,600	0.04	1,300	197
12	420	516	29,000	0.92	26,700	96	420	546	41,000	0.89	36,500	126
13	412	532	13,900	0.75	10,400	120	406	572	10,400	0.44	4,600	166

그림12. 금촉매를 이용한 고리이성질체화반응을 통해 합성된 KF유도체들의 광물리적 성질

- 이들 역시 가시광선 영역에서 다양한 형광파장을 갖고있음 (그림13).

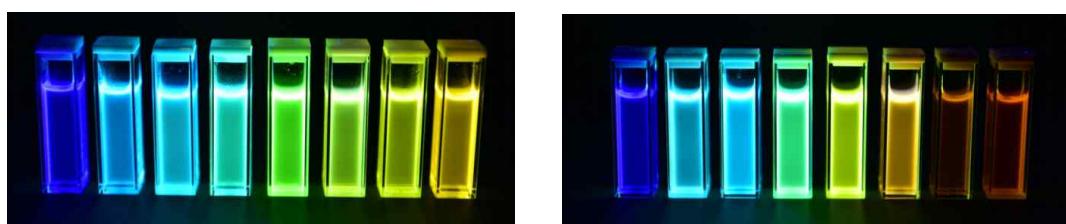


그림13. 대표 형광물질

- 1년차 연구에서 thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one 형광단 (KIOST-fluor, KF)을 효율적으로 합성할 수 있는 1) BOP[(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate]를 이용한 aza-[3+3] 고리첨가반응법과 2) 유기 금(I) 촉매를 이용한 6-*endo*-dig 고리이성질체 반응법을 개발함. 특히 이들 반응법은 상호보완적이어서 BOP반응법을 통해 합성이 어려운 유도체는 금(I)촉매를 이용한 합성법으로 제조가 가능하고 반대로 금(I)촉매 합성법으로 제조가 불가한 유도체는 BOP반응법으로 획득이 가능함 (그림14). 2년차 연구에서는 기 개발된 합성법을 통해 다양한 형광유도체를 확보하고 이를 토대로 안정적인 형광물성, 뛰어난 화학적 확장성을 갖는 형광소재를 도출하는데 역량을 집중함.

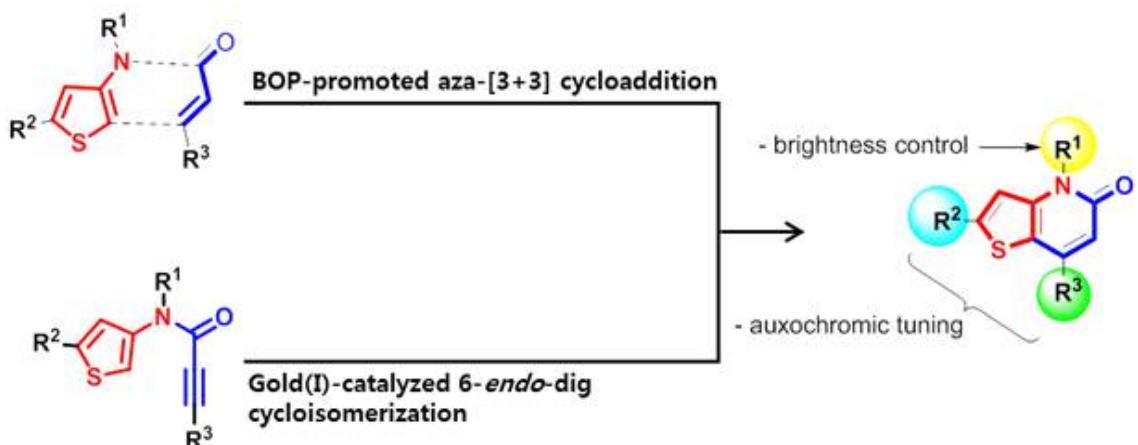


그림14. Thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-one 형광단의 합성법

- 일반적으로 저분자형광물질은 hexane, methylene chloride, chloroform 등 비극성용매에서 높은 형광세기를 보이지만 H₂O, MeOH, EtOH, DMSO 등 극성용매에서는 분자 주위에 용매화(solvation)이 발생하여 여기상태(excited state) 에너지준위가 낮아지며 비발광성감쇠 (nonradiative decay) 현상을 일으키기 때문에 형광세기가 현격히 감소함 (그림15).

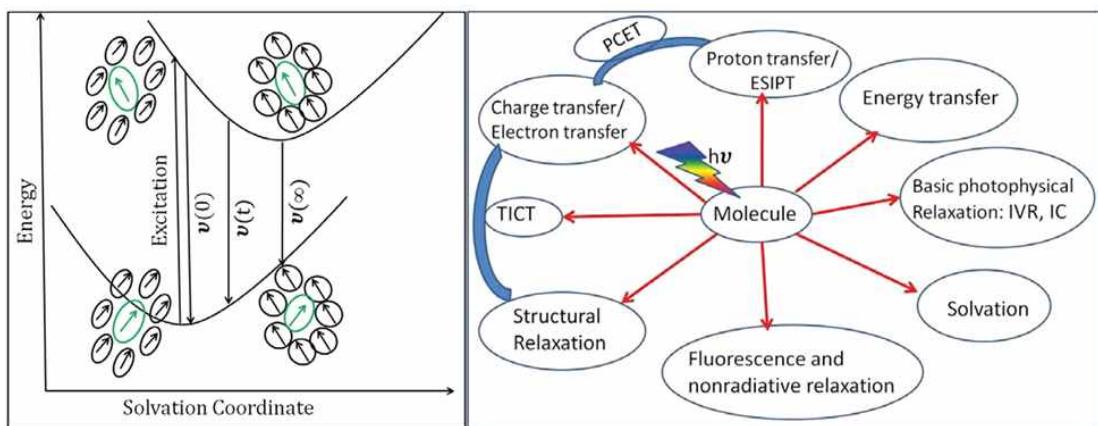


그림15. 용매화와 이에 따른 형광에너지 분산

- 따라서 KIOST-Fluor 분자가 금속이온 형광센서나 형광바이오센서의 신호리포터로서 정상적인 작동을 하기위해서는 극성용매에서 형광세기가 감소하지 않고 안정적으로 형광물성을 유지하는 것이 중요함.
- 확보된 60여개의 KIOST-Fluor 유도체 중 4개가 위의 조건을 만족시키는 것으로 밝혀져 이들에 대한 기초물성을 테스트한 결과 2번 화합물(녹색형광)과 4번 화합물(노란색형광)의 형광파장(λ_{em}), 형광밝기(brightness = 몰흡광도(ϵ) x 양자수득율(Φ_F)), Stokes shift가 특히 우수한 것으로 밝혀짐 (그림16).

cpd	In dichloromethane (DCM)						In acetonitrile					
	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	brightness	Stoke's shift	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	brightn ess	Stoke's shift
1	398	467	31,100	0.97	30,200	69	395	478	47,100	0.94	44,300	83
2	408	491	81,400	0.98	79,800	83	407	516	84,200	0.80	67,400	109
3	404	484	28700	0.98	28,100	80	404	504	48,100	0.99	47,600	100
4	420	516	29,000	0.92	26,700	96	420	546	41,000	0.89	36,500	126

그림16. 선별된 4종의 화합물 구조와 이들의 기초물성

- 화합물4는 형광파장이 methylene chloride와 acetonitrile에서 각각 516 nm와 546 nm로 선별된 4종류의 형광유도체 중에서 가장 긴 형광파장을 갖고 있음. 형광센서가 정확한 분석신호를 내기위해서는 센서에 사용되는 형광물질이 분석물질 또는 사용되는 용매에 따라 형광파장과 형광세기에 변화가 없어야 함.

화합물4는 용매의 극성에 따른 형광파장의 변화가 없었으며, 금속이온에 대한 자체 특성을 알아보기 위해 10종류의 금속이온에 대한 형광변화 유무를 확인하는 실험을 실시한 결과 사용된 모든 금속이온에 대해 형광파장, 형광세기의 변화는 없는 것으로 밝혀짐 (그림17).



그림17. 화합물4의 다양한 금속이온용액에 대한 형광안정성 테스트

- 다만 화합물4의 구조상 황(sulfur)이 포함되어 있으므로 용매 내 산화제 존재 시 sulfoxide 또는 sulfone으로 반응이 이뤄져 형광세기가 현저하게 감소하는 것으로 확인됨 (그림18).

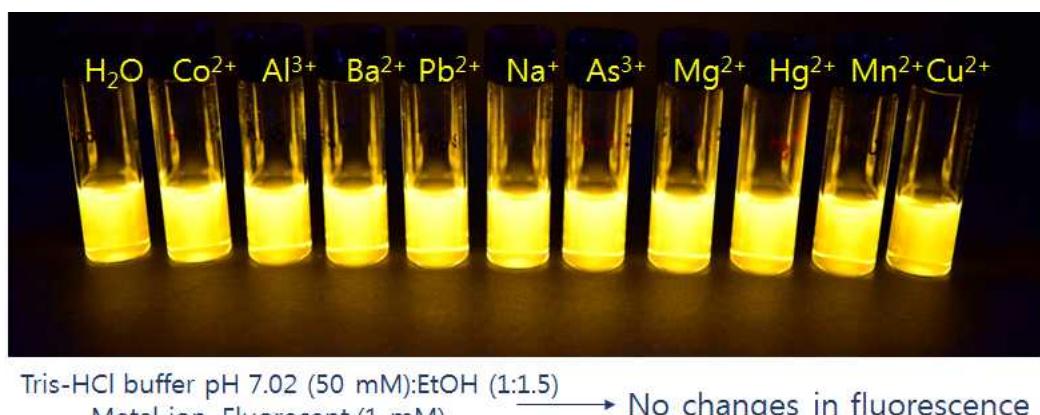


그림18. 화합물4의 산화성 용액에서의 형광물성 변화

제 2 절 형광화학센서 개발

1. 수소이온농도(pH) 센서 개발

- pH 센서의 설계와 합성: BOP를 이용한 aza-[3+3] 고리첨가반응의 생성물로서 KF-5와 KF-22는 용매의 극성에 따른 형광파장의 변화가 커진 화합물이었음. 또한 이 두 화합물은 에스터기를 갖고 있다는 공통점이 있으며, 카르복실기는 용액의 pH에 따라서 연결된 aromatic 고리와의 배치각도가 변하는 것이 알려져 있음. 따라서 간단한 가수분해 반응으로 KF-5와 KF-22 두 화합물을 KF-28 와 KF-29로 변환시켜 수소이온농도의 변화에 따른 파장 또는 형광세기의 변화

를 측정하였음.

- 측정결과 KF-28의 경우 pH의 증가(염기성)에 따라 형광세기가 증가하는 반면 KF-29의 경우 pH 1에서 강한 형광현상이 보였음(그림19).

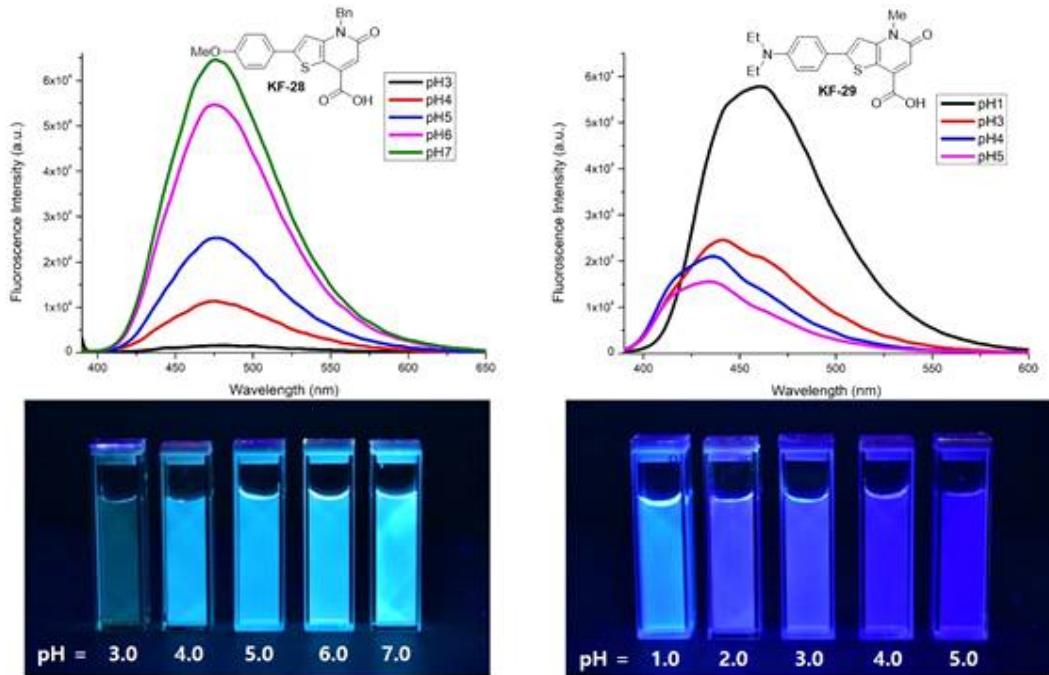


그림19. pH-Dependent fluorescence spectra of KF-28 (1 μ M, left) and KF-29 (10 μ M, right)

2. 납(Pb^{2+}) 센서 개발

- 센서의 설계와 합성

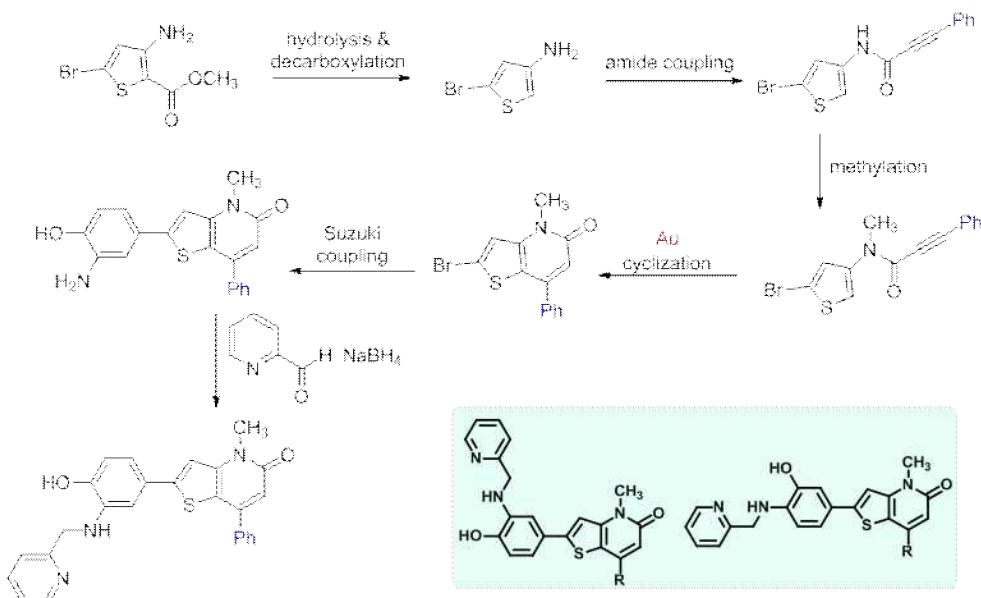


그림20. 납(Pb²⁺) 센서의 설계와 합성

- 앞서 개발된 금(I)촉매를 이용한 고리이성질체화 반응을 사용하여 금속이온과 칼레이션할 수 있는 2-(4-hydroxy-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one 화합물을 합성함 (그림20).
- 센서의 검증: 2-(4-hydroxy-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one 화합물을 Na⁺, Ba²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Hg²⁺, Co²⁺, Pb²⁺ 등 금속이온 용액에 첨가하여 납(Pb²⁺)이온에 선택적으로 감응한다는 것을 확인함 (그림21).

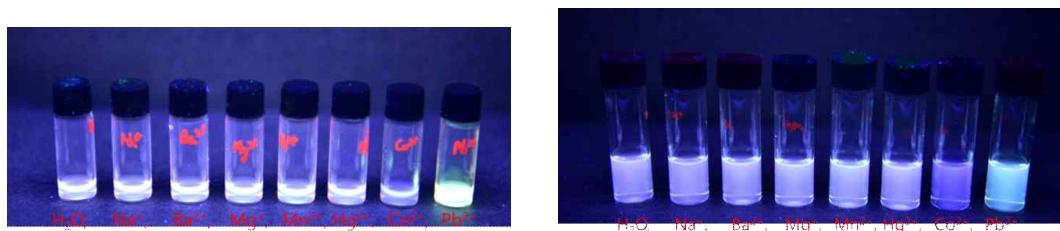


그림21.

2-(4-hydroxy-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one의 금속이온에 대한 선택성

- 1년차 연구를 통해 금(I)촉매를 이용한 고리이성질체화 반응을 사용하여 납(Pb²⁺)이온과 선택적으로 칼레이션할 수 있는 2-(4-hydroxy-3-((pyridin-2-ylmethyl)amino)phenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one 화합물을 확보하였으나 센서의 낮은 감도를 개선할 필요성이 제기됨 (그림21).
- 납 (Pb²⁺)이온에 대한 선택성을 높이기 위해 (2-aminoethyl)bis(2pyridylmethyl)amine기를 도입한 새로운 구조의 센서를 분자설계하여 합성함 (그림22).

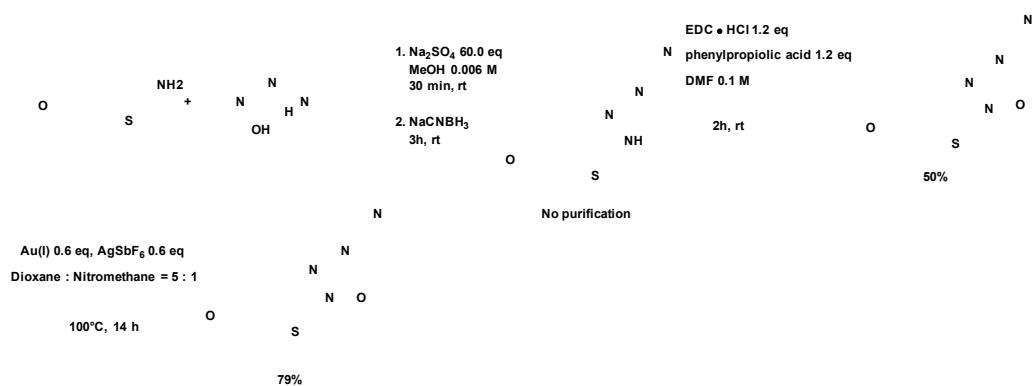


그림22. 감도 개선을 위한 신규 납 (Pb^{2+}) 센서의 합성루트

3. 수은 (Hg^{2+}) 센서 개발

- Thieno[3,2-b]pyridin-5(4H)-one 화학골격을 기반으로 하는 수은 (Hg^{2+}) 센서를 설계하였으며 현재 합성 진행 중 (그림23).

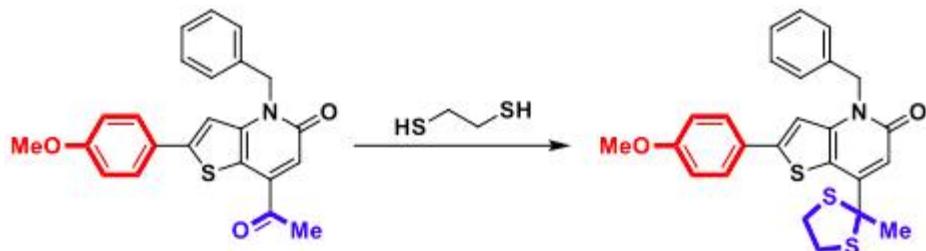


그림23. 합성중인 수은 (Hg^{2+}) 센서

4. Cationic polydiacetylene 기반의 수은센서 개발

- 체내 독성을 갖는 중금속인 수은의 검출을 위한 PDA 기반의 비색 및 형광센서를 개발하고자 함.
- 요오드이온과 수은이온의 강한 결합력을 이용하여, 요오드이온을 counteranion으로 갖는 cationic PDA의 광학 변화를 유도해 수은이온 화학센서를 개발함.

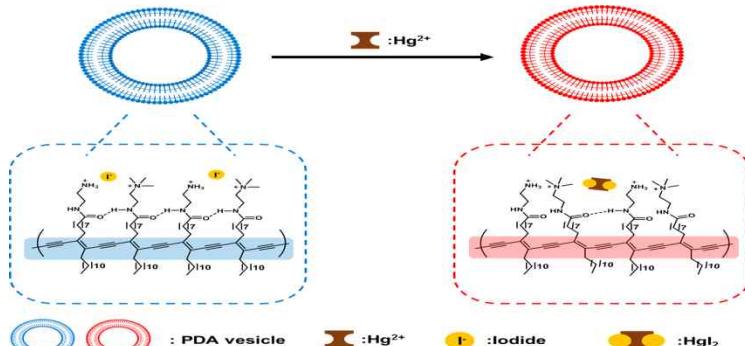


그림24. Cationic PDA의 counteranion exchange를 이용한 수은이온 검출 모식도

- Cationic polydiacetylene의 합성:

- 일차아민과 암모늄 요오드를 말단에 갖는 2종의 diacetylene 단량체를 합성함.
- 위 단량체를 이용하여 물상에서 vesicle을 만든 후 photopolymerization을 이용하여 요오드이온을 counteranion으로 갖는 cationic PDA (PDA-1)를 합성함.

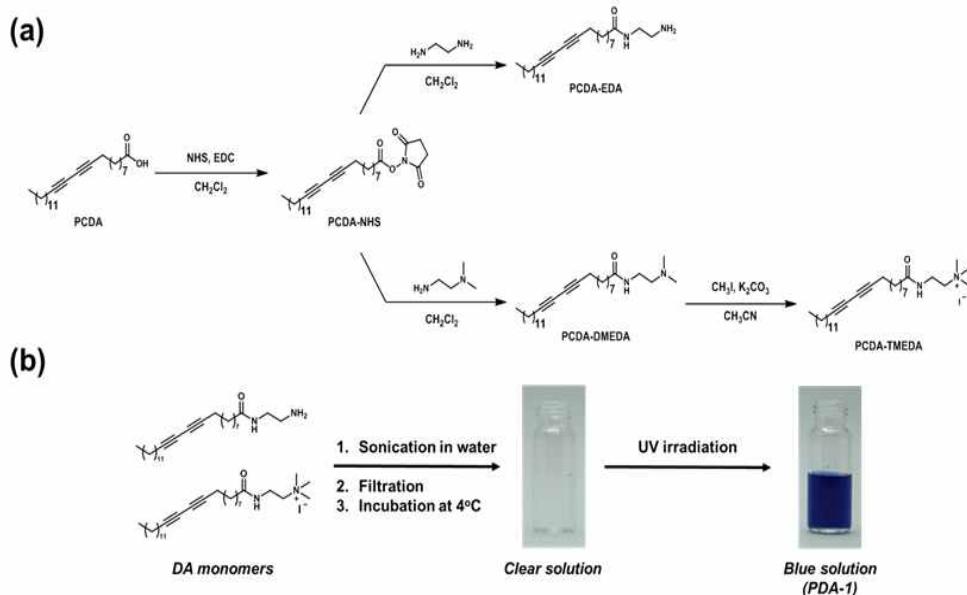


그림25. (a) Diacetylene 단량체 합성법, (b) Cationic PDA 합성 모식도

- 수은이온에 의한 PDA-1의 광학특성 변화 확인
 - 다양한 수은이온의 농도에 따라 PDA-1의 흡광도 및 형광특성의 변화를 확인
 - 수은이온의 농도에 따라 정량적으로 PDA-1의 광학성질이 변화함을 확인, 적정실험을 통해 PDA-1이 8.6 μM 수준의 검출한계를 갖는 것을 확인함.

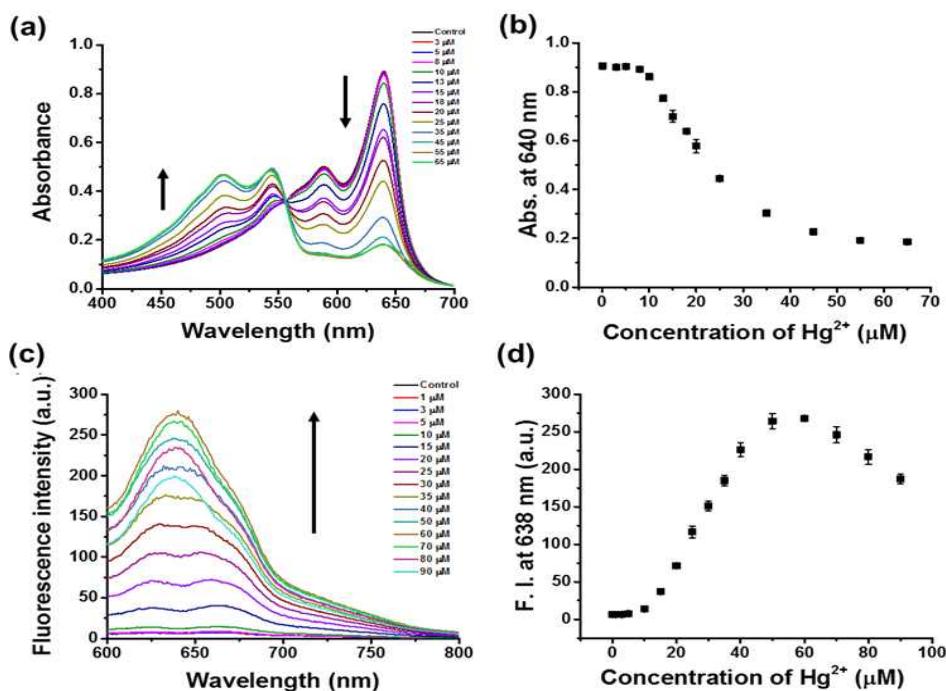


그림26. 다양한 농도의 수은에서 파장에 따른 PDA-1의 (a) 흡광도 및 (c) 형광세기의 변화; 수은의 농도에 따른 특정 파장에서 (b) 흡광도 및 (d) 형광세기의

변화

- 다른 금속이온에 대한 선택성 확인 및 수돗물 시료안의 수은이온 검출
- 다양한 금속이온에 존재에 따라 PDA-1의 광학성질 변화를 확인함, PDA-1이 수은이온에 대해 선택적으로 광학성질이 변화함을 확인함.
- 확연한 색변화로 인해 육안으로 수은이온 검출이 가능함.
- 수돗물 시료 실험을 통해 수돗물 안의 수은이온을 검출할 수 있음을 확인함.

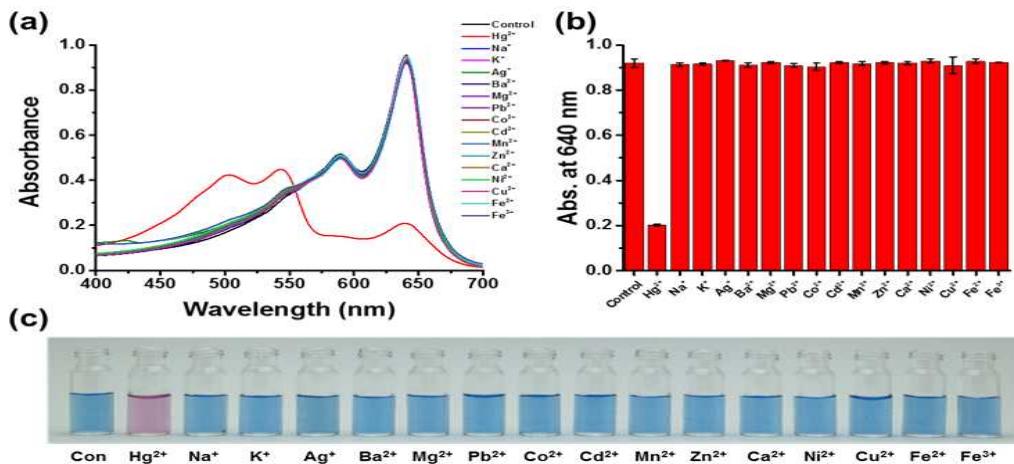


그림27. (a, b) 다양한 중금속에 의한 흡광도 변화: (c) 수은에 의한 PDA-1의 색 변화

- 위 연구내용을 종합하여 SCI급 국제저널인 Tetrahedron Letters에 보고 및 대한화학회 제 140회 학술발표회에 포스터 발표 수행.

5. Hydroxylamine 기능화 polydiacetylene 기반의 heptanal 비색센서 개발

- 폐암 환자에 다량으로 존재하는 폐암 생체지표인 heptanal의 검출을 위해 PDA 기반의 비색센서를 개발함.
- Aldehyde 물질 검출에 사용되는 hydroxylamine을 도입한 PDA를 합성하여 heptanal을 선택적으로 검출함.

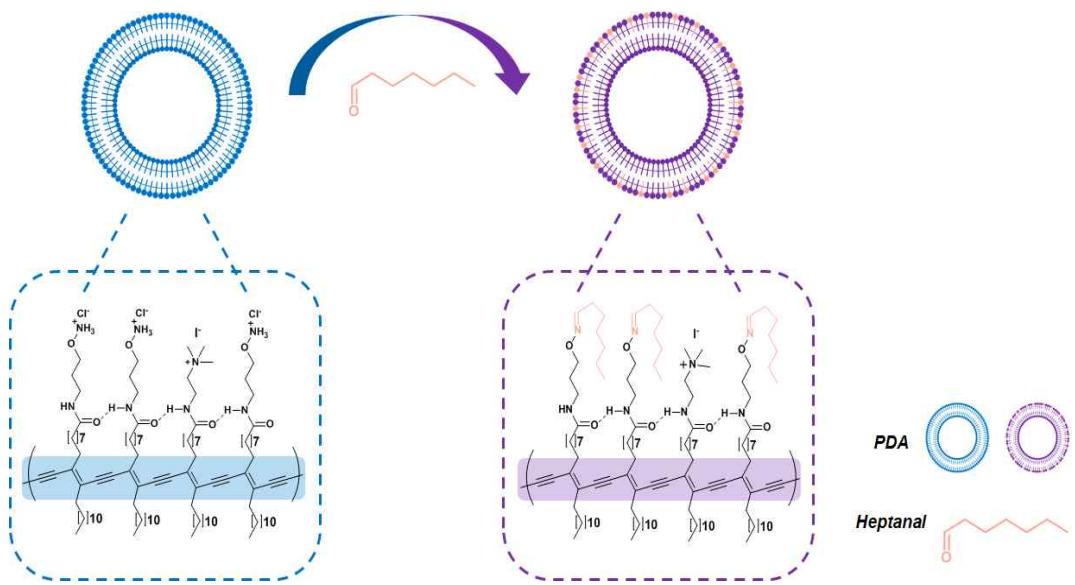


그림28. Hydroxylamine 으로 기능화 된 PDA 기반 heptanal 검출 모식도

- Heptanal 검출을 위해 말단에 hydroxylamine 및 quaternary ammonium을 갖는 diacetylene monomer의 합성을 합성하고(1, 8), 이를 기반으로 PDA liposome을 합성함.

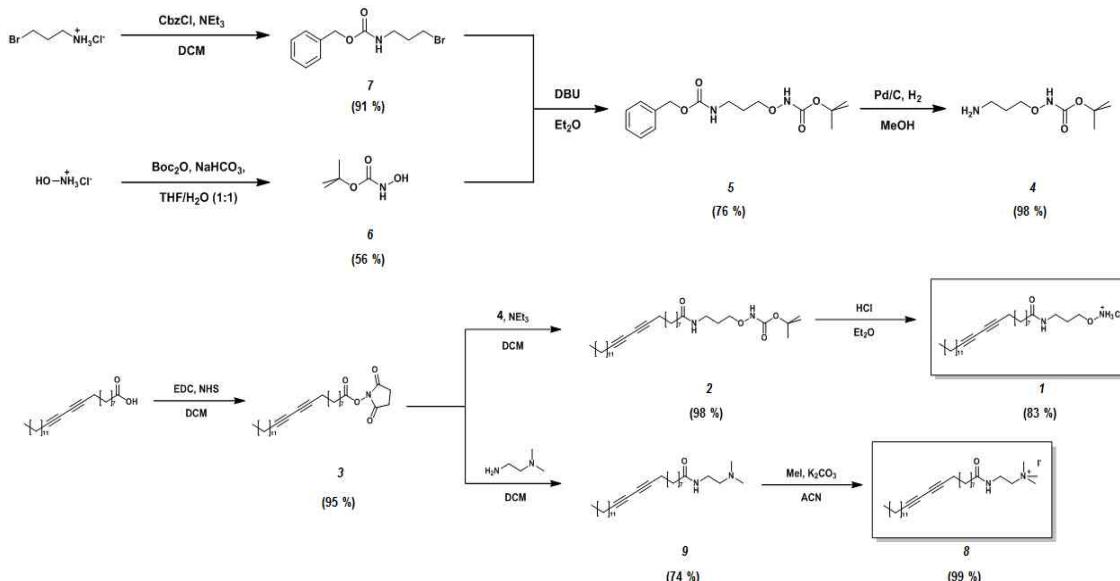


그림29. Hydroxylamine 및 quaternary ammonium을 갖는 diacetylene monomer 합성 법

- Heptanal 적정 실험을 통해 hydroxylamine을 갖는 PDA liposome의 정량적 흡광도 변화를 관찰, PDA liposome이 약 4.8 μM의 검출 한계를 가짐을 확인함.

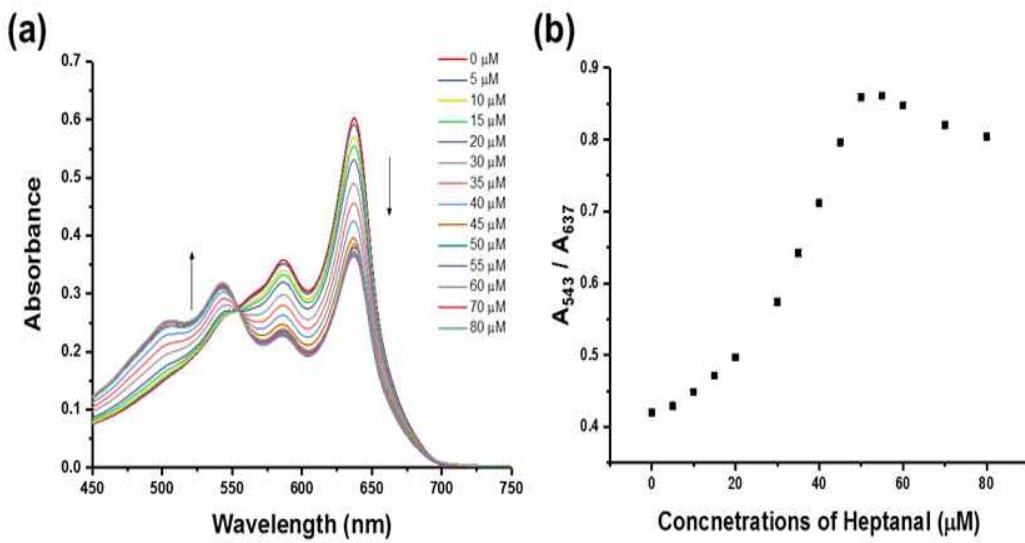


그림30. (a) 다양한 농도의 heptanal에서 PDA의 흡광도 변화, (b) heptanal 농도에 따른 543, 637 nm에서 흡광도 비의 변화 그래프

- 유사 aldehyde 화합물에 대한 선택성 확인 및 practical sample내 heptanal의 검출
- PDA liposome이 체내에 많이 존재하고, 짧은 carbon chain을 갖는 formaldehyde, acetaldehyde 등에 대해 선택성이 있음을 확인함.
- Serum sample 실험을 통해 본 센서가 체내 heptanal 검출에 응용가능성을 가짐을 확인함.

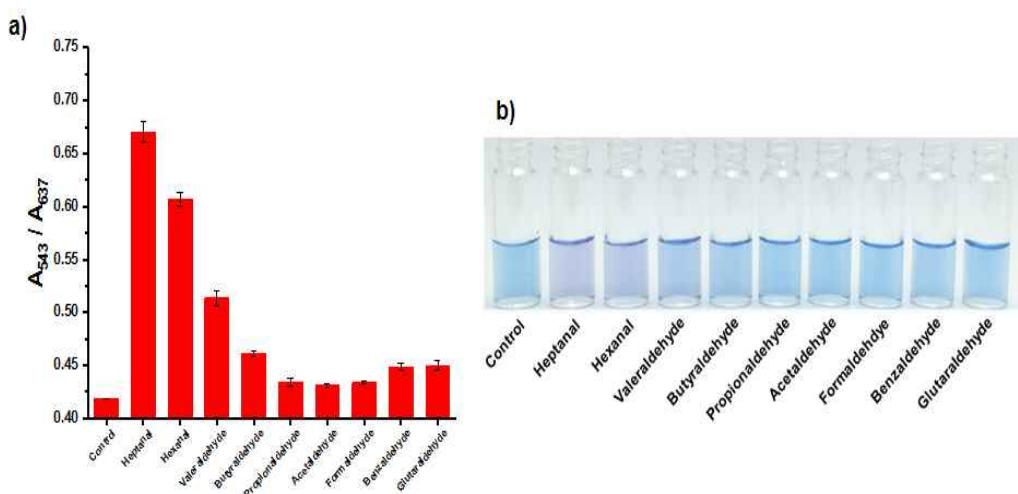


그림31. a) 다양한 carbon chain을 갖는 aldehyde에 대한 PDA liposome의 흡광도 변화; b) 색변화를 통한 선택적인 heptanal 검출

6. Caged-biotin 형광 유도체와 avidin을 이용한 chemodosimeter 개발

- Biotin은 avidin과 매우 높은 결합력을 가지나, caged-biotin은 avidin과 약한 결합력을 가짐.
- Caged-biotin 형광 유도체의 구조를 조정, 타겟에 선택적으로 감응하여 biotin-형광 유도체로 손쉽게 전환되는 구조를 디자인, 이를 기반으로 화학센서를 개발하고자 함.

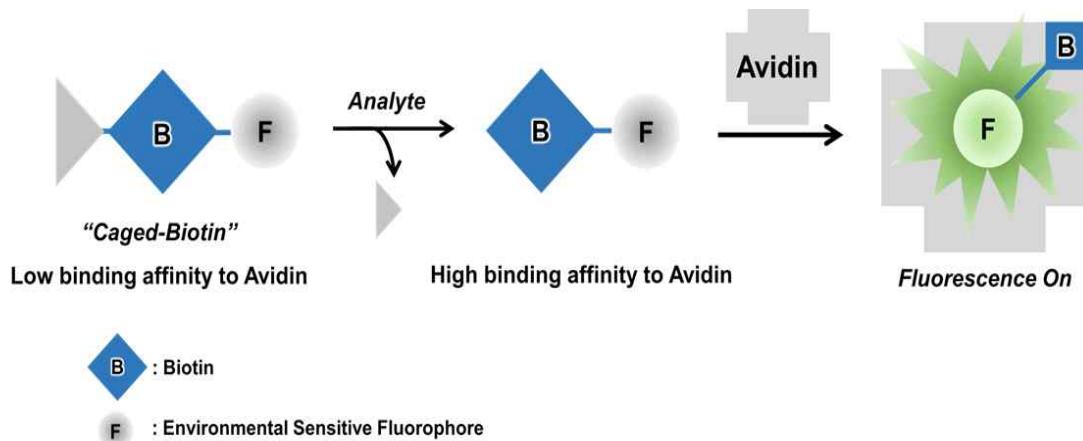


그림32. Caged-biotin 형광 유도체 기반 화학센서 모식도

- 그림 32에서 언급한 화학센서 구현을 위해 신호단으로 환경감응 형광단을 선정함.
- (Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl (DANSYL)과 4-Sulfamonyl-7-amino-benzoxadiazole (SBD)를 갖는 biotin-형광 유도체를 합성 (6, 7)

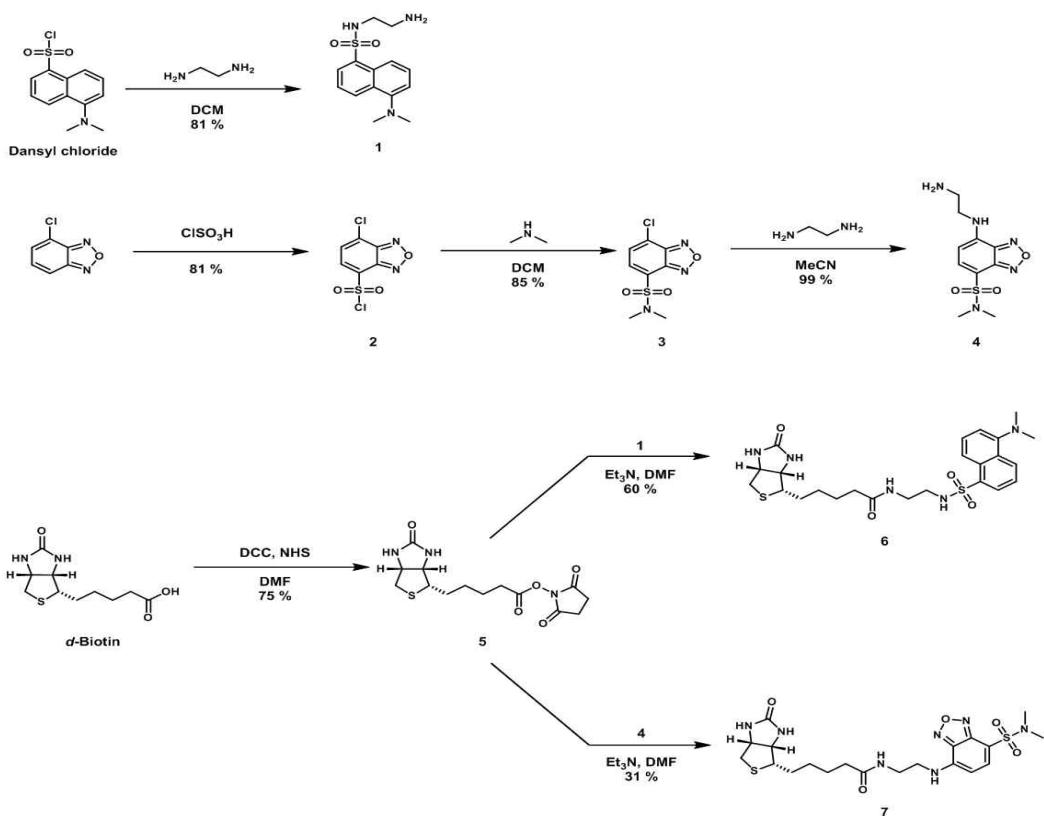


그림33. 환경 감응 형광단을 갖는 biotin-형광 유도체 합성법

- Streptavidin 존재 유무에 따른 6,7 각각의 형광특성을 확인. SBD를 신호단으로 갖는 7이 더 좋은 효율을 보이는 것을 확인함.

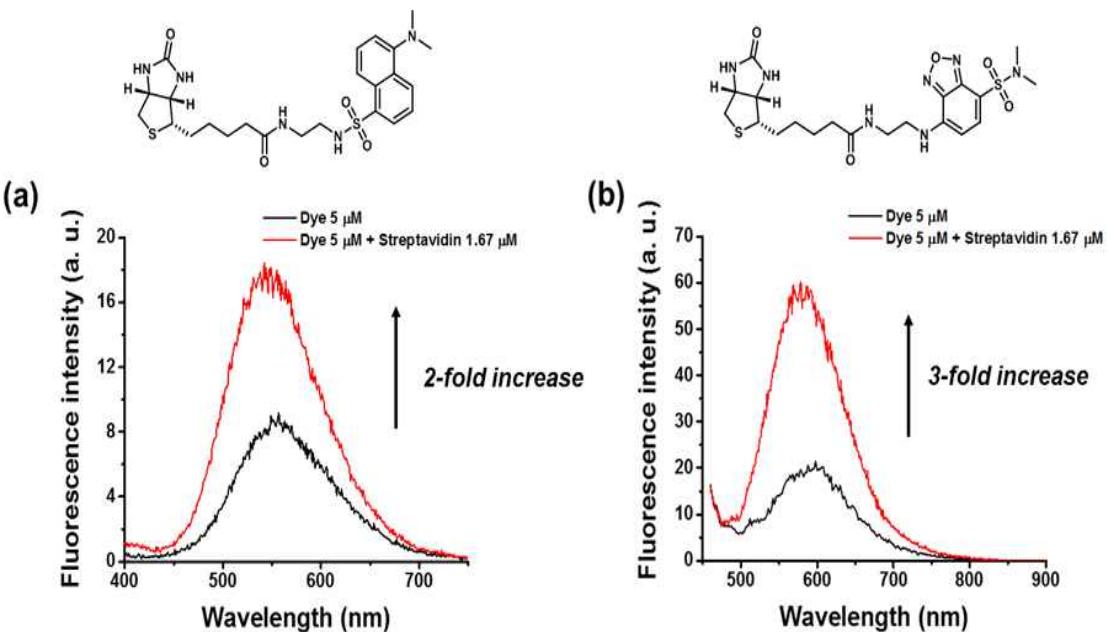


그림34. Streptavidin 존재 유무에 따른 biotin-형광 유도체의 형광 스펙트럼 (a)

DANSYL 유도체, (b) SBD 유도체

- 타겟 감응 reaction unit의 합성 및 caged-biotin 유도체의 합성
 - 불소 음이온에 감응하여 선택적으로 decaging 될 수 있는 silyl 유도체를 합성 함.
 - CDI coupling을 이용하여 silyl 유도체를 포함하는 caged-biotin 유도체를 합성 함.
 - 현재 caged-biotin 형광유도체 합성 진행 중이며, 합성이 완료되면 제안한 화학센서로의 응용연구를 수행할 예정임.

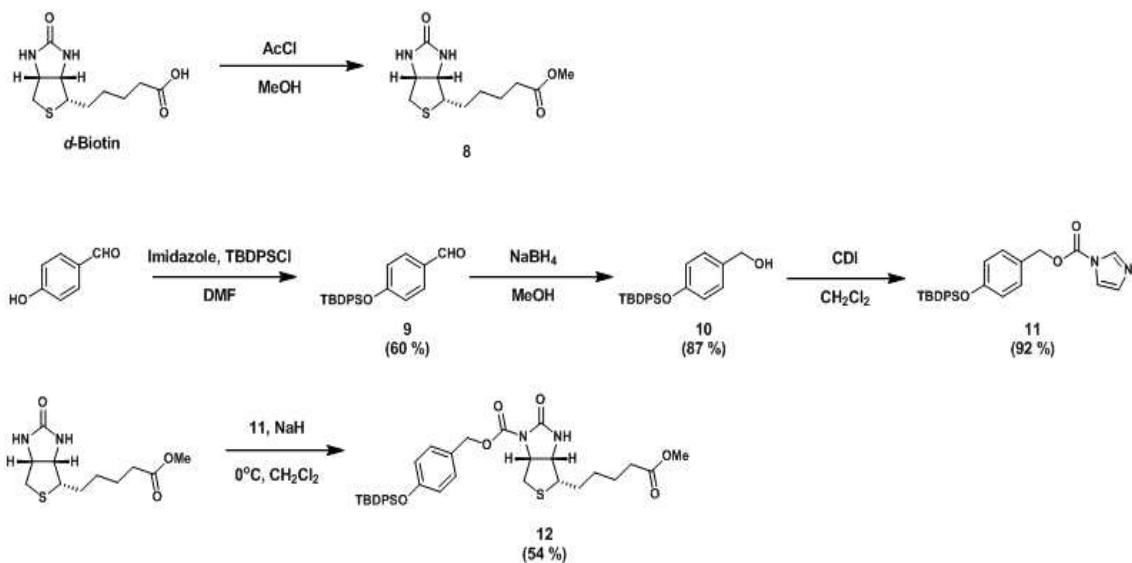


그림35. Silyl 유도체를 포함하는 caged-biotin 유도체의 합성법

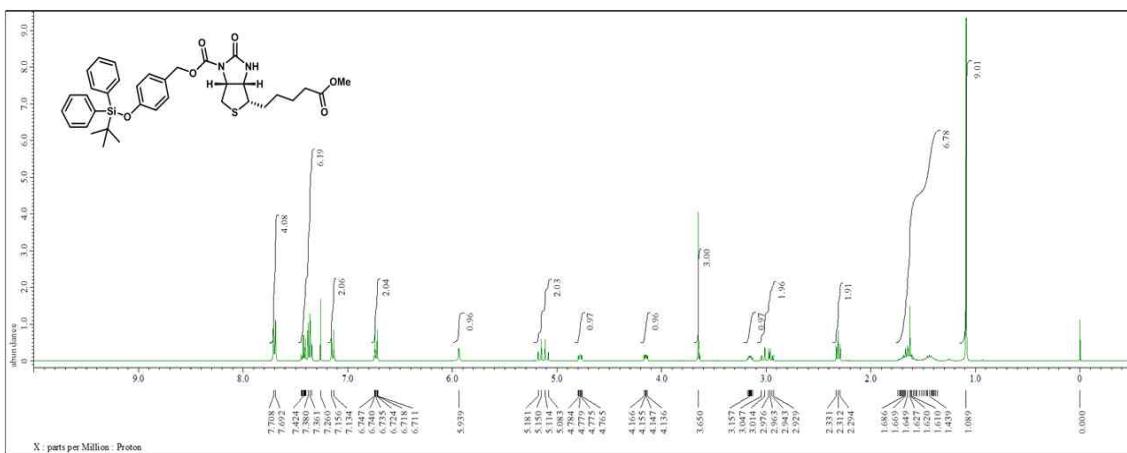


그림36. ^1H NMR spectrum of **12** in CDCl_3

제 3 절 형광바이오센서 개발

1. F-actin, vimentin 선택적 형광바이오센서 개발

- Phalloidin 기반 F-actin 선택적 형광바이오센서 개발

- Phalloidin은 Amanita phalloides에서 분리된 간세포에 대해 강한 독성을 보이는 천연물로서 F-actin과 선택적으로 결합하여 안정화시키는 역할을 하고 있음. 이러한 특성을 응용하려는 노력의 결과 현재 다양한 파장대의 형광단과 결합된 phalloidin유도체들이 F-actin 표지시약으로 판매되고 있음. 형광물성이 우수한 KIEST-Fluor와 phalloidin의 결합을 통해 새로운 F-actin 표지시약을 개발하기 위해 다음과 같은 합성루트를 통해 목표물질을 제작하였고 현재 공동연구 파트너인 연세대학교 의과대학 김현석교수 연구실에서 검증실험을 진행 중임 (그림37).

