

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023년 10월 5일 (05.10.2023)



(10) 국제공개번호
WO 2023/191369 A1

(51) 국제특허분류:

C07D 413/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/003721

(22) 국제출원일:

2023년 3월 21일 (21.03.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(30) 우선권정보:

10-2022-0038670 2022년 3월 29일 (29.03.2022) KR

(71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (**UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY**) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: 김도경 (**KIM, Dokyoung**); 02790 서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호, Seoul (KR). 안종민 (**AN, Jongmin**); 02826 서울특별시 성북구 아리랑로5길 50-8, 101-1102, Seoul (KR). 김재훈 (**KIM, Jaehoon**); 02452 서울특별시 동대문구 회기로25길 16, 206호, Seoul (KR). 김영웅 (**KIM, Youngwoong**); 27395 충청북도 충주시 엄발로 91, 105동 502호, Chungcheongbuk-do (KR).

(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung Gap**); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

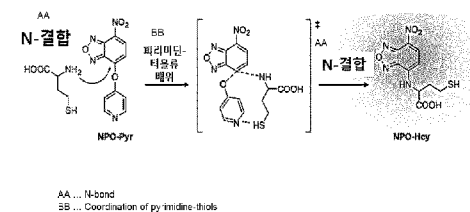
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ,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

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,

(54) Title: METHOD FOR DETECTING HOMOCYSTEINE IN PLASMA AND METHOD FOR DIAGNOSING GLIOBLASTOMA BY USING NOVEL FLUORESCENT PROBE

(54) 발명의 명칭: 신규 형광 프로브를 이용한 혈장 내 호모시스테인 검출 방법 및 교모세포종 진단 방법

(57) Abstract: The present invention relates to a fluorescent probe compound for detecting homocysteine, and use thereof, wherein the fluorescent probe compound prepared according to the present invention enables homocysteine present in in vitro plasma and feces to be detected within a short period of time without interference from other biomolecules, and thus has very high usability with respect to bio-derived materials and can be effectively used in early diagnosis identification of glioblastoma.



(57) 요약서: 본 발명은 호모시스테인 감지를 위한 형광 프로브 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따라 제조된 형광 프로브 화합물은 체외 혈장 및 변 내에 존재하는 호모시스테인을 다른 생체 분자의 간섭 없이 빠른 시간 내에 검출할 수 있어 생체 유래 물질에 대한 활용도가 매우 높으며, 교모세포종 조기 진단 확인에 유용하게 활용될 수 있다.

WO 2023/191369 A1

명세서

발명의 명칭: 신규 형광 프로브를 이용한 혈장 내 호모시스테인 검출 방법 및 교모세포종 진단 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 피리딘-니트로벤조퓨란(pyridine-nitrobenzofurazan)을 기반으로 하는 형광 프로브 화합물 및 이를 이용하여 혈장 내 호모시스테인을 검출하는 방법과 이를 통하여 교모세포종을 조기 진단하는 방법에 관한 것이다

배경기술

- [2] 교모세포종(glioblastoma)은 뇌의 전체적 조직에서 존재하는 신경교세포에서 발생하는 종양이며, 뇌종양의 12-15% 정도를 차지할 정도로 인간에게 치명적인 뇌종양이다. 교모세포종의 발생 원인은 정확하게 밝혀진 바가 없으며, 유전적, 환경적 요인과 관련이 있다고 알려져 있다. 또한 교모세포종은 성인에게 발생하는 원발성 악성 뇌종양 중 하나로 진단 후 치료를 하지 않을 경우 3-6개월 이내에 사망하고 치료 방법이 동원되어도 평균 생존기간이 12-14개월로 매우 악성도가 높은 종양이다. 교모세포종을 진단하기 위해서는 신경학적 검진이 시행된 후, 자기공명영상(MRI) 및 전산화 단층촬영(CT) 등의 영상진단 의료기기를 통해서 검사와 진단이 이루어지고 있다. 하지만, 해당 검진 및 진단 방법은 다른 진단에 비해서 높은 검사 비용과 조영제 사용으로 인한 부작용의 가능성이 있다. 또한, 영상진단 의료기기를 통해 교모세포종이 진단된 경우는 교모세포종이 이미 진행된 단계이며, 교모세포종 치료 시기를 놓치거나 진단 및 치료에 많은 비용이 요구되는 경우가 발생한다. 이러한, 교모세포종의 진단적 단점을 보다 편리한 방법으로 극복하고 교모세포종을 조기에 진단하여 예방하는 것은 필수적인 과제이다.
- [3] 현재까지 교모세포종을 검출하기 위한 기술들은 영상진단 의료기기(MRI, CT 등)와 조영제 개발이 이어져 왔다. 하지만 영상진단 의료기기 촬영을 위해 사용되는 조영제의 경우 부작용이 생길 수 있어, 진단적 단점이 존재한다. 또한, 영상진단은 절차가 단순하지 않고 비용 소모가 크다. 따라서, 비침습적인 방법으로 진단을 간단히 하고, 비용적 소모를 줄일 수 있는 교모세포종 조기 진단을 위한 시스템 개발은 극복해야 할 필수적인 과제이다.
- [4] 최근 연구에서 교모세포종에 대한 바이오 표지자로서 호모시스테인의 가능성이 보고되었다. 또한, 다양한 연구에서 뇌종양, 신경 퇴행성 질환, 암 및 심혈관질환과 같은 질병이 호모시스테인과 밀접한 연관이 있음이 밝혀졌다. 이러한 이유로 호모시스테인의 중요성, 그리고 호모시스테인과 관련된 질병에 대한 진단의 필요성이 대두되고 있다. 호모시스테인을 검출하는 방법에는 고속 액체 크로마토그래피(HPLC), 방사성 분석 및 광발광(photoluminescence; PL) 면역 검정법 등과 같은 방법들이 사용되고 있지만, 측정 장비의 사용법이 복잡하고 부피가 크기