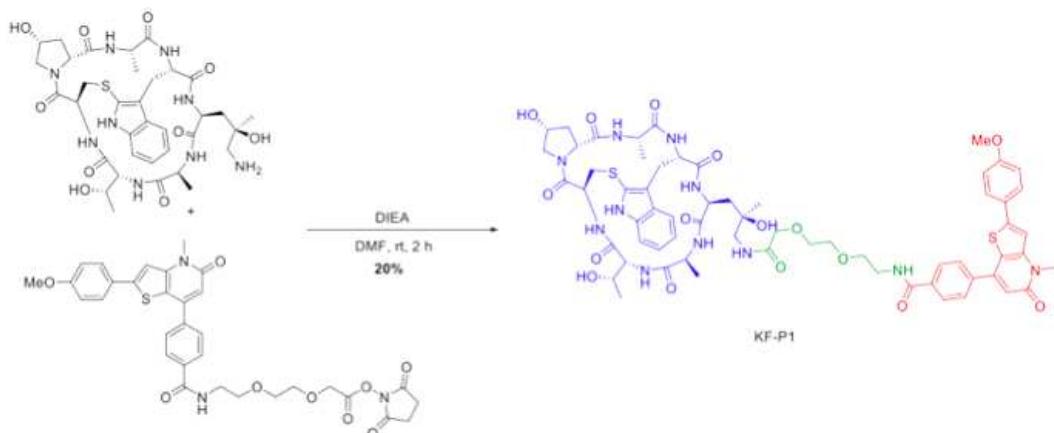
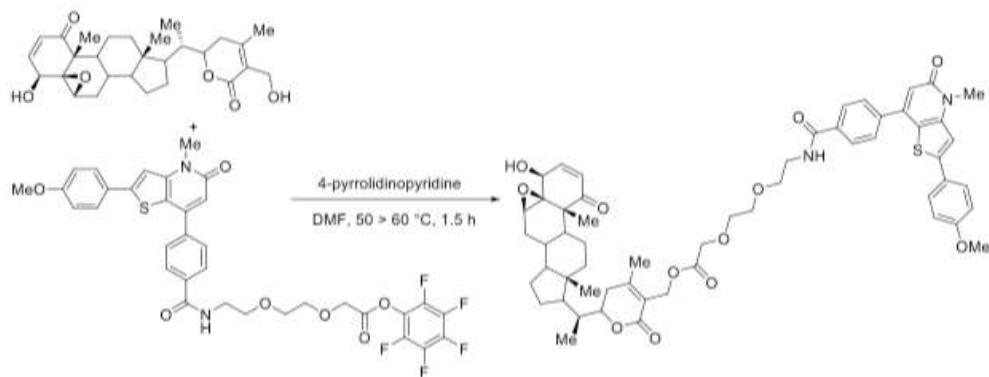


그림37. 천연물 phalloidin기반 F-actin 표지시약의 합성

- Withaferin A기반 F-actin 형광표지시약 개발

- Withaferin A는 Withania somnifera에서 분리된 항암, 항염증, 혈관생성억제 활성을 갖고 있는 천연물로서 단백질 타겟인 vimentin의 cysteine residue와 강력한 공유결합을 통해 연결되는 것으로 알려져 있음. Withaferin A는 1차, 2차 알콜기가 동시에 존재하므로 반응성이 큰 1차 알콜 부위를 통해 KIEST-Fluor 형광단과 연결이 가능함 (그림38).



NMR Spectra

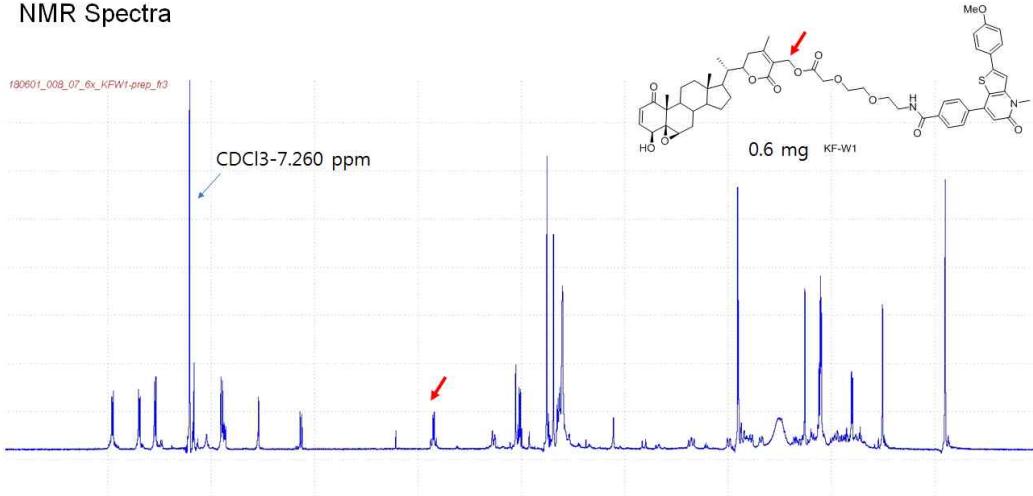


그림38. Withaferin A기반 F-actin 형광표지시약 합성과 NMR데이터

- 합성된 withaferin A-KF 결합체를 실제 세포에 적용하여 실험한 결과 형광시 그날이 증가하는 것을 관찰하였으나 vimentin siRNA로 knock-down된 조건에서도 형광염색된 이미지를 관찰하였음 (그림39). 이는 Withaferin A와 결합하기 위해 사용된 에스테르기 (ester)가 가수분해되어 합성물질로부터 분리된 KF형광단이 비선택적으로 세포단백질과 결합하기 때문에 발생하는 문제이므로 이를 억제하기 위해 에스테르기가 아닌 에테르(ether) 형식으로 결합된 새로운 결합체를 합성 중 (그림40).

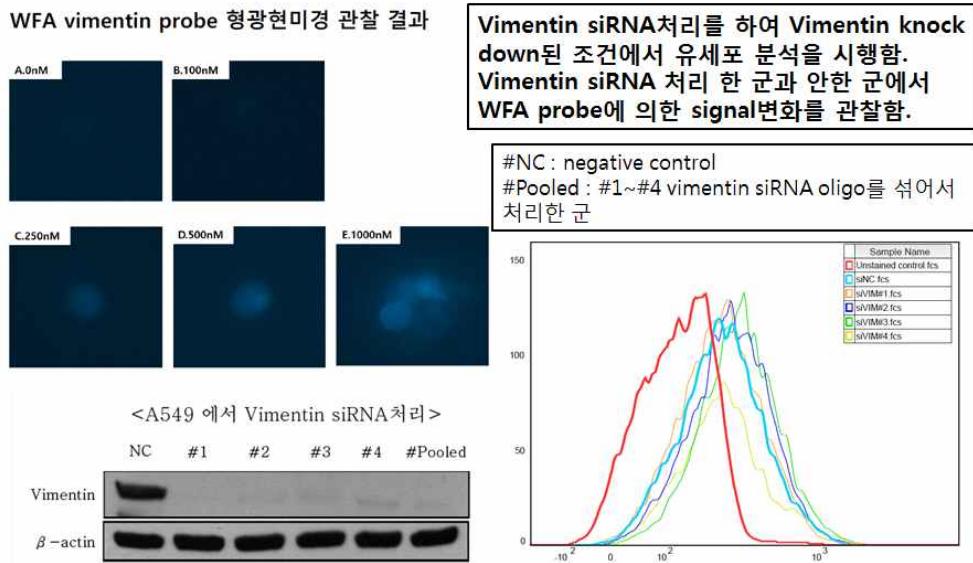


그림39. Witharein A-KF 결합체의 관찰결과 (연세대학교 제공)

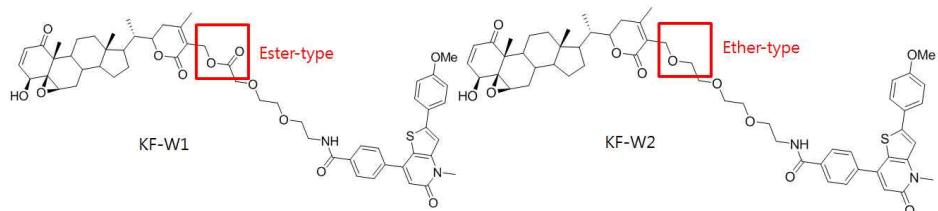


그림40. Withaferin A와 KF의 가수분해를 통한 분해를 방지하기 위한 신규유도체 합성

2. Caged-artificial peroxidase를 이용한 chemodosimeter 개발

- $[\text{Mn}2(2,6\text{-bis}((\text{bis}(\text{pyridin}-2\text{-ylmethyl})\text{amino})\text{methyl})-4\text{-methylphenolate})]^{3+}$ ($[\text{Mn}2(\text{bpmp})]^{3+}$) 유기 금속 복합체는 H_2O_2 존재 하에서 기질을 산화시키는 과 산화효소와 같은 활성을 가지고 있음.
- 리간드의 금속 결합 자리를 타겟에 선택적으로 감응하는 인지단으로 protection하여 인공 과산화효소 활성을 저해하고, 타겟에 의해 다시 deprotection 되었을 때 인공 과산화효소 활성이 조절되는 것을 통하여 타겟을 검출하는 새로운 화학 센서 플랫폼을 개발하고자 함.

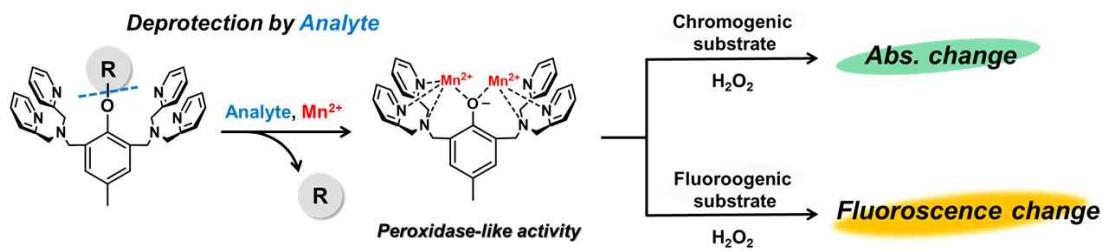


그림41. Caged-artificial peroxidase 기반 chemodosimeter 개발 모식도

- Caged-bpmp ligand 합성 및 artificial peroxidase 활성 억제 효과 확인
 - 그림41에서 언급한 화학센서 개발을 위하여 Pd(0) 이온에 선택적으로 deprotection된다고 알려진 allyl group을 Pd(0) 이온 인지단으로 하여 allyl group으로 protection된 caged-bpmp ligand를 합성함.

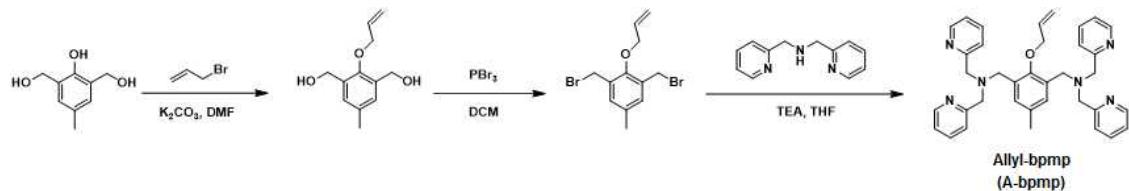


그림42. Pd(0) 이온에 선택적으로 감응하는 인지단으로 protection된 caged-bpmp ligand 합성법

- Caged-bpmp에서 artificial peroxidase 활성이 저해되는지 확인하기 위하여, 위 그림 2에서 합성한 allyl-bpmp (A-bpmp)와 가운데 hydroxyl group이 노출되어 있는 H-bpmp의 artificial peroxidase 활성을 비교함.
- H-bpmp ligand가 artificial peroxidase 활성을 보이는 Mn²⁺이온, H₂O₂, pH 7.0 buffer 조건 하에서 비색 기질인 ABTS 색이 변화하는지 확인하였을 때, H-bpmp의 경우 ABTS가 artificial peroxidase에 의해 산화되어 417 nm 흡광도가 증가하는 반면 caged-bpmp ligand의 경우 artificial peroxidase 활성이 100% 저해되는 것을 확인함.

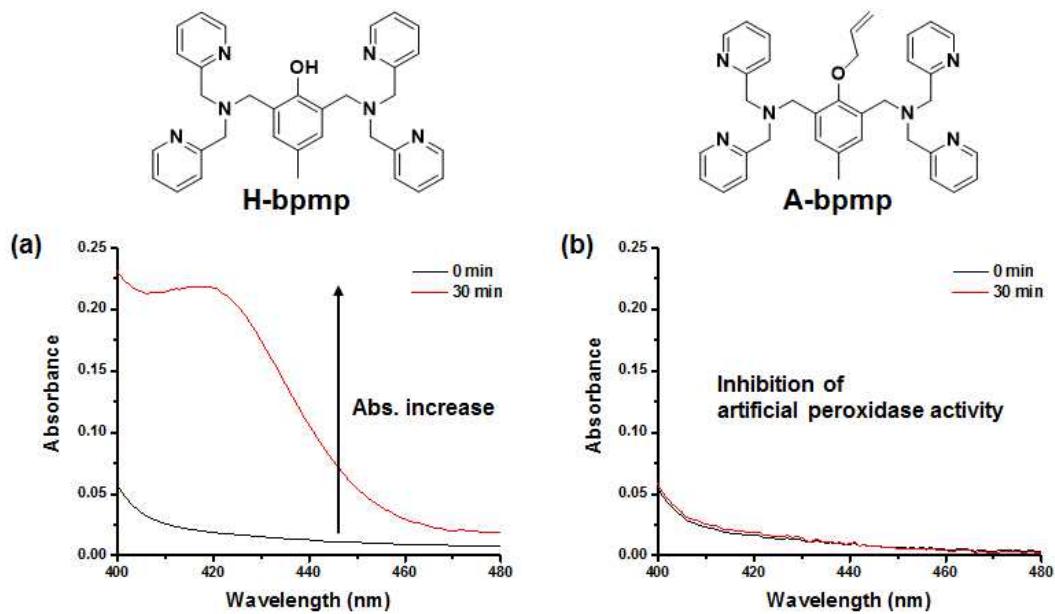


그림43. BPMP ligand의 금속 이온 결합 자리인 hydroxyl group protection에 따른 artificial peroxidase 활성 비교 a) H-bpmp ligand 사용, b) A-bpmp ligand 사용

- Caged-artificial peroxidase 기반 Pd 이온 검출
 - A-bpmp의 allyl group deprotection을 위해 $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 를 이용하여 $\text{Pd}(0)$ 이온의 영향을 확인함.
 - $\text{Pd}(0)$ 이온 자체가 artificial peroxidase 활성에 영향을 주진 않지만, A-bpmp 가 $\text{Pd}(0)$ 이온이 있을 때 Mn^{2+} 이온 없이도 artificial peroxidase 활성을 보이는 것으로 확인됨. Allyl group에 배위된 $\text{Pd}(0)$ 이온의 영향으로 생각됨.
 - 금속 이온의 경우 bpmp ligand와 결합하였을 때 미약하게 artificial peroxidase 활성을 보이기 때문에 타겟 검출 응용이 어려울 것으로 생각되어, 다른 anion 타겟 감응 인지단을 도입한 caged-bpmp ligand 합성 진행 중.

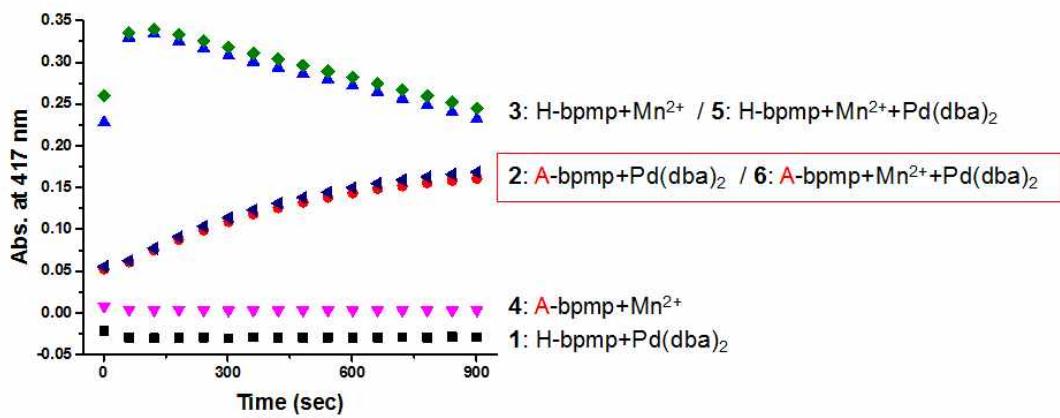


그림44. Pd(0) 이온에 의한 caged-bpmp ligand의 artificial peroxidase 활성 영향 비교

3. Thienopyridinone library 기반 human serum albumin 형광 센서 개발

- Thienopyridinone library 기반 blood protein 스크리닝
 - 본 과제에서 개발한 thienopyridinone library를 이용하여 특정 단백질에 대해 뛰어난 선택성을 갖는 형광 화학센서를 개발하기 위하여, 그림 5의 14 종류의 형광 물질을 이용하여 blood 내 높은 비율로 존재하는 주요 blood protein인 human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA), globulin, fibrinogen, transferrin 5 개 종류 단백질에 대하여 형광 변화 스크리닝을 진행함.

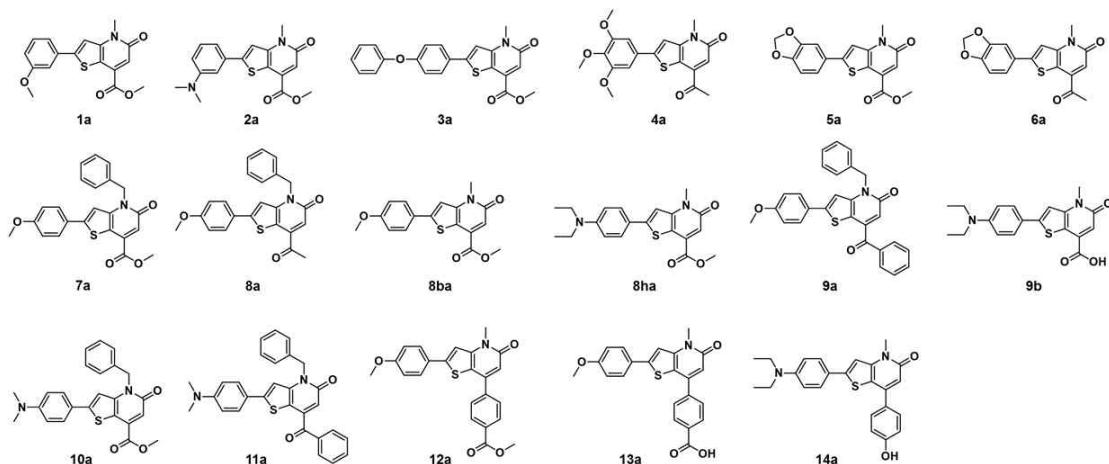


그림45. Blood protein 스크리닝에 이용한 14 개의 thienopyridinone derivative 구조

- pH 5, pH 7, pH 9 3 가지 pH 조건에서 dye 5 μM , blood protein 10 μM (형광 물질 대비 2 당량)일 때 형광 변화를 스크리닝한 결과, 9b 물질이 염기 조건

에서 HSA에 높은 선택성을 보이고 형광 신호가 크게 증가하는 것으로 확인 됨.

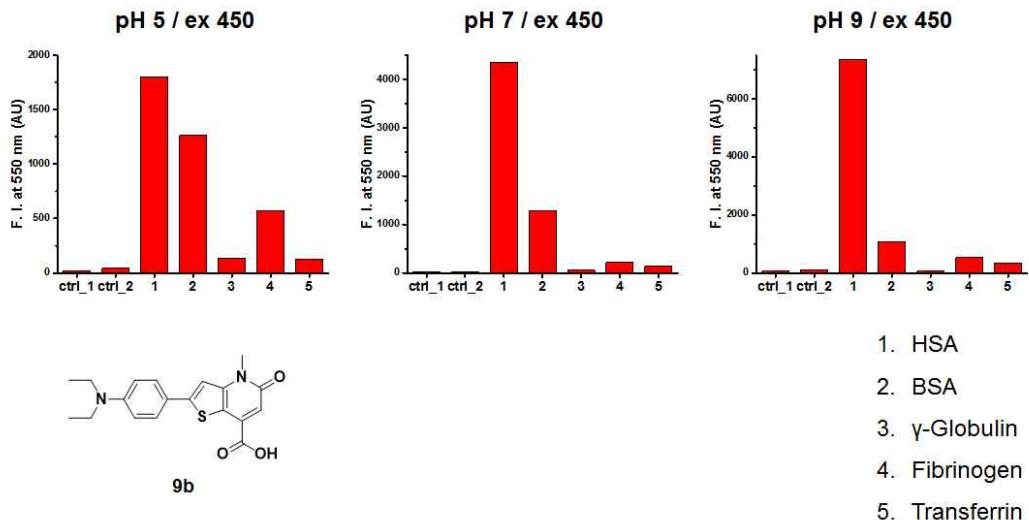


그림46. Blood protein에 대한 9b의 형광 변화 확인 결과

- 위 1차 blood protein 스크리닝을 통해 선정된 **9b** 물질을 이용하여 human serum albumin (HSA) 형광 센서를 개발하기 위하여 구체적인 형광 센서 작동 조건을 탐색함.
- 기존의 HSA 형광 센서들의 많은 문제로 꼽히고 있는 bovine serum albumin (BSA) 이 구분되지 않는 문제를 해결하기 위해, HSA/BSA 구분이 가장 뚜렷한 pH 9, 10% DMSO 조건에서 HSA 검출 실험을 진행함.

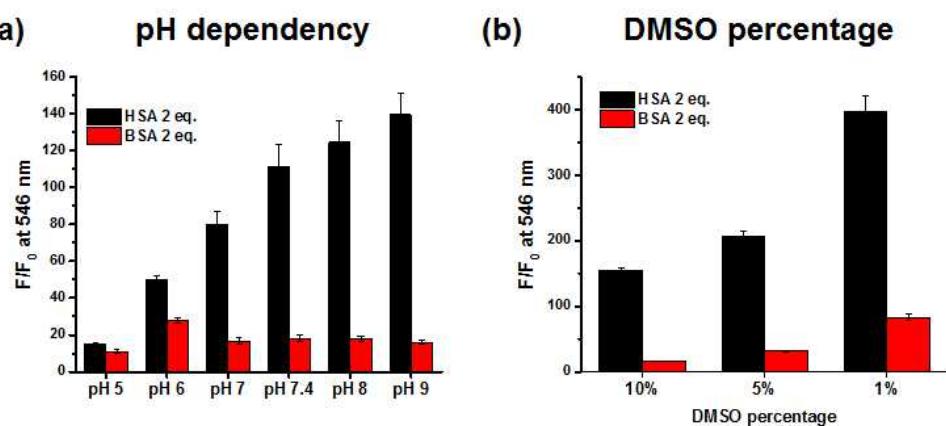


그림47. **9b** 물질을 이용한 HSA/BSA 구분 확인 실험 a) pH 영향 확인,
b) 유기용매 (DMSO) 비율 영향 확인

- 9b** 물질을 이용하여 HSA 정량 가능성을 확인하였고, HSA 존재시 형광 신호가 최대 160 배 증가하는 것을 확인함. **9b** 물질의 HSA 검출 한계는 4 nM로 실제 urine 내 HSA 검출에 사용할 수 있을 정도의 의미있는 수준이며 기존에 보고 된 HSA 형광 센서와 비교했을 때에도 매우 낮은 검출 한계임.

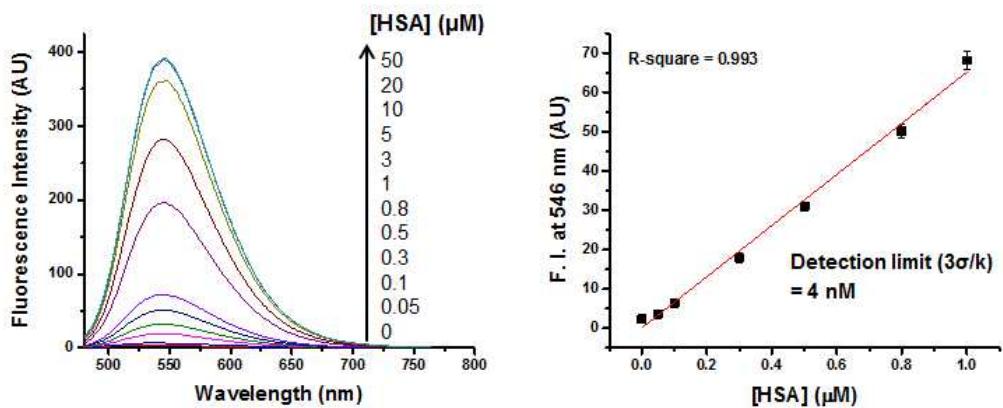


그림48. 9b 물질을 이용한 human serum albumin 정량 확인 및 검출 한계

- 1차 스크리닝에서 진행했던 5 종류의 주요 blood protein 외 blood 내에서 확인되는 다른 protein들에 대한 선택성 확인 실험을 진행함, HSA에 높은 선택성을 보이고 BSA와 뚜렷하게 구분이 가능함을 확인.

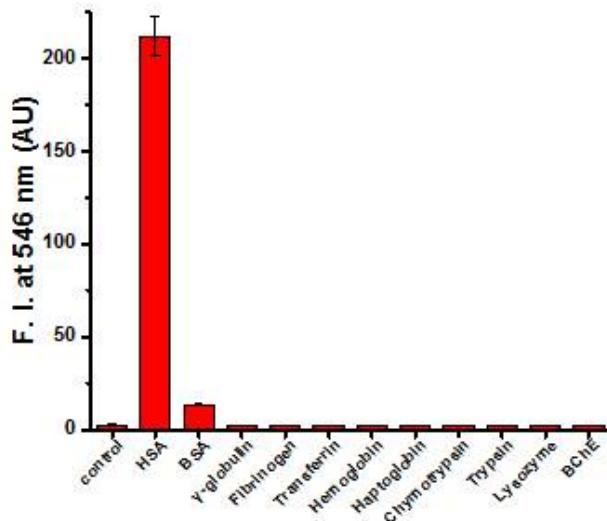


그림49. 9b 물질의 HSA 선택성 확인 실험 결과

- HSA에 대한 9b 물질의 dissociation constant (K_d) 측정 결과, $8.77 \mu\text{M}$ 로 9b 물질이 HSA 강하게 binding하는 것으로 확인됨.

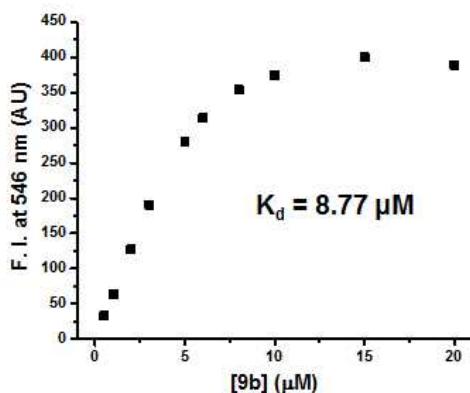


그림50. HSA에 대한 binding constant
확인 실험 결과

- 9b 물질이 HSA에 결합하는 당량수를 확인하기 위하여 Job's plot 실험 결과, 1:1 binding임을 확인함, HSA의 여러 가지 ligand binding site 중에 어떤 site에 결합하는지 확인하기 위하여 기존에 잘 알려진 site-binding drug인 ibuprofen (site 3A, 1A), digitoxin (site 3A), warfarin (2A), salicylic acid (2A, 1A)를 이용하여 경쟁 실험한 결과 ibuprofen, digitoxin과 유사한 binding site (3A)에 결합하는 것으로 확인됨.

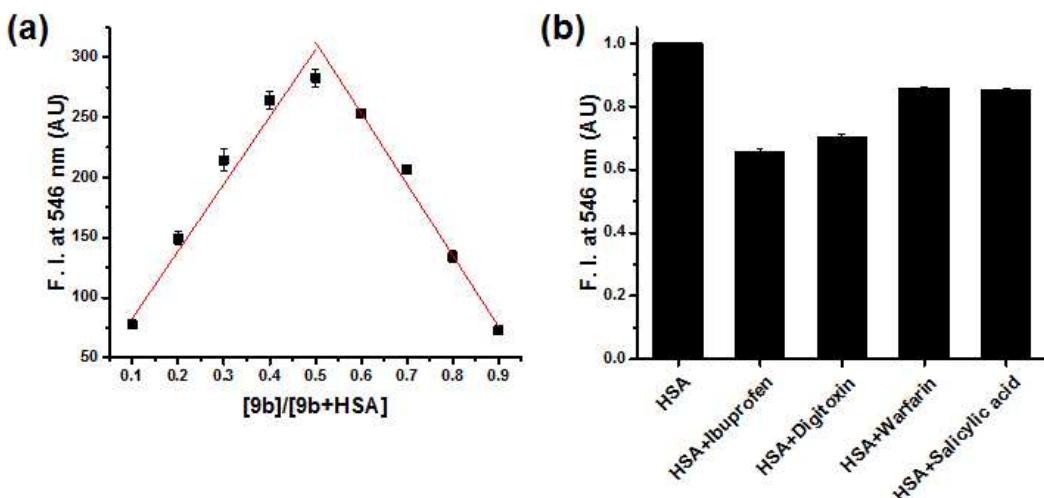


그림51. a) Job's plot 실험 결과 및 b) 9b 물질의 HSA binding site 확인 실험 결과

- 9b 물질이 실제 샘플에서도 HSA 검출에 응용 가능한지 확인하기 위하여 artificial urine 내에서 간섭없이 정확하게 HSA 검출이 가능한지 확인함, Albuminuria 질병 진단 기준인 30-300 mg/L 수준의 HSA 뿐 아니라 실제 urine 내 HSA 양인 5 mg/L (약 380 nM)의 낮은 농도 수준까지 artificial urine 내에

서 검출 가능함을 확인함.

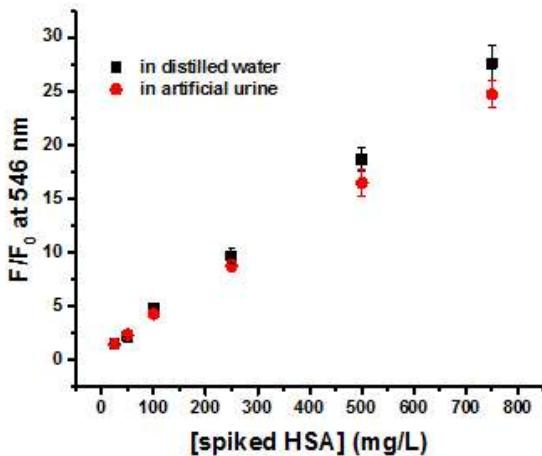


그림52. Artificial urine을 이용한 실제 시료 내 HSA 검출 가능성 확인 실험 결과

- 위 연구 내용을 종합하여 현재 thienopyridinone 기반 HSA 검출 형광 센서 개발에 대한 논문 투고 준비 중.

4. Ca²⁺이온센서 개발

- Ca²⁺이온센서의 설계
 - Ca²⁺이온은 세포의 증식, 유전자 조절, 세포 사멸 등 세포의 기본적인 기능과 대사활동, 신경세포에서 시냅스의 활동과 감극신호 (depolarizing signal) 전달에 관여하는 중요 인자임. 따라서 세포 내 Ca²⁺이온농도의 측정은 세포활동 특히 신경세포의 작동 메커니즘을 이해하기 위해 중요함. KIEST-Fluor 기반 Ca²⁺이온센서를 개발하기 위해 Ca²⁺이온에 선택적으로 칠레이션 (chelation) 하는 것으로 알려져 있는 BAPTA ((1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid))를 인지단으로 도입하여 분자설계를 했고 합성을 수행중임 (그림53).

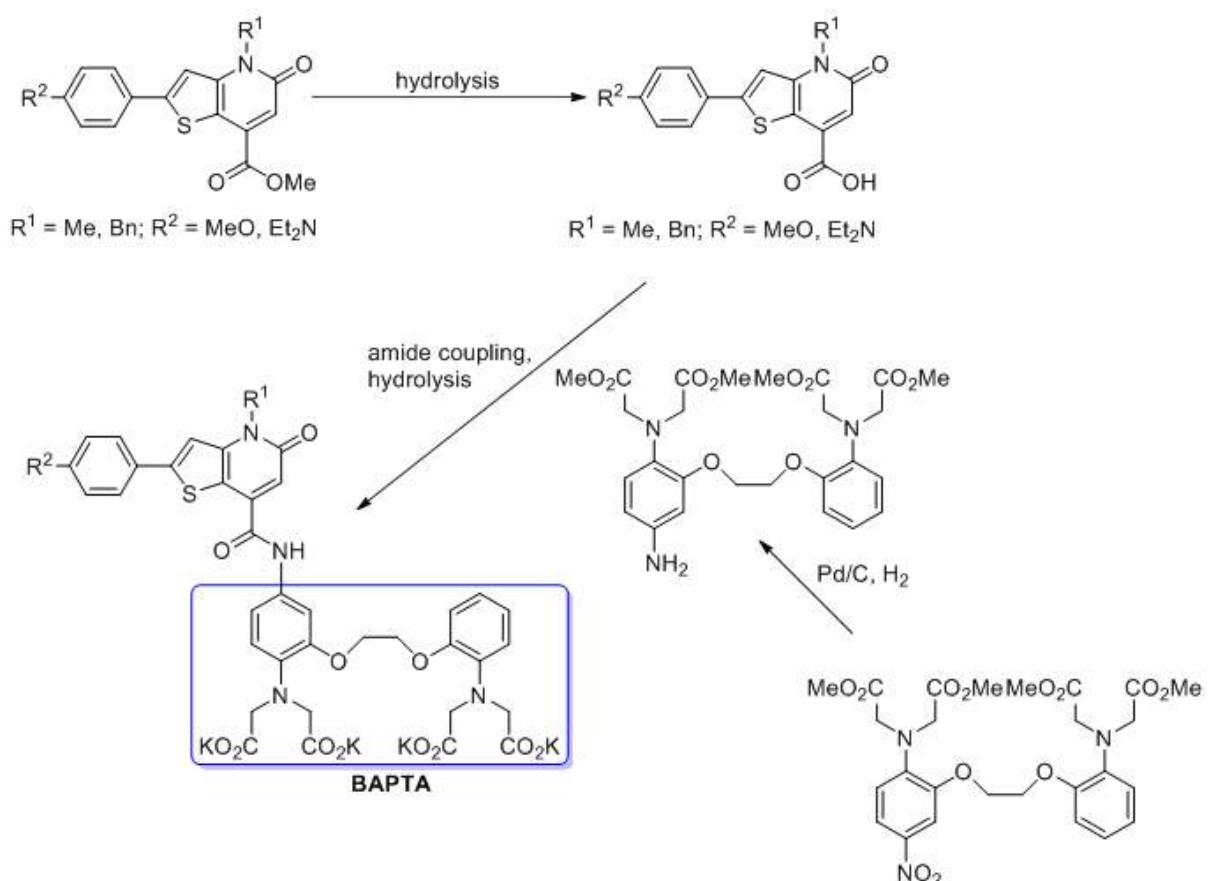


그림53. Calcium specific chelator인 BAPTA를 인지단으로 도입한 Ca²⁺이온센서의 설계

제 4 절 실험방법 및 화합물 데이터

1. 기기 및 시약

- 모든 무수 용매 및 시약은 반응용으로 사용했으며, 별도의 정제과정을 거치지 않았음. 또한 유기반응추적을 위해 0.25mm 실리카겔이 피막 된 유리판을 사용하였음. 컬럼크로마토그래피는 실리카겔 (70-230 메쉬)을 사용하여 정제된 용매로 분리하였음.
- ¹H와 ¹³C의 스펙트럼 데이터는 Varian Unity-Inova 500MHz와 Bruker 600MHz 핵자기공명분광기를 사용하여 얻었음. Chemical shift는 CDCl₃에서 CHCl₃ (δ 7.26)와 dimethylsulfoxide (DMSO-d₆)에서는 DMSO (δ 2.50)와 비교하여 δ (ppm) 단위를 사용하며, 결합 상수는 Hz로 나타내었음. 녹는점 측정은 녹는점 측정기 기로 기록했으며, 보정하지 않았음. 고분해능질량분석기는 한국기초과학연구원

에 의뢰하여 magenetic sector-electric sector double focusing mass analzer and electron ionization, and Fast atom bombardment 모드로 측정하였음. 광물리적 특성은 (흡수, 방출, 여기, 양자효율과 분자흡광계수) Shimadzu UV1650PC 와 형광 분광광도계 Scinco FS-2 (1cm quartz cell)로 측정하였음.

2. 합성

- 화합물 **2a**, **2b**에 대한 일반적인 합성방법: 출발물질 methyl 3-amino-5-bromothiophene-2-carboxylate 1 (1.00g, 4.24 mmol, 1.0 당량)을 DMF (N,N-dimethylformamide, 40mL)에 용해시킨 후, NaH (60% in mineral oil dispersion, 237 mg, 11.9 mmol, 1.4 당량)을 0 °C에서 적가한 후, 10분 동안 교반함. 교반 후, methyl iodide를 (343 μL, 5.51 mmol, 1.3 당량)을 적가 하여 상온에서 18시간 교반함. 반응이 완결되면, 물 (50 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 50 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그래피하여 하얀색 고체 화합물 **2a** (783 mg, 3.13 mmol, 74%)를 얻었음.
 - Methyl 5-bromo-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**2a**): ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.67 (br s, 1H), 6.63 (s, 1H), 3.78 (s, 3H), 2.93 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.4, 156.5, 121.8, 119.5, 99.2, 51.3, 31.7; 데이터는 문헌에서 보고된 것과 일치함.
 - Methyl 3-(benzylamino)-5-bromothiophene-2-carboxylate (**2b**): 출발물질 benzyl bromide (1.59 g, 9.32 mmol, 1.1 당량)을 사용하여 하얀색 고체 화합물 **2b** (1.71g, 5.24 mmol, 62%)를 얻었음. m.p: 76–77 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.31–7.29 (m, 2H), 7.25–7.20 (m, 3H), 6.54 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.38 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 3.75 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 164.3, 155.4, 138.5, 128.9, 127.6, 127.0, 121.8, 119.9, 100.1, 51.3, 49.0; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₃H₁₂BrNO₂S [M]⁺ 324.9772, found 324.9774.
- 화합물 **3a-3s**에 대한 일반적인 합성방법: 출발물질 **2a** (250 mg, 1.00 mmol, 1.0 당량)을 툴루엔 (2.5 mL, 0.25M), phenyl boronic acid (146 mg, 1.20 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (50.9 mg, 0.050 mmol, 0.05 당량)과 sodium carbonate (127 mg, 1.20 mmol, 1.2 당량)을 녹인 3차 중류수 (1 mL)를 적가하고 반응 혼합물을 110 °C 온도에 가열하여 5시간동안 교반함. 반응이 종결된 후, 3차 중류수 (5 mL)를 넣은 후, EtOAc (ethyl acetate, 4 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층을 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그래피하여 옅은 노란색 고체 화합물 **3a** (128 mg, 0.517 mmol, 52%)를 얻었음.

- Methyl-3-(methylamino)-5-phenylthiophene-2-carboxylate (**3a**): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.64–7.62 (m, 2H), 7.41–7.39 (m, 2H), 7.34–7.34 (m, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.68 (br s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.02 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 157.5, 149.8, 133.7, 129.0, 128.99, 126.1, 111.7, 97.5, 51.1, 31.7; 테이터는 문현에서 보고된 것과 일치함.
- 2.2.2 Methyl-(4-methoxyphenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3b**): 출발물질 **2a** (600 mg, 2.40 mmol, 1.0 당량), 4-methoxyphenylboronic acid (437 mg, 1.84 mmol, 1.2 당량), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (139 mg, 0.12 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (7.2 mL)와 톤투엔 (9.6 mL)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **3b** (404 mg, 1.46 mmol, 61%)를 얻었음. m.p: 138–139 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (dd, $J = 6.9$ Hz와 $J = 2.1$ Hz, 2H), 6.92 (dd, $J = 6.9$ Hz와 $J = 2.1$ Hz, 2H), 6.75 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 160.5, 157.7, 150.0, 127.5, 126.5, 114.4, 110.7, 96.7, 55.5, 51.1, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ [M]⁺ 277.0773, found 277.0772.
- Methyl-(3-methoxyphenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3c**): 출발물질 **2a** (300 mg, 1.20 mmol, 1.0 당량), 3-methoxyphenylboronic acid (219 mg, 1.44 mmol, 1.2 당량), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (69.4 mg, 0.06 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (3 mL)와 톤투엔 (4.8 mL)을 사용하여 노란색 고체 **3c** (218 mg, 0.786 mmol, 66%)를 얻었음. m.p: 49–50 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.30 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.22 (dt, $J = 7.5$ Hz와 $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.14 (t, $J = 2.0$ Hz, 1H), 6.90 (dd, $J = 2.5$ Hz와 $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.66 (br s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (d, $J = 5.5$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 157.6, 151.2, 150.9, 134.5, 129.7, 114.6, 113.3, 111.7, 110.0, 97.2, 51.2, 40.7, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ [M]⁺ 277.0773, found 277.0775.
- Methyl-(2-methoxyphenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3d**): 출발물질 **2a** (300 mg, 1.20 mmol, 1.0 당량), 2-methoxyphenylboronic acid (219 mg, 1.44 mmol, 1.2 당량), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (69.4 mg, 0.06 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (3 mL)와 톤투엔 (4.8 mL)을 사용하여 노란색 액체 **3d** (217 mg, 0.782 mmol, 65%)를 얻었음. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.67 (dd, $J = 7.5$ Hz와 $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 7.02–6.98 (m, 2H), 6.70 (br s, 1H), 3.95 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 165.6, 156.7, 156.6, 145.5, 130.0, 128.7, 122.5, 121.1, 113.9,

111.9, 98.7, 55.8, 51.2, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₄H₁₅NO₃S [M]⁺ 277.0773, found 277.0775.

- Methyl-3-(methylamino)-5-(4-phenoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (**3e**): 출발물질 **2a** (200 mg, 0.800 mmol, 1.0 당량), (4-phenoxyphenyl)boronic acid (205 mg, 0.960 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (46.2 mg, 0.04 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (2 mL)와 톨루엔 (3.2 mL)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **3e** (220 mg, 0.648 mmol, 81%)를 얻었음. m.p: 75–76 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.60–7.58 (m, 2H), 7.38–7.36 (m, 2H), 7.15 (tt, *J* = 7.5 Hz와 *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.07–7.05 (m, 2H), 7.03–7.00 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.03 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 158.4, 157.6, 156.6, 149.4, 130.0, 128.7, 127.6, 124.0, 119.5, 118.9, 111.3, 97.1, 51.2, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₉H₁₇NO₃S [M]⁺ 339.0929, found 339.0932.
- Methyl-5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3f**): 출발물질 **2a** (400 mg, 1.60 mmol, 1.0 당량), benzo[d][1,3]dioxol-5-ylboronic acid (318 mg, 1.92 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (92.4 mg, 0.080 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (4.8 mL)와 톨루엔 (6.4 mL)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **3f** (319 mg, 1.09 mmol, 68%)를 얻었음. m.p: 124–125 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.14 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.09 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.82 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.73 (s, 1H), 6.00 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 157.6, 149.9, 148.6, 148.3, 128.1, 120.3, 111.2, 108.8, 106.6, 101.6, 96.9, 51.2, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₄H₁₃NO₄S [M]⁺ 291.0565, found 291.0567.
- Methyl-5-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3g**): 출발물질 **2a** (250 mg, 1.00 mmol, 1.0 당량), (2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-boronic acid (216 mg, 1.20 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (57.0 mg, 0.050 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (2 mL)와 톨루엔 (2.5 mL)을 사용하여 옅고 끈적한 노란색 고체 **3g** (274 mg, 0.897 mmol, 90%)를 얻었음. m.p: 50–51 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.11 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.08 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.83 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.64 (br s, 1H), 4.22 (s, 4H), 3.79 (s, 3H), 2.97 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.2, 157.5, 149.5, 144.5, 143.6, 127.2, 119.3, 117.6, 114.8, 110.8, 96.6, 64.4, 64.3, 50.9, 31.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₅H₁₅NO₄S [M]⁺ 305.0722, found 305.0720.
- Methyl 3-(methylamino)-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate

(3h): 출발물질 **2a** (485 mg, 1.94 mmol, 1.0 당량), (3,4,5-trimethoxyphenyl)boronic acid (493 mg, 2.33 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (112 mg, 0.10 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (5.8 mL)와 톨루엔 (7.8 mL)을 사용하여 노란색 고체 **3h** (438 mg, 1.30 mmol, 67%)를 얻었음. m.p: 135–136 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.82 (s, 2H), 6.77 (s, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.91 (s, 3H), 3.83 (s, 3H), 3.05 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 157.3, 153.7, 150.1, 139.2, 129.5, 111.7, 103.7, 93.0, 61.1, 56.4, 51.3, 31.9; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₄H₁₃NO₄S [M]⁺ 337.0987, found 337.0897.

- Methyl 5-(4-(dimethylamino)phenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate
(3i): 출발물질 **2a** (300 mg, 1.20 mmol, 1.0 당량), (4-(dimethylamino)phenyl)boronic acid (237 mg, 1.43 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (69.3 mg, 0.060 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (2 mL)와 톨루엔 (4.8 mL)을 사용하여 옅은 빨간색 고체 **3i** (194 mg, 0.668 mmol, 56%)를 얻었음. m.p: 130–132 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.52 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.71 (s, 1H), 6.70 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.02 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H), 3.01 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.5, 158.1, 151.3, 151.0, 127.2, 121.7, 112.2, 109.2, 95.5, 51.1, 40.4, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₅H₁₈N₂O₂S [M]⁺ 290.1089, found 290.1092.
- Methyl 5-(3-(dimethylamino)phenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate
(3j): 출발물질 **2a** (300 mg, 1.20 mmol, 1.0 당량), (3-(dimethylamino)phenyl)boronic acid (237 mg, 1.43 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (69.3 mg, 0.060 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (2 mL)와 톨루엔 (4.8 mL)을 사용하여 옅은 빨간색 고체 **3j** (194 mg, 0.668 mmol, 56%)를 얻었음. m.p: 102–103 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.00 (dd, *J* = 7.2 Hz와 *J* = 1.2 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.84 (s, 1H), 6.74 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.67 (br s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.04 (d, *J* = 5.4 Hz, 3H), 3.00 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.4, 150.9, 134.5, 129.7, 114.6, 113.3, 111.7, 110.0, 97.2, 51.2, 40.7, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₅H₁₈N₂O₂S [M]⁺ 290.1089, found 290.1087.
- Methyl 5-(2-(dimethylamino)phenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate
(3k): 출발물질 **2a** (200 mg, 0.800 mmol, 1.0 당량), (2-(dimethylamino)phenyl)boronic acid (158 mg, 0.960 mmol, 1.2 당량), Pd(PPh₃)₄ (46.0 mg, 0.040 mmol, 0.05 당량), 0.4M sodium carbonate (1 mL)와 DMF (4.8 mL)을 사용하여 노란색 액체 **3k** (174 mg, 0.599 mmol, 75%)를 얻었

음. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.56 (dd, $J = 7.8 \text{ Hz}$ 와 $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.28 (td, $J = 7.8 \text{ Hz}$ 와 $J = 1.4 \text{ Hz}$, 1H), 7.14 (dd, $J = 7.8 \text{ Hz}$ 와 $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 7.05 (td, $J = 7.2 \text{ Hz}$ 와 $J = 1.2 \text{ Hz}$, 1H), 6.99 (s, 1H), 6.64–6.63 (m, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.02 (d, $J = 5.4 \text{ Hz}$, 3H), 2.68 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.8, 156.7, 151.9, 147.9, 129.6, 129.4, 128.0, 123.0, 119.9, 113.5, 98.8, 51.0, 44.3, 31.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 290.1089, found 290.1093.

- Methyl 5-(4-(diethylamino)phenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3l**): 출발물질 **2a** (400 mg, 1.60 mmol, 1.0 당량), *N,N*-diethyl-4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)aniline (528 mg, 1.92 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (92.3 mg, 0.0800 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (2 mL)와 툴루엔 (6.4 mL)을 사용하여 주황색 액체 **3l** (490 mg, 1.54 mmol, 96%)를 얻었음. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.49 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 2H), 6.70 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 9.0 \text{ Hz}$, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.37 (q, $J = 7.3 \text{ Hz}$, 4H), 3.03 (d, $J = 5.0 \text{ Hz}$, 3H), 1.19 (t, $J = 7.0 \text{ Hz}$, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 158.0, 151.4, 148.4, 127.3, 120.6, 111.4, 108.7, 95.1, 50.9, 44.5, 31.7, 12.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 318.1402, found 318.1405.
- Methyl 3-(methylamino)-5-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thiophene-2-carboxylate (**3m**): 출발물질 **2a** (100 mg, 0.400 mmol, 1.0 당량), 4-(4-methyl)piperazinylboronic acid (145 mg, 0.480 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (23.0 mg, 0.0200 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (0.5 mL)와 DMF (1.6 mL)을 사용하여 갈색 고체 **3m** (113 mg, 0.327 mmol, 82%)를 얻었음. m.p: 153–154 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 6.91 (d, $J = 8.4 \text{ Hz}$, 2H), 6.74 (s, 1H), 6.67 (br s, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.28 (t, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 4H), 3.02 (d, $J = 5.4 \text{ Hz}$, 3H), 2.57 (t, $J = 5.1 \text{ Hz}$, 4H), 2.36 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.5, 157.9, 151.7, 150.5, 127.1, 124.6, 115.5, 110.0, 96.2, 55.0, 51.1, 48.4, 46.3, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 345.1511, found 345.1508.
- Methyl 3-(methylamino)-5-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)thiophene-2-carboxylate (**3n**): 출발물질 **2a** ((100 mg, 0.400 mmol, 1.0 당량)을 dioxane:H₂O (3:1, 1.6 mL)에 용해시킨 후, (2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)boronic acid (96.0 mg, 0.440 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (9.00 mg, 0.0400 mmol, 0.1 equiv.), 1,1'-bis(diphenylphosphino)ferrocene (dpff, 22.2 mg, 0.0400 mmol, 0.1 equiv.)와 Cs_2CO_3 (260 mg, 0.800 mmol, 2.0 equiv.)를 적가함. 반응 혼합물을 110

° C에서 가열하여 18시간 교반시킨다. 반응이 완결되면, 물 (2 mL)을 넣고 DCM (dichloromethane, 3 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하고 캘럼크로마토그래피하여 끈적한 적주황색 액체 **3n** (45.0 mg, 0.131 mmol, 33%)를 얻었음. m.p: 157-159 ° C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.08 (s, 2H), 6.65 (s, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.19 (t, $J = 5.7$ Hz, 4H), 3.01 (d, $J = 4.8$ Hz, 3H), 2.76 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.00-1.95 (m, 4H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 158.1, 151.8, 143.8, 124.8, 121.3, 120.6, 108.6, 94.6, 50.9, 50.0, 31.7, 27.8, 21.9; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 342.1402, found 342.1404.

- Methyl 5-(4-(diphenylamino)phenyl)-3-(methylamino)thiophene-2-carboxylate (**3o**): 출발물질 **2a** (500 mg, 2.00 mmol, 1.0 당량), (4-(diphenylamino)phenyl)boronic acid (693 mg, 2.40 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (116 mg, 0.100 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (3 mL)와 툴루엔 (8 mL)을 사용하여 노란색 고체 **3o** (728 mg, 1.76 mmol, 88%)를 얻었음. m.p: 69-71 ° C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.94-7.47 (m, 2H), 7.30-7.27 (m, 4H), 7.14-7.12 (m, 4H), 7.08-7.04 (m, 4H), 6.77 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.02 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 157.7, 150.0, 148.8, 147.3, 129.5, 127.2, 126.9, 125.1, 123.7, 122.8, 110.6, 96.7, 51.2, 31.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 414.1402, found 414.1404.
- Methyl 3-(methylamino)-5-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)thiophene-2-carboxylate (**3p**): 출발물질 **2a** (400 mg, 1.60 mmol, 1.0 equiv.), (4-(trifluoromethoxy)phenyl)boronic acid (395 mg, 1.92 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (92.0 mg, 0.0800 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (4.8 mL)와 툴루엔 (6.4 mL)을 사용하여 노란색 고체 **3p** (365 mg, 1.10 mmol, 69%)를 얻었다. m.p: 68-70 ° C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.24 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.03 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 157.4, 149.7 (q, $J = 1.9$ Hz), 148.1, 132.6, 127.6, 121.5, 120.6 (q, $J = 256.1$ Hz), 112.3, 98.2, 51.3, 31.8; ^{19}F NMR (600 MHz, CDCl_3) δ -57.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_3\text{S}$ [M]⁺ 331.0490, found 331.0490.
- Methyl 3-(methylamino)-5-(4(trifluoromethyl)phenyl)thiophene-2-carboxylate (**3q**): 출발물질 **2a** (400 mg, 1.60 mmol, 1.0 equiv.), (4-(trifluoromethyl)phenyl)boronic acid (365 mg, 1.92 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (92.0 mg, 0.080 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (4.8 mL)와 툴루엔 (6.4 mL)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **3q** (345 mg, 1.09 mmol, 68%)를 얻

었음. m.p: 93–95 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.04 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 157.3, 147.6, 137.2, 130.7, (q, $J = 32.5$ Hz), 126.3, 126.1 (q, $J = 3.7$ Hz), 124.1 (q, $J = 270.6$ Hz), 112.9, 98.8, 51.4, 31.8; ^{19}F NMR (600 MHz, CDCl_3) δ -62.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{NO}_2\text{S}$ [M]⁺ 315.0541, found 315.0543.

- Methyl 3-(benzylamino)-5-(4-methoxyphenyl)thiophene-2-carboxylate (**3r**): 출발물질 **2b** (500 mg, 1.53 mmol, 1.0 equiv.), 4-methoxyphenylboronic acid (280 mg, 1.84 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (88.6 mg, 0.080 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (4 mL)와 톤투엔 (6.1 mL)을 사용하여 노란색 고체 **3r** (392 mg, 1.11 mmol, 73%)를 얻었음. m.p: 100–102 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.50 (dd, $J = 6.6$ Hz와 $J = 1.8$ Hz, 2H), 7.37–7.33 (m, 4H), 7.29–7.26 (m, 1H), 7.22 (br s, 1H), 6.89 (dd, $J = 6.6$ Hz와 $J = 2.4$ Hz, 2H), 6.70 (s, 1H), 4.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.82 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.5, 160.5, 156.7, 150.0, 139.0, 128.9, 127.49, 127.45, 127.1, 126.4, 114.4, 111.2, 97.5, 55.5, 51.2, 49.1; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}$ [M]⁺ 353.1086, found 353.1088.
- Methyl 3-(benzylamino)-5-(4(dimethylamino)phenyl)thiophene-2-carboxylate (**3s**): 출발물질 **2b** (500 mg, 1.53 mmol, 1.0 equiv.), (4-(dimethylamino)phenyl)boronic acid (304 mg, 1.84 mmol, 1.2 equiv.), $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (88.6 mg, 0.080 mmol, 0.05 equiv.), 0.4 M sodium carbonate (2 mL)와 톤투엔 (6.1 mL)을 사용하여 옅은 빨간색 고체 **3s** (371 mg, 1.01 mmol, 66%)를 얻었음. m.p: 135–136 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.46–7.44 (m, 2H), 7.37–7.33 (m, 4H), 7.28–7.25 (m, 2H), 6.67–6.66 (m, 3H), 4.53 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.99 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.5, 157.0, 151.3, 151.0, 139.2, 128.8, 127.4, 127.2, 121.6, 112.2, 109.8, 96.3, 51.1, 49.1, 40.4; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ [M]⁺ 366.1402, found 366.1405.

- 화합물 **5a–5s**에 대한 일반적인 합성 방법:

- 출발물질 **3a** (150 mg, 0.600 mmol, 1.0 당량)을 에탄올 (4 mL, 0.25 M)에 용해 시킨 후, 1N KOH (2 mL)을 적가한 후, 반응 혼합물을 70 °C로 가열하여 1 시간 동안 교반함. 반응이 완결되면, 용매를 감압 농축하여 별도의 분리 없이 사용함. 실리카겔 (750 mg, 출발물질의 500% 무게비)을 에틸아세트 (2 mL)와 메탄올 (2 mL, 1:1 비율)에 용해하여 60 °C로 가열하여 2시간동안 교반함. 반응이 종결되면, 실리카겔은 여과하고 물 (5 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl

acetate, 5 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그래피하여 하얀색 고체 화합물 **5a** (105 mg, 0.555 mmol, 92%)를 얻었음.

- *N*-methyl-5-phenylthiophen-3-amine (**5a**): ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.59–7.57 (m, 2H), 7.37 (td, J = 7.2 Hz and J = 1.8 Hz, 2H), 7.28 (tt, J = 7.2 Hz와 J = 1.5 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.48 (br s, 1H), 2.85 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 150.3, 143.6, 134.7, 128.9, 127.6, 125.6, 116.0, 95.0, 32.7; 데이터는 문헌에서 보고된 것과 일치함.
- 5-(4-Methoxyphenyl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5b**): 출발물질 **3b** (185 mg, 0.667 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **5b** (130 mg, 0.593 mmol, 89%)를 얻었음. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (dd, J = 6.6 Hz와 J = 1.8 Hz, 2H), 6.91 (dd, J = 6.6 Hz와 J = 2.4 Hz, 2H), 6.74 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.87 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 2.84 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 159.3, 150.3, 143.6, 127.6, 126.9, 115.1, 114.3, 94.0, 55.5, 32.8; 데이터는 문헌에서 보고된 것과 일치함.
- 5-(3-Methoxyphenyl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5c**): 출발물질 **3c** (182 mg, 0.656 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 갈색 오일 **5c** (122 mg, 0.556 mmol, 85%)를 얻었음. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.36 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.27 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.23 (s, 1H), 6.93 (dd, J = 2.5 Hz와 J = 8.0 Hz, 1H), 6.89 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.99 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.71 (br s, 1H), 2.87 (s, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 159.8, 150.2, 142.9, 135.8, 129.7, 117.9, 116.1, 112.7, 111.0, 94.5, 55.1, 32.4; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NOS}$ [M]⁺ 219.0718, found 219.0717.
- 5-(2-Methoxyphenyl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5d**): 출발물질 **3d** (204 mg, 0.736 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 암녹색 오일 **5d** (139 mg, 0.634 mmol, 86%)를 얻었음. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.62 (dd, J = 7.5 Hz and J = 1.5 Hz, 1H), 7.26 (td, J = 7.9 Hz and J = 1.8 Hz, 1H), 7.09 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 7.01–6.96 (m, 2H), 6.00 (d, J = 1.5 Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.63 (br s, 1H), 2.84 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 155.8, 149.6, 138.7, 128.28, 128.25, 123.4, 120.8, 118.5, 111.6, 95.6, 55.5, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NOS}$ [M]⁺ 219.0718, found 219.0716.
- *N*-Methyl-5-(4-phenoxyphenyl)thiophen-3-amine (**5e**): 출발물질 **3e** (56.0 mg,

0.165 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 노란색 고체 **5e** (33.2 mg, 0.118 mmol, 72%)를 얻었음. m.p: 84–85 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.53 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.38–7.36 (m, 2H), 7.14 (tt, *J* = 7.2 Hz와 *J* = 1.1 Hz, 1H), 7.07–7.05 (m, 2H), 7.01 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.79 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 5.91 (d, *J* = 1.2 Hz, 1 H), 2.85 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 157.1, 156.9, 150.3, 143.0, 129.95, 129.90, 127.0, 123.5, 119.14, 119.06, 115.6, 94.5, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C17H15NOS [M]⁺ 281.0874, found 281.0871.

- 5-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5f**): 출발물질 **3f** (28.0 mg, 0.0961 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 녹색 고체 **5f** (16.3 mg, 0.0699 mmol, 73%)를 얻었음. m.p: 65–66 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.05–7.03 (m, 2H), 6.80 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 5.97 (s, 2H), 5.86 (s, 1H), 3.63 (br s, 1H), 2.83 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.2, 148.1, 147.3, 143.5, 129.1, 119.4, 115.5, 108.7, 106.4, 101.3, 94.2, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C12H11NO2S [M]⁺ 233.0511, found 233.0508.
- 5-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-*N*-methylthiophen-3amine (**5g**): 출발물질 **3g** (256 mg, 0.838 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 갈색 오일 **5g** (160 mg, 0.647 mmol, 77%)를 얻었음. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.09–7.04 (m, 2H), 6.85 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 5.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 4.27 (s, 4H), 3.61 (br s, 1H), 2.83 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.2, 143.7, 143.3, 143.2, 128.5 119.0, 117.6, 115.3, 114.5, 94.1, 64.53, 64.50, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C13H13NO2S [M]⁺ 247.0667, found 247.0668.
- *N*-Methyl-5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)thiophen-3-amine (**5h**): 출발물질 **3h** (400 mg, 1.19 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 갈색 오일 **5h** (298 mg, 1.07 mmol, 90%)를 얻었음. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.77 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 6.75 (s, 2H), 5.89 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 3.89 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 2.83 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 153.4, 150.2, 143.5, 137.8, 130.5, 115.9, 103.1, 94.7, 61.0, 56.2, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C14H17NO3S [M]⁺ 279.0929, found 279.0930.
- 5-(4-(Dimethylamino)phenyl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5i**): 출발물질 **3i** (1.20 g, 4.13 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 옅은 갈색 오일 **5i** (600 mg, 2.58 mmol, 62%)를 얻었음. m.p: 125–127 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.71–6.70 (m, 3H), 5.81 (s, 1H), 2.98 (s, 6H), 2.84 (s, 3H); ¹³C

NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.2, 150.1, 144.5, 126.6, 123.3, 114.0, 112.6, 93.0, 40.6, 32.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₃H₁₆N₂S [M]⁺ 232.1034, found 232.1033.

- 5-(3-(Dimethylamino)phenyl)-N-methylthiophen-3-amine (**5j**): 출발물질 **3j** (159 mg, 0.547 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 갈색 액체 **5j** (109 mg, 0.469 mmol, 86%)를 얻었음. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.26 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.94–6.93 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 6.70 (dd, *J* = 8.0 Hz 와 *J* = 2.5 Hz, 1H), 5.93 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 3.38 (br s, 1H), 3.01 (s, 6H), 2.85 (s, 3H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.9, 150.1, 144.6, 135.4, 129.5, 115.9, 114.4, 112.0, 109.9, 94.6, 40.7, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₃H₁₆N₂S [M]⁺ 232.1034, found 232.1032.
- 5-(2-(Dimethylamino)phenyl)-N-methylthiophen-3-amine (**5k**): 출발물질 **3k** (170 mg, 0.585 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 액체 **5k** (110 mg, 0.473 mmol, 81%)를 얻었음. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.23 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.11 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 5.99 (s, 1H), 3.56 (br s, 1H), 2.86 (s, 3H), 2.67 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 151.3, 149.1, 141.4, 129.5, 128.9, 128.1, 122.8, 119.5, 117.9, 96.4, 44.2, 32.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₃H₁₆N₂S [M]⁺ 232.1034, found 232.1035.
- 5-(4-(Diethylamino)phenyl)-N-methylthiophen-3-amine (**5l**): 출발물질 **3l** (80.8 mg, 0.254 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 적갈색 고체 **5l** (41.5 mg, 0.159 mmol, 63%)를 얻었음. m.p: 88–90 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.44 (dd, *J* = 6.5 Hz 와 *J* = 2.3 Hz, 2H), 6.70–6.67 (m, 3H), 5.81 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H), 3.62 (br s, 1H), 3.39 (q, *J* = 7.0 Hz, 4H), 2.84 (s, 3H), 1.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 6H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 150.2, 147.3, 144.6, 126.8, 122.1, 113.7, 111.7, 92.6, 44.5, 32.7, 12.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₅H₂₀N₂S [M]⁺ 260.1347, found 260.1346.
- *N*-Methyl-5-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)thiophen-3-amine (**5m**): 출발물질 **3m** (180 mg, 0.521 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 갈색 고체 **5m** (123 mg, 0.428 mmol, 82%)를 얻었음. m.p: 149–150 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.84 (s, 1H), 3.60 (br s, 1H), 3.24 (t, *J* = 4.8 Hz, 4H), 2.83 (s, 3H), 2.57 (t, *J* = 5.1 Hz, 4H), 2.35 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.7, 150.3, 143.9, 126.5,

126.1, 115.9, 114.6, 93.6, 55.2, 48.9, 46.3, 32.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₆H₂₁N₃S [M]⁺ 287.1456, found 287.1459.

- *N*-Methyl-5-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1ij]quinolin-9-yl)thiophen-3-amine (**5n**): 출발물질 **3n** (100 mg, 0.292 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 암갈색 고체 **5n** (74.3 mg, 0.261 mmol, 89%)를 얻었음. m.p: 66–68 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.00 (s, 2H), 6.65 (s, 1H), 5.78 (s, 1H), 3.63 (br s, 1H), 3.16 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 2.83 (s, 3H), 2.77 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 2.00–1.96 (m, 4H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.1, 145.0, 142.7, 124.5, 122.3, 121.6, 113.6, 92.8, 50.1, 32.8, 27.8, 22.1; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₂₀N₂S [M]⁺ 284.1347, found 284.1346.
- 5-(4-(Diphenylamino)phenyl)-*N*-methylthiophen-3-amine (**5o**): 출발물질 **3o** (406 mg, 0.979 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 적갈색 고체 **5o** (150 mg, 0.421 mmol, 43%)를 얻었음. m.p: 125–126 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.41 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.29–7.25 (m, 4H), 7.11 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 7.05–7.02 (m, 4H), 6.77 (s, 1H), 5.88 (s, 1H), 2.84 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) 150.3, 147.7, 147.3, 143.5, 129.4, 128.9, 126.4, 124.6, 123.8, 123.1, 115.2, 94.3, 32.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₃H₂₀N₂S [M]⁺ 356.1347, found 356.1349.
- *N*-Methyl-5-(4-(trifluoromethoxy)phenyl)thiophen-3-amine (**5p**): 출발물질 **3p** (339 mg, 1.02 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 녹색 고체 **5p** (224 mg, 0.820 mmol, 80%)를 얻었음. m.p: 121–123 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (dd, J = 6.6 Hz와 J = 1.8 Hz, 2H), 7.21 (d, J = 9.0 Hz와 J = 0.6 Hz, 2H), 6.82 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 5.95 (d, J = 1.2 Hz, 1H), 2.85 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.4, 148.6, 141.9, 133.5, 126.9, 121.4, 119.8 (q, J = 255.6 Hz), 116.5, 95.5, 32.7; ¹⁹F NMR (600 MHz, CDCl₃) δ -57.9; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₂H₁₀F₃NOS [M]⁺ 273.0435, found 273.0437.
- *N*-Methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)thiophen-3-amine (**5q**): 출발물질 **3q** (172 mg, 0.545 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 연녹색 고체 **5q** (112 mg, 0.435 mmol, 80%)를 얻었음. m.p: 116–118 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.92 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 6.00 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 2.86 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.6, 141.7, 138.1, 129.3 (q, J = 32.4 Hz), 125.9 (q, J = 3.8 Hz), 125.6, 124.3 (q, J = 270.1 Hz), 117.0, 96.3, 32.7; ¹⁹F NMR (600 MHz, CDCl₃) δ -62.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₂H₁₀F₃NS [M]⁺ 257.0486, found 257.0483.

- *N*-Benzyl-5-(4-methoxyphenyl)thiophen-3-amine (**5r**): 출발물질 **3r** (336 mg, 0.951 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **5r** (278 mg, 0.941 mmol, 99%)를 얻었음. m.p: 92–93 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.42–7.41 (m, 2H), 7.38–7.35 (m, 2H), 7.30 (tt, *J* = 7.2 Hz와 *J* = 1.7 Hz, 1H), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.78 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 5.89 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.83 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 159.3, 148.8, 143.5, 139.4, 128.7, 127.8, 127.5, 127.4, 126.9, 115.2, 114.3, 94.9, 55.5, 50.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₈H₁₇NOS [M]⁺ 295.1031, found 295.1033.
- *N*-Benzyl-5-(4-(dimethylamino)phenyl)thiophen-3-amine (**5s**): 출발물질 **3s** (350 mg, 0.955 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 적갈색 고체 **5s** (230 mg, 0.746 mmol, 78%)를 얻었음. m.p: 125–126 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.45–7.41 (m, 4H), 7.37 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.30 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 6.74–6.740 (m, 1H), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 5.84 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 4.29 (s, 2H), 3.95 (br s, 1H), 2.98 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 150.1, 148.7, 144.4, 139.5, 128.7, 127.8, 127.4, 126.6, 123.2, 114.1, 112.6, 93.9, 50.5, 40.6; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₉H₂₀N₂S [M]⁺ 308.1347, found 308.1351.
- 화합물 **6a–6q**에 대한 일반적인 합성방법:
 - 출발물질 **5a** (29.4 mg, 0.155 mmol, 1.0 당량)에 DMF (1.5 mL, 0.1 M)을 용해한 후, mono-methyl fumarate (25.0 mg, 0.186 mmol, 1.2 당량), BOP (Benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate, 83.0 mg, 0.186 mmol, 1.2 당량)와 *N,N*-diisopropylethylamine (67.0 μL, 0.388 mmol, 1.2 당량)을 적가함. 반응 혼합물을 상온에서 교반하고 반응이 종결되면, 물 (3 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 5 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 캘럼크로마토그래피하여 옅은 노란색 액체 **6a** (21.2 mg, 0.0703 mmol, 45%)를 얻었음.
 - Ethyl 4-methyl-5-oxo-2-phenyl-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6a**): ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.56 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.39 (t, *J* = 12.5 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 6.99 (s, 1H), 4.03 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.03 (ddd, *J* = 7.7 Hz와 *J* = 16.2 Hz, *J* = 31.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 167.2, 143.9, 140.4, 133.8, 129.2, 128.2, 125.6, 113.3, 112.5, 52.9, 38.4, 34.4, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₆H₁₅NO₃S [M]⁺ 301.0773, found 301.0770.

- Methyl 2-(4-methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6b**): 출발물질 **5b** (50.0 mg, 0.228 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 연노란색 고체 **6b** (36.3 mg, 0.109 mmol, 48%)를 얻었음. m.p: 164–165 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.48 (dd, *J* = 6.9 Hz 와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.92 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.88 (s, 1H), 4.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.02 (ddd, *J* = 48.9 Hz와 *J* = 16.2 Hz, *J* = 7.5 Hz, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.4, 167.2, 159.8, 143.9, 140.3, 126.9, 126.7, 114.5, 112.4, 111.3, 55.5, 52.9, 38.4, 34.5, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₁₇NO₄S [M]⁺ 331.0878, found 331.0876.

- Methyl 2-(3-methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6c**): 출발물질 **5c** (121 mg, 0.552 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 갈색 액체 **6c** (106 mg, 0.320 mmol, 58%)를 얻었음. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.28 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.05–7.06 (m, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.84 (dd, *J* = 2.3 Hz와 *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.01 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.33 (s, 3H), 3.00 (ddd, *J* = 46.8 Hz와 *J* = 19.2 Hz, *J* = 8.9 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 167.0, 160.1, 143.5, 140.3, 135.0, 130.1, 118.0, 113.5, 113.4, 112.5, 111.2, 55.4, 52.8, 38.3, 34.3, 30.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₁₇NO₄S [M]⁺ 331.0878, found 331.0876.

- Methyl 2-(2-methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6d**): 출발물질 **5d** (136 mg, 0.620 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 연갈색 고체 **6d** (134 mg, 0.404 mmol, 65%)를 얻었음. m.p: 160–161 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.59 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.28 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.01–6.98 (m, 2H), 4.02 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.02 (ddd, *J* = 57.8 Hz와 *J* = 19.4 Hz, *J* = 8.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 167.2, 155.8, 139.6, 139.0, 129.0, 128.0, 122.6, 121.1, 115.3, 113.1, 111.7, 55.7, 52.8, 38.4, 34.5, 30.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₁₇NO₄S [M]⁺ 331.0878, found 331.0881.

- Methyl 4-benzyl-2-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6e**): 출발물질 **5r** (69.4 mg, 0.235 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 연갈색 고체 **6e** (73.3 mg, 0.180 mmol, 77%)를 얻었음. m.p: 99–100 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.36 (dd, *J* = 4.2 Hz와

J = 2.4 Hz, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.28–7.24 (m, 3H), 6.86 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.73 (s, 1H), 5.19 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.99 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.04 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.13 (ddd, *J* = 47.7 Hz와 *J* = 16.2 Hz, *J* = 6.9 Hz, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 167.4, 159.7, 143.7, 139.6, 137.0, 128.9, 127.5, 126.94, 126.92, 126.6, 114.5, 112.9, 111.8, 55.5, 52.9, 47.0, 38.5, 34.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{NO}_4\text{S}$ [M]⁺ 407.1191, found 407.1188.

- 2-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-6,7-dihydrothieno[3,2-*b*] pyridin-5(4H)-one (**6f**): 출발물질 **5b** (40.0 mg, 0.182 mmol, 1.0 당량)와 acrylic acid (15.0 μL , 0.218 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 흰색 고체 **6f** (38.2 mg, 0.140 mmol, 77%)를 얻었음. m.p: 152–153 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.46 (dd, *J* = 9.5 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.91 (dd, *J* = 9.5 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 2H), 6.87 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 2.94 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 168.7, 159.5, 141.6, 139.8, 127.0, 126.8, 115.3, 114.5, 112.5, 55.5, 32.3, 30.5, 20.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2\text{S}$ [M]⁺ 273.0824, found 273.0825.
- Methyl 4-methyl-5-oxo-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydronothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6g**): 출발물질 **5e** (33.0 mg, 0.117 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **6g** (25.0 mg, 0.0635 mmol, 54%)를 얻었음. m.p: 56–58 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.51 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.38–7.35 (m, 2H), 7.14 (tt, *J* = 7.8 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.05–7.04 (m, 2H), 7.02 (dd, *J* = 2.4 Hz와 *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.91 (s, 1H), 4.02 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.03 (ddd, *J* = 47.1 Hz, *J* = 16.5 Hz and *J* = 7.2 Hz, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.3, 167.1, 157.6, 156.8, 143.3, 140.4, 130.0, 128.9, 127.1, 123.8, 119.3, 119.2, 112.9, 111.9, 52.9, 38.4, 34.4, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{NO}_4\text{S}$ [M]⁺ 393.1035, found 393.1039.
- Methyl 2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7tetrahydronothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6h**): 출발물질 **5f** (40.5 mg, 0.174 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **6h** (32.8 mg, 0.0950 mmol, 55%)를 얻었음. m.p: 150–151 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.03 (dd, *J* = 8.0 Hz 와 *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.00 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.83 (s, 1H), 6.79 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 5.97 (s, 2H), 3.99 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.32 (s, 3H), 3.00 (ddd, *J* = 49.4 Hz와 *J* = 19.7 Hz, *J* = 8.9 Hz, 2H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3)

δ 171.3, 167.1, 148.3, 147.8, 143.7, 140.2, 128.1, 119.4, 112.7, 111.5, 108.8, 106.2, 101.5, 52.8, 38.3, 34.4, 30.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₁₅NO₅S [M]⁺ 345.0671, found 345.0668.

- Methyl 2-(2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-4-methyl-5oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6i**): 출발물질 **5g** (145 mg, 0.586 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **6i** (130 mg, 0.362 mmol, 62%)를 얻었음. m.p: 126-128 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.02 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 6.99 (dd, *J* = 2.3 Hz와 *J* = 9.0 Hz, 1H), 6.82-6.80 (m, 2H), 4.23 (s, 4H), 3.95 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.74 (s, 3H), 3.28 (s, 3H), 2.96 (ddd, *J* = 51.9 Hz와 *J* = 19.8 Hz, *J* = 8.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.2, 167.0, 143.8, 143.7, 143.3, 140.1, 127.3, 118.7, 117.7, 114.3, 112.5, 111.4, 64.44, 64.39, 52.7, 38.2, 34.3, 30.4; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₈H₁₇NO₅S [M]⁺ 359.0827, found 359.0825.
- Methyl 4-methyl-5-oxo-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6j**): 출발물질 **5h** (80.0 mg, 0.286 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **6j** (60.4 mg, 0.154 mmol, 54%)를 얻었음. m.p: 133-134 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 6.89 (s, 1H), 6.73 (s, 2H), 4.02 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.91 (s, 6H), 3.86 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.36 (s, 3H), 3.02 (ddd, *J* = 38.4 Hz와 *J* = 16.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.3, 167.2, 153.7, 144.0, 140.2, 138.4, 129.6, 113.2, 112.2, 103.2, 61.1, 56.4, 52.9, 38.3, 34.4, 30.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₉H₂₁NO₆S [M]⁺ 391.1090, found 391.1088.
- Methyl 2-(4-(dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6k**): 출발물질 **5i** (91.6 mg, 0.394 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 주황갈색 고체 **6k** (83.1 mg, 0.241 mmol, 61%)를 얻었음. m.p: 121-123 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.43 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.82 (s, 1H), 6.72 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 3.99 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.02 (m, 8H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.6, 167.3, 150.4, 144.8, 140.2, 126.6, 122.1, 112.6, 111.1, 110.0, 52.8, 40.6, 38.4, 34.5, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₈H₂₀N₂O₃S [M]⁺ 344.1195, found 344.1193.
- Methyl 2-(3-(dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6l**): 출발물질 **5j** (114 mg, 0.491 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 갈색 고체 **6l** (102 mg, 0.296 mmol, 61%)를 얻었음. m.p:

99–100 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.24 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.96 (s, 1H), 6.92 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 6.86 (s, 1H), 6.70 (dd, J = 8.4 Hz 와 J = 2.4 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.35 (s, 3H), 3.08–2.96 (m, 8H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 167.2, 151.0, 144.9, 140.2, 134.5, 129.8, 114.2, 113.1, 112.5, 112.0, 109.5, 52.9, 40.7, 38.4, 34.4, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 344.1195, found 344.1193.

- Methyl 2-(2-(dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6m**): 출발물질 **5k** (105 mg, 0.452 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 액체 **6m** (118 mg, 0.342 mmol, 76%)를 얻었음. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.52 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.24 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.16 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 7.06 (t, J = 7.2 Hz, 1H), 4.03 (t, J = 6.9 Hz, 1H), 3.79 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.04 (ddd, J = 7.1 Hz 와 J = 16.4 Hz, J = 60.2 Hz, 2H), 2.65 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.6, 167.2, 151.0, 140.9, 139.0, 128.6, 128.5, 128.4, 123.6, 120.5, 114.5, 113.9, 52.7, 44.4, 38.4, 34.5, 30.4; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 344.1195, found 344.1197.
- Methyl 4-benzyl-2-(4-(dimethylamino)phenyl)-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6n**): 출발물질 **5s** (60.0 mg, 0.194 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 주황색 액체 **6n** (66.3 mg, 0.158 mmol, 81%)를 얻었음. ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.33–7.27 (m, 6H), 7.25–7.22 (m, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.67 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.19 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.99 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.02 (t, J = 6.6 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.12 (ddd, J = 49.8 Hz 와 J = 16.2 Hz, J = 6.6 Hz, 2H), 2.96 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 171.4, 167.4, 150.3, 144.6, 139.4, 137.0, 128.7, 127.3, 126.9, 126.5, 121.9, 112.4, 111.6, 110.3, 52.7, 46.8, 40.4, 38.4, 34.6; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 420.1508, found 420.1505.
- Methyl 2-(4-(diethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6o**): 출발물질 **5l** (160 mg, 0.614 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 끈적한 주황색 고체 **6o** (166 mg, 0.446 mmol, 73%)를 얻었음. m.p: 62–64 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.39 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.79 (s, 1H), 6.64 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 3.97 (t, J = 7.0 Hz, 1H), 3.77 (s, 3H), 3.38 (q, J = 7.2 Hz, 4H), 3.33 (s, 3H), 3.00 (ddd, J = 46.6 Hz 와 J = 16.3 Hz, J = 7.1 Hz, 2H), 1.18 (t, J = 7.3 Hz, 6H); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 171.5, 167.2, 147.7, 145.0, 140.1, 126.7, 120.9, 111.7, 110.7, 109.5, 52.7, 44.4,

38.3, 34.5, 30.5, 12.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₀H₂₄N₂O₃S [M]⁺ 372.1508, found 372.1505.

- Methyl 4-methyl-2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-oxo4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6p**): 출발물질 **5m** (50.0 mg, 0.174 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 연주황색 고체 **6p** (26.1 mg, 0.0653 mmol, 38%)를 얻었음. m.p: 112-114 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.86 (s, 1H), 4.00 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.30-3.28 (m, 4H), 3.02 (ddd, *J* = 49.8 Hz와 *J* = 16.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.34-2.62 (m, 4H), 2.39 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 171.5, 167.2, 151.0, 144.2, 140.3, 126.6, 125.2, 116.0, 111.9, 110.8, 55.0, 52.9, 48.5, 46.1, 38.4, 34.5, 30.6; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₁H₂₅N₃O₃S [M]⁺ 399.1617, found 399.1615.
- Methyl 4-methyl-5-oxo-2-(2,3,6,7-tetrahydro-1H,5H-pyrido[3,2,1-*ij*]quinolin-9-yl)-4,5,6,7-tetrahydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**6q**): 출발물질 **5n** (70.0 mg, 0.246 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 주황색 고체 **6q** (63.6 mg, 0.160 mmol, 65%)를 얻었음. m.p: 135-137 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.00 (s, 2H), 6.77 (s, 1H), 3.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H), 3.78 (s, 3H), 3.34 (s, 3H), 3.19 (m, 4H), 3.01 (ddd, *J* = 44.0 Hz와 *J* = 16.3 Hz, *J* = 7.8 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 6.5 Hz, 4H), 2.00 (m, 4H); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 171.6, 167.3, 145.3, 143.1, 140.1, 125.0, 124.4, 121.7, 121.6, 121.1, 110.6, 109.4, 52.8, 50.1, 38.4, 34.6, 30.6, 27.8, 22.0; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₂H₂₄N₂O₃S [M]⁺ 396.1508, found 396.1504.

- 화합물 KF-1 ~ KF-5, KF-12 ~ KF-19, KF-22 ~ KF-24에 대한 일반적인 합성 방법 (Route B):

- Methyl 4-methyl-5-oxo-2-phenyl-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-1**): 출발물질 **6a** (20.2 mg, 0.0670 mmol, 1.0 당량)을 DMF (0.7 mL, 0.25 M)로 용해하여 potassium carbonate (14.0 mg, 0.100 mmol, 1.5 당량)을 적가한 다음 반응 혼합물을 70 °C로 가열하여 1시간동안 교반함. 반응 종결 후, 물 (1 mL)을 넣고 반응이 완결되면, 물 (2 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 3 mL)로 3번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 캘럼크로마토그래피하여 노란색 고체 **KF-1** ((9.60 mg, 0.0320 mmol, 48%)를 얻었음. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.41 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.23 (s, 1H), 4.02 (s, 3H), 3.79 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.1,

162.4, 151.3, 145.8, 134.1, 133.4, 129.5, 129.4, 126.4, 119.0, 115.7, 111.3, 53.3, 32.4; 데이터는 문헌에서 보고된 것과 일치함.

- Methyl 2-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-2**): 출발물질 **6b** (60.0 mg, 0.181 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-2** (29.5 mg, 0.0896 mmol, 50%)를 얻었음. ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.65 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 6.97 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.87 (s, 3H), 3.79 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.2, 162.5, 160.8, 151.6, 146.0, 134.1, 127.7, 126.0, 118.1, 114.8, 110.1, 55.6, 53.3, 32.4. 데이터는 문헌에서 보고된 것과 일치함.
- Methyl 2-(3-Methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-3**): 출발물질 **6c** (60.0 mg, 0.181 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-3** (54.8 mg, 0.166 mmol, 65%)를 얻었음. m.p: 155–156 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.34 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.29 (d, *J* = 4.2 Hz, 2H), 7.26–7.25 (m, 1H), 6.98 (dd, *J* = 8.1 Hz 와 *J* = 2.7 Hz, 1H), 4.05 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 3.82 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.1, 162.3, 160.3, 151.0, 145.7, 134.6, 134.0, 130.4, 119.0, 118.8, 115.6, 115.0, 111.8, 111.4, 55.6, 53.3, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for C17H15NO4S [M]⁺ 329.0722, found 329.0719.
- Methyl 2-(2-Methoxyphenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-4**): 출발물질 **6d** (98.6 mg, 0.297 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-4** (47.8 mg, 0.145 mmol, 49%)를 얻었음. m.p: 164–168 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.70 (dd, *J* = 8.0 Hz 와 *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.35 (td, *J* = 8.0 Hz 와 *J* = 1.5 Hz, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.05–7.01 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 3.97 (s, 3H), 3.75 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 162.5, 156.5, 147.2, 145.2, 134.1, 130.5, 128.9, 122.1, 121.3, 118.6, 116.4, 113.6, 112.0, 55.8, 53.2, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for C17H15NO4S [M]⁺ 329.0722, found 329.0722.
- Methyl 4-Benzyl-2-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-5**): 출발물질 **6e** (42.3 mg, 0.104 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-5** (17.8 mg, 0.0439 mmol, 42%)를 얻었음. m.p: 143–145 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (dd, *J* = 6.9 Hz 와 *J* = 2.1 Hz, 2H), 7.32–7.26 (m, 6H), 7.06 (s, 1H), 6.93 (dd, *J* = 6.6 Hz 와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 5.52 (s, 2H), 4.02 (s, 3H), 3.84 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.2,

162.4, 160.8, 151.4, 145.6, 135.9, 134.4, 129.1, 127.9, 127.7, 127.2, 126.0, 118.4, 115.4, 114.7, 110.7, 55.6, 53.3, 48.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₃H₁₉NO₄S [M]⁺ 405.1035, found 405.1032.

- Methyl 4-Methyl-5-oxo-2-(4-phenoxyphenyl)-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-12**): 출발물질 **6g** (24.2 mg, 0.0615 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-12** ((15.0 mg, 0.0383 mmol, 63%)를 얻었음. m.p: 178–180 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.67 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 3.0 Hz, 2H), 7.38 (t, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.20–7.16 (m, 3H), 7.08–7.05 (m, 4H), 4.01 (s, 3H), 3.78 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.1, 162.4, 158.9, 156.4, 150.9, 145.9, 134.1, 130.1, 128.2, 127.9, 124.2, 119.7, 119.0, 118.6, 115.4, 110.7, 53.3, 32.4; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₂H₁₇NO₄S [M]⁺ 391.0878, found 391.0875.
- Methyl 2-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-13**): 출발물질 **6h** (32.8 mg, 0.0950 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-13** (13.0 mg, 0.0379 mmol, 40%)를 얻었음. m.p: 183–184 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.22 (dd, *J* = 7.8 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 7.16 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.87 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.04 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.77 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.1, 162.4, 151.3, 148.9, 148.6, 145.8, 134.0, 127.6, 120.6, 118.5, 115.1, 110.6, 109.1, 106.7, 101.8, 53.3, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₇H₁₃NO₅S [M]⁺ 343.0514, found 343.0513.
- Methyl 2-(2,3-Dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-14**): 출발물질 **6i** (116 mg, 0.323 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-14** (58.4 mg, 0.163 mmol, 50%)를 얻었음. m.p: 222–224 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.17–7.13 (m, 2H), 7.22 (s, 1H), 7.07 (s, 1H), 6.68 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H), 4.29 (s, 4H), 3.98 (s, 3H), 3.72 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 165.0, 162.3, 151.0, 145.8, 144.9, 144.0, 133.8, 126.8, 119.6, 118.3, 118.1, 115.1, 114.9, 110.3, 64.6, 64.5, 53.2, 32.2; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₈H₁₅NO₅S [M]⁺ 357.0671, found 357.0669.
- Methyl 4-Methyl-5-oxo-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-15**): 출발물질 **6j** (52.0 mg, 0.133 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-15** (13.3 mg, 0.0342 mmol, 26%)를 얻었음. m.p: 205–208 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.21 (s, 1H), 7.18

(s, 1H), 6.89 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.95 (s, 6H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.2, 162.4, 153.9, 151.4, 145.7, 139.5, 133.9, 129.0, 118.8, 115.4, 111.1, 103.8, 61.2, 56.5, 53.3, 32.4; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C19H19NO}_6\text{S}$ [M]⁺ 389.0933, found 389.0930.

- Methyl 2-(4-(Dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-16**): 출발물질 **6k** (60.0 mg, 0.174 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 적주황색 고체 **KF-16** (19.6 mg, 0.0572 mmol, 33%)를 얻었음. m.p: 178– 180 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.14 (s, 1H), 7.10 (s, 1H), 6.73 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 4.00 (s, 3H), 3.77 (s, 3H), 3.04 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 162.5, 152.6, 151.2, 146.4, 133.9, 127.3, 121.1, 117.2, 114.2, 112.3, 108.5, 53.2, 40.4, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C18H18N2O}_3\text{S}$ [M]⁺ 342.1038, found 342.1037.

- Methyl 2-(3-(Dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-17**): 출발물질 **6l** (81.2 mg, 0.236 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-17** (22.0 mg, 0.0642 mmol, 27%)를 얻었음. m.p: 170–172 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.29–7.26 (m, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.16 (s, 1H), 7.02 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 6.94 (s, 1H), 6.74 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.75 (s, 3H), 3.01 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.1, 162.3, 152.4, 151.0, 145.7, 134.0, 133.9, 129.9, 118.5, 115.3, 114.5, 113.5, 111.0, 109.8, 53.2, 40.6, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C18H18N2O}_3\text{S}$ [M]⁺ 342.1038 found 342.1039.

- Methyl 2-(2-(Dimethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-18**): 출발물질 **6m** (88.0 mg, 0.255 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 노란색 고체 **KF-18** (28.3 mg, 0.0826 mmol, 32%)를 얻었음. m.p: 120– 122 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.32 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.21–7.20 (m, 2H), 7.11 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.69 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 162.4, 151.9, 149.6, 145.0, 134.3, 129.9, 129.6, 127.9, 123.5, 120.4, 118.6, 117.2, 112.8, 53.1, 44.4, 32.2; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C18H18N2O}_3\text{S}$ [M]⁺ 342.1038, found 342.1041.

- Methyl 4-Benzyl-2-(4-(dimethylamino)phenyl)-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-19**): 출발물질 **6n** (50.0 mg, 0.119 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 빨간색 고체 **KF-19** (18.4 mg, 0.0440 mmol, 37%)

를 얻었음. m.p: 187–189 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.32–7.28 (m, 4H), 7.26–7.25 (m, 1H), 7.21 (s, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.69 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 5.50 (s, 2H), 4.01 (s, 3H), 3.01 (s, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 162.5, 152.5, 151.0, 146.0, 136.0, 134.3, 129.0, 127.8, 127.3, 127.2, 117.3, 114.6, 112.3, 109.1, 53.2, 48.6, 40.4; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 418.1351, found 418.1348.

- Methyl 2-(4-(Diethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-22**): 출발물질 **6o** (55.8 mg, 0.150 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 주황색 고체 **KF-22** (29.4 mg, 0.0794 mmol, 53%)를 얻었음. m.p: 146–148 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.53 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 7.02 (s, 1H), 6.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 3.97 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 3.40 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 162.5, 151.7, 148.6, 146.4, 133.8, 127.5, 120.0, 116.8, 114.0, 111.6, 108.0, 53.1, 44.5, 32.2, 12.7; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 370.1351, found 370.1354.
- Methyl 4-Methyl-2-(4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-23**): 출발물질 **6p** (24.6 mg, 0.0616 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 적갈색 고체 **KF-23** (10.0 mg, 0.0252 mmol, 41%)를 얻었음. m.p: 135–136 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, $J = 10.2$ Hz, 2H), 7.15 (s, 1H), 7.12 (s, 1H), 6.93 (d, $J = 10.8$ Hz, 2H), 3.99 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.32 (t, $J = 5.7$ Hz, 4H), 2.62 (t, $J = 5.7$ Hz, 4H), 2.38 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.3, 162.5, 151.9, 151.8, 146.2, 133.9, 127.3, 124.0, 117.8, 115.6, 114.6, 109.4, 54.9, 53.2, 48.1, 46.2, 32.3; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 397.1460 found 397.1459.
- Methyl 4-Methyl-5-oxo-2-(2,3,6,7-tetrahydro-1*H*,5*H*-pyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylate (**KF-24**): 출발물질 **6q** (50.0 mg, 0.126 mmol, 1.0 당량)을 사용하여 주황색 고체 **KF-24** (18.0 mg, 0.0456 mmol, 36%)를 얻었음. m.p: 176–177 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.16 (s, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.76 (s, 3H), 3.24–3.22 (m, 4H), 2.89 (t, $J = 6.6$ Hz, 4H), 2.10–2.08 (m, 4H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 165.4, 162.6, 153.2, 146.5, 144.2, 133.9, 125.0, 121.6, 120.0, 116.6, 114.0, 107.8, 53.1, 50.0, 32.3, 27.9, 21.8; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ [M]⁺ 394.1351, found 394.1347.

- 화합물 KF-6 ~ KF-8에 대한 합성방법 (Route C):
 - 2-(4Methoxyphenyl)-4-methylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (KF-6): 출발물질 5b (37.9 mg, 0.139 mmol, 1.0 당량)을 DCM (dichloromethane, 1.5 mL, 0.25 M)에 용해시키고 *N*-bromosuccinimide (28.0 mg, 0.193 mmol, 1.1 당량)을 0 °C에 적가한 다음 반응 혼합물을 상온에서 18시간 교반시킴. 반응이 종결되면, 물 (2 mL)을 넣고 DCM (2 mL)로 세 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그래피하여 하얀색 고체 KF-6 (16.9 mg, 0.0623 mmol, 45%)를 얻었음. m.p: 158–160 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.58 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.13 (s, 1H), 6.96 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.55 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 3.86 (s, 3H), 3.74 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 162.4, 160.6, 148.9, 145.0, 133.1, 127.6, 126.0, 117.3, 116.6, 114.7, 110.9, 55.6, 32.0; HRMS (EI): m/z calcd for C15H13NO2S [M]⁺ 271.0667, found 271.0666.
 - 2-(4-Methoxyphenyl)-4,7-dimethylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (KF-7): 출발물질 5b (60 mg, 0.2736 mmol, 1.0 당량)을 DMF (*N,N*-diethylaminoformamide, 2.0 mL, 0.14 M)에 용해시키고 crotonic acid (26.6 mg, 0.3283 mmol, 1.2 당량), BOP (145 mg, 0.3283 mmol, 1.2 당량), and DIPEA (119 μL, 0.684 mmol, 2.5 당량)을 적가한 다음 반응 혼합물을 상온에서 1시간 교반시킴. 반응이 종결되면, 물 (4 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 4 mL)로 세 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 별도의 분리를 하지 않고 사용함. 정제되지 않은 혼합물 (56.4 mg, 0.1963 mmol, 1.0 당량)을 DCM (1.5 mL, 0.13 M)에 용해하여 *N*-bromosuccinimide (42 mg, 0.2355 mmol, 1.2 당량) and p-toluenesulfonic acid (3.7 mg, 0.0196 mmol, 0.1 당량)을 적가한 다음 반응 혼합물을 상온에서 5시간 교반시킴. 반응이 종결한 후, 물 (3 mL)을 넣고 DCM (4 mL)로 세 번 추출한다. 얻어진 유기층은 무수 Na₂SO₄로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그래피하여 하얀색 고체 KF-7 (15.9 mg, 0.0557 mmol, 22%, two steps)을 얻었음. m.p: 180–182 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.58 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.12 (s, 1H), 6.95 (dd, *J* = 6.6 Hz 와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 6.37 (d, *J* = 1.2 Hz, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.35 (d, *J* = 1.2 Hz, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 162.8, 160.5, 147.5, 144.0, 127.5, 126.2, 119.3, 115.6, 114.7, 111.2, 55.6, 31.8, 19.8; HRMS (EI): m/z calcd for C16H15NO2S [M]⁺ 285.0824, found 285.0826.
 - 2-(4-Methoxyphenyl)-4-methyl-7-phenylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (KF-8): 출발물질 5b (40 mg, 0.1824 mmol, 1.0 당량)을 DMF

(*N,N*-dimethylaminoformamide, 1.8 mL, 0.1 M)에 용해시키고 trans-cinnamic acid (32.4 mg, 0.2189 mmol, 1.2 당량), BOP (97 mg, 0.2189 mmol, 1.2 당량)과 DIPEA (79 μ L, 0.456 mmol, 2.5 당량을 적가시키고 반응 혼합물을 상온에서 1 시간 교반시킴. 반응이 종결되면, 물 (4 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 4 mL)로 세 번 추출한다. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하고 별도의 분리를 하지 않고 사용함. 정제되지 않은 혼합물 (68.8 mg, 0.1969 mmol, 1.0 당량)을 DCM (2 mL, 0.1 M)에 용해하여 *N*-bromosuccinimide (42 mg, 0.2355 mmol, 1.2 당량)과 p-toluenesulfonic acid (3.7 mg, 0.0196 mmol, 0.1 당량)을 적가한 다음 반응 혼합물을 상온에서 5시간 교반시킴. 반응이 종결한 후, 물 (4 mL)을 넣고 DCM (5 mL)로 세 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그라피하여 하얀색 고체 KF-8 (16.4 mg, 0.0472 mmol, 15%, two steps)을 얻었음. m.p: 165–167 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.68–7.67 (m, 2H), 7.58 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.52–7.49 (m, 3H), 7.19 (s, 1H), 6.93 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 6.60 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.77 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 162.8, 160.6, 148.8, 147.1, 145.0, 137.5, 129.7, 129.1, 127.8, 127.5, 126.0, 117.4, 114.9, 114.7, 111.2, 55.6, 31.9; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{NO}_2\text{S}$ [M]⁺ 347.0980, found 347.0977.

- 화합물 KF-9 ~ KF-11, KF-20 ~ KF-21, KF-25 ~ KF-27에 대한 일반적인 합성 방법 (Route A)
 - 7-Acetyl-2-(4-methoxyphenyl)-4-methylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (KF-9): 출발물질 5b (30.0 mg, 0.137 mmol, 1.0 당량)을 DMF (1.4 mL)에 용해하여 2-oxo-4-pentenoic acid (18.7 mg, 0.164 mmol, 1.2 당량), BOP (77 mg, 0.164 mmol, 1.2 당량)과 DIPEA (61 μ L, 0.343 mmol, 2.5 당량)을 적가한 다음 반응 혼합물을 상온에서 30분 동안 교반함. 반응이 종결된 후, 물 (1 mL)을 넣고 EtOAc (ethyl acetate, 2 mL)로 세 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하고 컬럼크로마토그라피하여 노란색 고체 KF-9 (9.6 mg, 0.0320 mmol, 48%)을 얻었음. m.p: 221–222 °C; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 7.64 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.13 (s, 1H), 7.09 (s, 1H), 6.96 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 3.86 (s, 3H), 3.78 (s, 3H), 2.65 (s, 3H); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 197.9, 163.0, 160.8, 152.8, 146.1, 139.1, 127.7, 126.1, 118.3, 114.7, 113.1, 109.6, 55.6, 32.4, 26.3; HRMS (EI): m/z calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_3\text{S}$ [M]⁺ 313.0773, found 313.0772.
 - 7-Acetyl-4-benzyl-2-(4-methoxyphenyl)thieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (KF-10): 출발물질 5r (60.0 mg, 0.203 mmol, 1.0 당량)과 (*E*)-4-oxopent-2-enoic acid

(27.8 mg, 0.244 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 녹색 고체 **KF-10** (20.4 mg, 0.0524 mmol, 26%)를 얻었음. m.p: 202–204 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.54 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.33–7.24 (m, 5H), 7.17 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.92 (dd, *J* = 6.9 Hz와 *J* = 2.1 Hz, 2H), 5.52 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 2.67 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 197.9, 163.0, 160.7, 152.8, 145.8, 139.4, 135.8, 129.0, 127.9, 127.7, 127.1, 126.1, 118.5, 114.6, 113.5, 110.1, 55.5, 48.7, 26.4. 데이터는 문현에 보고된 것과 일치함.

- 7-Benzoyl-4-benzyl-2-(4-methoxyphenyl)thieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-11**): 출발물질 **5r** (40.0 mg, 0.135 mmol, 1.0 당량)과 3-benzoylacrylic acid (28.6 mg, 0.163 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 주황색 고체 **KF-11** (23.2 mg, 0.0514 mmol, 38%)를 얻었음. m.p: 148–150 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.89 (dd, *J* = 8.1 Hz와 *J* = 1.5 Hz, 2H), 7.65 (tt, *J* = 7.5 Hz와 *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.55–7.52 (m, 4H), 7.34 (d, *J* = 4.8 Hz, 4H), 6.92 (quin, *J* = 4.2 Hz, 1H), 7.11 (s, 1H), 6.93–6.91 (m, 3H), 5.54 (s, 2H), 3.83 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 194.7, 162.4, 160.7, 151.8, 145.8, 139.9, 135.94, 135.9, 133.6, 130.1, 129.0, 128.8, 127.9, 127.7, 127.2, 126.0, 120.1, 115.0, 114.7, 110.6, 55.5, 48.7; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₈H₂₁NO₃S [M]⁺ 451.1242, found 451.1245.
- 7-Acetyl-2-(4-(dimethylamino)phenyl)-4-methylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-20**): 출발물질 **5i** (31.0 mg, 0.133 mmol, 1.0 당량)과 (*E*)-4-oxopent-2-enoic acid (28.1 mg, 0.160 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 빨간색 고체 **KF-20** (15.0 mg, 0.0460 mmol, 35%)를 얻었음. m.p: 196–198 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.08 (s, 1H), 7.03 (s, 1H), 6.73 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 3.78 (s, 3H), 3.03 (s, 6H), 2.64 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 198.0, 163.1, 154.0, 151.1, 146.5, 139.0, 127.3, 121.3, 117.4, 112.4, 108.0, 40.4, 32.4, 26.4; HRMS (EI): m/z calcd for C₁₈H₁₈N₂O₂S [M]⁺ 326.1089, found 326.1088.
- 7-Benzoyl-4-benzyl-2-(4-(dimethylamino)phenyl)thieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-21**): 출발물질 **5s** (40.0 mg, 0.130 mmol, 1.0 당량)과 3-benzoylacrylic acid (27.4 mg, 0.156 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 빨간색 고체 **KF-21** (25.0 mg, 0.0538 mmol, 41%)를 얻었음. m.p: 216–218 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.91 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.64 (tt, *J* = 7.5 Hz와 *J* = 1.3 Hz, 1H), 7.54–7.49 (m, 4H), 7.35–7.33 (m, 4H), 7.27–7.26 (m, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.85 (s, 1H), 6.69 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 5.54 (s, 2H), 3.01 (s, 6H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 194.9, 165.5, 153.0, 151.1, 146.2, 139.9, 136.1, 136.0,

133.6, 130.1, 129.0, 128.8, 127.8, 127.3, 127.2, 121.1, 119.1, 114.3, 112.3, 109.0, 48.7, 40.4; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₉H₂₄N₂O₂S [M]⁺ 464.1558, found 464.1562.

- 7-Benzoyl-2-(4-(diphenylamino)phenyl)-4-methylthieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-25**): 출발물질 **5o** (40.0 mg, 0.112 mmol, 1.0 당량)과 3-benzoylacrylic acid (23.7 mg, 0.134 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 빨간색 고체 **KF-25** (26.9 mg, 0.0525 mmol, 47%)를 얻었음. m.p: 125–128 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.86 (dd, *J* = 8.4 Hz와 *J* = 0.6 Hz, 2H), 7.65–7.27 (m, 1H), 7.56 (dd, *J* = 6.6 Hz와 *J* = 2.4 Hz, 2H), 7.52 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.31–7.29 (m, 4H), 7.20 (s, 1H), 7.16–7.14 (m, 4H), 7.11–7.07 (m, 4H), 6.85 (s, 1H), 3.81 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 194.7, 162.4, 152.2, 149.3, 147.1, 146.3, 139.6, 136.0, 133.6, 130.1, 129.6, 129.0, 128.8, 127.2, 126.4, 125.3, 124.0, 122.5, 119.5, 115.1, 109.8, 32.5; HRMS (EI): m/z calcd for C₃₃H₂₄N₂O₂S [M]⁺ 512.1558, found 512.1556.
- 7 - Benzoyl - 4 - meth y l - 2 - (4 - (t r i - fluoromethoxy)phenyl)thieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-26**): 출발물질 **5p** (40.0 mg, 0.146 mmol, 1.0 당량)과 3-benzoylacrylic acid (30.9 mg, 0.175 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 녹색 고체 **KF-26** (22.0 mg, 0.0512 mmol, 35%)를 얻었음. m.p: 220–221 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.83 (dd, *J* = 7.2 Hz 와 *J* = 1.2 Hz, 2H), 7.72 (dd, *J* = 8.7 Hz와 *J* = 0.9 Hz, 2H), 7.63 (td, *J* = 7.8 Hz와 *J* = 1.2 Hz, 1H), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.27 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.23 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 3.80 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 194.6, 162.4, 150.0, 149.9, 145.9, 139.4, 135.9, 133.7, 132.1, 130.0, 128.9, 127.8, 121.7, 121.3, 120.5 (*d*, *J*(C–F) = 256.2 Hz), 115.6, 111.7, 32.4; ¹⁹F NMR (600 MHz, CDCl₃) δ –57.8; HRMS (EI): m/z calcd for C₂₂H₁₄F₃NO₃S [M]⁺ 429.0646, found 429.0649.
- 7-Benzoyl-4-methyl-2-(4-(trifluoromethyl)phenyl)thieno[3,2-*b*]pyridin-5(4*H*)-one (**KF-27**): 출발물질 **5q** (40.0 mg, 0.155 mmol, 1.0 당량)과 3-benzoylacrylic acid (32.8 mg, 0.186 mmol, 1.2 당량)을 사용하여 녹색 고체 **KF-27** (18.8 mg, 0.0455 mmol, 29%)를 얻었음. m.p: 236–238 °C; ¹H NMR (600 MHz, CDCl₃) δ 7.85 (dd, *J* = 20.1 Hz와 *J* = 7.5 Hz, 4H), 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.67 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.54 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.38 (s, 1H), 6.94 (s, 1H), 3.85 (s, 3H); ¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃) δ 194.5, 162.3, 149.4, 145.7, 139.2, 136.7, 135.8, 133.7, 131.1 (*q*, *J*_(C–F) = 33.2 Hz), 130.0, 128.9, 126.5, 126.34–126.31 (m), 124.0

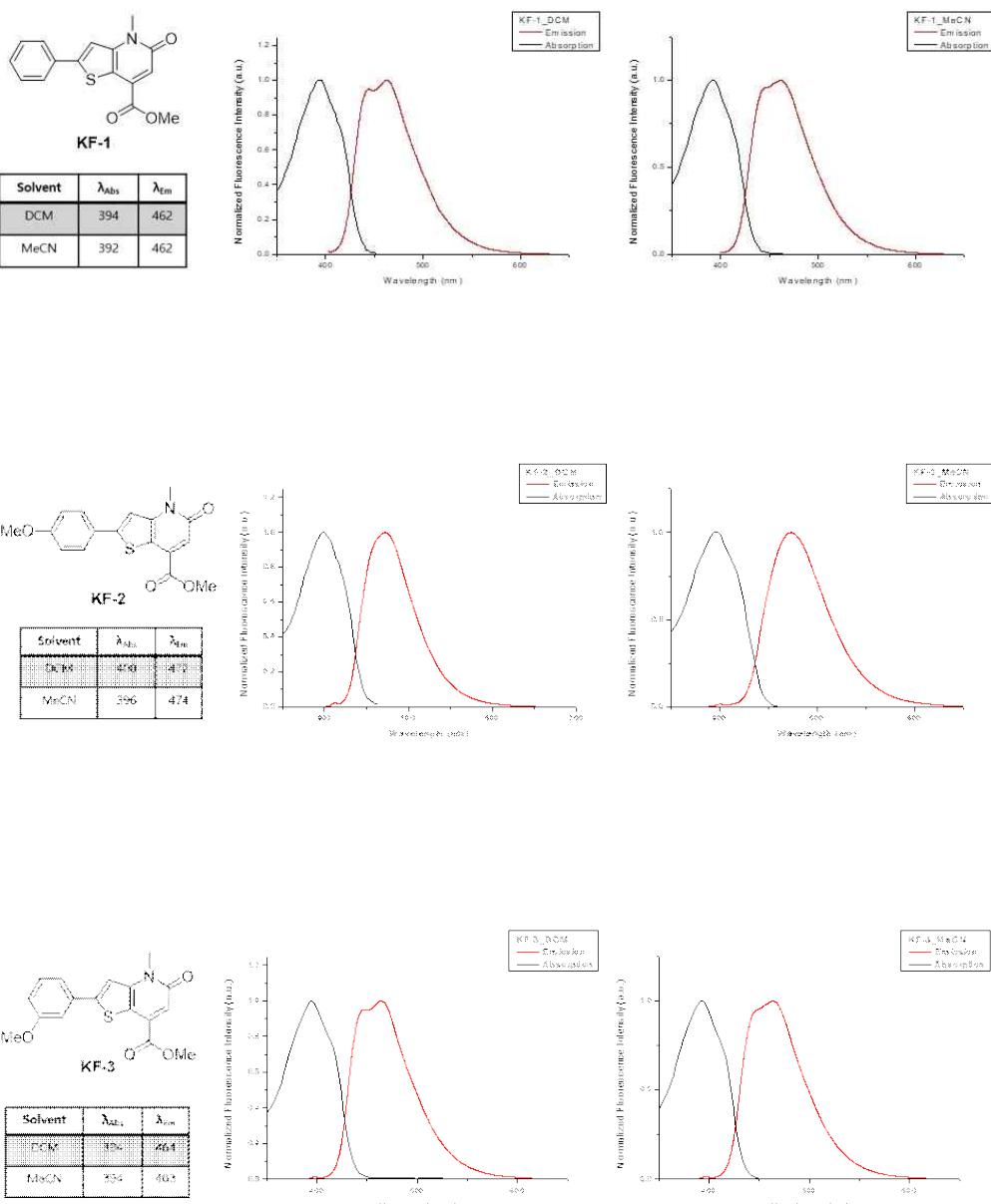
(q, $J_{(C-F)} = 270.5$ Hz), 121.7, 116.0, 112.3, 32.3; ^{19}F NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ -62.8; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{22}H_{14}F_3NO_2S$ [M] $^+$ 413.0697, found 413.0695.

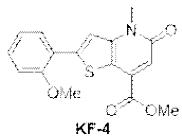
- 4-Benzyl-2-(4-methoxyphenyl)-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylic Acid (**KF-28**): 출발물질 **KF-2** (26.2 mg, 0.0646 mmol, 1.0 당량)을 에탄올 (2 mL)에 용해시키고 1 N KOH (0.32 mL)을 적가한 다음 반응 혼합물을 70 °C에서 가열하여 1시간동안 교반함. 반응이 종결된 후, 1 N HCl (2 mL)로 pH 2까지 산성화시켜 EtOAc (ethyl acetate, 2 mL)로 다섯 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하여 노란색 고체 **KF-28** (19.8 mg, 0.0506 mmol, 78%)을 얻었음. m.p: 246–248 °C; 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.71 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.68 (s, 1H), 7.33–7.30 (m, 4H), 7.26–7.23 (m, 1H), 7.02 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 6.95 (s, 1H), 5.51 (s, 2H), 3.80 (3H); ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.5, 161.3, 160.2, 149.7, 145.6, 136.7, 135.5, 128.6, 127.34, 127.30, 127.2, 125.3, 117.2, 114.7, 113.9, 111.7, 55.4, 47.4; HRMS (FAB): m/z calcd for $C_{22}H_{18}NO_4S$ [M+H] $^+$ 392.0957, found 392.0954.
- 2-(4-(Diethylamino)phenyl)-4-methyl-5-oxo-4,5-dihydrothieno[3,2-*b*]pyridine-7-carboxylic Acid (**KF-29**): 출발물질 **KF-22** (22.4 mg, 0.0605 mmol, 1.0 당량)을 에탄올 (2 mL)에 용해시키고 1 N KOH (0.3 mL)을 적가한 다음 반응 혼합물을 70 °C에서 가열하여 1시간동안 교반함. 반응이 종결된 후, 1 N HCl (2 mL)로 pH 2까지 산성화시켜 EtOAc (ethyl acetate, 3 mL)로 다섯 번 추출함. 얻어진 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조, 여과, 감압 농축하여 주황색 고체 **KF-29** (13.8 mg, 0.0387 mmol, 64%)을 얻었음. m.p: 257–258 °C; 1H NMR (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ 7.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.56 (s, 1H), 6.79 (s, 1H), 6.73 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.67 (s, 3H), 3.42–3.37 (m, 4H), 1.19 (t, $J = 7.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ 165.7, 161.3, 151.2, 148.2, 146.5, 127.2, 119.4, 115.5, 112.4, 111.4, 109.4, 43.7, 32.0, 12.5; HRMS (FAB): m/z calcd for $C_{19}H_{21}N_2O_3S$ [M+H] $^+$ 357.1273, found 357.1276.

3. 광물리적 특성 시료 측정 방법

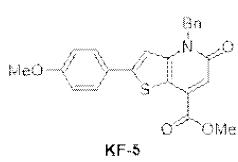
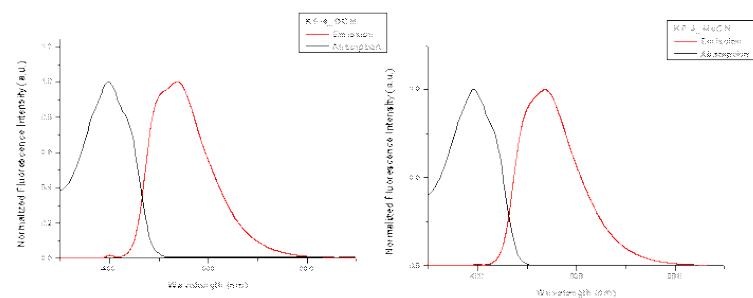
- 저장 용액(1.0 mM)을 DCM (Dichloromethane)과 MeCN (Acetonitrile)로 준비한 다음 최종 용액의 농도를 DCM과 MeCN을 사용하여 10 μ M로 희석함. 시료는 UV-Vis 분광광도계와 FS-2 형광 분광광도계 (Scinco)를 이용하여 측정하였음.

그림54. KF-1 ~ KF-27의 광물리적 특성과 도표 데이터

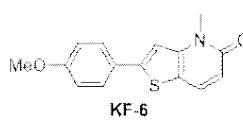
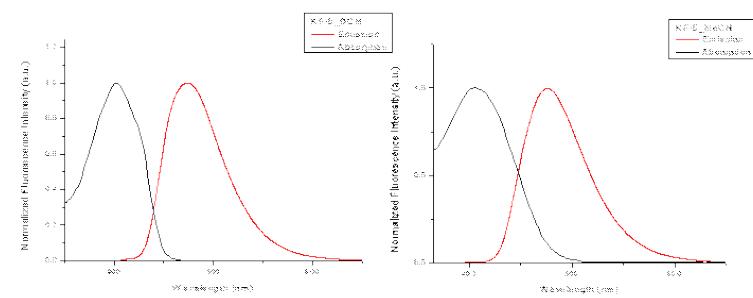




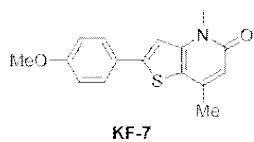
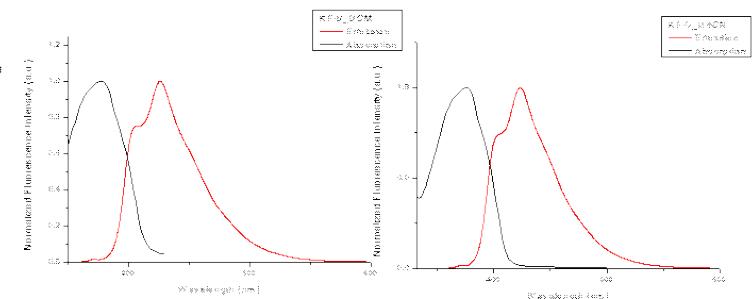
Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	376	409
MeCN	396	408



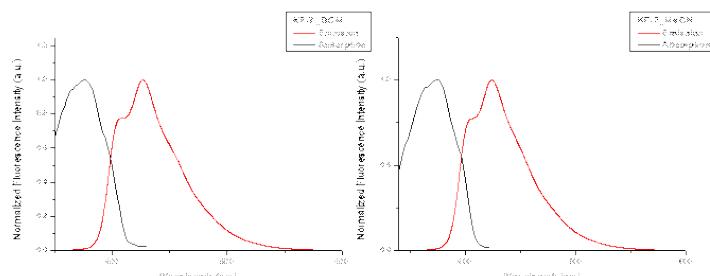
Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	403	472
MeCN	400	477

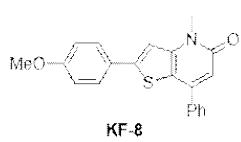


Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	378	426
MeCN	376	424

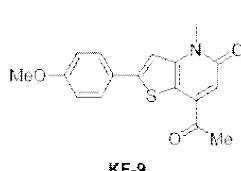
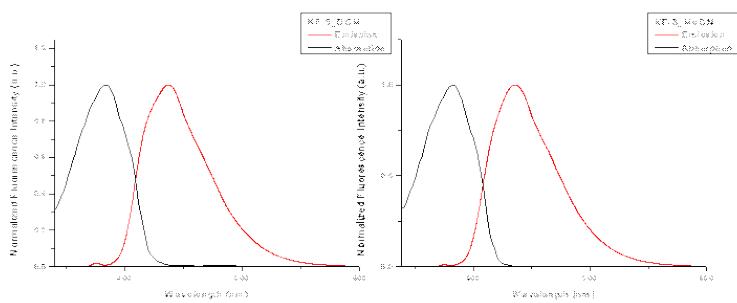


Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	376	427
MeCN	374	425

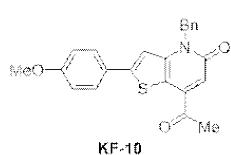
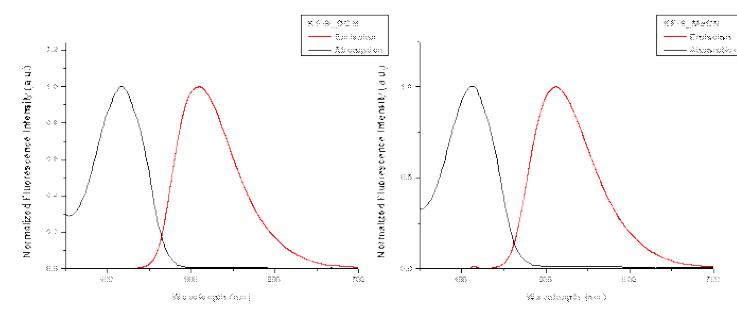




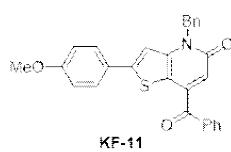
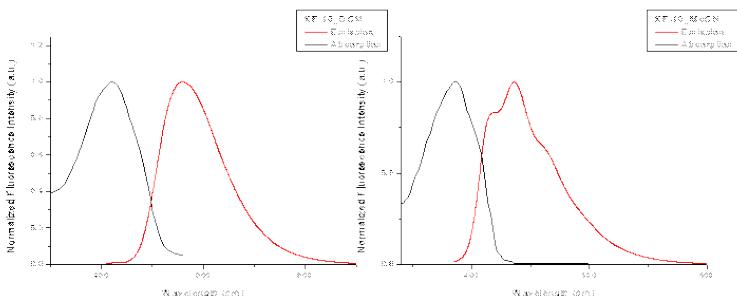
Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	398	437
MeCN	394	435



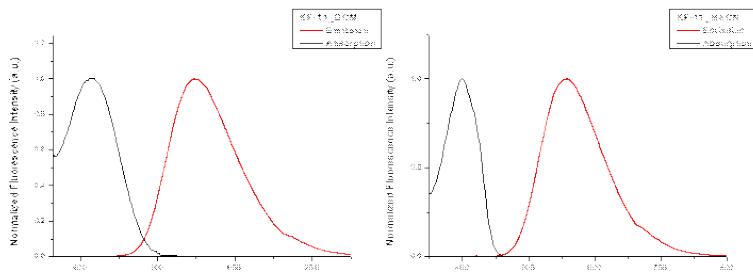
Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	418	510
MeCN	412	512

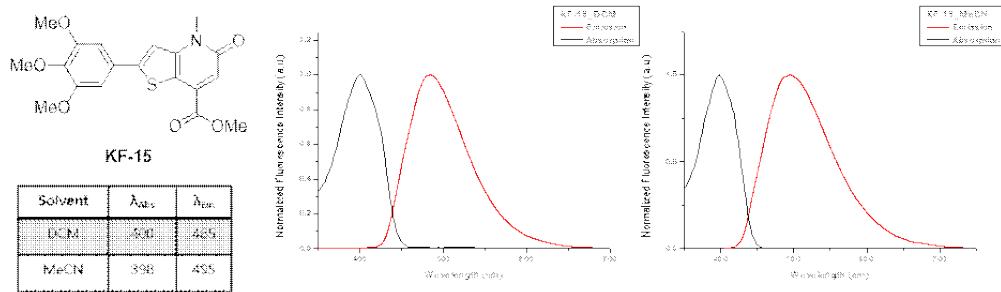
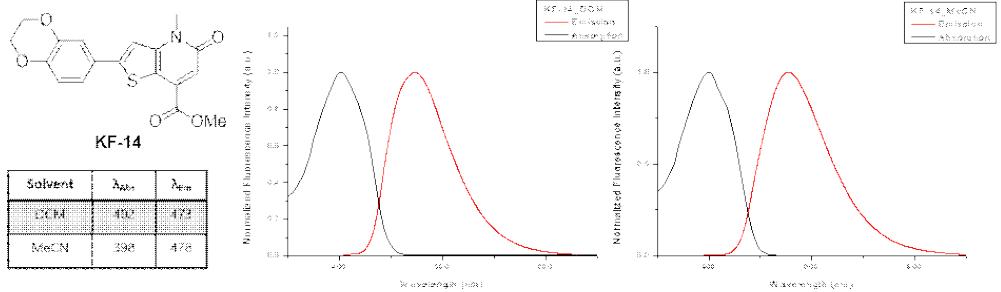
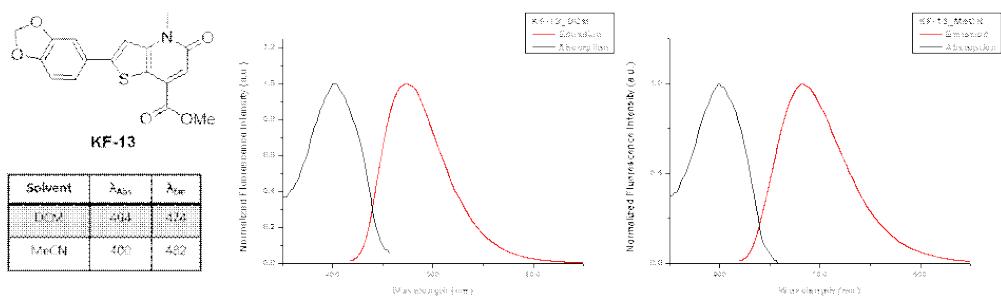
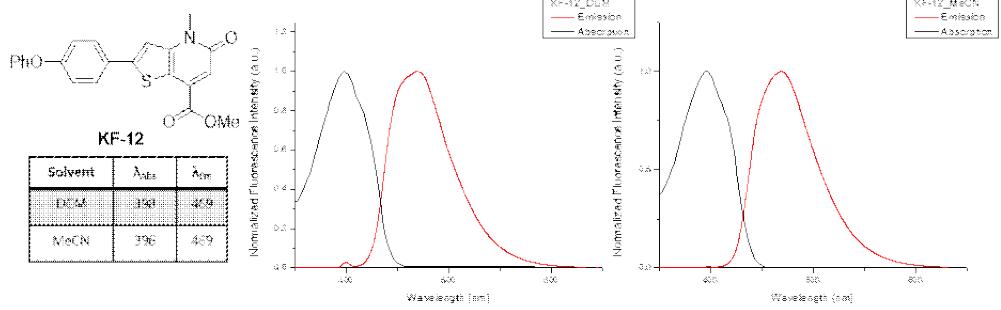


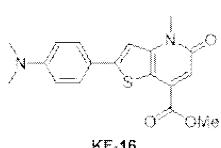
Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	426	512
MeCN	420	515



Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	418	547
MeCN	408	552

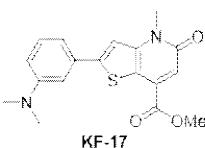
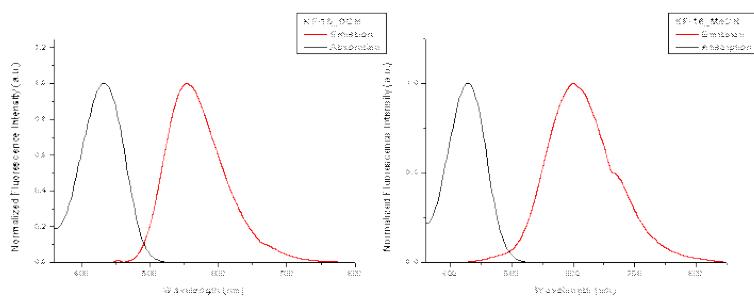






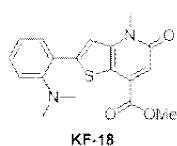
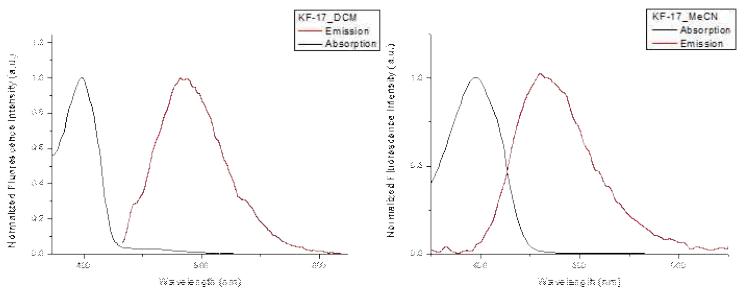
KF-16

Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	434	554
MeCN	426	560



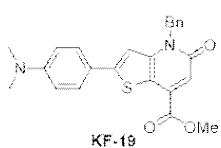
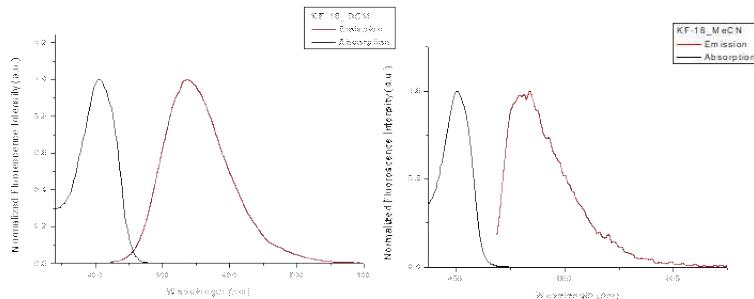
KF-17

Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	396	466
MeCN	396	460



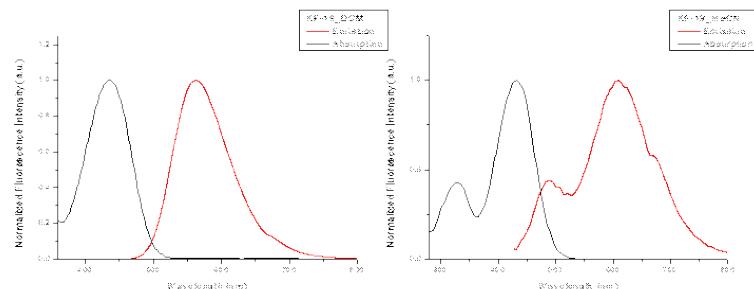
KF-18

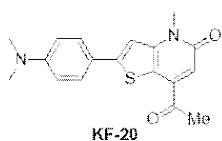
Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	406	556
MeCN	402	454



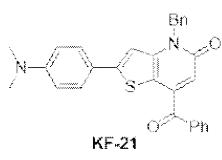
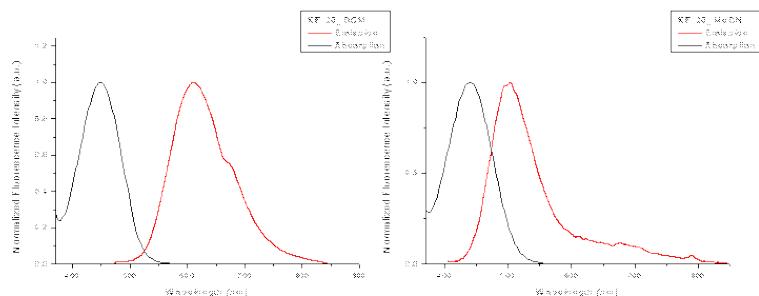
KF-19

Solvent	λ_{abs}	λ_{em}
DCM	436	563
MeCN	392	462

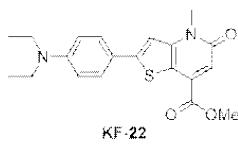
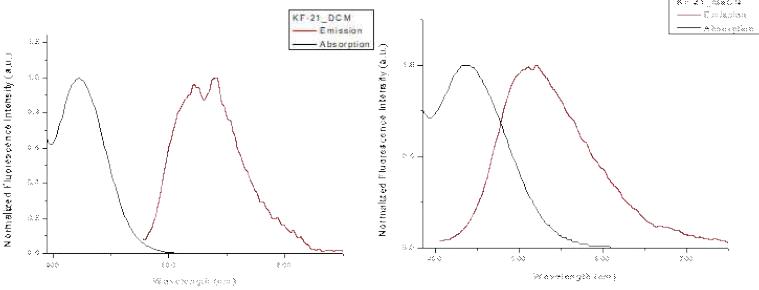




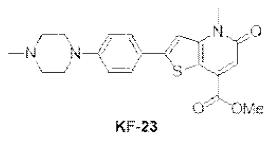
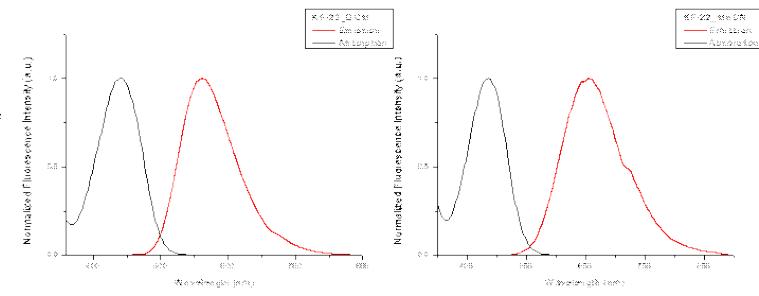
Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	448	516
MeCN	440	504



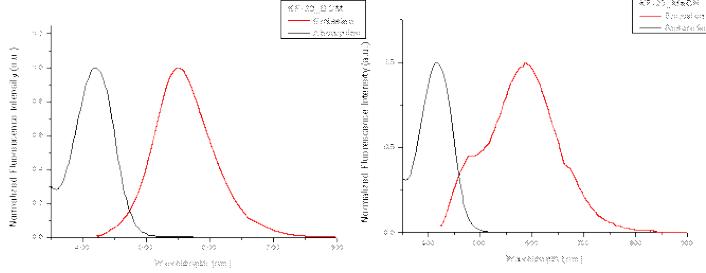
Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	446	543
MeCN	458	521

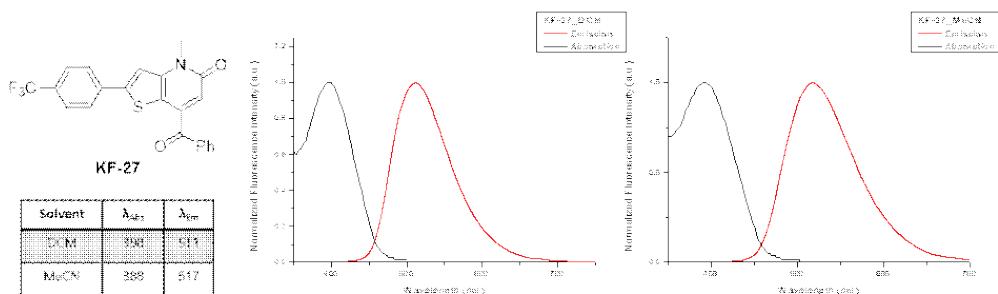
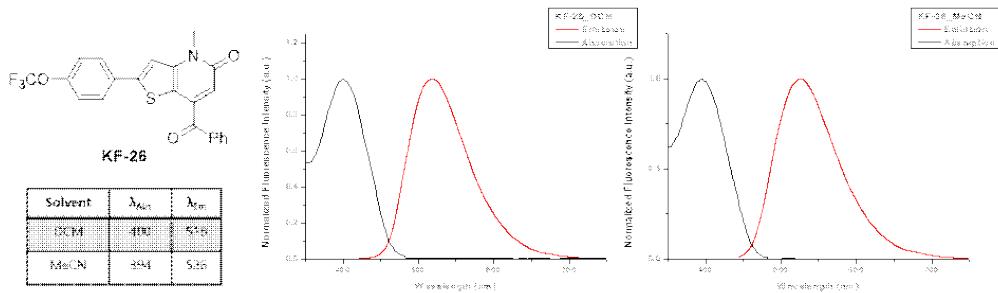
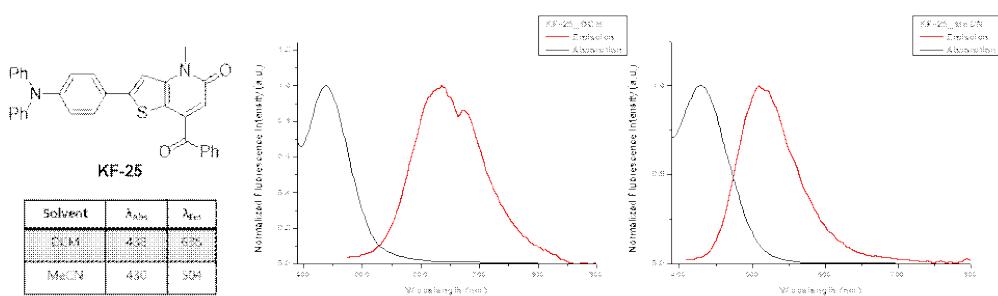
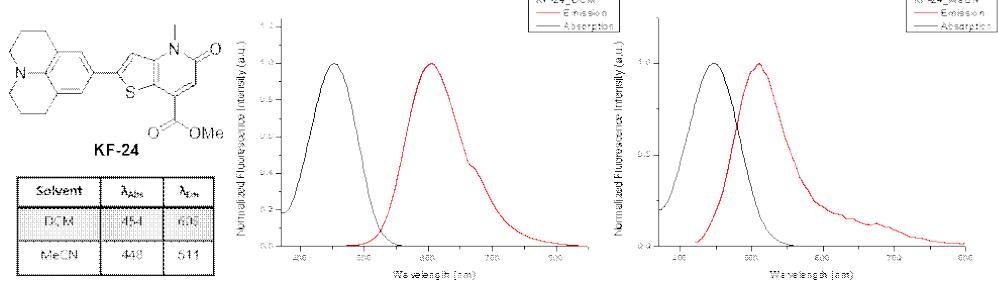


Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	452	526
MeCN	436	605



Solvent	λ_{Abs}	λ_{Em}
DCM	420	550
MeCN	418	587

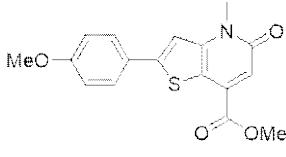
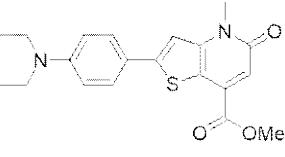
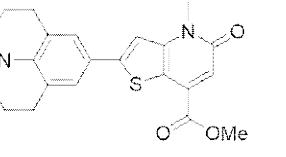




4. Solvatochromic effect 실험방법

- 저장용액 (1 mM)을 사용하여 다양한 분석용 용매로 시료의 최종 농도를 10 μM로 준비함. 시료는 UV-Vis와 형광 분광광도계를 이용하여 측정하였음.

표2. KF-2와 KF-22, KF-24에 대한 solvatochromic effect

이름	KF-2			KF-22			KF-24		
구조									
용매/溶媒	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)	Φ_F	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)	Φ_F	λ_{Abs} (nm)	λ_{Em} (nm)	Φ_F
Hexane	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toluene	402	473	0.98	434	504	0.98	442	529	-
THF	402	472	0.99	436	543	0.97	430	502	-
CHCl ₃	400	472	0.295	442	545	0.99	454	580	0.48
DCM	400	472	0.90	442	562	0.91	454	615	0.25
MeCN	396	474	0.77	436	605	0.08	448	511	0.02
DMF	402	477	0.99	442	604	0.16	456	509	0.10
DMSO	404	480	0.99	446	615	0.1	460	508	0.17
EtOH	400	480	0.99	444	516	0.04	458	508	0.09
MeOH	396	484	0.99	444	503	0	456	493	0.30

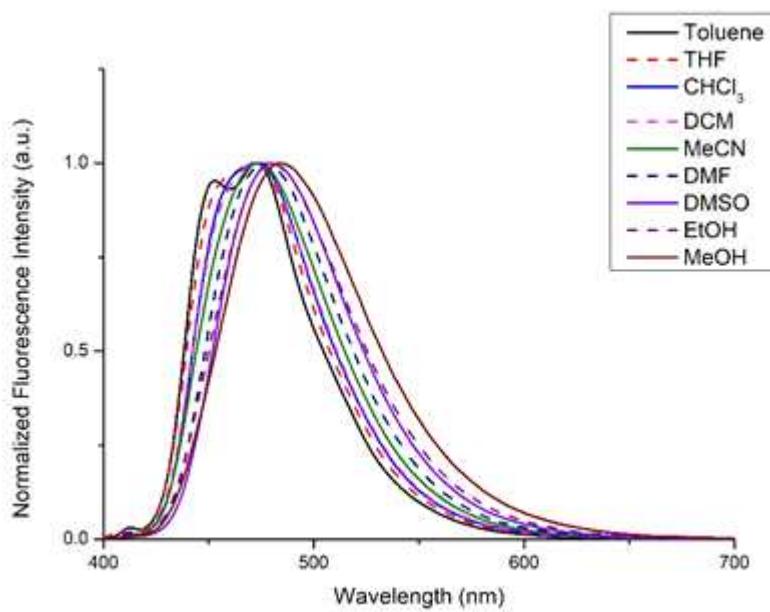


그림55. KF-28에 대한 solvatochromic effect 그래프

표3. KF-28과 KF-29에 대한 pH 테스트

이름	KF-28		KF-29	
구조				
pH	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)	λ_{Ex} (nm)	λ_{Em} (nm)
pH 1	-	-	382	461
pH 2	-	-	-	-
pH 3	381	482	378	441
pH 4	382	475	376	436
pH 5	381	475	373	434
pH 6	379	475	-	-
pH 7	382	476	-	-

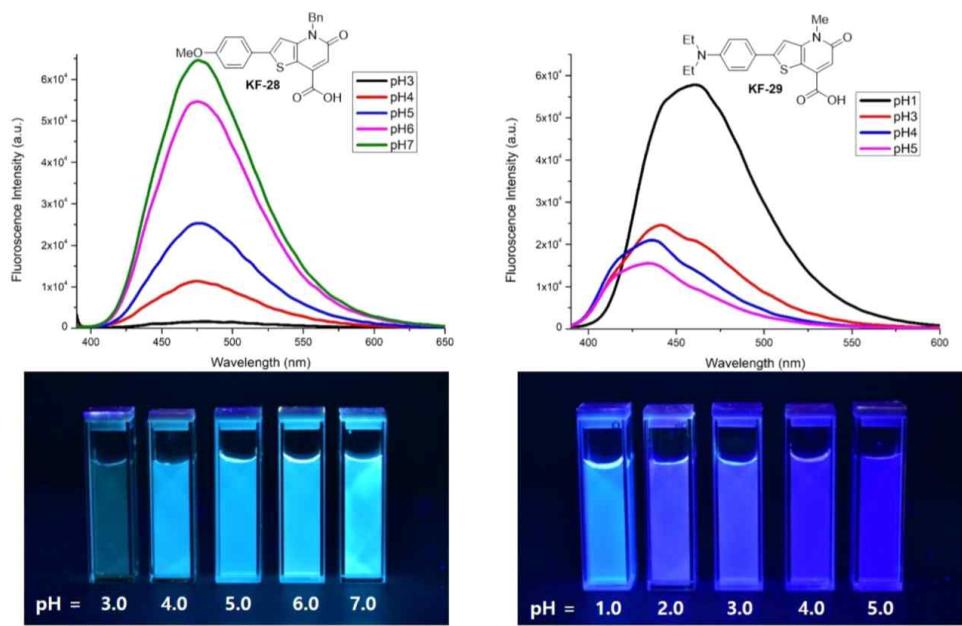


그림56. KF-28과 KF-29에 대한 pH 테스트 및 형광사진

5. KF-9와 Fluorescein의 광안정성 비교 실험방법

- 저장 용액(1.0 mM)을 에탄올로 준비하고 최종 용액의 농도를 에탄올을 사용하여 10 μ M로 희석함. 시료는 FS-2 형광 분광광도계 (Scinco)를 이용하여 5시간 동안 할로겐 램프에 노출시켜 측정했음.

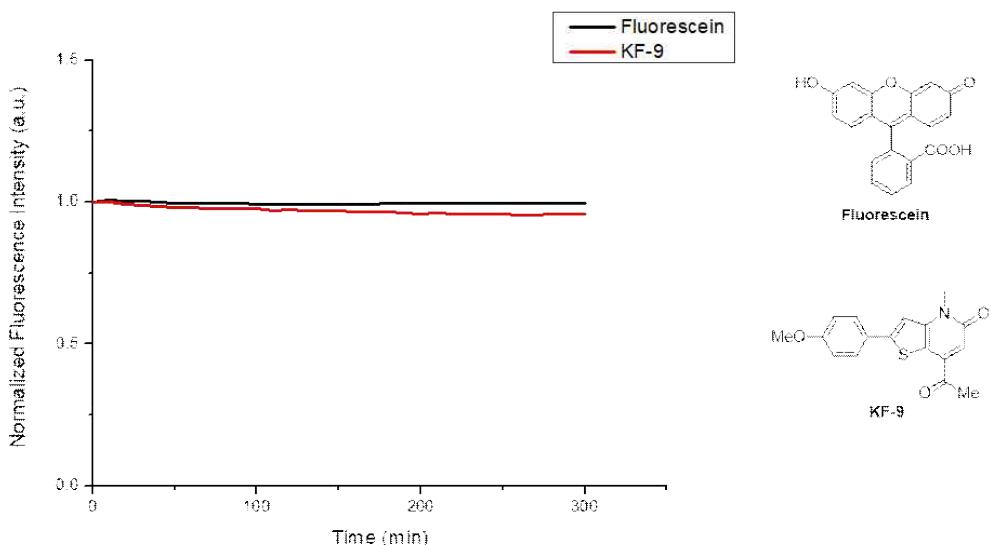
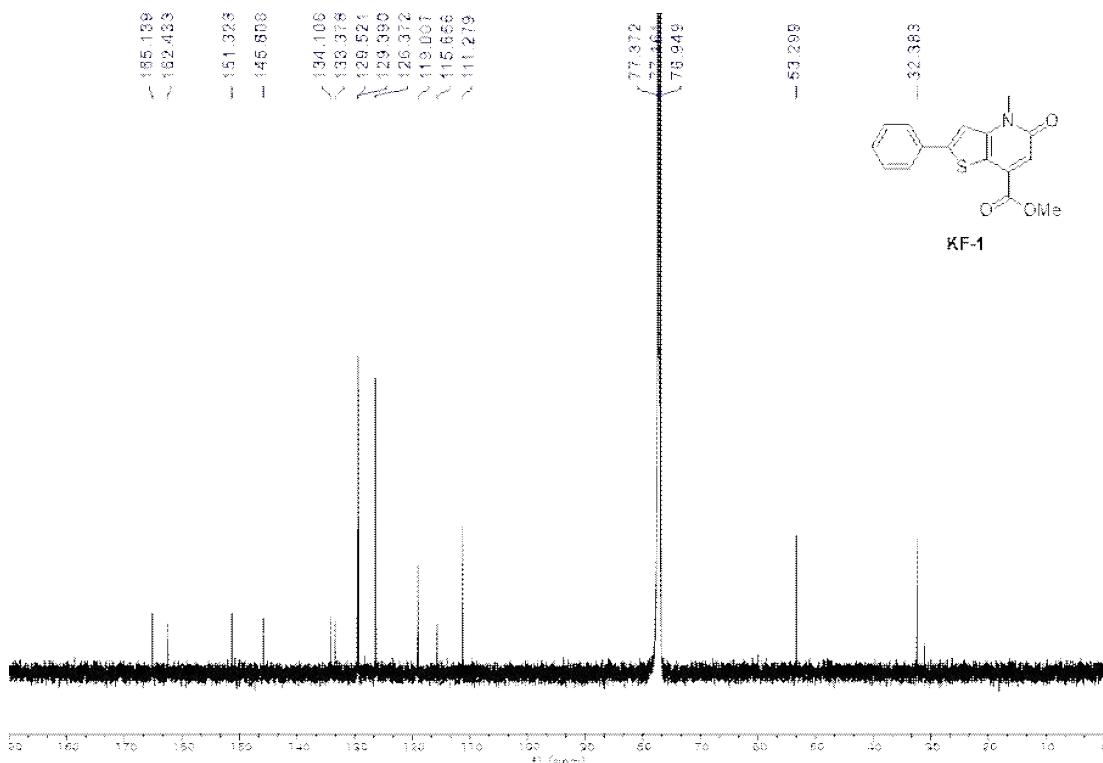
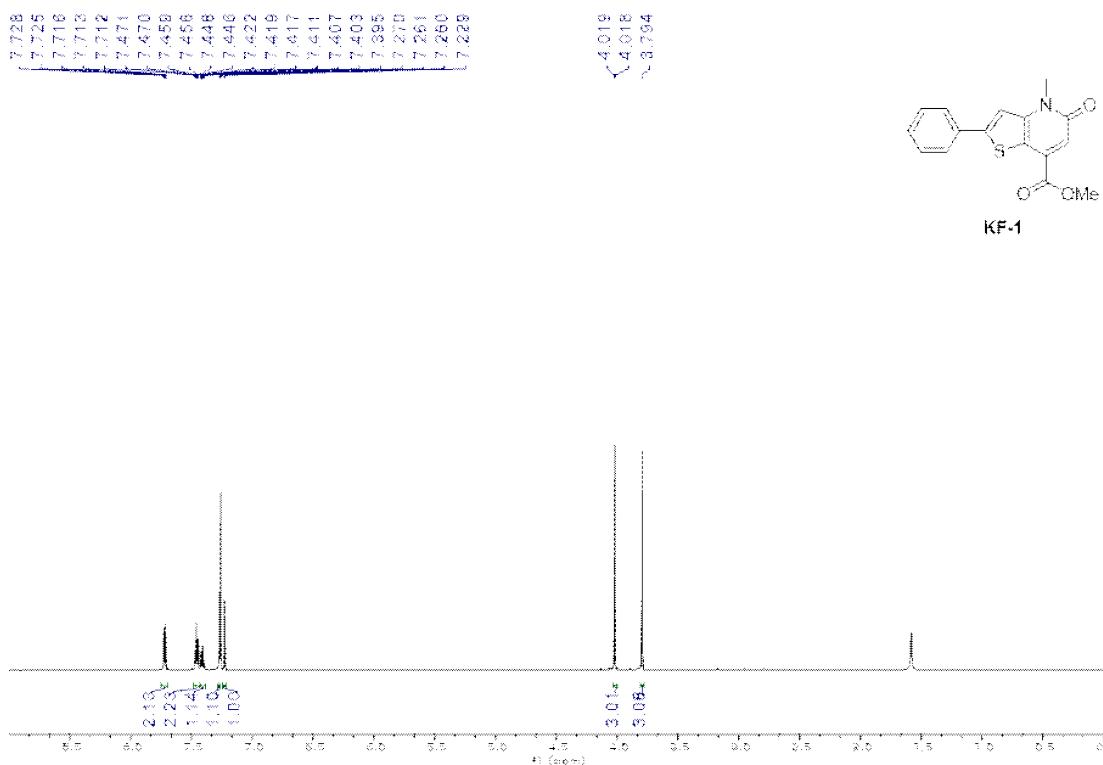


그림57. KF-9와 Fluorescein의 광안정성 비교

6. KF-1 ~ KF-29의 NMR 스펙트럼 데이터



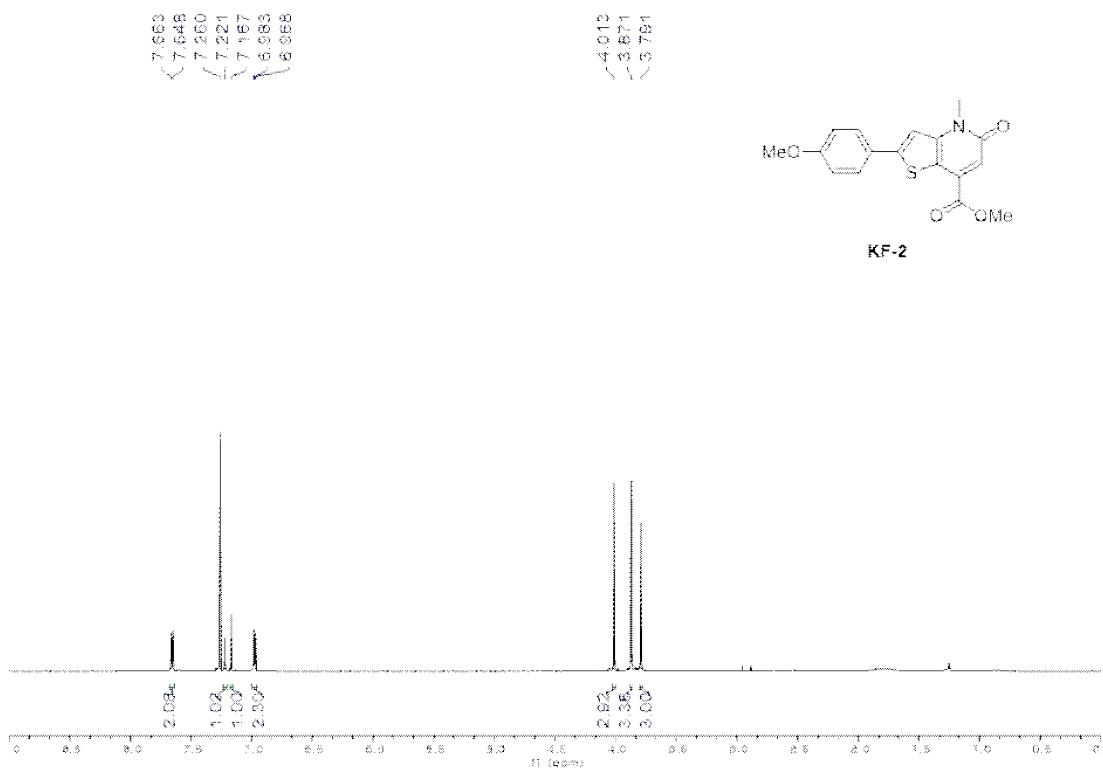


그림60. KF-2의 ¹H NMR 스펙트럼

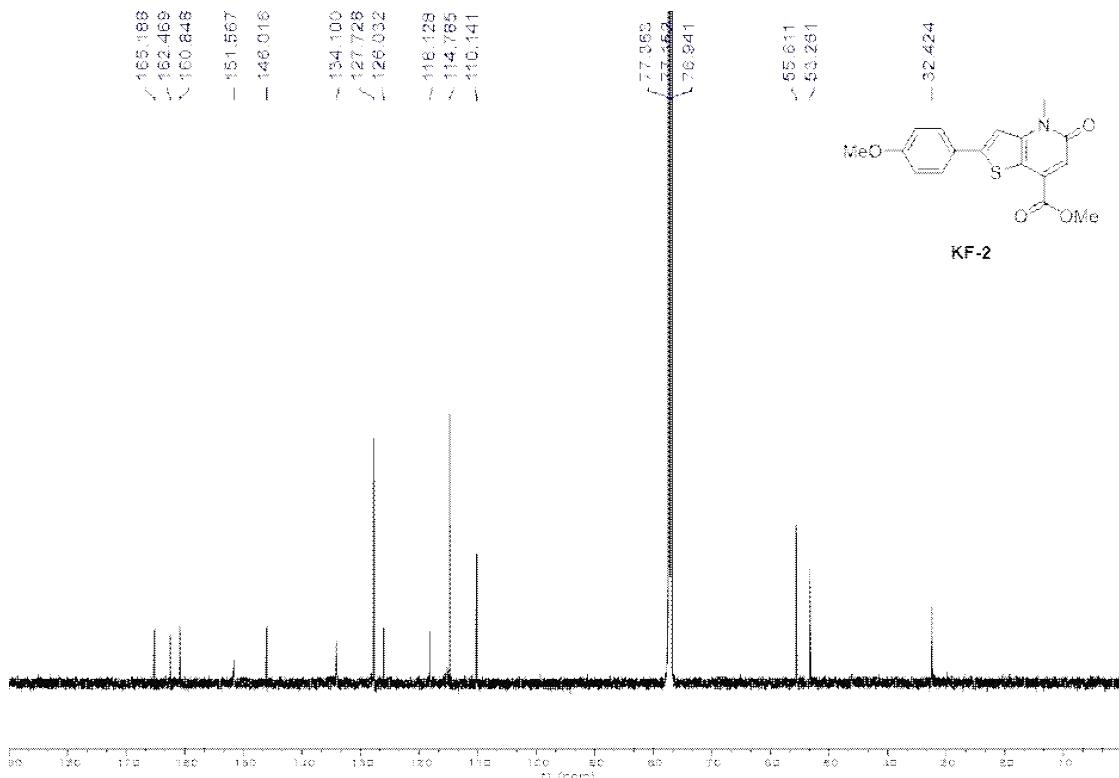


그림61. KF-2의 ¹³C NMR 스펙트럼

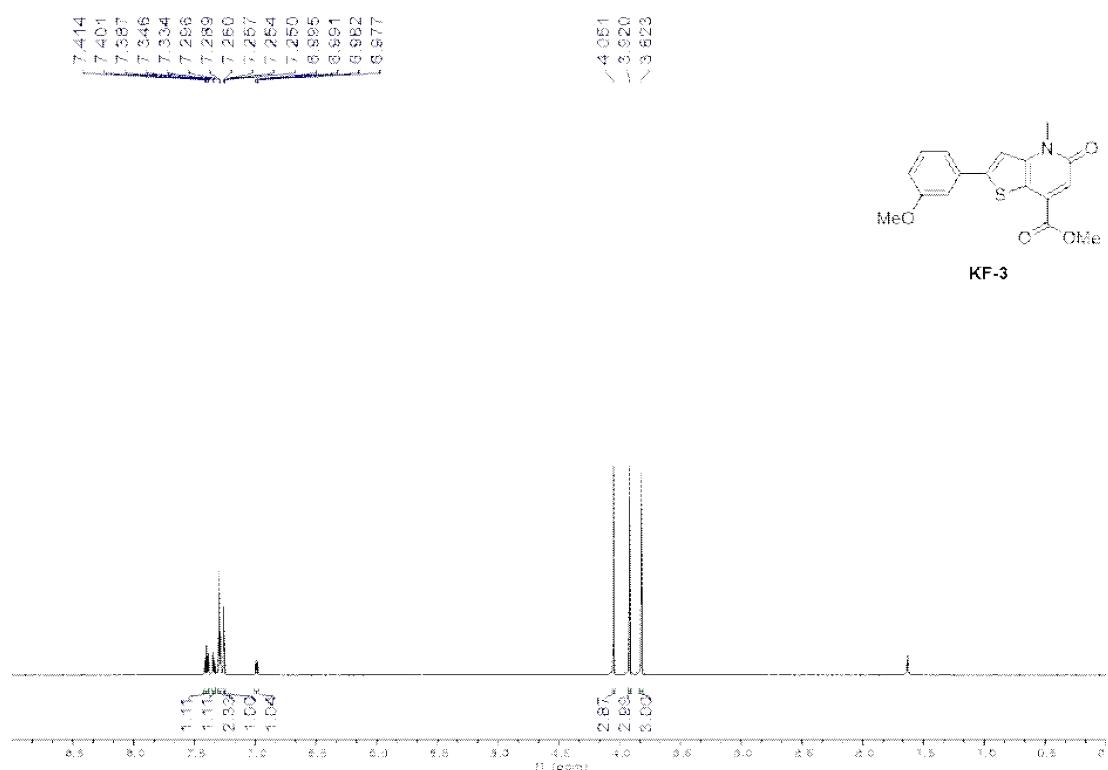


그림62. KF-3의 ¹H NMR 스펙트럼

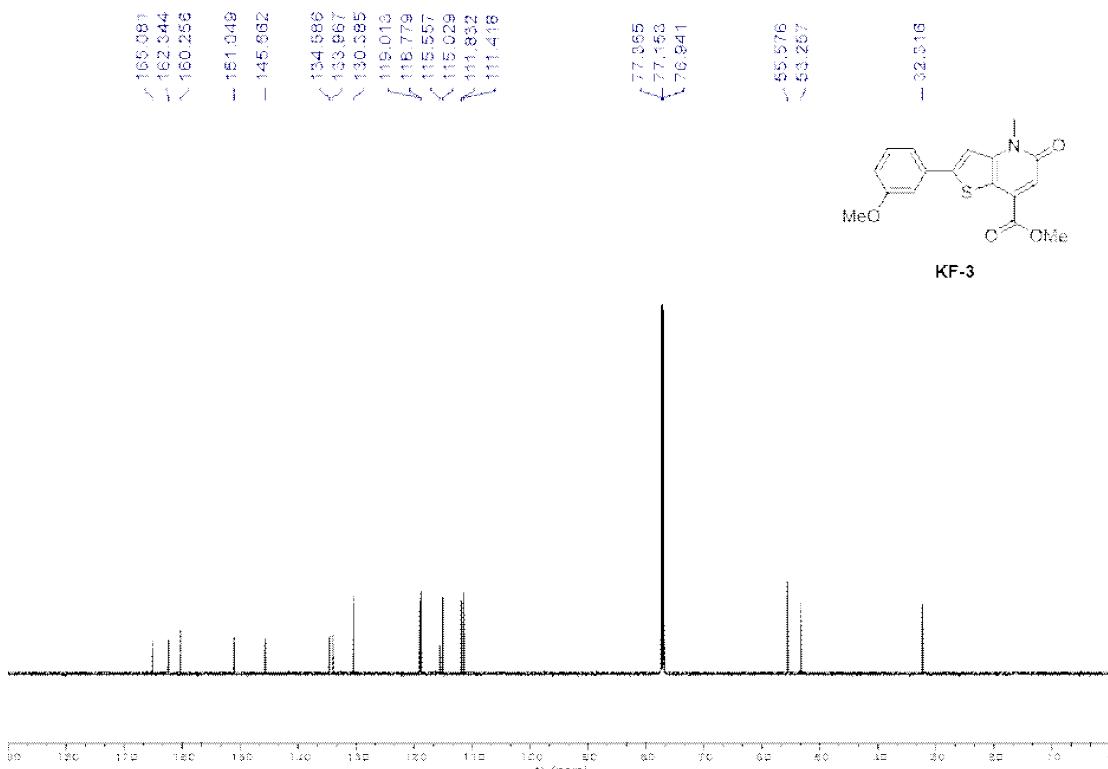


그림63. KF-3의 ¹³C NMR 스펙트럼

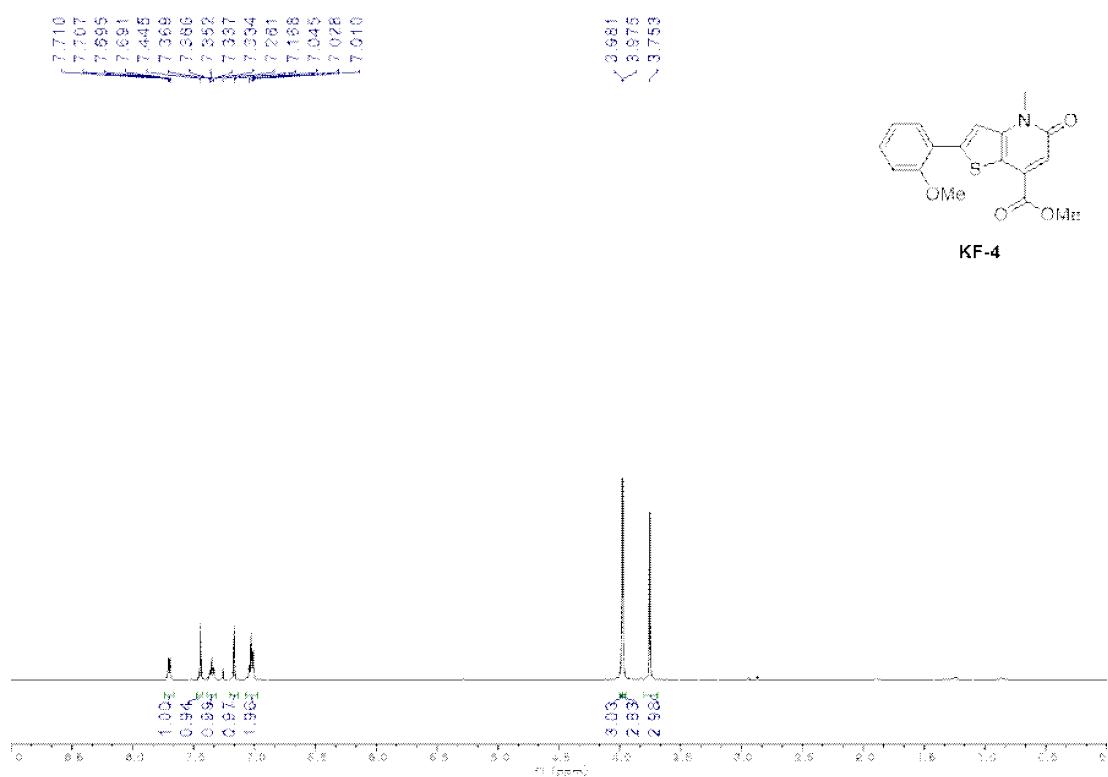


그림64. KF-4의 ¹H NMR 스펙트럼

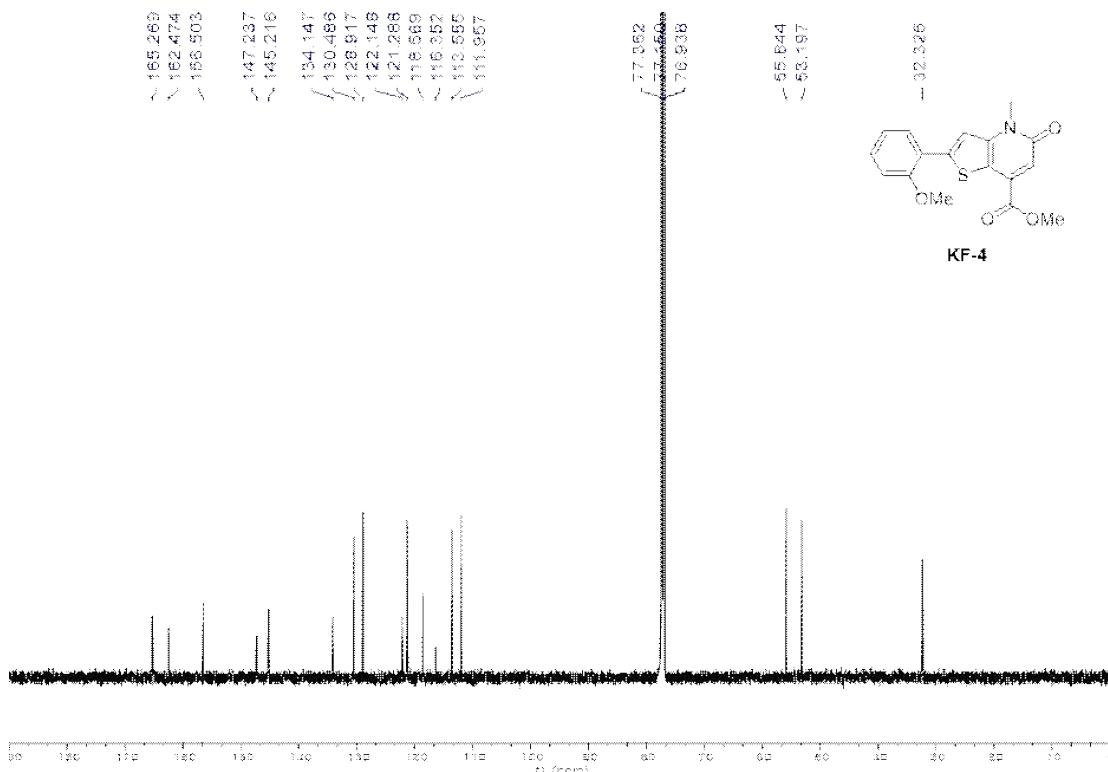


그림65. KF-4의 ¹³C NMR 스펙트럼

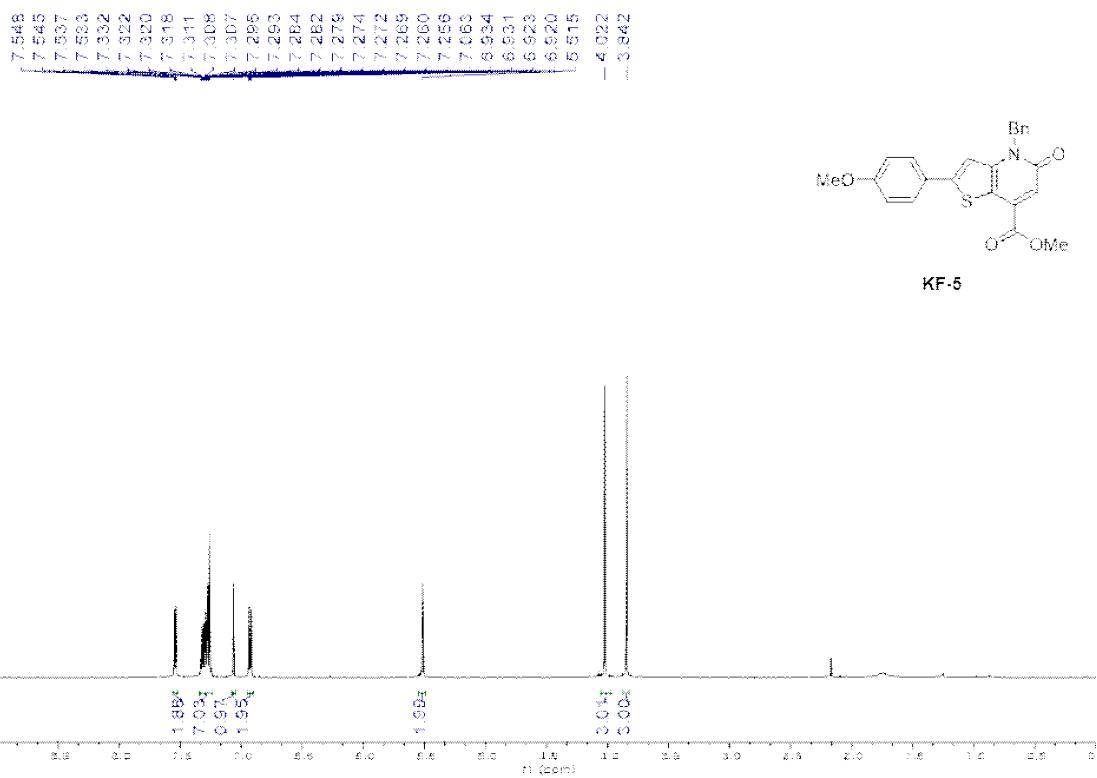


그림66. KF-5의 ^1H NMR 스펙트럼

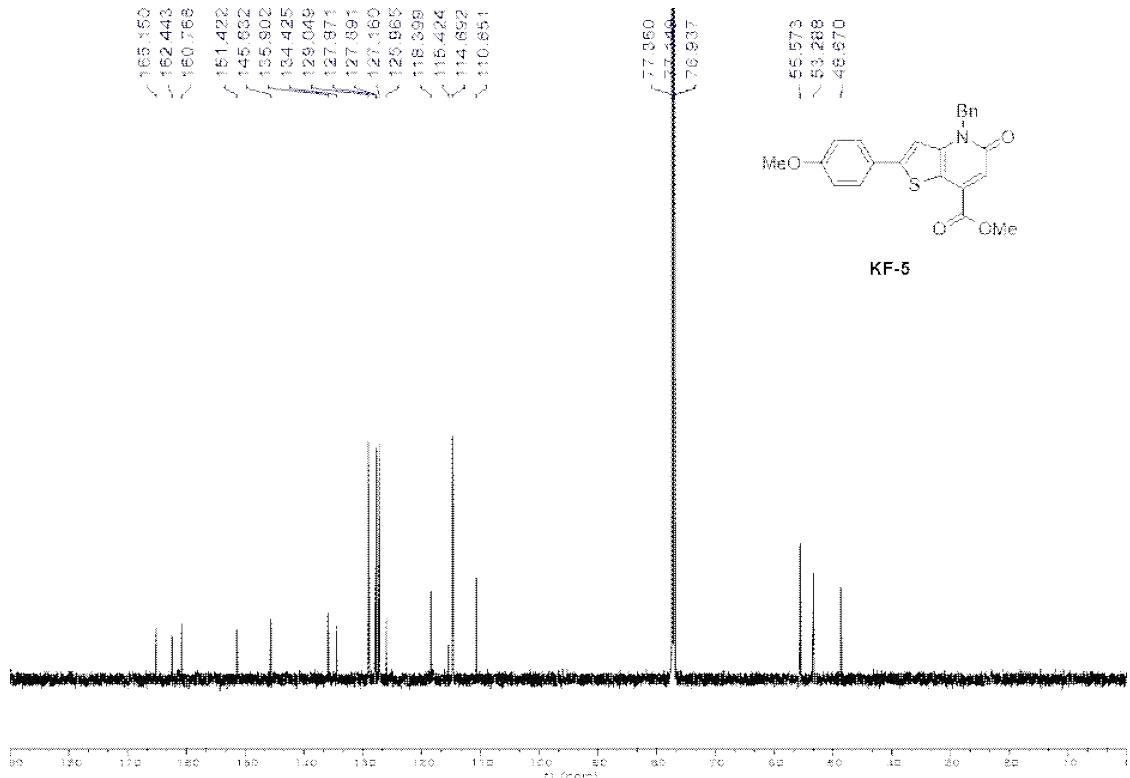


그림67. KF-5의 ^{13}C NMR 스펙트럼

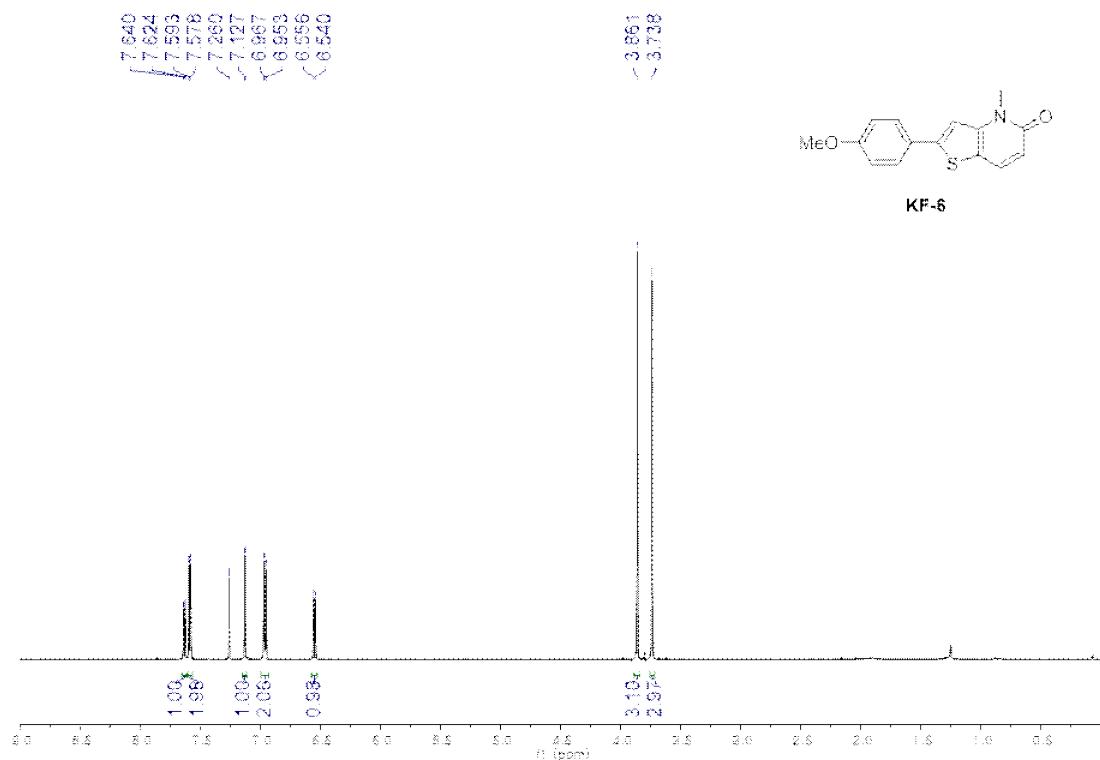


그림68. KF-6의 ¹H NMR 스펙트럼

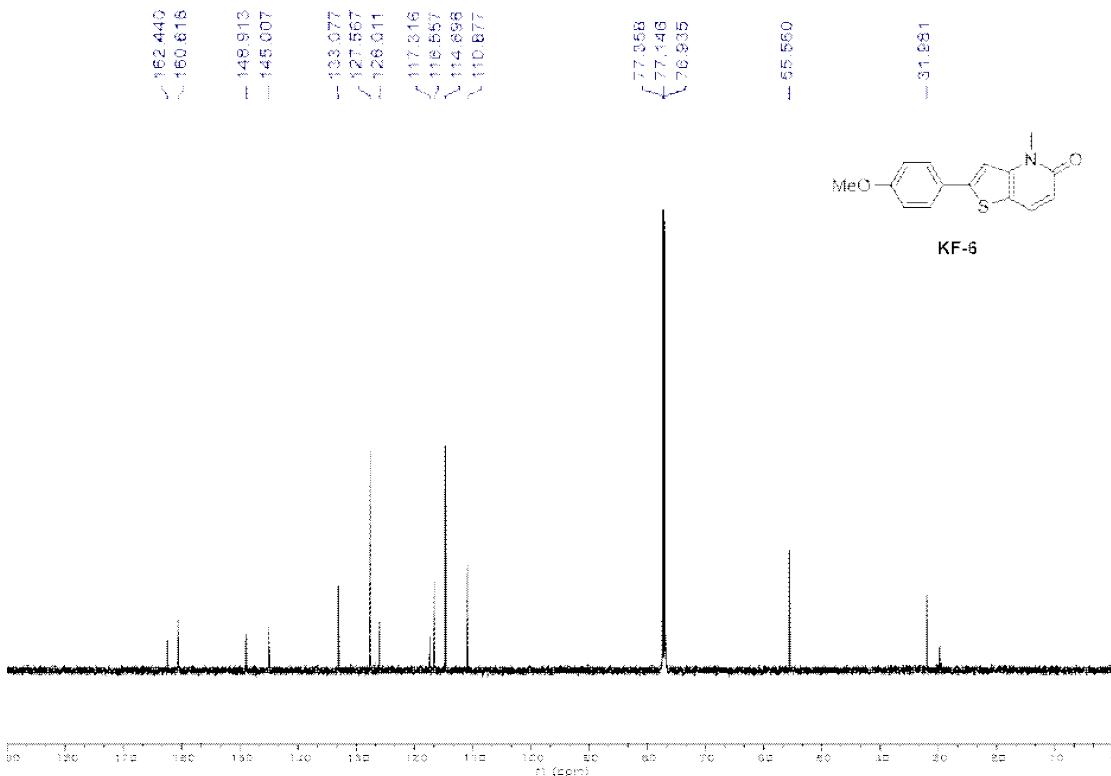


그림69. KF-6의 ¹³C NMR 스펙트럼

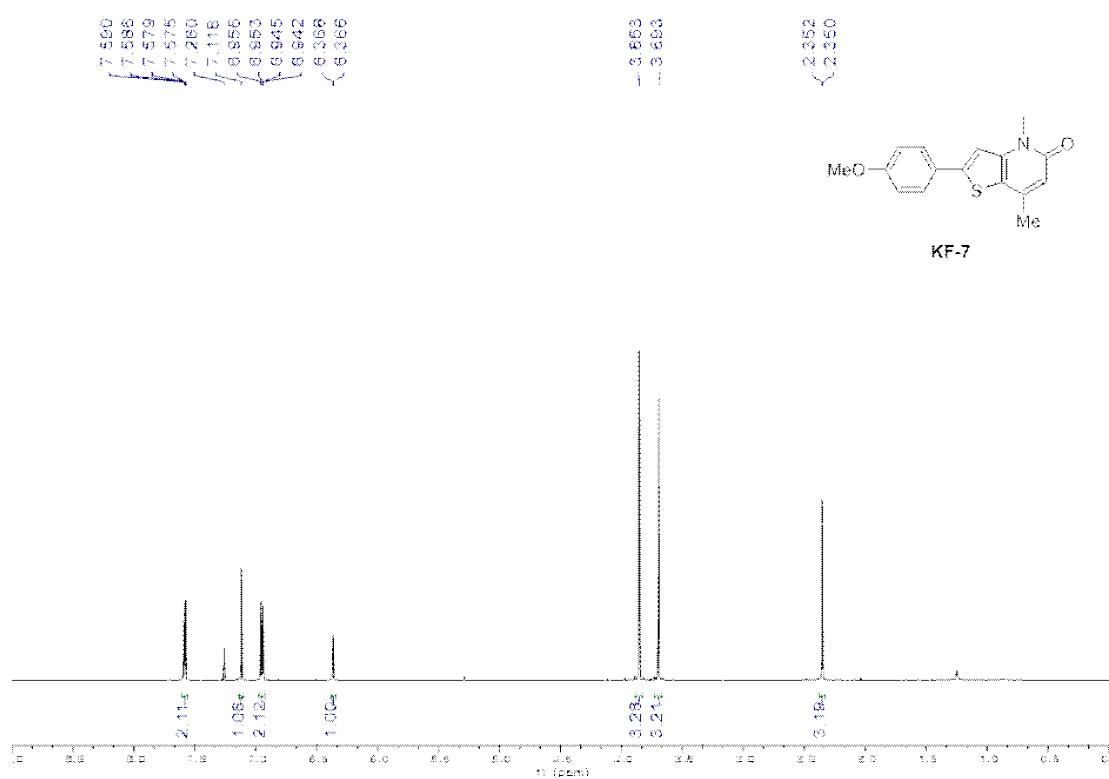


그림70. KF-7의 ^1H NMR 스펙트럼

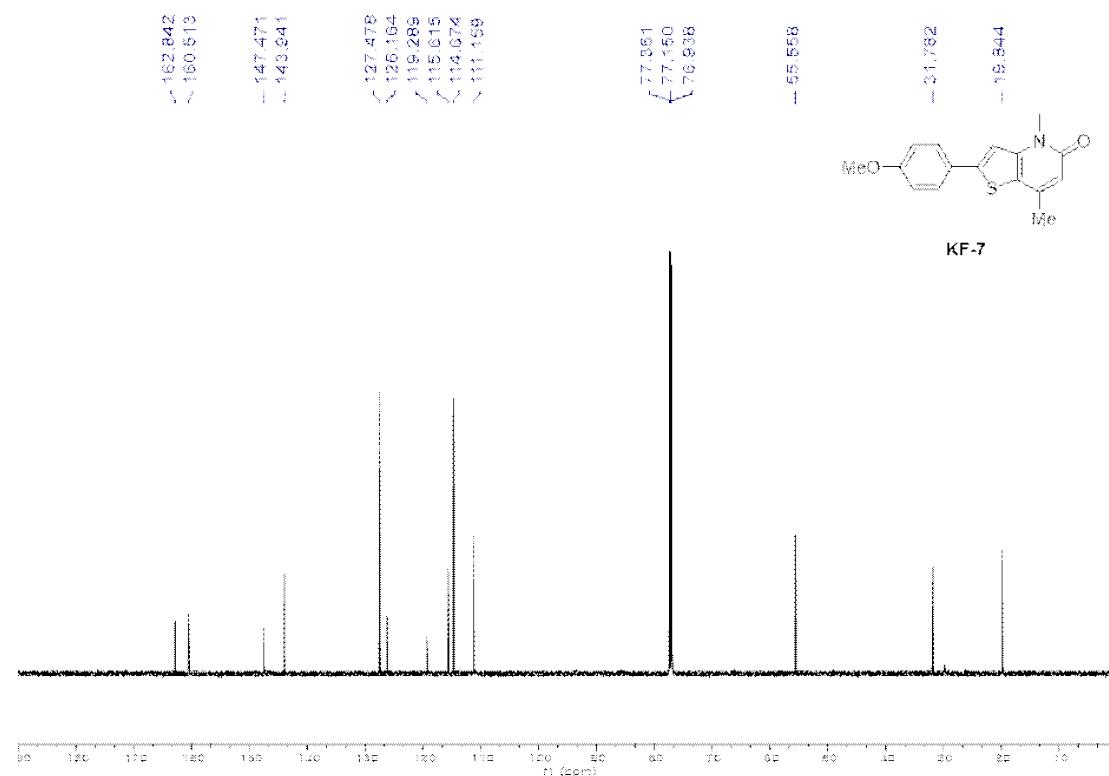


그림71. KF-7의 ^{13}C NMR 스펙트럼

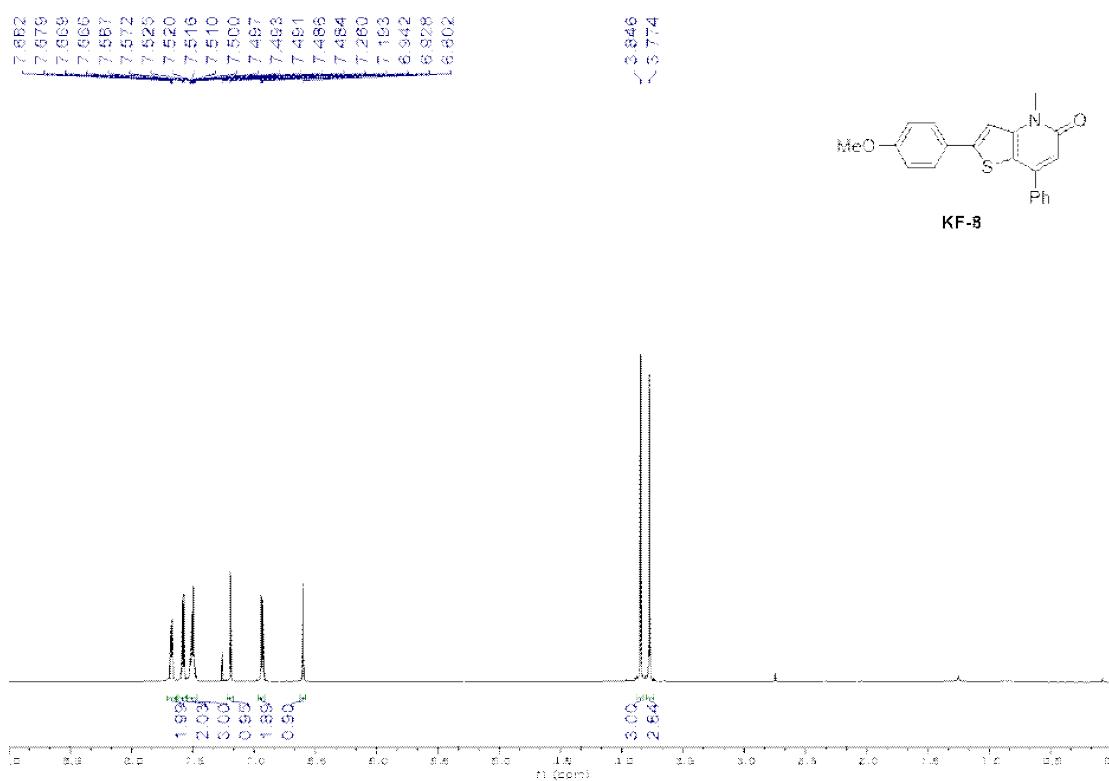


그림72. KF-8의 ¹H NMR 스펙트럼

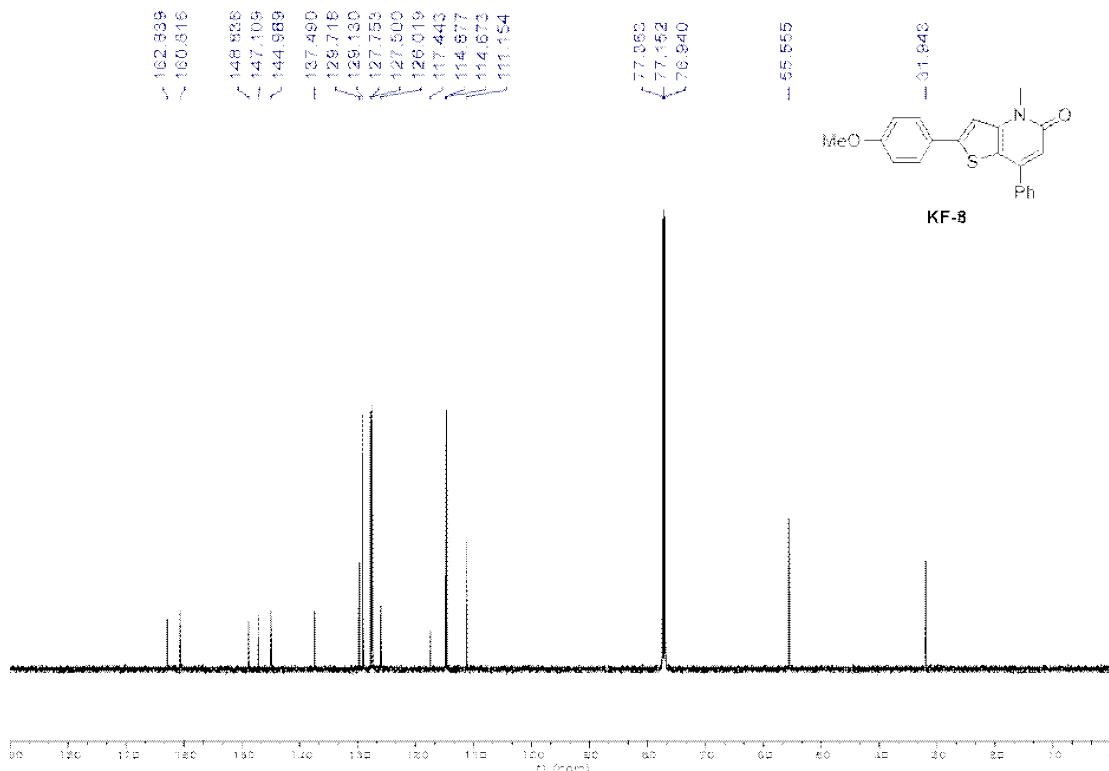


그림73. KF-8의 ¹³C NMR 스펙트럼

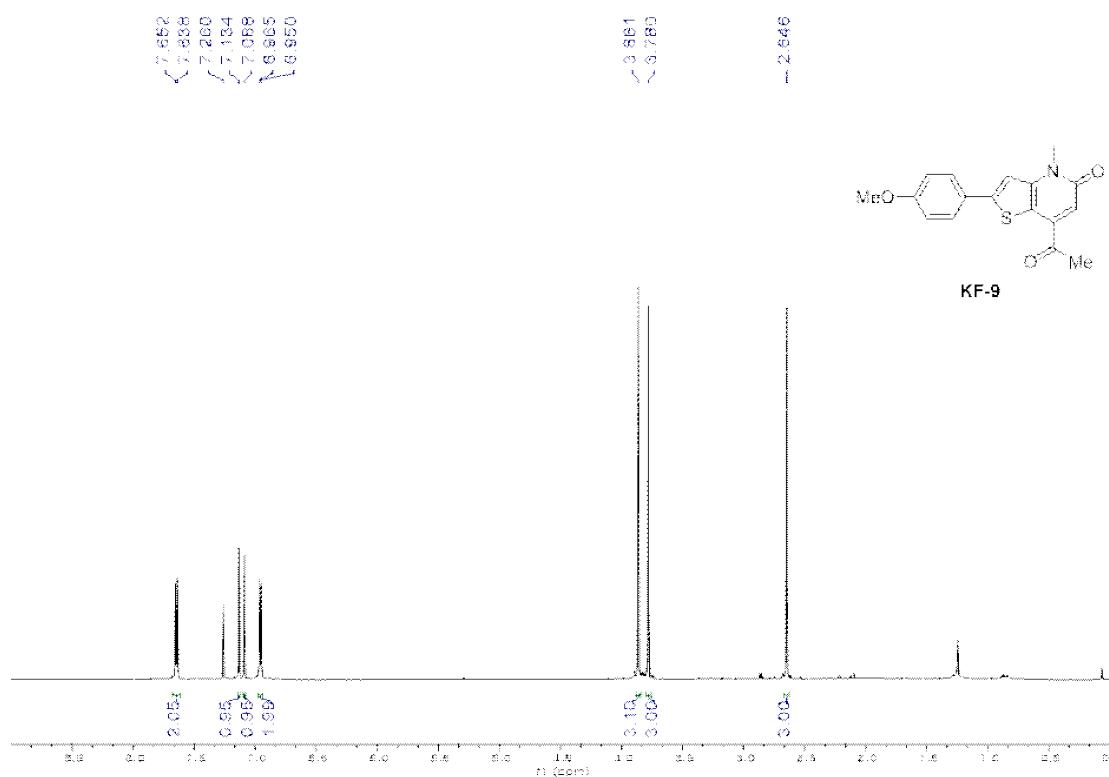


그림74. KF-9의 ¹H NMR 스펙트럼

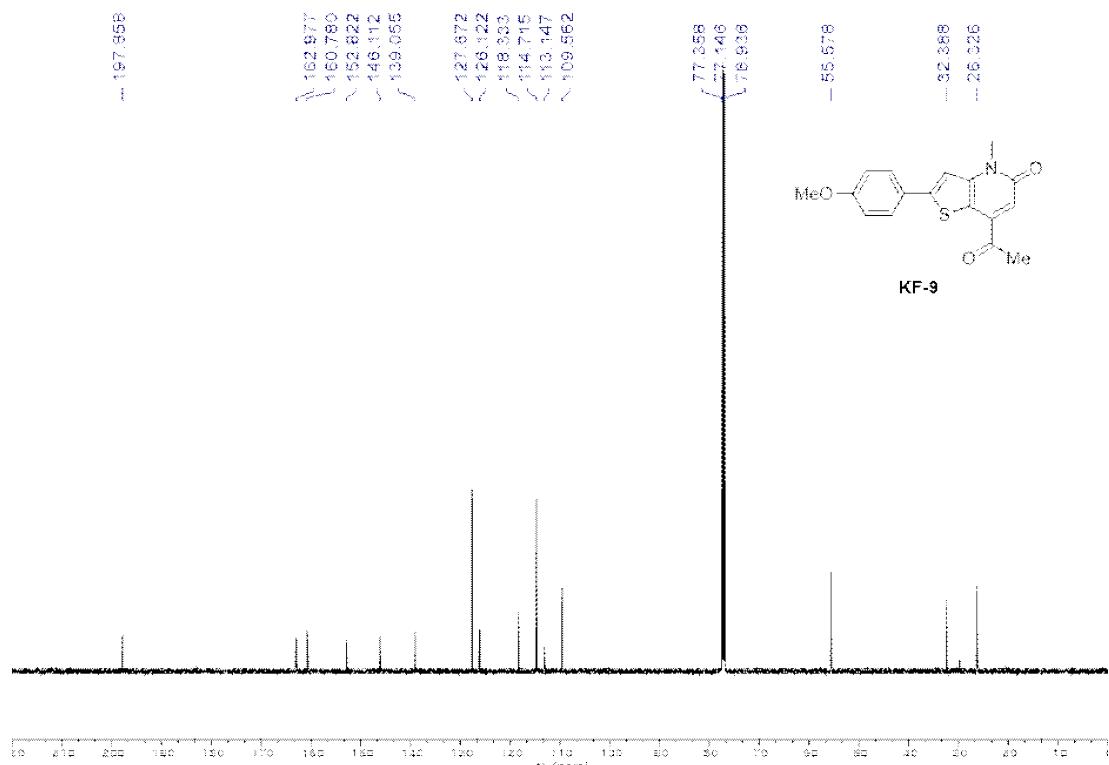
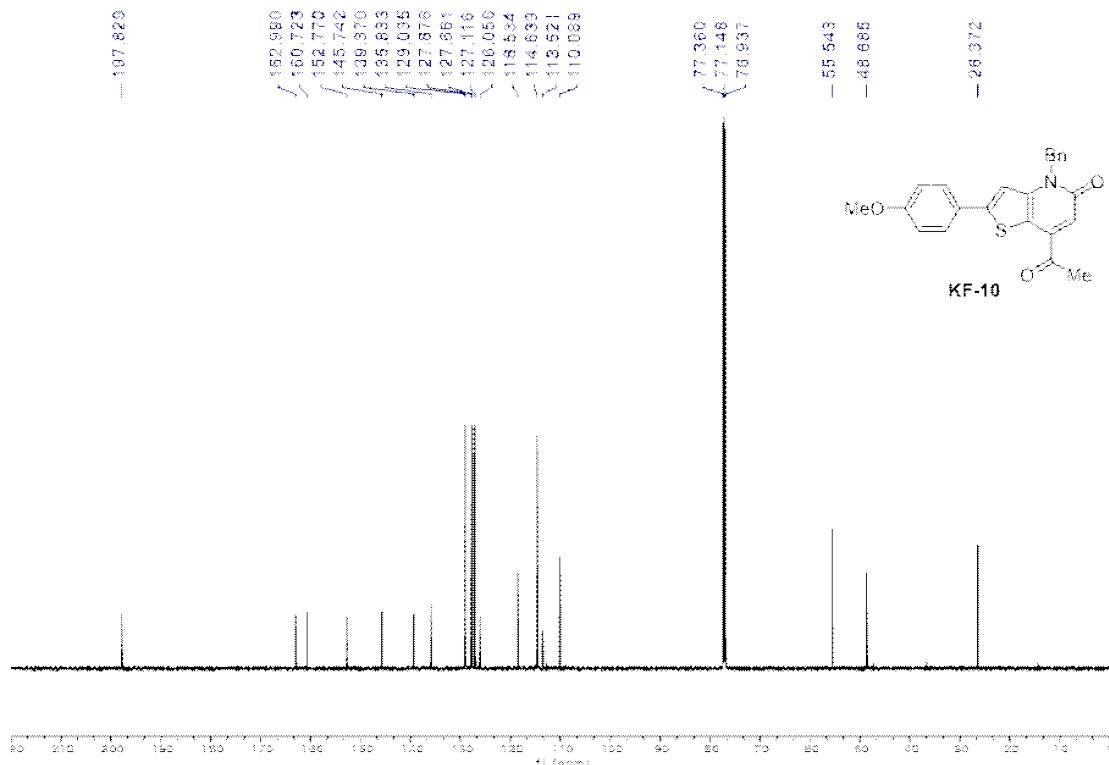
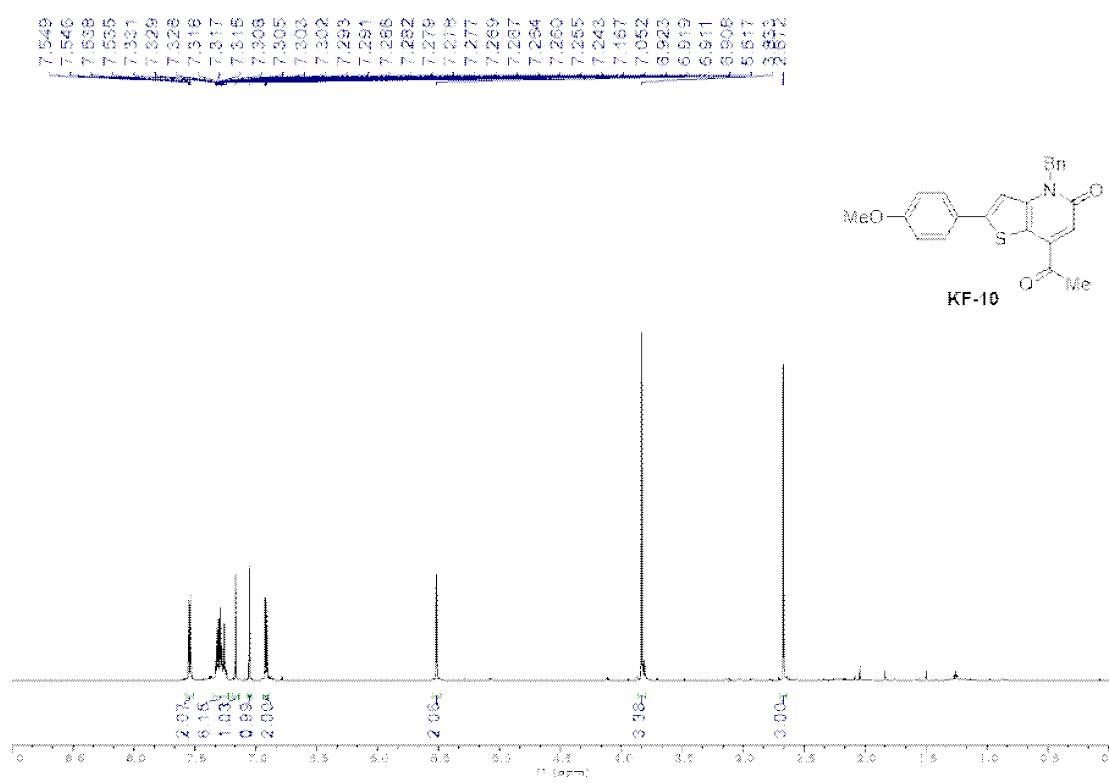


그림75. KF-9의 ¹³C NMR 스펙트럼



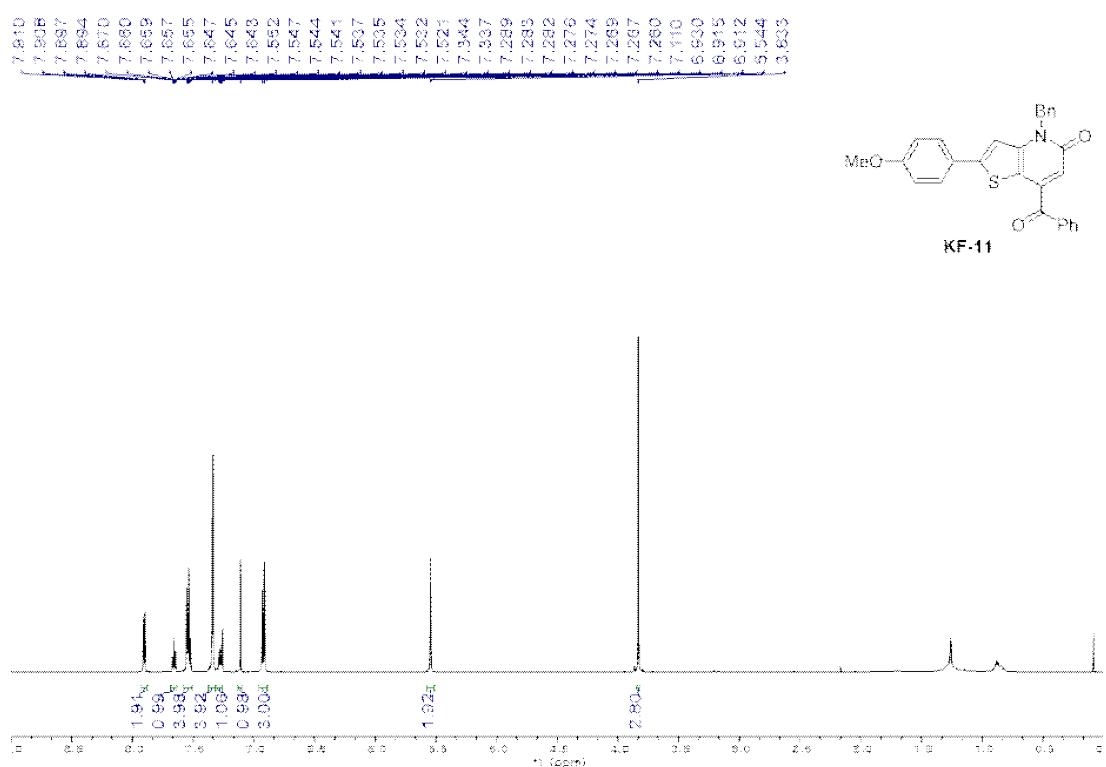


그림78. KF-11의 ^1H NMR 스펙트럼

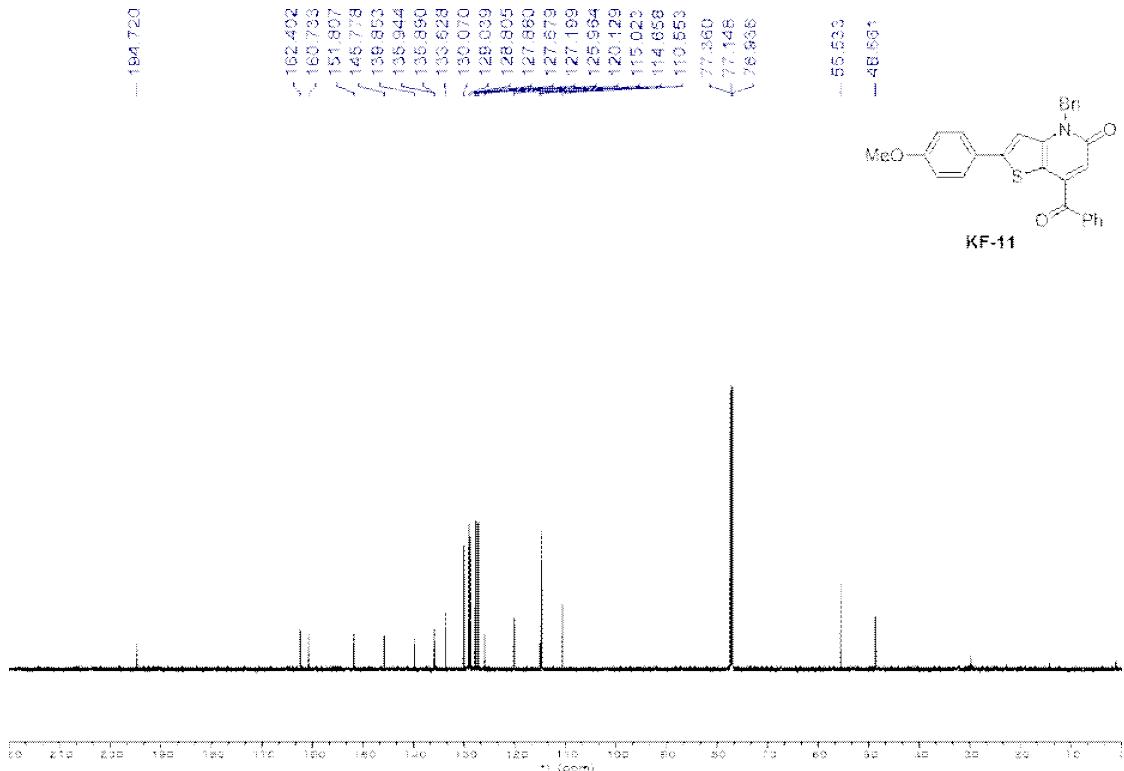


그림79. KF-11의 ^{13}C NMR 스펙트럼

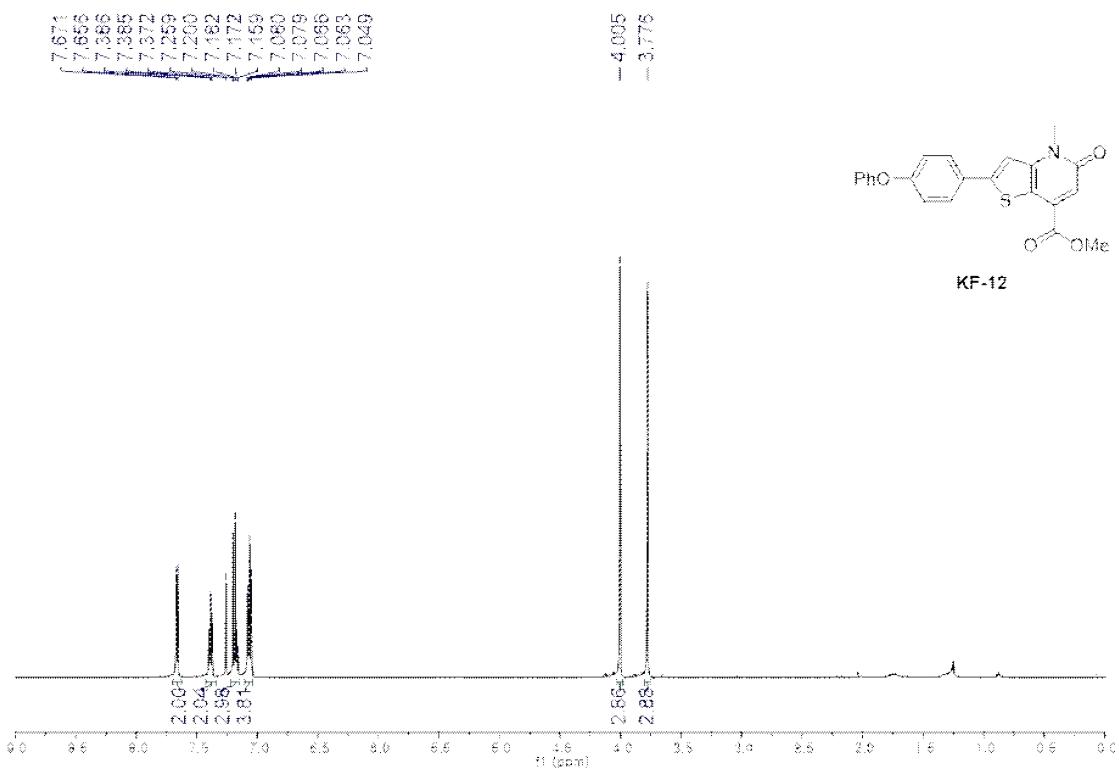


그림80. KF-12의 ¹H NMR 스펙트럼

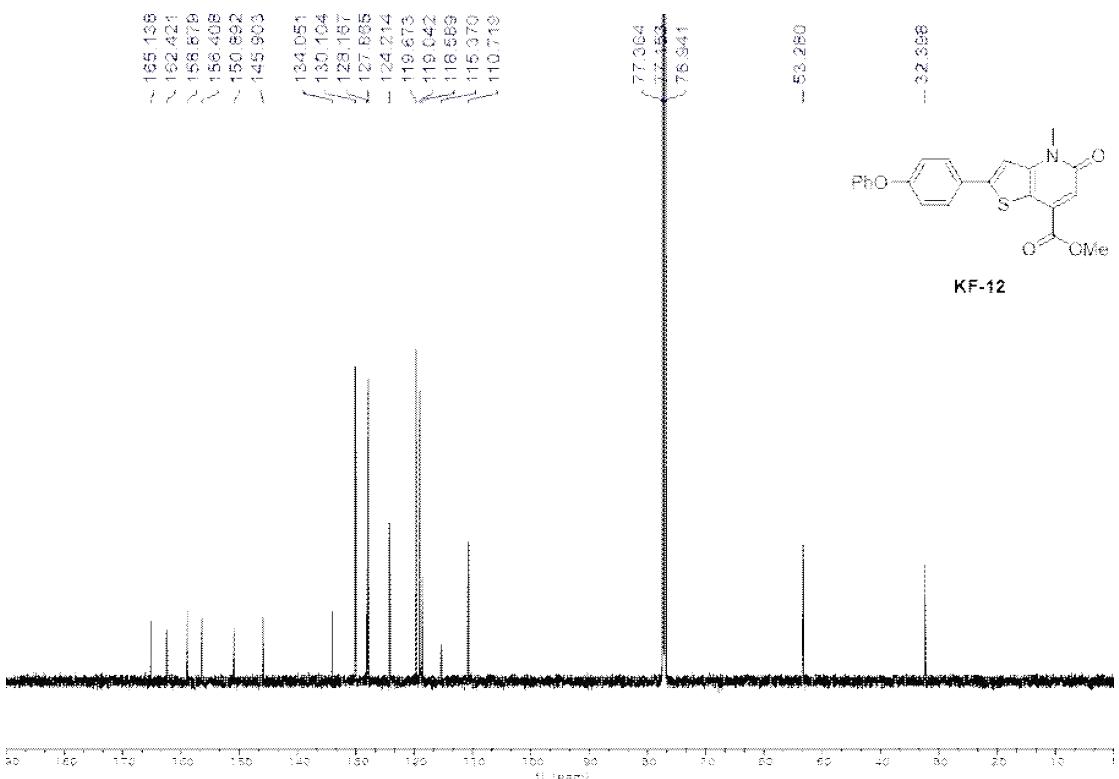


그림81. KF-12의 ¹³C NMR 스펙트럼

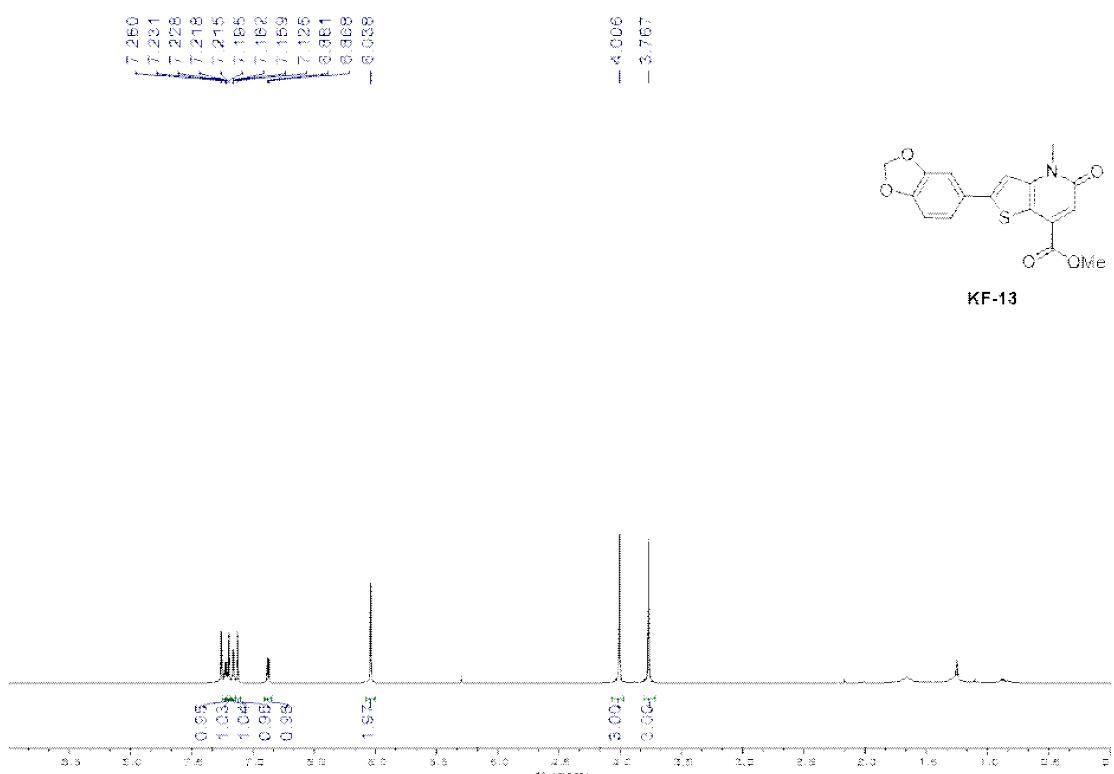


그림82. KF-13의 ^1H NMR 스펙트럼

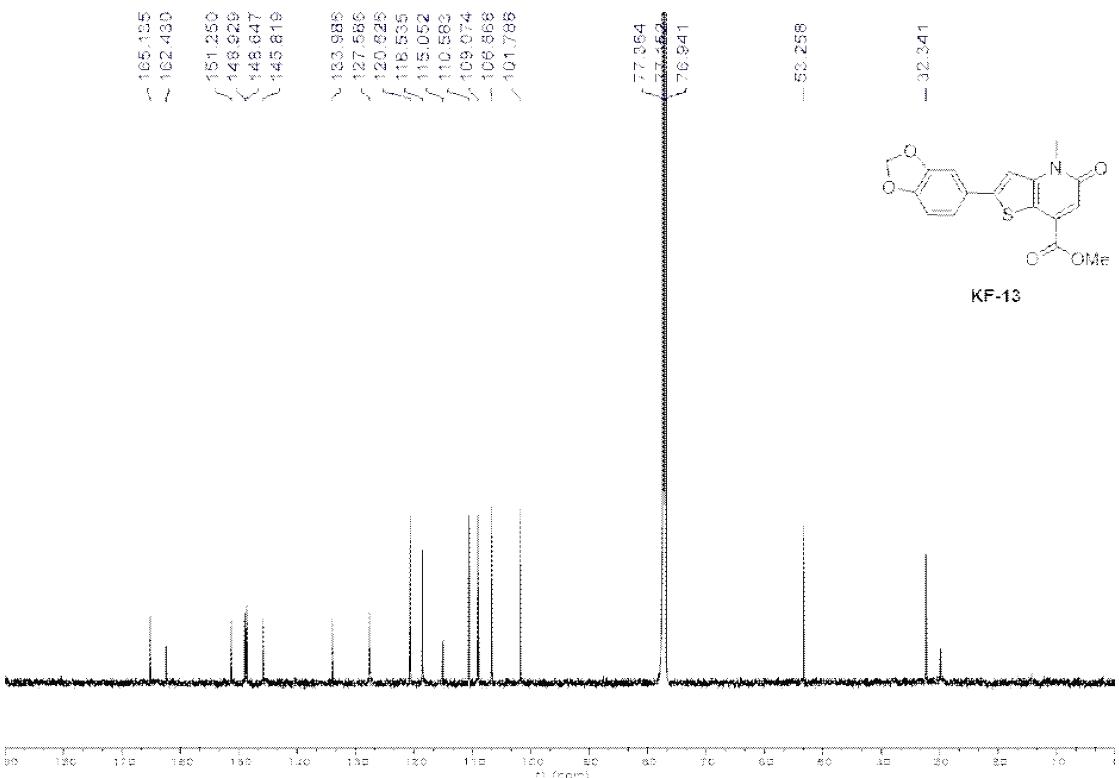


그림83. KF-13의 ^{13}C NMR 스펙트럼

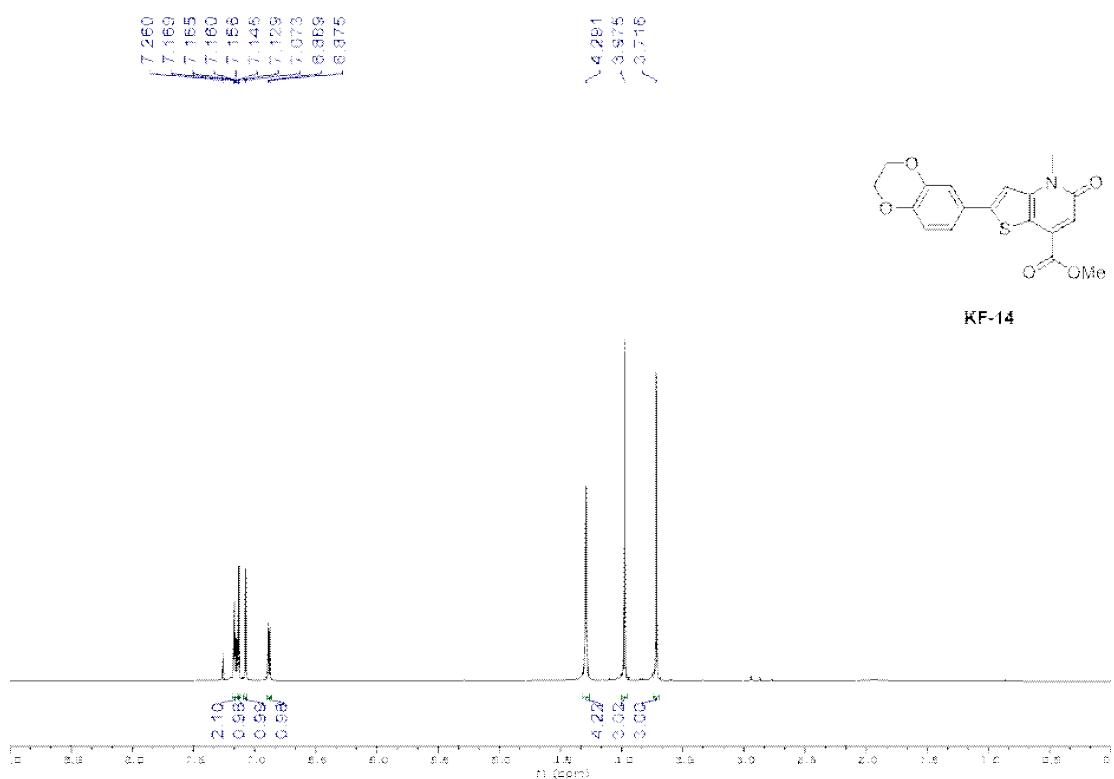


그림84. KF-14의 ¹H NMR 스펙트럼

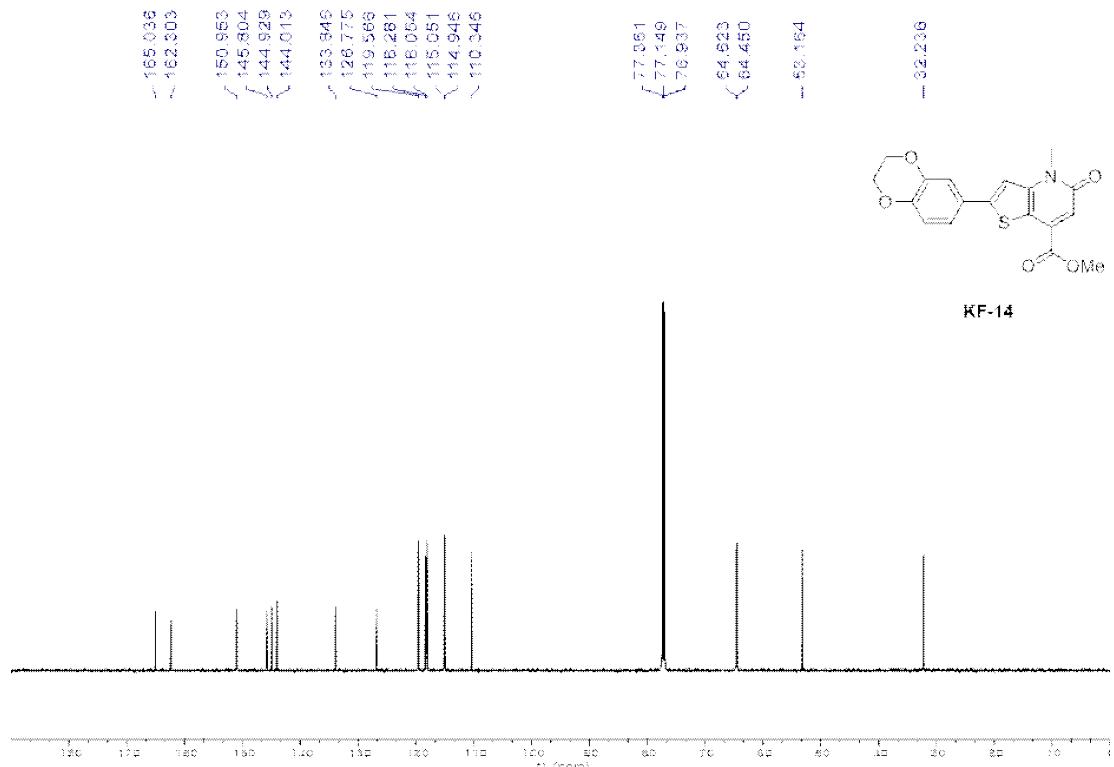


그림85. KF-14의 ¹³C NMR 스펙트럼

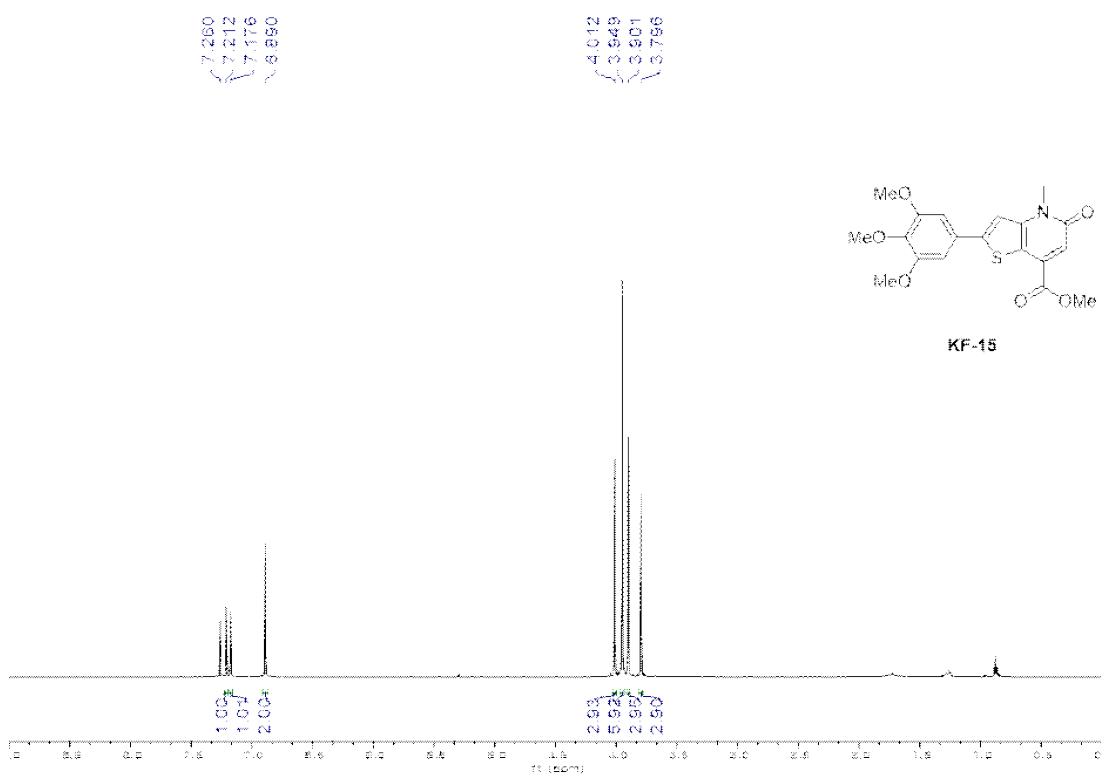


그림86. KF-15의 ¹H NMR 스펙트럼

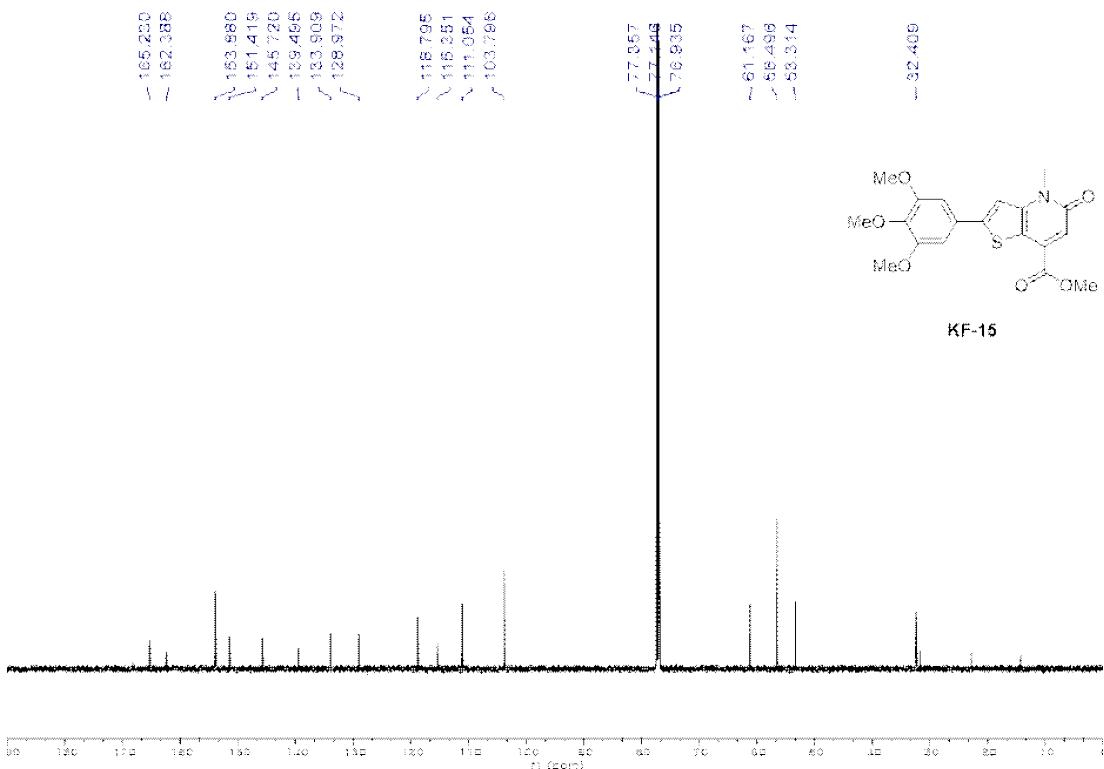


그림87. KF-15의 ¹³C NMR 스펙트럼

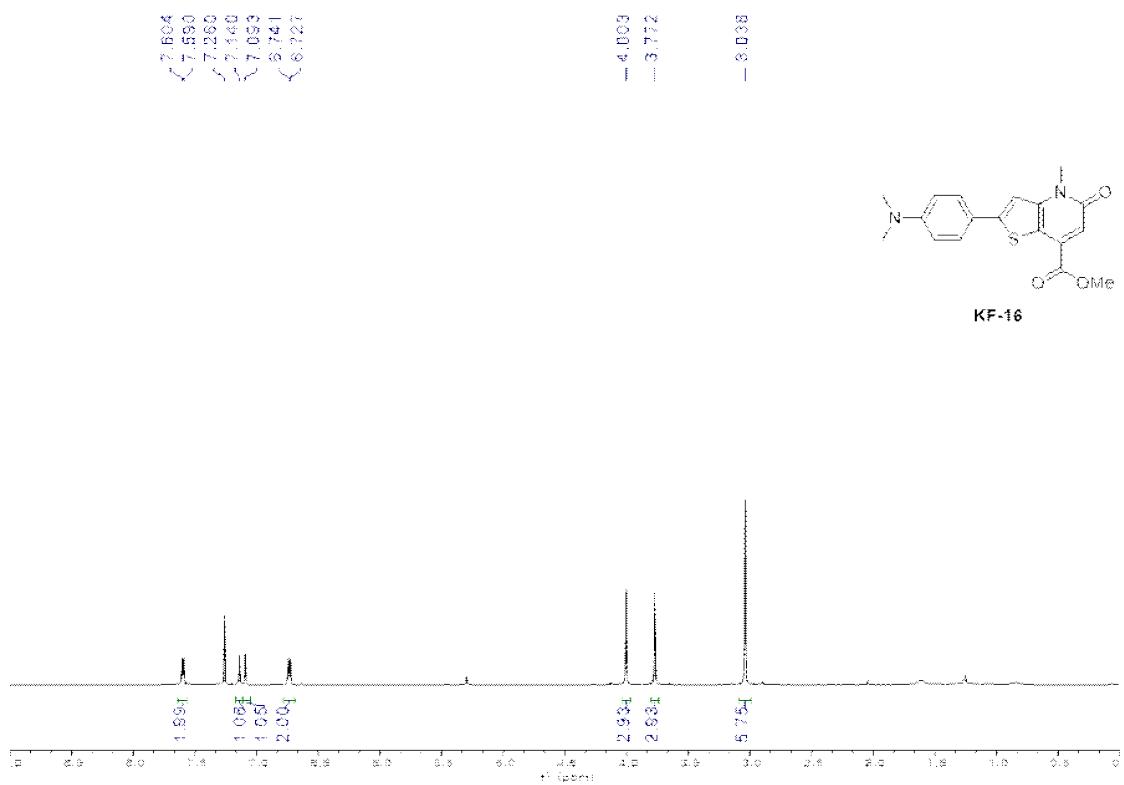


그림88. KF-16의 ¹H NMR 스펙트럼

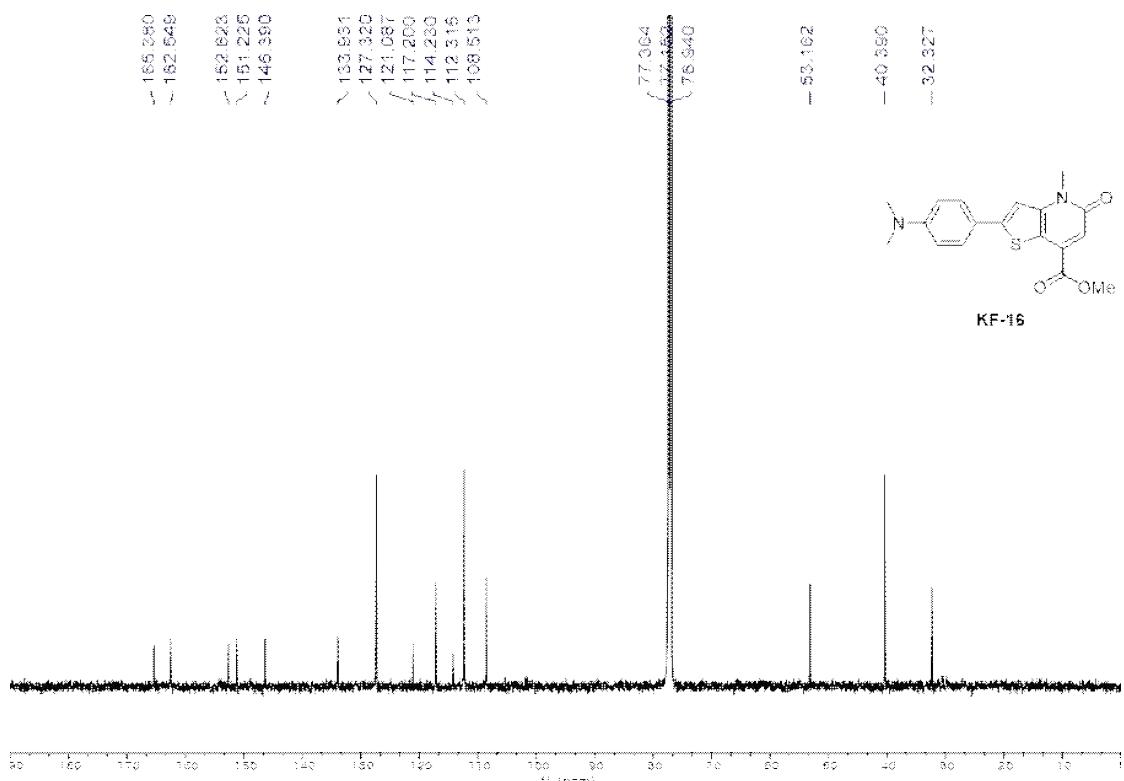


그림89. KF-16의 ¹³C NMR 스펙트럼

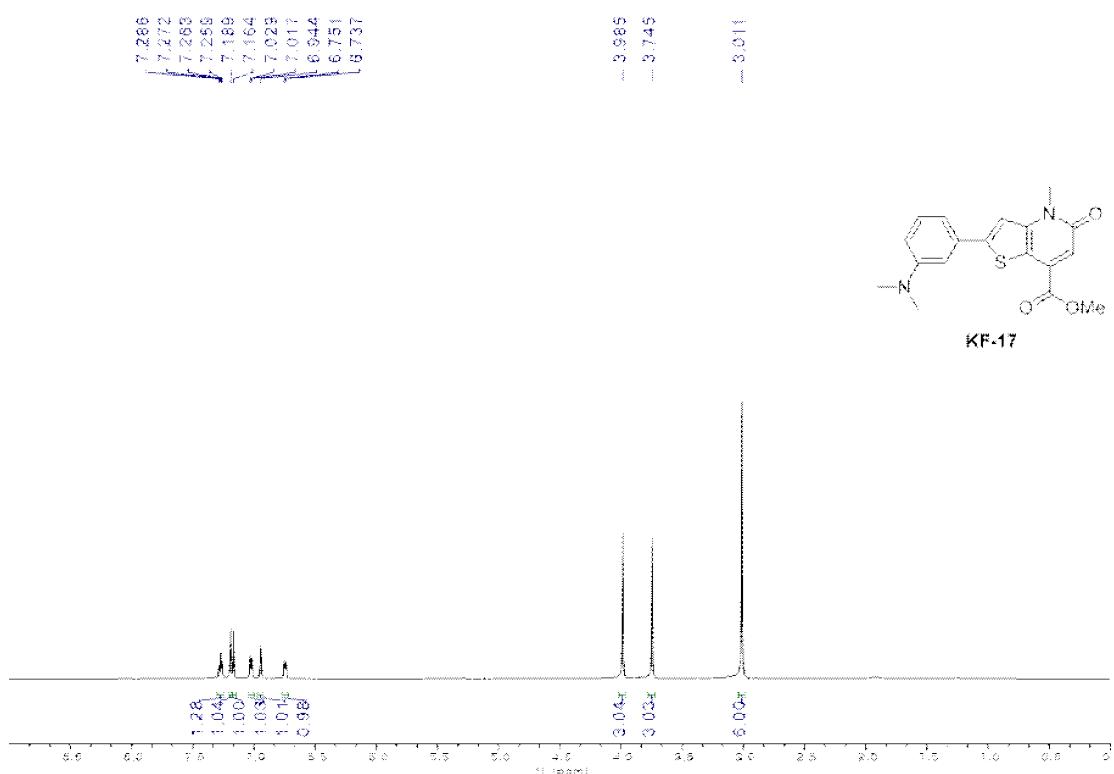


그림90. KF-17의 ¹H NMR 스펙트럼

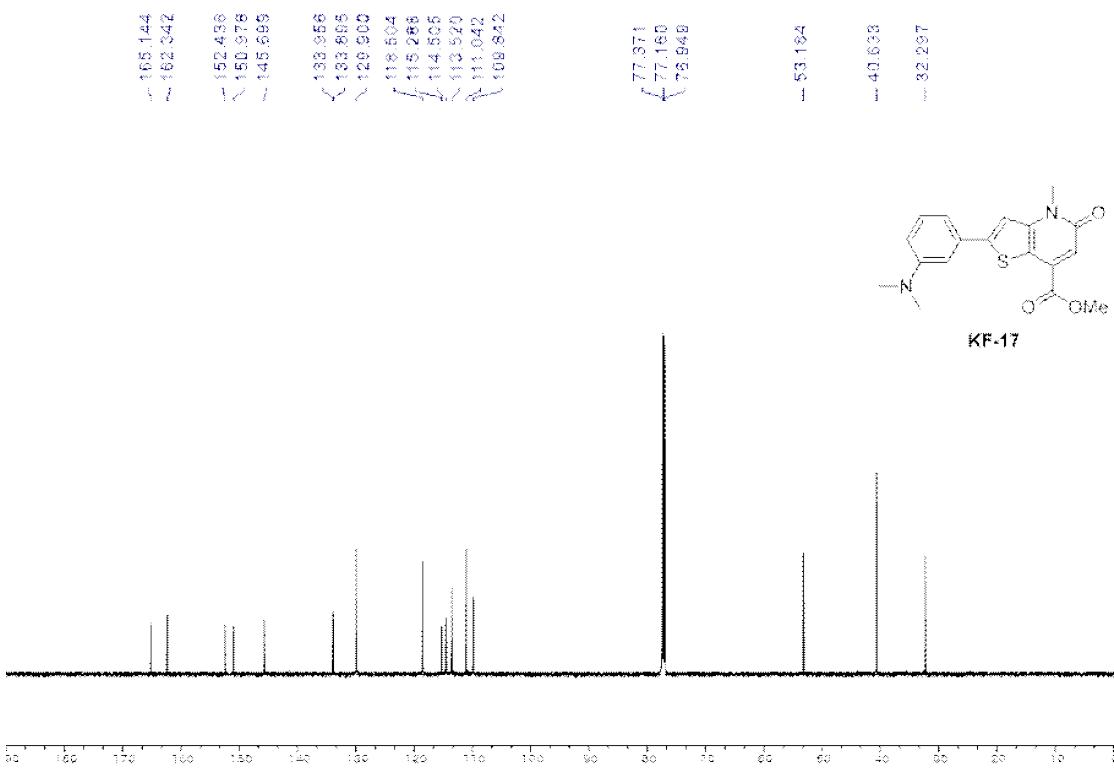


그림91. KF-17의 ¹³C NMR 스펙트럼

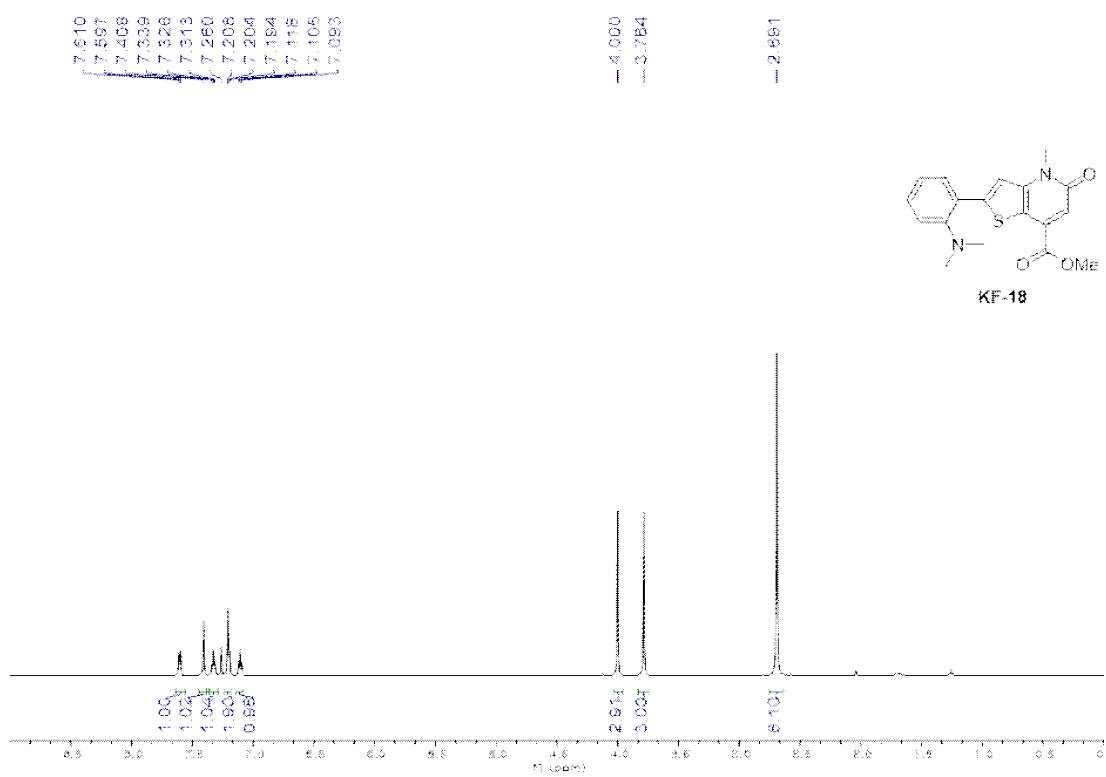


그림92. KF-18의 ¹H NMR 스펙트럼

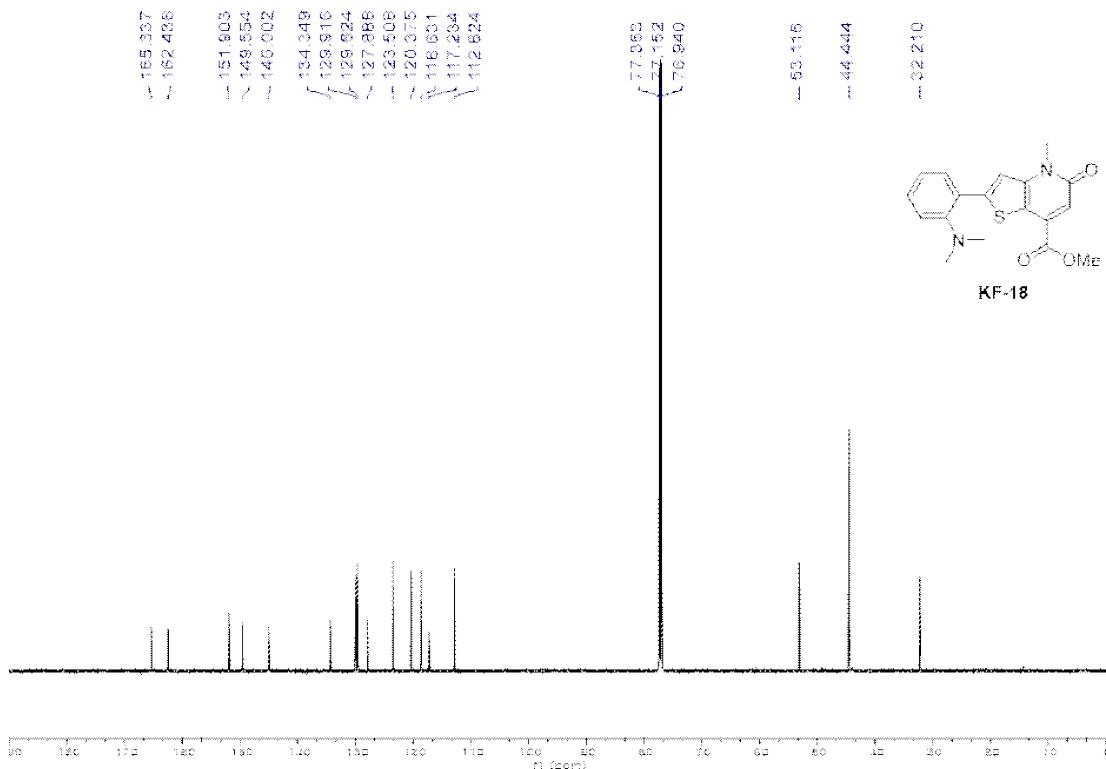


그림93. KF-18의 ¹³C NMR 스펙트럼

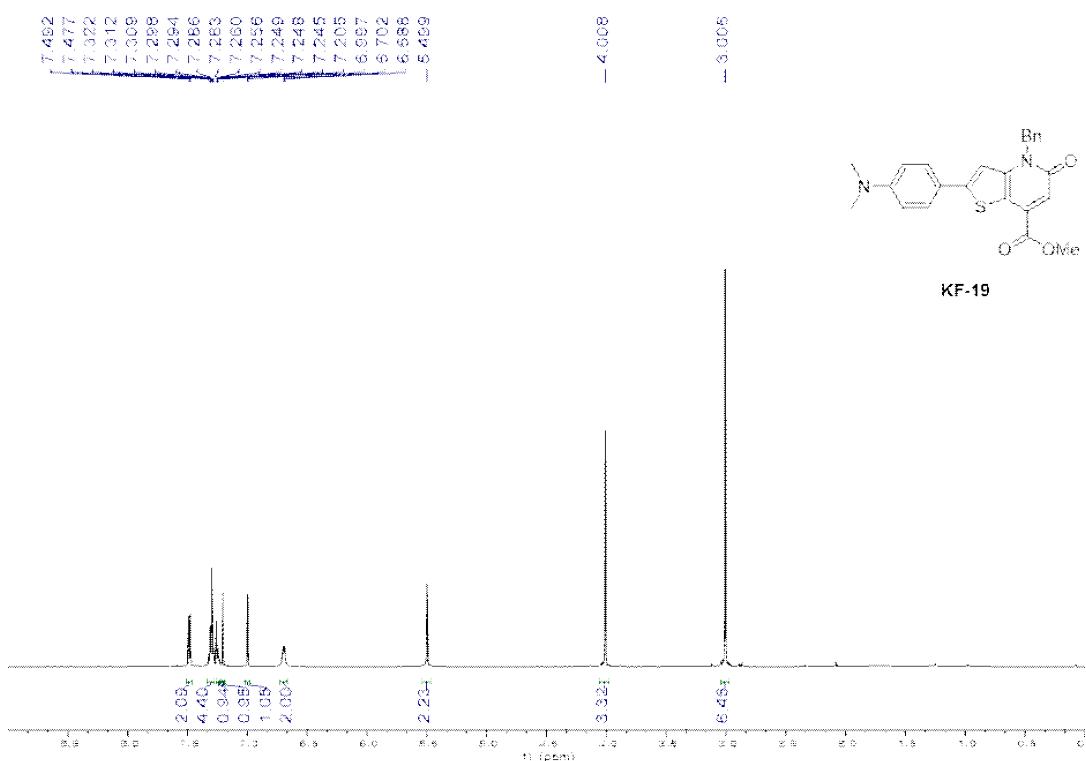


그림94. KF-19의 ¹H NMR 스펙트럼

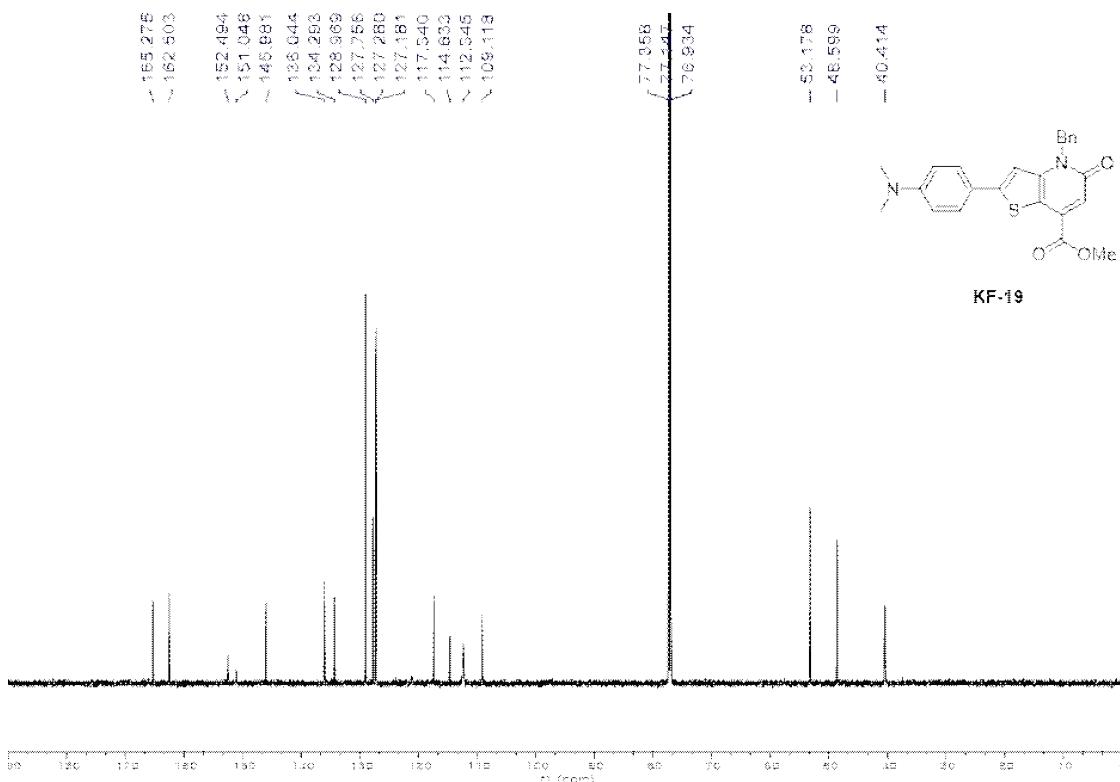


그림95. KF-19의 ¹³C NMR 스펙트럼

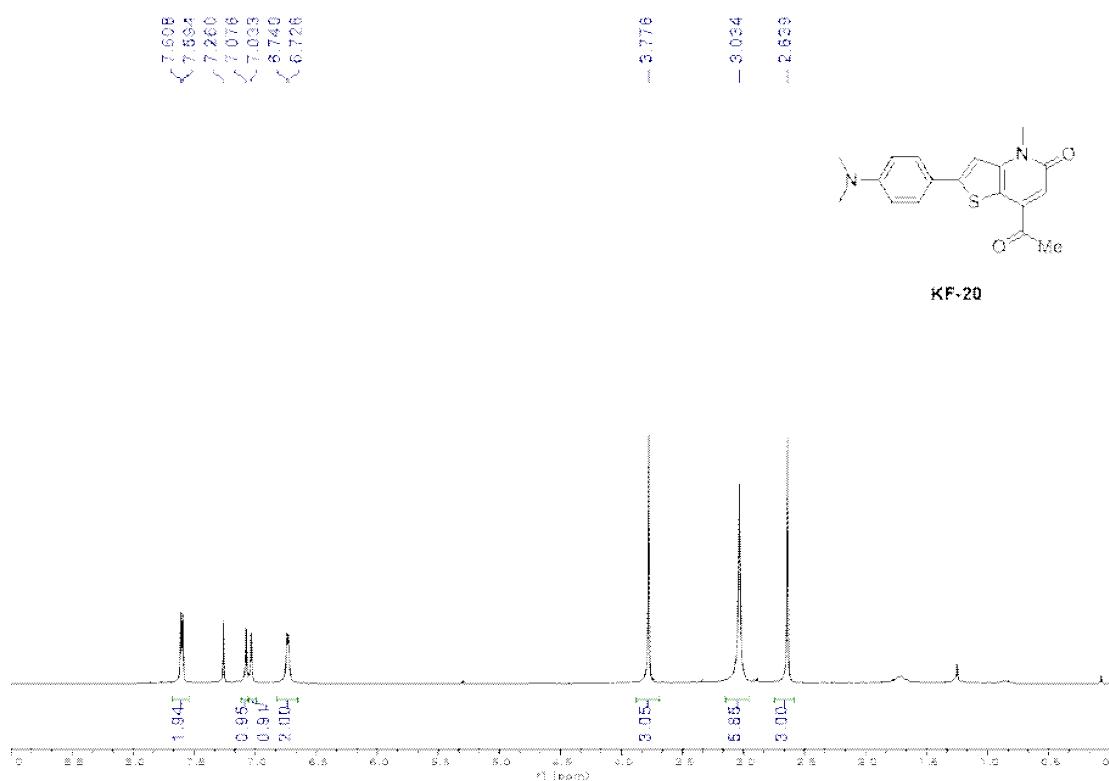


그림96. KF-20의 ^1H NMR 스펙트럼

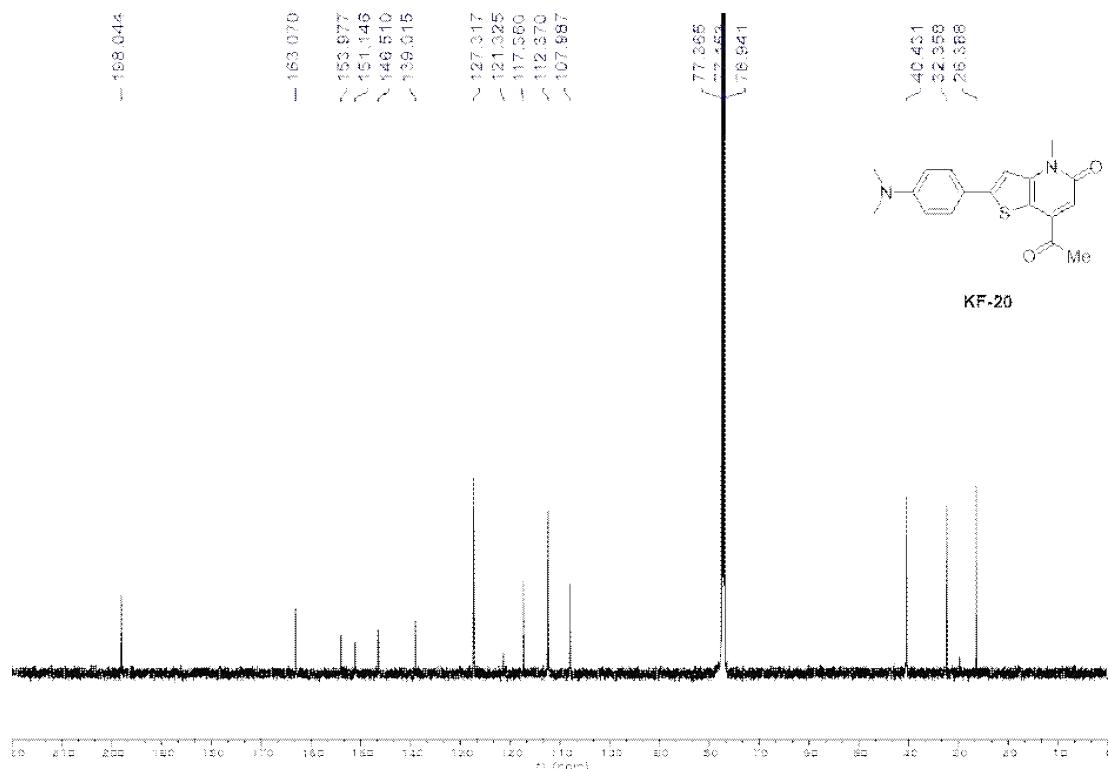


그림97. KF-20의 ^{13}C NMR 스펙트럼

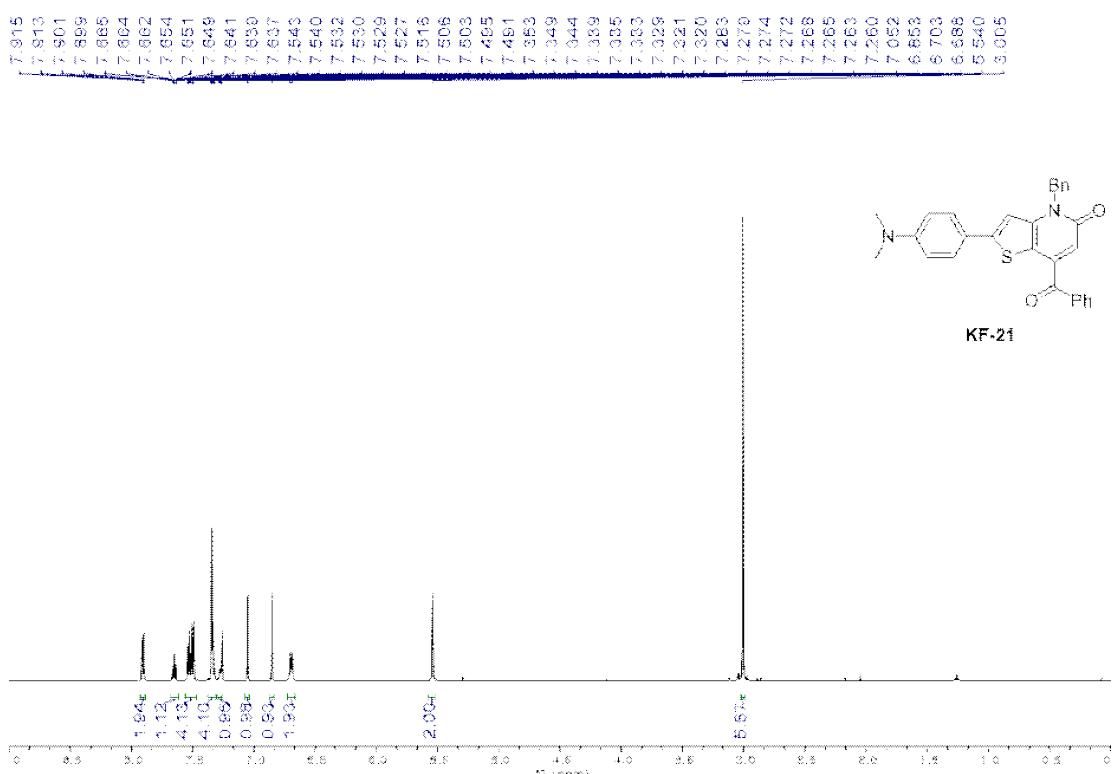


그림98. KF-21의 ^1H NMR 스펙트럼

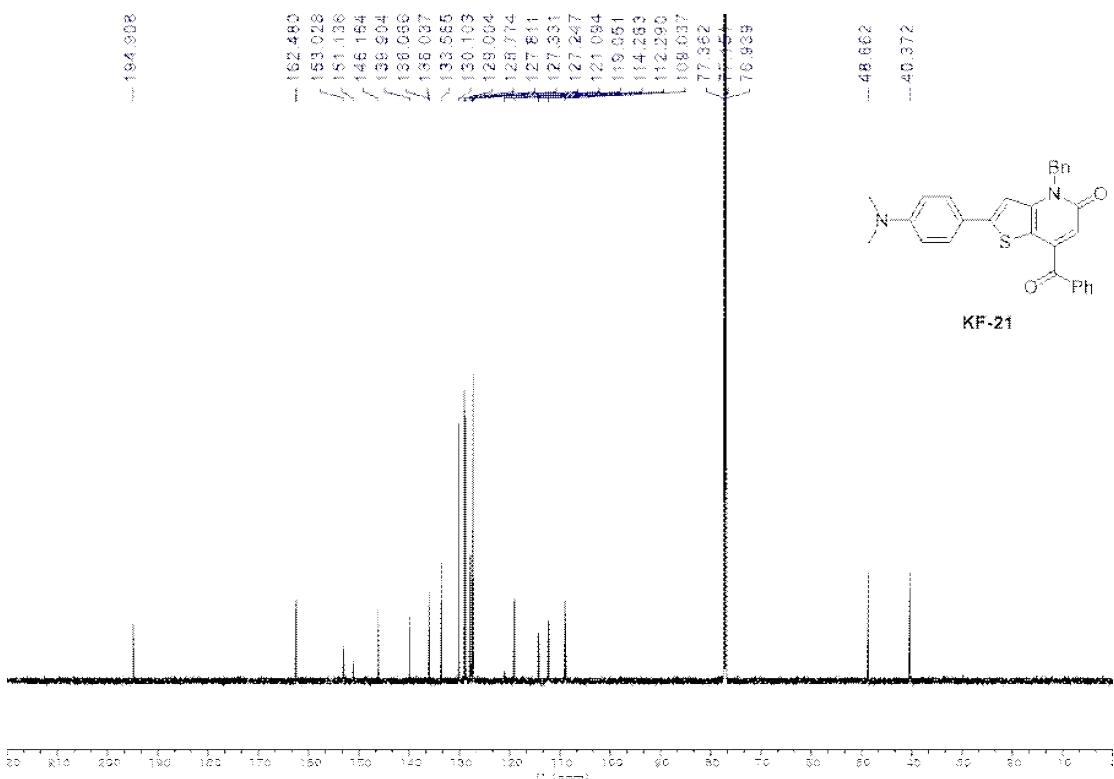
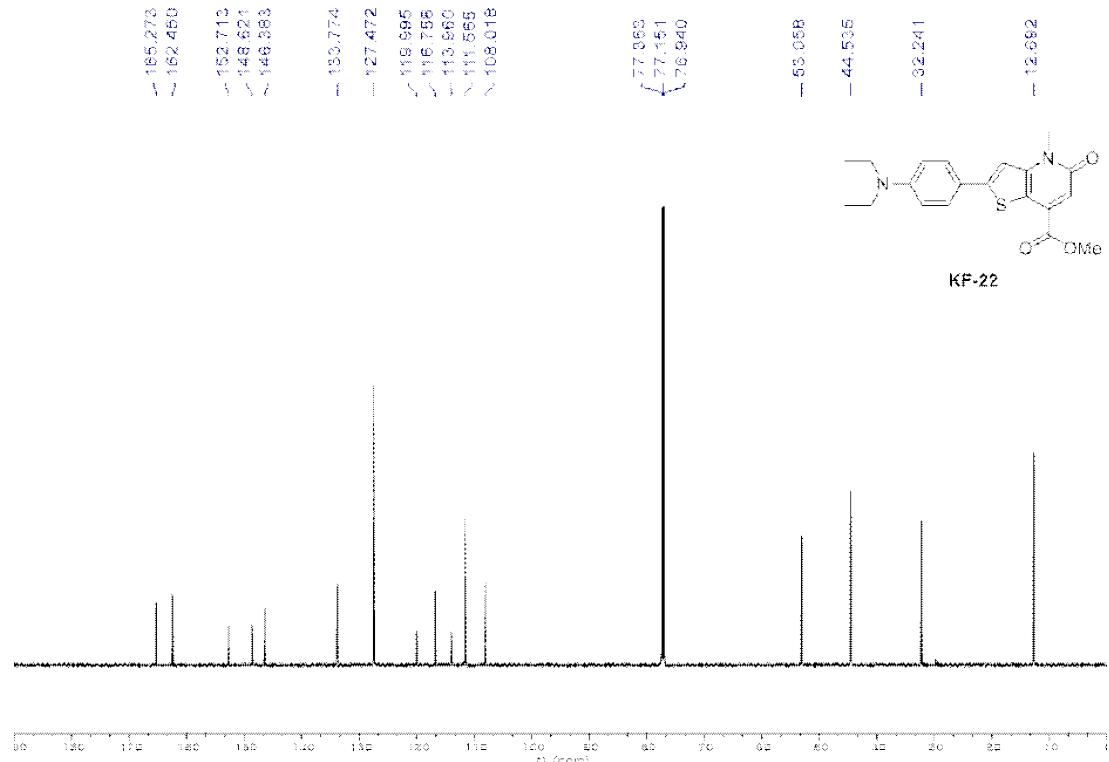
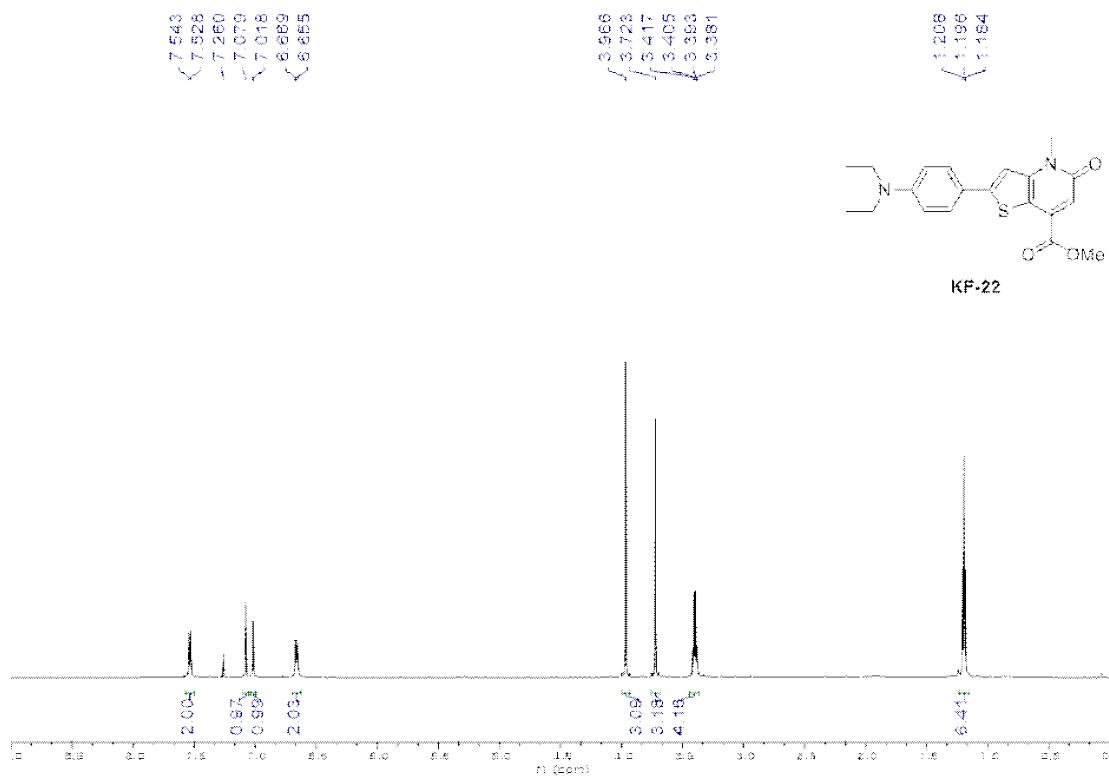


그림99. KF-21의 ^{13}C NMR 스펙트럼



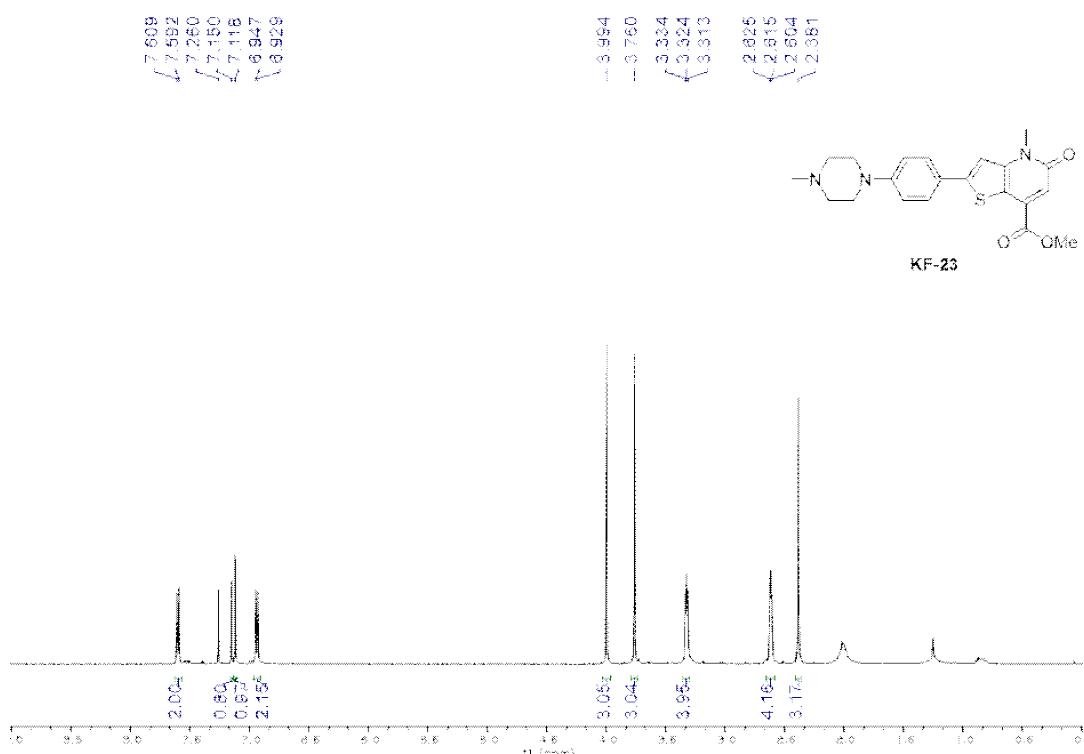


그림102. KF-23의 ¹H NMR 스펙트럼

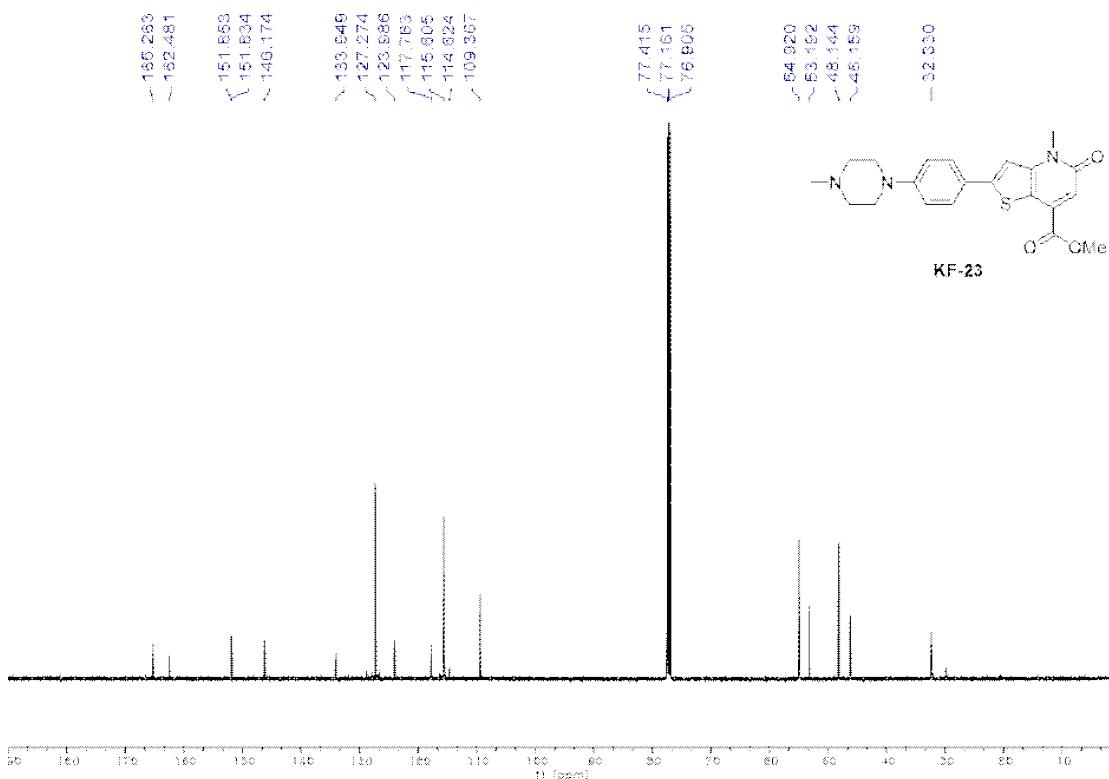


그림103. KF-23의 ¹³C NMR 스펙트럼

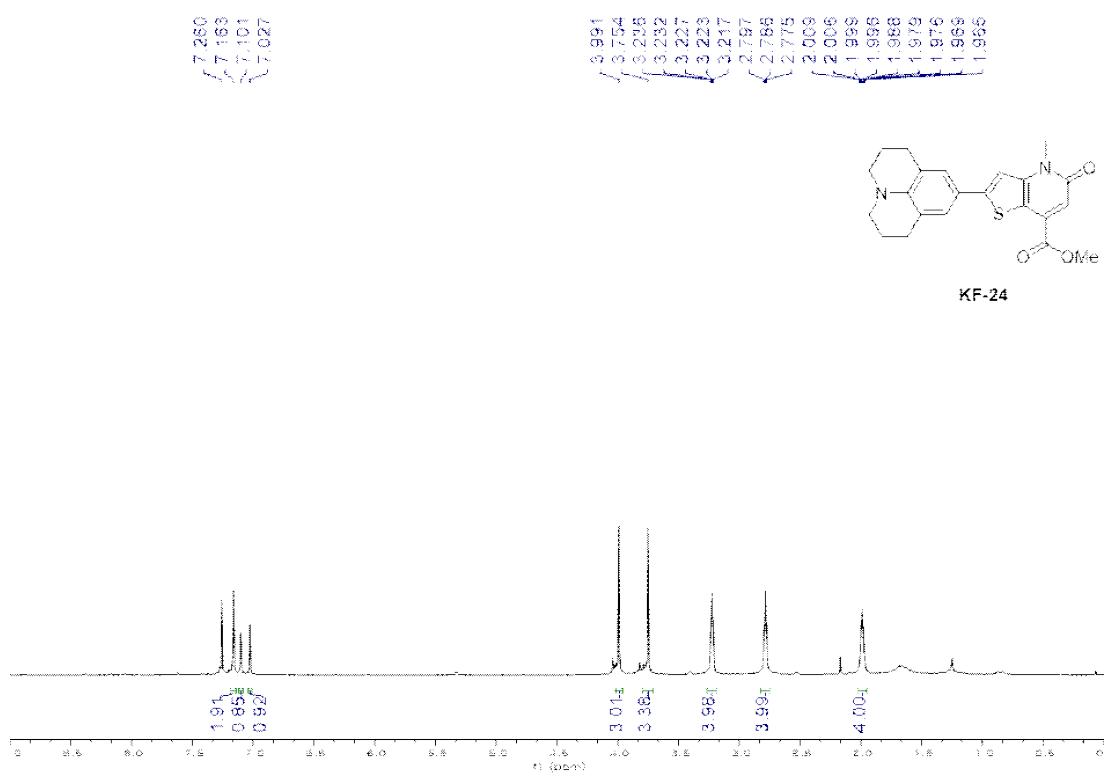


그림104. KF-24의 ¹H NMR 스펙트럼

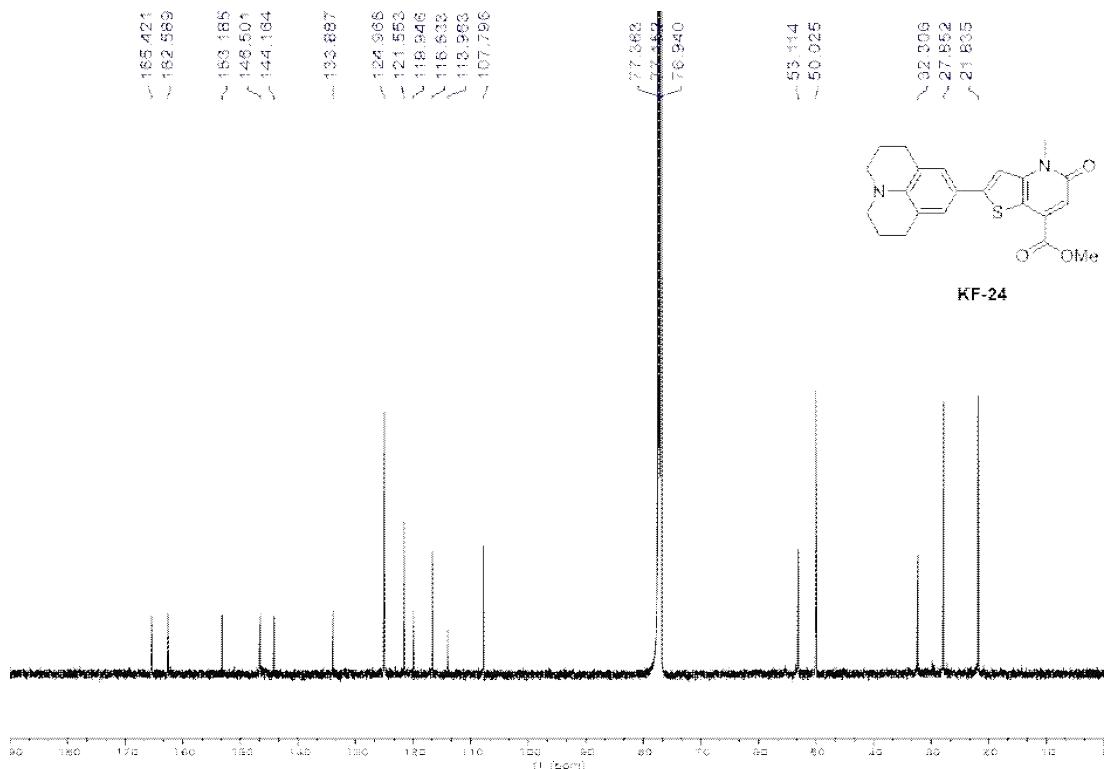


그림105. KF-24의 ¹³C NMR 스펙트럼

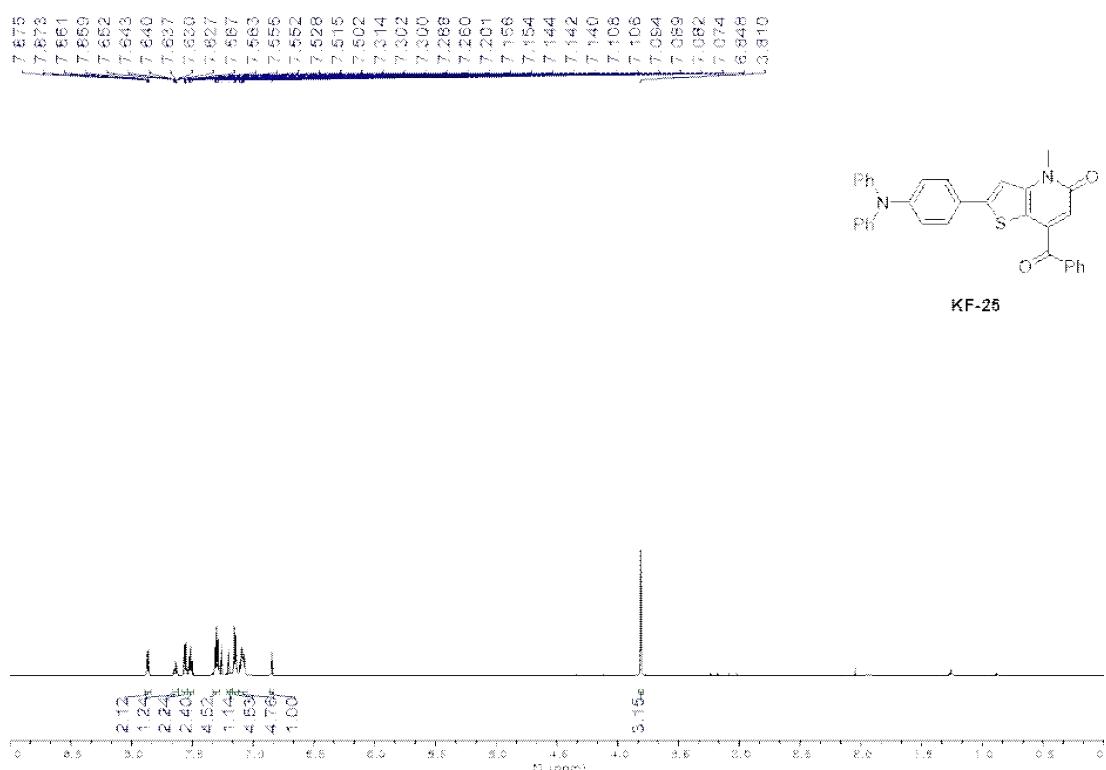


그림106. KF-25의 ¹H NMR 스펙트럼

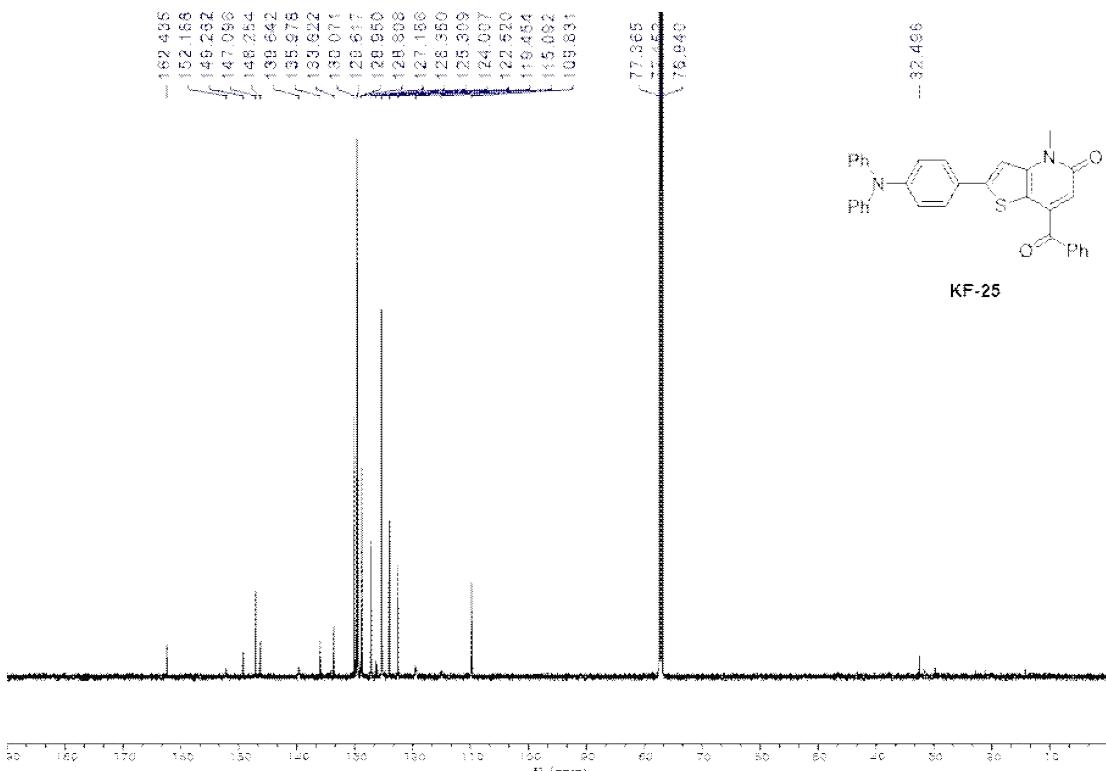


그림107. KF-25의 ¹³C NMR 스펙트럼

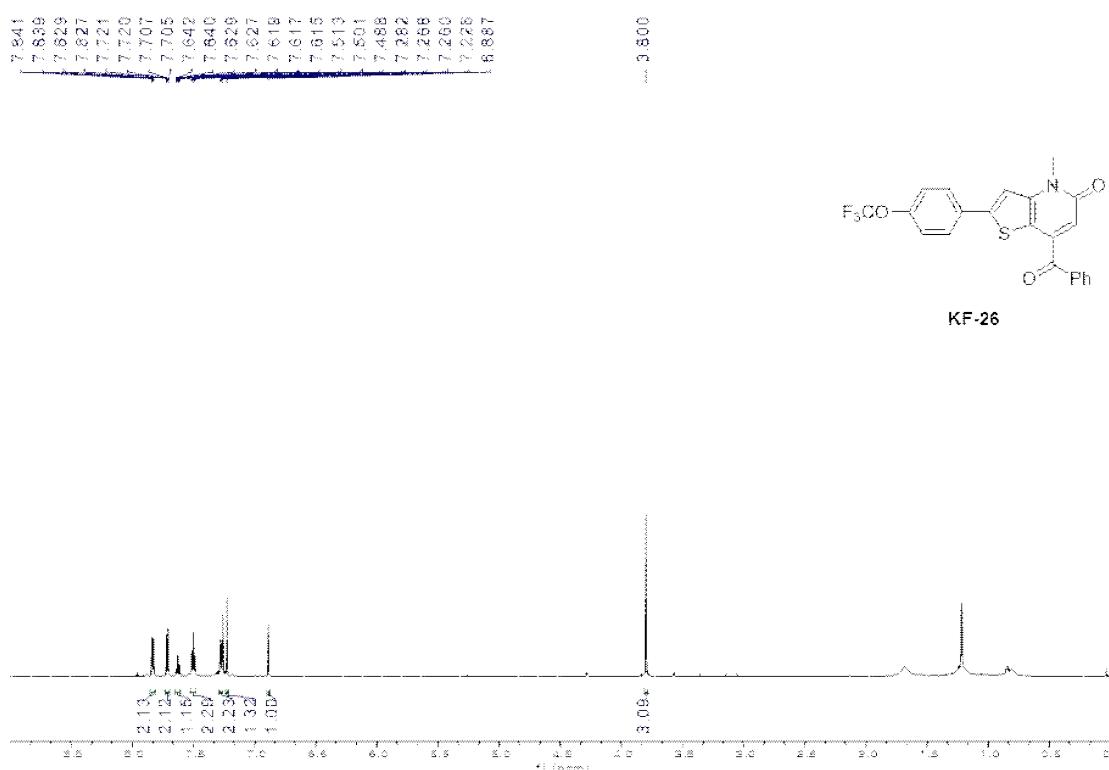


그림108. KF-26의 ¹H NMR 스펙트럼

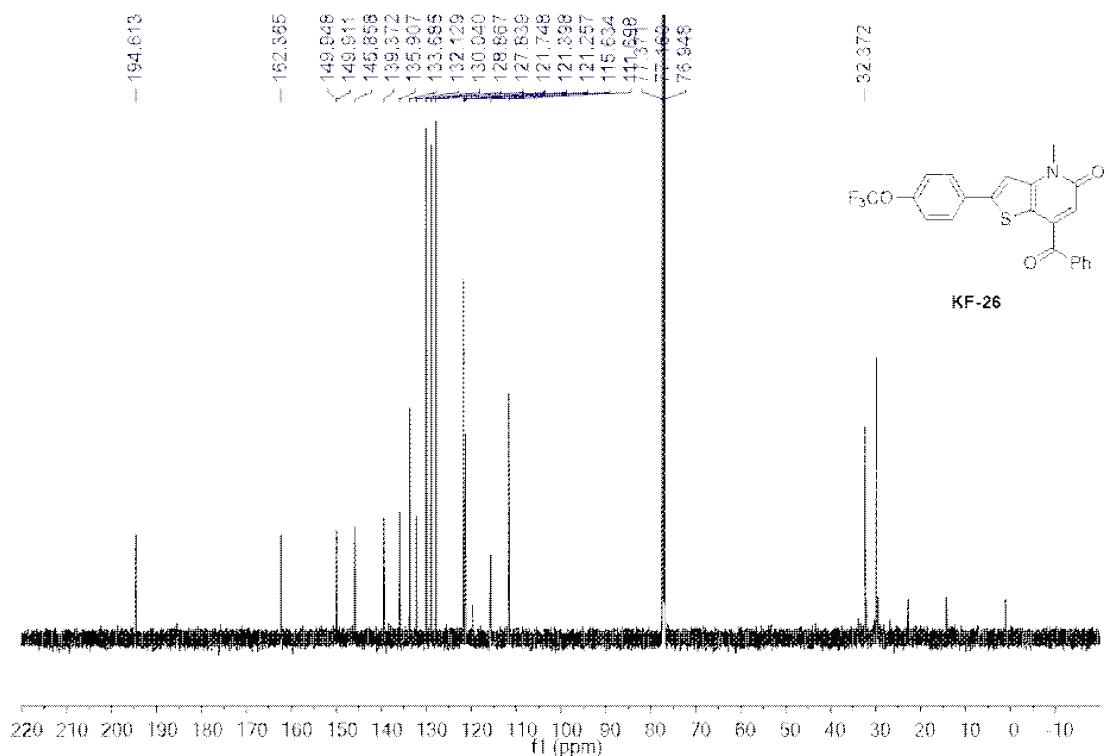


그림109. KF-26의 ¹³C NMR 스펙트럼

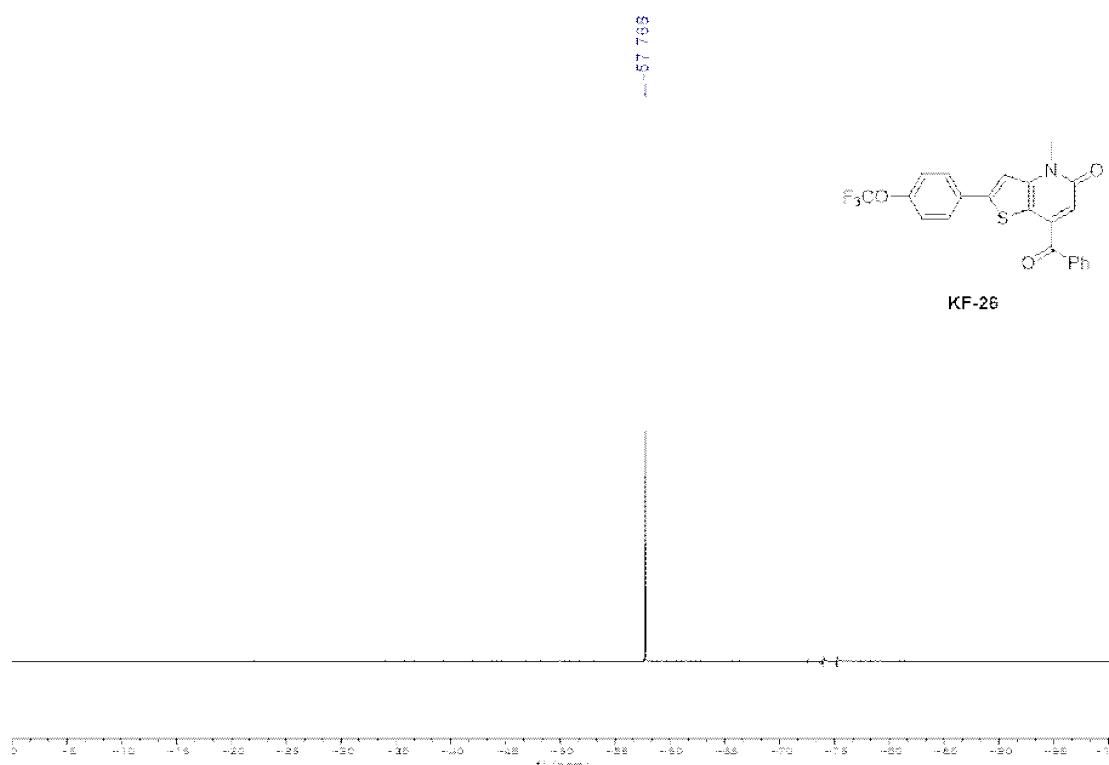


그림110. KF-26의 ^{19}F NMR 스펙트럼

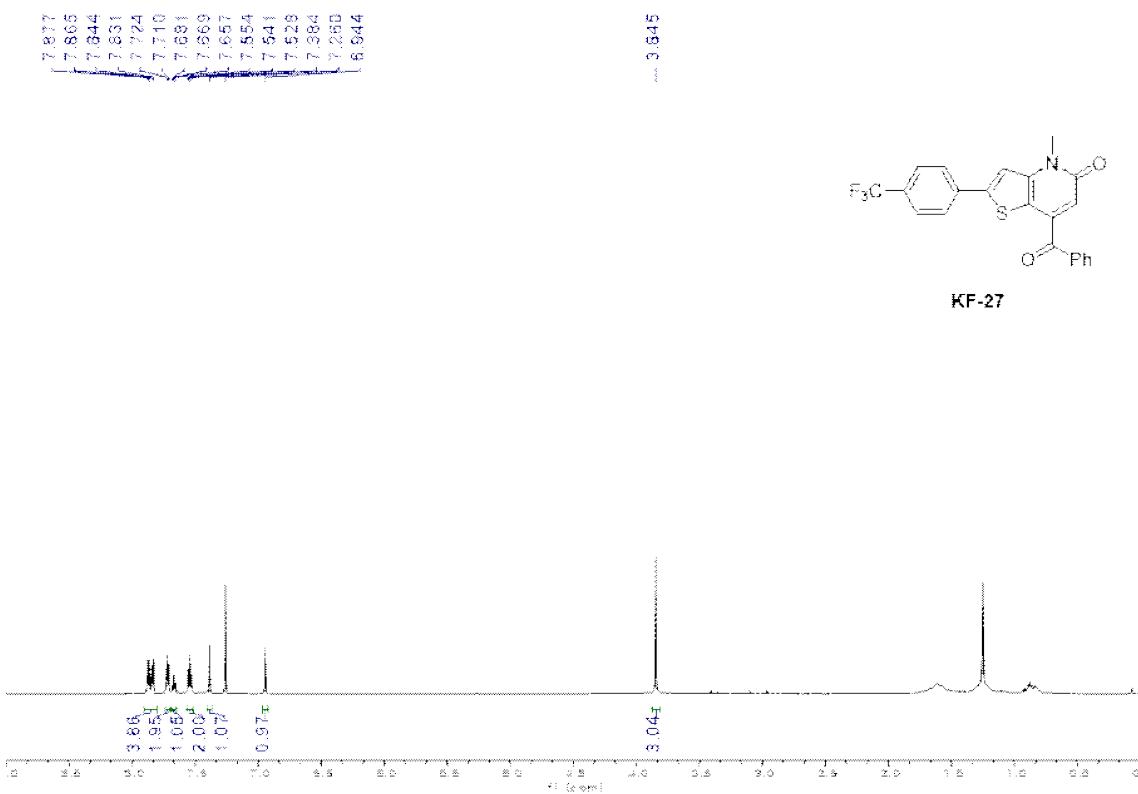


그림111. KF-27의 ^1H NMR 스펙트럼

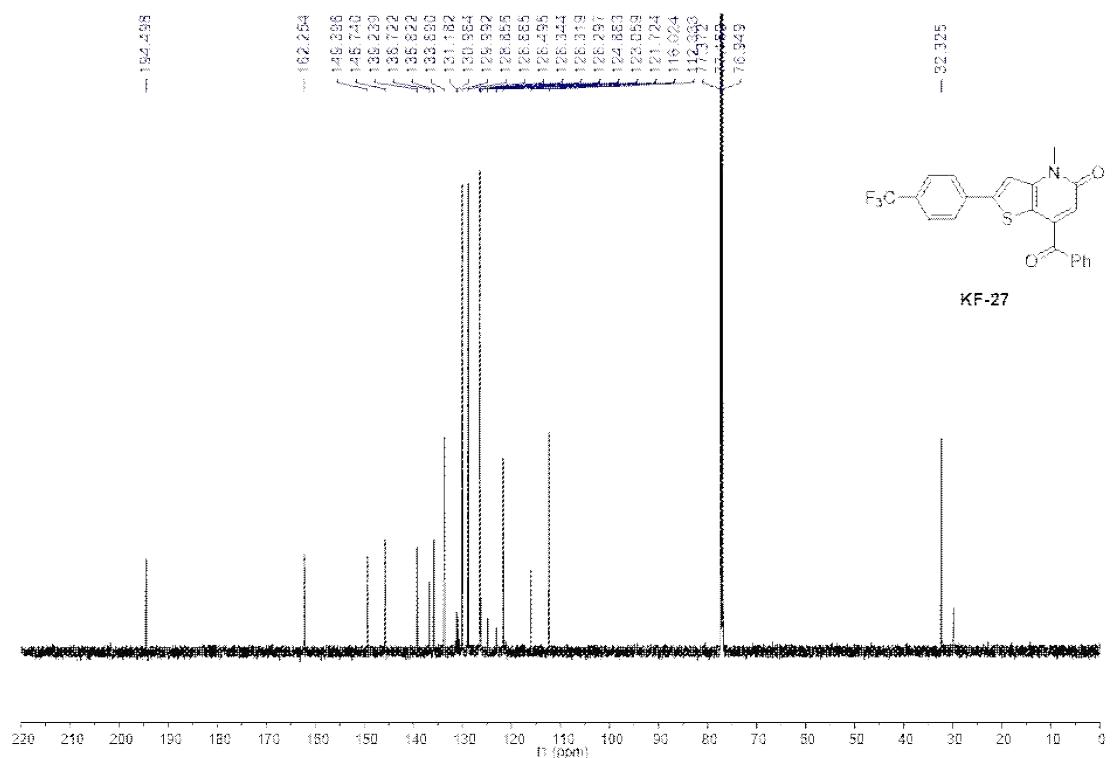


그림112. KF-27의 ^{13}C NMR 스펙트럼

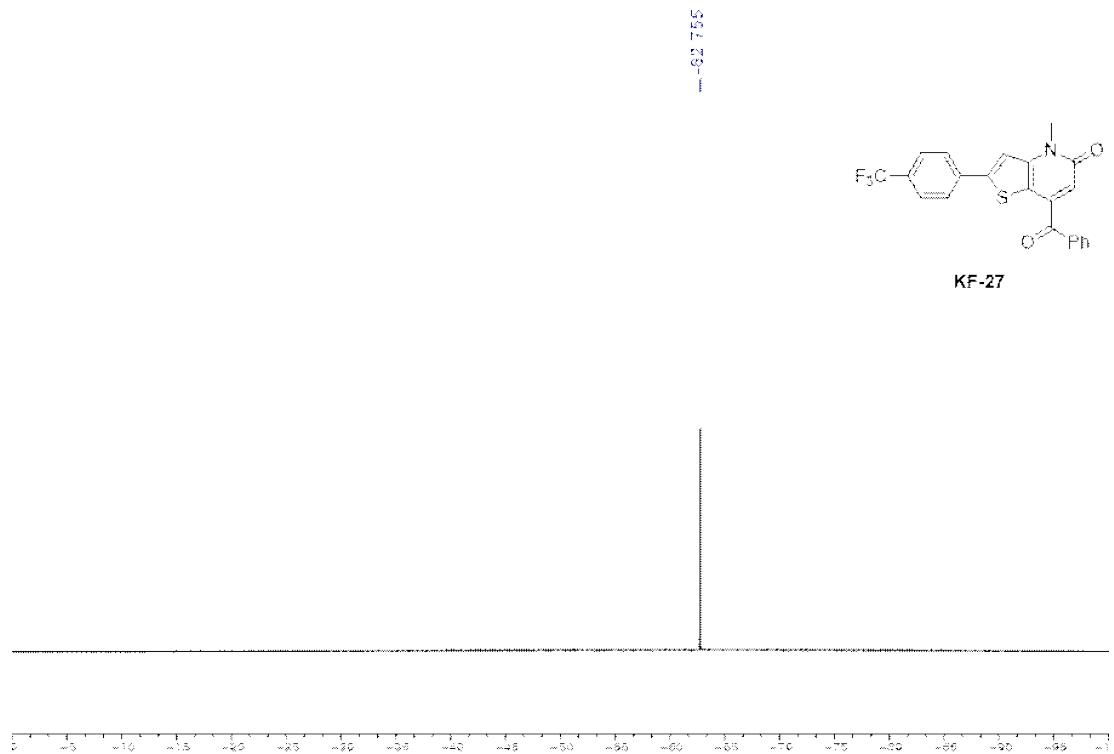


그림113. KF-27의 ^{19}F NMR 스펙트럼

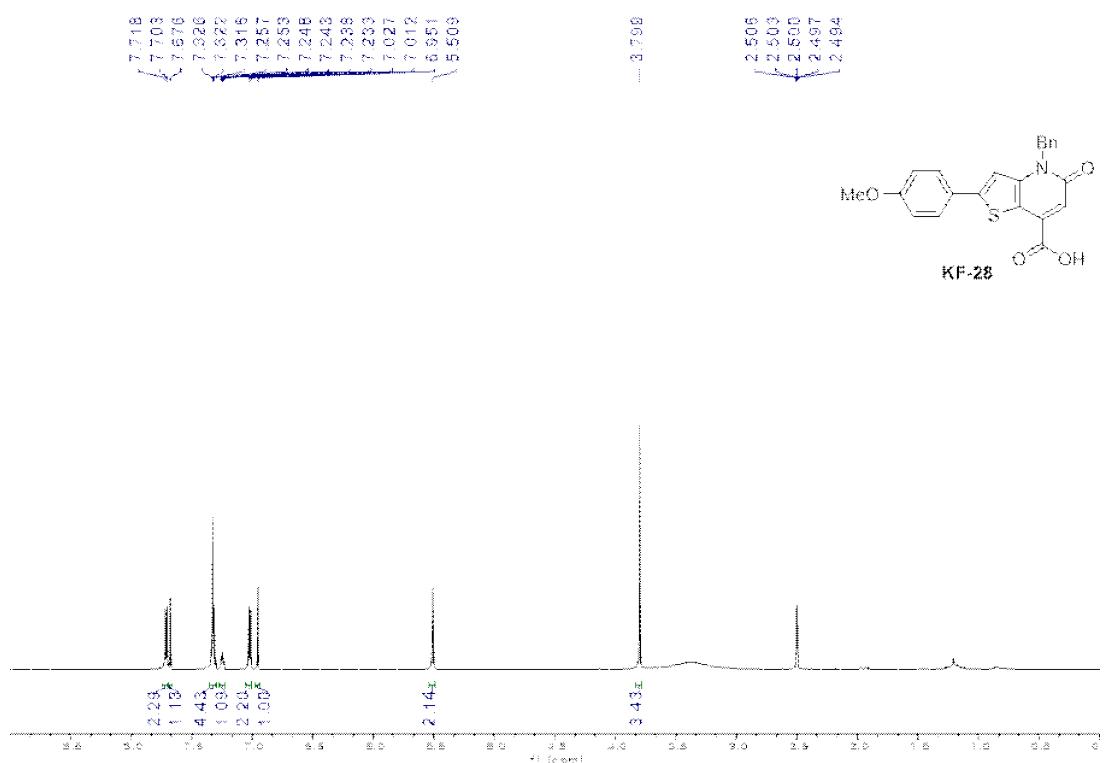


그림114. KF-28의 ¹H NMR 스펙트럼

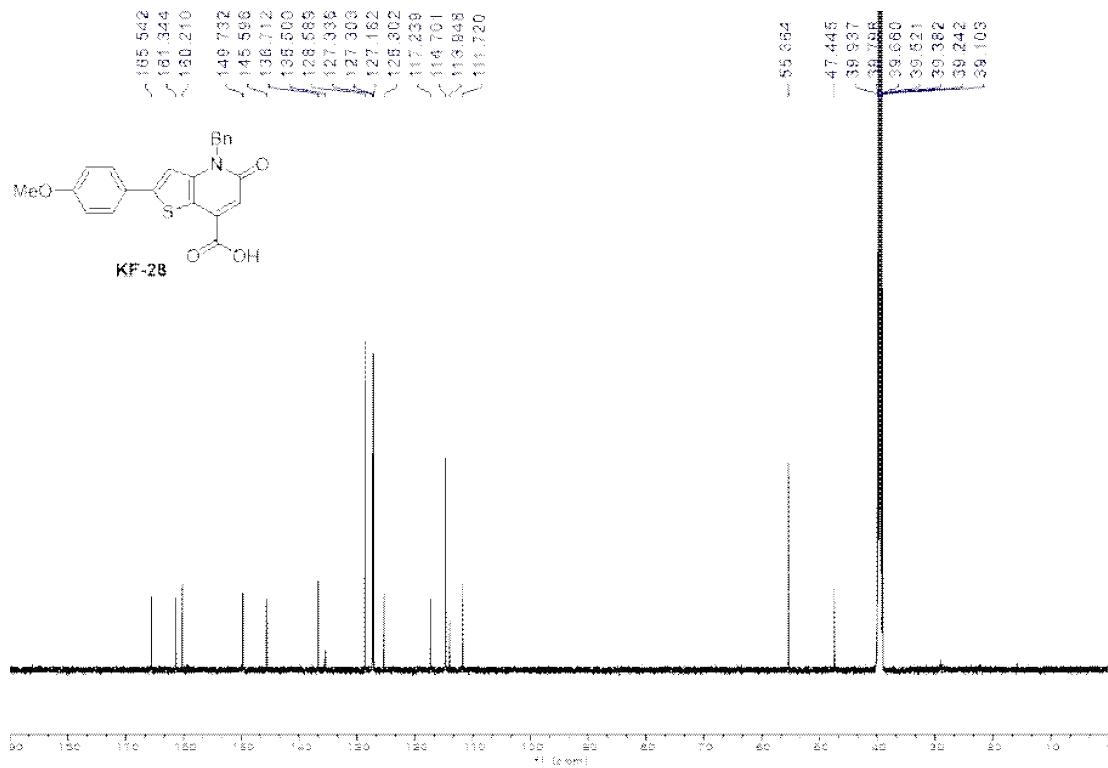
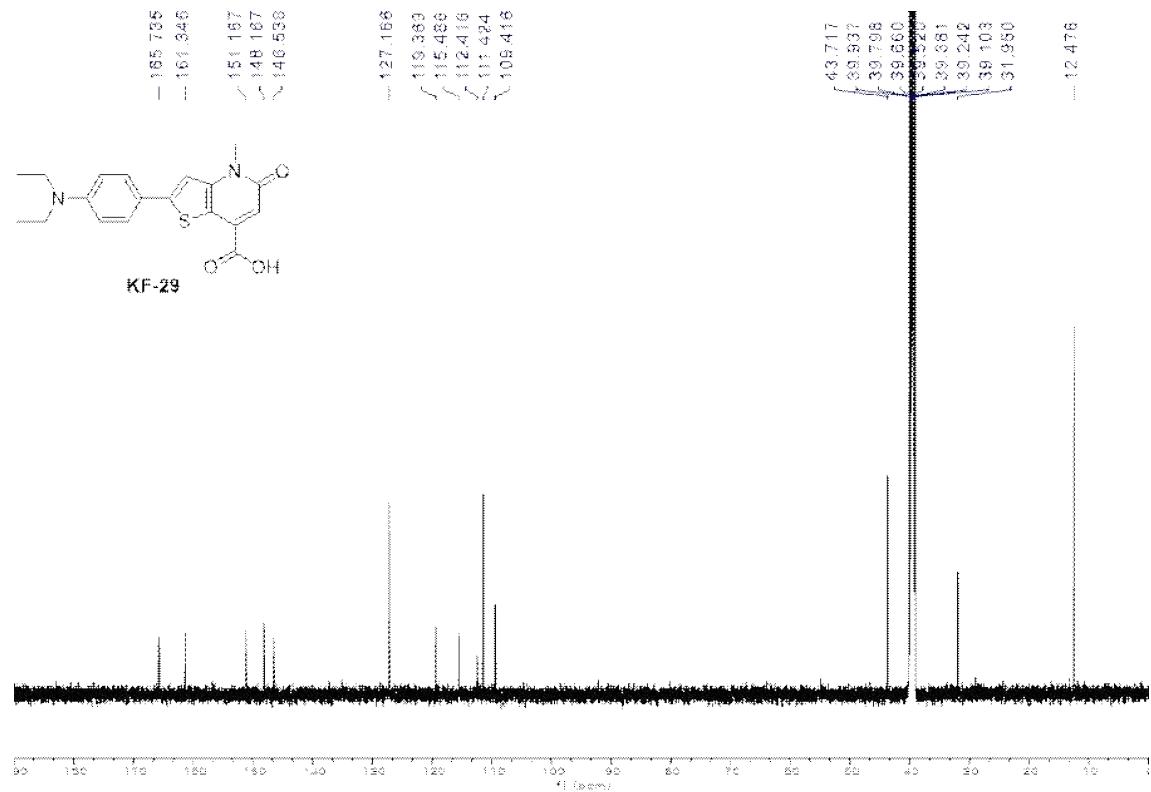
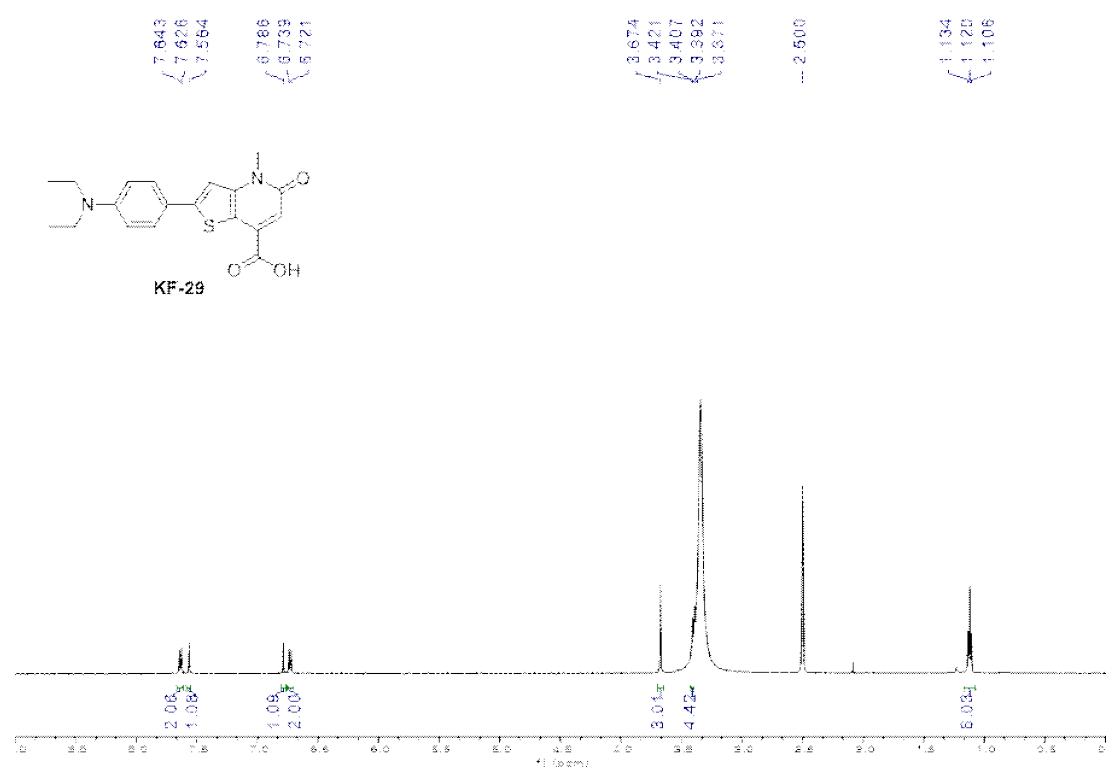


그림115. KF-28의 ¹³C NMR 스펙트럼



제 4 장 목표 달성도

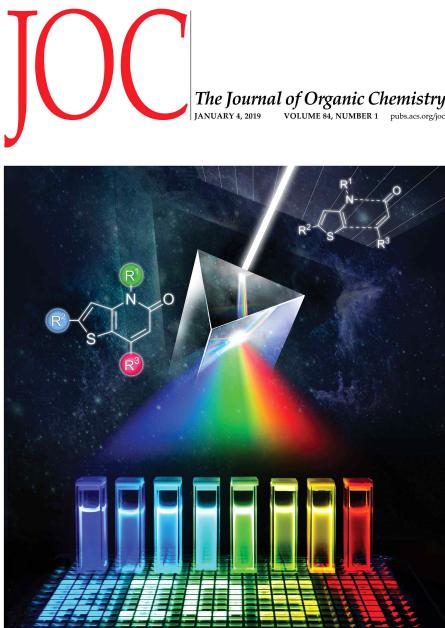
- 본 과제는 독창적 화학골격을 갖는 저분자 유기형광물질을 이용하여 해양환경 오염 인자인 중금속 또는 특정 단백질에 대해 뛰어난 선택성을 갖는 다양한 형광화학센서 개발을 최종 목표로 2014년 기획연구 수행, 2016년 연구과제수행을 위한 한도외예산을 확보한 후 2017년 시작되었음.
- 여기서 독창적 화학골격을 갖는 저분자 유기형광물질은 상품화에 성공한 ‘epicoconone’처럼 형광특성이 우수한 해양천연물을 기반으로 할 수 있으나 과제의 시작과 동시에 형광유도체 도출, 형광센서 제작, 검증을 수행해야하는 과제의 특성상 합성형광물질 중심으로 과제를 수행하되 형광천연물의 탐색도 동시에 시도하였음.
- 저분자 유기형광물질 개발
 - Thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one 화학골격의 신규 저분자 형광물질 도출
 - ✓ 1) BOP[(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexa-fluorophosphate]를 이용한 aza-[3+3] 고리첨가반응법과 2) 유기 금(I) 촉매를 이용한 6-*endo*-dig 고리이성질체 반응법을 개발함. 특히 이들 반응법은 상호보완적이어서 BOP반응법을 통해 합성이 어려운 유도체는 금(I)촉매를 이용한 합성법으로 제조가 가능하고 반대로 금(I)촉매 합성법으로 제조가 불가한 유도체는 BOP반응법으로 획득이 가능함.
 - ✓ 지난 2년간의 과제 수행을 통해 한국해양과학기술원 영문 이니셜을 고유 이름으로 하는 신규형광물질이 개발되어 KIOST-Fluor (KF)라는 이름으로 논문, 국내외특허 등에서 학계/산업계에 소개되었음 (논문: J. Org. Chem., Tetrahedron Lett. 등, 학회: ACS National Meeting Boston, ISHC (international society of heterocyclic chemistry) in Regensburg Germany , 대한화학회 제 140회 학술발표회 등, 국내외 특허 각 2건씩- 제6장 대표적 연구실적 참조).
- 해양환경 분석용 형광화학센서 개발
 - 해수에 존재하는 수은, 납 등 중금속 검출을 위한 형광화학센서 개발
 - 분석물질의 특성에 맞는 선택적 인지단을 선정하고 형광단과 화학적 결합
- 바이오분자 탐색용 형광 바이오센서 개발
 - EMT암세포 표지단백질 vimentin과 F-actin 및 칼슘이온에 대해 각각 선택성을 갖는 형광 바이오센서 분자설계와 세부조정을 수행

구분		달성 목표(전)	달성(전)
과학적 성과	논문	mrnIF 81점 이상	1
		mrnIF 61~80	0
		mrnIF 41~60	1
		mrnIF 40점 이하	1
		소계	3
	저서	국제저서	
		국내저서	
		국제편저	
		역서 등	
		소계	
기술적 성과	특허	국제특허 출원	2
		국제특허 등록	
		국제특허 추가등록	
		국내특허 출원	2
		국내특허 등록	
경제적 성과	기술료	기술이전 성과	
사회적,인프라..	홍보활동	대외세미나, 기고	2
	대외활동	국내외학회참여	3
계	-		

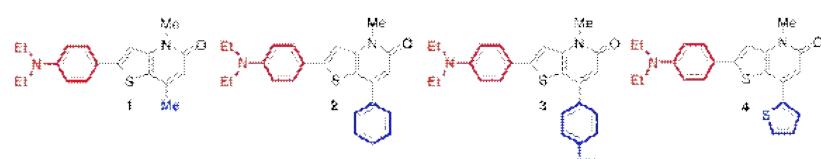
제 5 장 연구개발성과의 활용계획

- 전 세계적으로 아직 태동기에 머물러 있는 형광물질의 해양과학과 해양생명공학에서의 응용연구에 과감히 진출하여 제반 연구기반 조성과 국내 관련 연구의 활성화를 도모하고, 이를 통해 국제적으로 선도적 위치를 점함.
- 국내의 형광화학탐침 분야는 높은 연구 잠재력을 가진 일부 연구자들에 의해 유지되고 있으며 대부분의 분석용 화학탐침은 외국의 제조사로부터 수입하여 활용하고 있는 실정임. 따라서 독자적 화학골격을 갖는 형광물질제조, 화학탐침분자설계/응용기술 확보는 경제적으로 수입대체 효과를 기대할 수 있으며, 이를 기반으로 다양한 영역에서의 연구저변을 확대할 수 있을 것으로 기대하고 있음.
- 본 과제를 통해 도출된 독창적 화학구조를 갖는 KIOST-Fluor (KF)를 기반으로 해양과학기술원이 해양연구 관련 정부 출연 연구기관으로서 학교, 산업체 또는 다른 정부 출연기관과는 차별적으로 수행할 수 있는 연구영역인 해양생명공학소재 및 해양환경 분석기술 개발과 관련된 해양과학기술원 내 관련 연구자 간의 융복합 연구를 활성화하고 이를 통해 대형 융복합 과제로의 발전을 도모함.
- 차후 해양과학기술원 주도의 해양생명공학 관련 대형 국가연구개발 사업으로 발전시키기 위한 기초자료 제공
- 미래 해양생명공학 연구 및 해양분석 관련 연구개발을 활성화하여 국제특허, 국내특허 출원 및 등록을 통한 지적재산권의 확보와 산업화 가능성 모색
- 정부가 선정한 미래 신성장 동력 중 하나인 해양생명공학 신소재 개발은 높은 경제적 파급효과를 갖고 있으며, 관련 산업발전에 기여함.
- 특히 산업의 고도화와 이로 인한 인구의 도시집중 현상에 기인한 해양오염에 대한 근원적 문제해결과 동시에 해양오염물질 분석법 개발 등을 통한 해양환경감시기술 개발을 모색

제 6 장 연구개발과제의 대표적 연구 실적

대표성과 - 1.	Synthesis, Molecular Engineering, and Photophysical Properties of Fluorescent Thieno[3,2- <i>b</i>]pyridine-5(4 <i>H</i>)-ones
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규 저분자 형광단 발굴 <ul style="list-style-type: none"> • 본 연구를 통해 thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one 계열의 신규 형광단 KIOST-Fluor, KF를 도출함. • 흡수파장 (absorption wavelength), 여기파장 (excitation wavelength), 형광파장 (emission wavelength), 물흡광계수 (molar extinction coefficient), 양자수득율 (quantum yield), Stokes shift, fluorescence lifetime 등 KIOST-Fluor 유도체들의 기초적 광물리적 성질을 토대로 화학구조와 물성 사이의 관계를 파악함. ■ Thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one기반 저분자 형광단의 효율적 합성법 구축 <ul style="list-style-type: none"> • BOP [(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate]를 이용한 aza-[3+3] 고리 침가반응법을 개발하여 다양한 기능기를 갖는 thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one형 광단을 합성함. ■ 주변 환경 변화에 따른 형광특성 관찰 <ul style="list-style-type: none"> • 합성된 KIOST-Fluor 유도체의 용매극성 변화에 따른 형광파장의 변화 (solvatochromism)와 수소이온 농도에 따른 형광세기의 변화를 관찰하여 최적의 물성을 갖는 유도체를 선별함.
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규형 광단 확보 <ul style="list-style-type: none"> • 화학적 합성이 용이하고 물성이 우수한 thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one 기반 KIOST-fluor 신규 형광단을 도출함. • BOP[(benzotriazol-1-yloxy)tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate]를 이용한 aza-[3+3] 고리 침가반응법을 개발했음. ■ 형광파장의 미세조정 <ul style="list-style-type: none"> • Thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one형 광단 기본구조에 다양한 치환기를 도입하여 형광파장 390 nm부터 670nm까지 가시광선 영역에 해당하는 저분자 형광단 유도체를 도출했으며 이들 유도체들 중 높은 Stokes shift값과 우수한 밝기 등 형광소재로 적합한 유도체를 도출함.
 <small>The Journal of Organic Chemistry JANUARY 4, 2019 VOLUME 84, NUMBER 1 pubs.acs.org/joc</small>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>J. Org. Chem.</i> 2019, 84, 379–391. 게재 • Journal of Organic Chemistry editorial office로부터 ‘supplementary cover art’ 승인을 받아 기관홍보와 과제홍보를 이룸. • 국내특허 출원 (출원번호: 10-2017-0163722), PCT출원 (출원번호: PCT/KR2017/015585) • 2017 ISHC (international society of heterocyclic chemistry) in Regensburg Germany 발표

대표성과 -2.	Gold(I)-Catalyzed Cycloisomerization of <i>N</i> -Alkenyl Alkynylamides: A Golden Avenue for the Access to Highly Fluorescent Thieno[3,2- <i>b</i>]pyridine-5(4 <i>H</i>)-ones
성과 내용	<ul style="list-style-type: none"> ■ 유기금속촉매를 이용한 KIOST-Fluor의 합성법 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 유기 금(I) 촉매를 이용한 <i>N</i>-alkenyl alkynylamides의 고리이성질체화 반응을 개발하여 2-pyridone과 thieno[3,2-<i>b</i>]pyridine-5(4<i>H</i>)-one형 광단 합성에 적용하였음. • 이 반응은 BOP를 이용한 KIOST-Fluor 합성법과는 상호보완적이어서 BOP로 합성하기 어려운 유도체는 금(I)촉매를 이용해 합성이 가능하고, 반대로 금(I)촉매를 이용해 합성하기 어려운 KIOST-Fluor는 BOP를 이용하여 합성할 수 있음. ■ 신규형 광단의 광물리적 특성 분석 완료 <ul style="list-style-type: none"> • 흡광파장, 형광파장, 여기파장, 몰흡광계수, Stokes shift, 양자수득율(quantum yield), solvatochromism 등 형광단 개발에서 중요한 광물리적 특성을 측정하여 분자의 화학구조와 형광현상 간의 관계를 규명함. ■ 합성된 형광물질을 이용한 단백질 형광표지 시약 개발 모색 <ul style="list-style-type: none"> • 최근 들어 형광물질 관련 논문 투고 시 심사자들에 의해 최소 한 건 이상의 응용 예를 제시해달라는 요청을 받고 있어 앞으로 KIOST-Fluor를 활용한 형광센서, 형광표지 시약, 형광프로브 개발이 중요해짐. • Withaferin A, phalloidin과 KIOST-Fluor를 결합하여 각각 vimentin, F-actin을 선택적으로 형광표지 할 수 있는 형광결합체 제작연구 진행 중임.
성과의 우수성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 신규 형광단 확보 <ul style="list-style-type: none"> • BOP를 이용한 aza-[3+3] 고리첨가 반응은 pyridone 7번 탄소에 아세틸, 벤조일, 에스터 등 주로 전자받개(electron acceptor) 특성을 갖는 기능기들이 도입되었고 알킬 또는 수소 등을 도입하기 위해서는 브롬화반응을 통한 별도의 반응방법을 사용해야 했음. • 그러나 유기 금(I)촉매를 이용한 고리이성질체화 반응은 수소, 알킬, 페닐기 등 BOP 반응에서 합성하기 어려웠던 유도체들을 mild한 반응조건에서 높은 수율로 얻을 수 있는 일종의 BOP반응과는 상보적 관계에 있는 합성법임. • 유기 금(I)촉매를 이용한 고리이성질체화 반응을 통해 전자주개(electron donor) 또는 전자받개 (electron acceptor) 성질을 갖는 다양한 페닐유도체를 KIOST-fluor형광단 기본골격에 도입할 수 있게 됨. ■ 구조-형광 상관관계 연구 수행 <ul style="list-style-type: none"> • 합성된 유도체들의 기본 광물리적 특성을 측정하여 화학구조와 광물리적 특성 사이의 상호관계를 파악하였으며, 이는 새로운 형광단 또는 형광화학/바이오센서를 합성설계하는데 있어서 중요한 기본 정보를 제공할 것임. • BOP반응으로 합성된 KIOST-Fluor 유도체보다 금(I) 촉매반응을 통해 합성된 유도체들의 광물리적 특성이 우수함. 특히 밝기와 관련있는 몰흡광계수와 양자수득율; 흡광/형광파장의 중첩이 없어 정확한 형광신호를 전달할 수 있는지 여부를 알 수 있는 Stokes shift; 용매의 극성변화에 무관한 안정적 형광파장 특성을 갖고 있음.



cpd	In dichloromethane (DCM)					In acetonitrile						
	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	brightness	Stoke's shift	λ_{abs}	λ_{em}	ϵ	Φ_F	brightn ess	Stoke's shift
1	398	467	31,100	0.97	30,200	69	395	478	47,100	0.94	44,300	83
2	408	491	81,400	0.98	79,800	83	407	516	84,200	0.80	67,400	109
3	404	484	28700	0.98	28,100	80	404	504	48,100	0.99	47,600	100
4	420	516	29,000	0.92	26,700	96	420	546	41,000	0.89	36,500	126

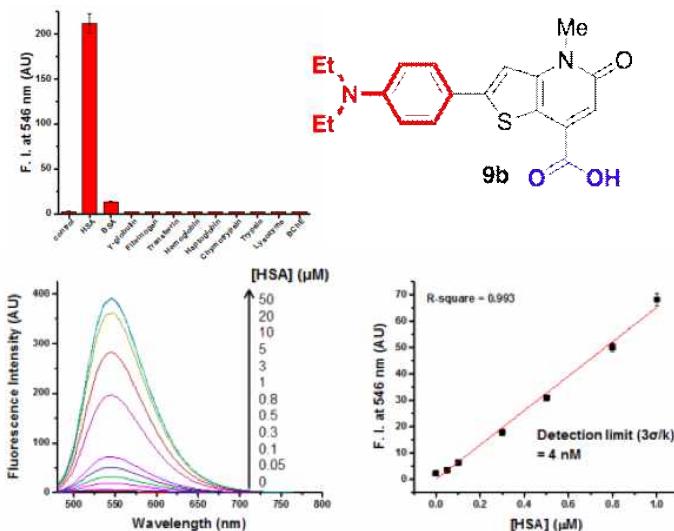
- Gold(I)-Catalyzed Cycloisomerization of *N*-Alkenyl Alkynylamides: A Golden Avenue for the

- Access to Highly Fluorescent Thieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-ones (manuscript 준비 중)
- Gold(I)-catalyzed synthesis of 2-arylthieno[3,2-*b*]pyridine-5(4*H*)-ones and studies toward a small-molecule fluorescent probe for vimentin (2018. 08.22, Westin Boston Waterfront, 256회 미국화학회-보스톤)
 - 국내특허 출원 (출원번호: 10-2018-0095669), PCT출원 (출원번호: PCT/KR2018/009490)

대표성과 -3.	<p>Cationic polydiacetylene 기반의 수은센서 개발</p> <p>■ 수은 (Hg^{2+}) 센서: 요오드이온과 수은이온의 강한 결합력을 이용하여, 요오드이온을 counteranion으로 갖는 cationic PDA (polydiacetylene)의 광학변화를 유도해 수은이온 화학센서를 개발함.</p> <ul style="list-style-type: none"> 다양한 수은이온의 농도에 따라 PDA-1의 흡광도 및 형광특성의 변화를 확인 수은이온의 농도에 따라 정량적으로 PDA-1의 광학성질이 변화함을 확인, 적정실험을 통해 PDA-1이 8.6 μM 수준의 검출한계를 갖는 것을 확인함. 화연한 색변화로 인해 육안으로 수은이온 검출이 가능함. 수돗물 시료 실험을 통해 수돗물 안의 수은이온을 검출할 수 있음을 확인함. <p>(a) Absorbance spectra of PDA-1 at 640 nm in the presence of various metal ions. The x-axis is Wavelength (nm) from 400 to 700, and the y-axis is Absorbance from 0.0 to 1.0. A legend lists metal ions: Control, Hg^{2+}, Na^+, K^+, Ag^+, Ba^{2+}, Mg^{2+}, Pb^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Ni^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{2+}, Fe^{3+}. The Hg^{2+} curve shows a significant increase in absorbance compared to the control.</p> <p>(b) Bar chart of Absorbance at 640 nm for various metal ions. The y-axis ranges from 0.0 to 1.0. The Hg^{2+} bar is significantly higher than others.</p> <p>(c) Colorimetric response of PDA-1 to various metal ions. A row of test tubes shows color changes from blue (Control) to red (Hg²⁺).</p> <p style="text-align: center;">성과 내용</p> <p>그림. (a, b) 다양한 중금속에 의한 흡광도 변화; (c) 수은에 의한 PDA-1의 색변화</p> <p>(a) Absorbance spectra of PDA-1 at 640 nm versus concentration of Hg^{2+} (μM). The x-axis is Concentration of Hg^{2+} (μM) from 0 to 70, and the y-axis is Absorbance from 0.0 to 1.0. Arrows indicate increasing absorbance with increasing Hg^{2+} concentration.</p> <p>(b) Plot of Absorbance at 640 nm versus Concentration of Hg^{2+} (μM). The y-axis ranges from 0.0 to 1.0, and the x-axis ranges from 0 to 70. A series of black squares shows a linear decrease in absorbance as the concentration of Hg^{2+} increases.</p> <p>(c) Fluorescence intensity (a.u.) versus wavelength (nm) from 600 to 800 nm. The x-axis is Wavelength (nm), and the y-axis is Fluorescence intensity (a.u.). Multiple curves are shown for different Hg^{2+} concentrations, with intensity decreasing as concentration increases.</p> <p>(d) Plot of Fluorescence intensity at 638 nm (a.u.) versus Concentration of Hg^{2+} (μM). The y-axis ranges from 0 to 300, and the x-axis ranges from 0 to 100. A series of black squares shows a linear increase in fluorescence intensity with increasing Hg^{2+} concentration.</p> <p>그림. 다양한 농도의 수은에서 파장에 따른 PDA-1의 (a) 흡광도 및 (c) 형광세기의 변화; 수은의 농도에 따른 특정 파장에서 (b) 흡광도 및 (d) 형광세기의 변화</p> <ul style="list-style-type: none"> 다른 금속이온에 대한 선택성 확인 및 수돗물 시료안의 수은이온 검출
----------	---

	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 금속이온에 존재에 따라 PDA-1의 광학성질 변화를 확인함, PDA-1이 수은이온에 대해 선택적으로 광학성질이 변화함을 확인함.
	<ul style="list-style-type: none"> <i>Tetrahedron Lett.</i> 2017, 58, 4340-4343. 논문게재 제140회 대한화학회 학술발표회 발표

대표성과 - 4.	Thienopyridinone derivative를 이용한 human serum albumin 형광 센서 개발
성과 내용	<p>■ 단백질 스크리닝</p> <ul style="list-style-type: none"> 본 과제에서 개발한 thienopyridinone library를 이용하여 특정 단백질에 대해 뛰어난 선택성을 갖는 형광 화학센서를 개발하기 위하여, 그럼 5의 14 종류의 형광 물질을 이용하여 blood 내 높은 비율로 존재하는 주요 blood protein인 human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA), globulin, fibrinogen, transferrin 5 개 종류 단백질에 대하여 형광 변화 스크리닝을 진행함. pH 5, pH 7, pH 9 3 가지 pH 조건에서 dye 5 μM, blood protein 10 μM (형광 물질 대비 2 당량)일 때 형광 변화를 스크리닝한 결과, 9b 물질이 염기 조건에서 HSA에 높은 선택성을 보이고 형광 신호가 크게 증가하는 것으로 확인됨. <p>■ Thienopyridinone derivative를 이용한 human serum albumin 형광 센서 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> 위 1차 blood protein 스크리닝을 통해 선정된 9b 물질을 이용하여 human serum albumin (HSA) 형광 센서를 개발하기 위하여 구체적인 형광 센서 작동 조건을 탐색함. 기존의 HSA 형광 센서들의 많은 문제로 꼽히고 있는 bovine serum albumin (BSA) 이 구분되지 않는 문제를 해결하기 위해, HSA/BSA 구분이 가장 뚜렷한 pH 9, 10% DMSO 조건에서 HSA 검출 실험을 진행함.
성과의 우수성	<p>■ 9b 물질을 이용하여 HSA 정량 가능성을 확인하였고, HSA 존재 시 형광 신호가 최대 160 배 증가하는 것을 확인함. 9b 물질의 HSA 검출 한계는 4 nM로 실제 urine 내 HSA 검출에 사용할 수 있을 정도의 의미있는 수준이며 기존에 보고된 HSA 형광 센서와 비교했을 때에도 매우 낮은 검출 한계임.</p> <p>■ HSA에 대한 9b 물질의 dissociation constant (K_d) 측정 결과, 8.77 μM로 9b 물질이 HSA 강하게 binding하는 것으로 확인됨.</p> <p>■ 9b 물질이 실제 샘플에서도 HSA 검출에 응용 가능하지 확인하기 위하여 artificial urine 내에서 간섭없이 정확하게 HSA 검출이 가능한지 확인함. Albuminuria 질병 진단 기준인 30-300 mg/L 수준의 HSA 뿐 아니라 실제 urine 내 HSA 양인 5 mg/L (약 380 nM)의 낮은 농도 수준까지 artificial urine 내에서 검출 가능함을 확인함.</p>



제 7 장 참고문헌

- (1) Valeur, B.; Berberan-Santos, M. N. *Molecular Fluorescence, Second Edition*. Wiley: 2012.
- (2) (a) Junjia, L.; Chen, L.; Wei, H. Fluorophores and Their Applications as Molecular Probes in Living Cells. *Curr. Org. Chem.* **2013**, *17*, 564–579. (b) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 855–866. (c) Lavis, L. D.; Raines, R. T. Bright Ideas for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2008**, *3*, 142–155.
- (3) (a) de Moliner, F.; Kielland, N.; Lavilla, R.; Vendrell, M. Modern Synthetic Avenues for the Preparation of Functional Fluorophores. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 3758–3769. (b) Kim, E.; Lee, Y.; Lee, S.; Park, S. B. Discovery, Understanding, and Bioapplication of Organic Fluorophore: A Case Study with an Indolizine-Based Novel Fluorophore, Seoul-Fluor. *Acc. Chem. Res.* **2015**, *48*, 538–547. (c) Sinkeldam, R. W.; Greco, N. J.; Tor, Y. Fluorescent Analogs of Biomolecular Building Blocks: Design, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2579–2619.
- (4) Wang, B.; Anslyn, E. V., *Chemosensors: Principles, Strategies, and Applications*, Wiley: 2011.
- (5) (a) New, E. J. Harnessing the Potential of Small Molecule Intracellular Fluorescent Sensors. *ACS Sens.* **2016**, *1*, 328–333. (b) Carter, K. P.; Young, A. M.; Palmer, A. E. Fluorescent Sensors for Measuring Metal Ions in Living Systems. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4564–4601.
- (6) (a) Woodward, A. N.; Kolesar, J. M.; Hall, S. R.; Saleh, N.-A.; Jones, D. S.; Walter, M. G. Thiazolothiazole Fluorophores Exhibiting Strong Fluorescence and Viologen-Like Reversible Electrochromism. *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 8467–8473. (b) Wang, J.; Wu, Q.; Xu, Y.; Yu, C.; Wei, Y.; Mu, X.; Hao, E.; Jiao, L. Synthesis, structure and photophysical properties of near-infrared 3,5-diarylbenzoBODIPY fluorophores. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 52180–52188. (c) Tong, S.; Zhao, S.; He, Q.; Wang, Q.; Wang, M.-X.; Zhu, J. Fluorophores for Excited-State Intramolecular Proton Transfer by an Yttrium Triflate-Catalyzed Reaction of Isocyanides with Thiocarboxylic Acids. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 6599–6603. (d) Otani, T.; Tsuyuki, A.; Iwachi, T.; Someya, S.; Tateno, K.; Kawai, H.; Saito, T.; Kanyiva, K. S.; Shibata, T. Facile Two-Step Synthesis of 1,10-Phenanthroline-Derived Polyaza[7]helicenes with High Fluorescence and CPL Efficiency. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2017**, *56*, 3906–3910. (e) Cheng, Y.; Li, G.; Liu, Y.; Shi, Y.; Gao, G.; Wu, D.; Lan, J.; You, J. Unparalleled Ease of Access to a Library of Biheteroaryl Fluorophores via Oxidative Cross-Coupling Reactions: Discovery of Photostable NIR Probe for Mitochondria. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 4730–4738. (f) Yamaguchi, Y.; Ochi, T.; Matsubara, Y.; Yoshida, Z.-I. Highly

- Emissive Whole Rainbow Fluorophores Consisting of 1,4-Bis(2-phenylethynyl)benzene Core Skeleton: Design, Synthesis, and Light-Emitting Characteristics. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119*, 8630–8642. (g) Janiga, A.; Krzeszewski, M.; Gryko, D. T. Diindolo[2,3-b:2',3'-f]pyrrolo[3,2-b]pyrroles as Electron-Rich, Ladder-Type Fluorophores: Synthesis and Optical Properties. *Chem. Asian J.* **2015**, *10*, 212–218. (h) Zhao, D.; Wang, W.; Yang, F.; Lan, J.; Yang, L.; Gao, G.; You, J. Copper-Catalyzed Direct C Arylation of Heterocycles with Aryl Bromides: Discovery of Fluorescent Core Frameworks. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2009**, *121*, 3346–3350. (i) Kim, E.; Koh, M.; Lim, B. J.; Park, S. B. Emission Wavelength Prediction of a Full-Color-Tunable Fluorescent Core Skeleton, 9-Aryl-1,2-dihydropyrrolo[3,4-b]indolizin-3-one. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6642–6649.
- (7) (a) Lee, J. S.; Kim, K. Reactions of 3-methylamino-5-phenylthiophene with α,β -unsaturated esters and α,β -unsaturated nitriles. *J. Heterocycl. Chem.* **2000**, *37*, 363–372. (b) Thomae, D.; Kirsch, G.; Seck, P.; Kaminski, T. One-pot synthesis of 7-hydroxythieno[3,2-b]pyridin-5(4H)-ones. *Synthesis* **2007**, 2153–2156. (c) Acharya, A.; Gautam, V.; Ila, H. Synthesis of thieno-fused five- and six-membered nitrogen and oxygen heterocycles via intramolecular heteroannulation of 4,5-substituted 3-amino or 3-hydroxy 2-functionalized thiophenes. *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 7920–7938.
- (8) Dormoy, J.-R.; Castro, B.; Rabanal, F.; Giralt, E. Benzotriazol-1-yloxytris(dimethylamino)phosphonium Hexafluorophosphate. *eEROS* John Wiley & Sons, Ltd.; 2001.
- (9) (a) Xu, X.; Doyle, M. P. The [3+3]-Cycloaddition Alternative for Heterocycle Syntheses: Catalytically Generated Metallocenolcarbenes as Dipolar Adducts. *Acc. Chem. Res.* **2014**, *47*, 1396–1405. (b) Harrity, J. P. A.; Provoost, O. [3+3] Cycloadditions and related strategies in alkaloid natural product synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2005**, *3*, 1349–1358.
- (10) Würth, C.; Grabolle, M.; Pauli, J.; Spieles, M.; Resch-Genger, U. Relative and absolute determination of fluorescence quantum yields of transparent samples. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 1535–1550.
- (11) (a) Rasmussen, S. C.; Sattler, D. J.; Mitchell, K. A.; Maxwell, J. Photophysical characterization of 2,3-difunctionalized thieno[3,4-b]pyrazines. *J. Lumin.* **2004**, *109*, 111–119. (b) Fujitsuka, M.; Sato, T.; Sezaki, F.; Tanaka, K.; Watanabe, A.; Ito, O. Laser flash photolysis study on the photoinduced reactions of 3,3'-bridged bithiophenes. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1998**, *94*, 3331–3337. (c) Becker, R. S.; Seixas de Melo, J.; Macanita, A. L.; Elisei, F. Comprehensive Evaluation of the Absorption, Photophysical, Energy Transfer, Structural, and Theoretical Properties of α -Oligothiophenes with One to Seven Rings. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100*, 18683–18695.
- (12) Kulinich, A. V.; Mikitenko, E. K.; Ishchenko, A. A. Scope of negative

- solvatochromism and solvatofluorochromism of merocyanines. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18*, 3444–3453.
- (13) Kim, E.; Lee, S.; Park, S. B. 9-Aryl-1,2-dihydropyrrolo[3,4-b]indolin-3-one (Seoul-Fluor) as a smart platform for colorful ratiometric fluorescent pH sensors. *Chem. Comm.* **2011**, *47*, 7734–7736.
- (14) Kurasawa, O.; Oguro, Y.; Miyazaki, T.; Homma, M.; Mori, K.; Iwai, K.; Hara, H.; Skene, R.; Hoffman, I.; Ohashi, A.; Yoshida, S.; Ishikawa, T.; Cho, N. Identification of a new class of potent Cdc7 inhibitors designed by putative pharmacophore model: Synthesis and biological evaluation of 2,3-dihydrothieno[3,2-d]pyrimidin-4(1H)-ones. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 2133–2147.
- (15) Kim, B. S.; Choi, K. S.; Kim, K. Reactions of Thioaroylketene S,N-Acetals with 1,3-Dicarbonyl Compounds in the Presence of Mercury(II) Acetate: A General Route to 2-Acyl- and 2-Aroyl-3-(alkyla-mino)-5-arylthiophenes and 2-(Ethoxycarbonyl)-3-(methyla-mino)-5-arylthiophenes. *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6086–6097.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.