때문에 호모시스테인에 대한 현장 진단을 위한 장비로 활용하기에는 어려움이 있다.

- [5] 형광 분자 프로브 분야는 생체 내의 분자의 특성이나 구조를 분석하기 위해 사용되는 분자 단위의 도구로, 생체에 존재하는 다양한 분자와 단백질 그리고 이에 대한 특성을 통해 생물학적 현상 규명이나 질병 인자의 검출에 대한 형광 신호를 시각적으로 관찰할 수 있게 해 주어 편리하다. 이러한 특징들 때문에 많은 개발이 이루어지고, 다양한 연구에서 폭넓게 활용되고 있는 분야이다. 특히, 생체 내 대사물질에 대해 높은 민감도와 선택성을 가지고 검출할 수 있으며, 실시간으로 대사물질 및 단백질 분자 등에 활용되기 용이하여, 그 중요도가 증가하는 추세이다.
- [6] 현재까지, 호모시스테인을 포함한 바이오티올 (biothiol)을 검출할 수 있는 형광 분자 프로브는 일부 보고가 되고 있다. 시스테인과 호모시스테인에 감응하는 다양한 형광 분자 프로브가 보고되었지만, 대부분 합성 방법이 복잡하고 바이오티올 종류 중 특정 하나에 대한 선택성이 부족하였다. 시스테인과 호모시스테인의 구조적 유사성(시스테인의 탄소수 = 호모시스테인의 탄소수 + 1) 때문에 호모시스테인에 대해서만 선택성, 민감도, 그리고 특이도를 갖는 것은 어려운 실정이며, 아직 호모시스테인만을 선택적으로 검출할 수 있는 형광 분자 프로브는 개발에 높은 난이도를 가진다. 호모시스테인에 대한 선택성을 가지는 전기화학발광 프로브도 개발되었지만, 전기화학발광 프로브의 합성 방법이 비교적 복잡하고 시간이 오래 걸리며, 매우 낮은 농도(예: 0.176 ppm; 0.01 μ M)의 호모시스테인을 검출할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 또한, 호모시스테인을 감지하여 최대인광 세기에 도달하는 데 걸리는 시간이 60분 이상 소요되어 빠른 시간 내에 호모시스테인을 검출할 수 없었다.
- [7] 본 발명자들은 간단한 합성법으로, 높은 민감도로 호모시스테인을 빠른 시간 내에 선택적으로 검출할 수 있는 형광 분자 프로브 화합물을 개발하였으며, 상기 형광 분자 프로브 화합물을 이용해 체외에서 혈장 내에 존재하는 호모시스테인을 선택적으로 검출하여 교모세포종 조기 진단을 위한 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명의 목적은 호모시스테인(homocysteine)을 단시간에 선택적으로 검출할 수 있는 형광 프로브 화합물 및 이를 이용하여 체외 혈장 내 호모시스테인을 측정할 수 있는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 본 발명의 다른 목적은, 상기 형광 프로브 화합물을 이용하여 교모세포종을 조기에 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

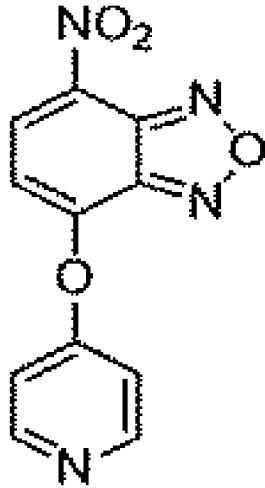
과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[11] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[12] [화학식 1]

[13]



[14] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 호모시스테인과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있다.

[15] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 pH 6 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있다.

[16] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 또는 생체 분자들을 포함하는 시료 중에서 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것일 수 있다.

[17] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 호모시스테인 선택적 검출용 형광 프로브 화합물일 수 있다.

[18] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 검출용 화학센서 및 호모시스테인 검출용 조성물을 제공한다.

[19] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 시료에 첨가하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인의 검출 방법을 제공한다.

[20] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

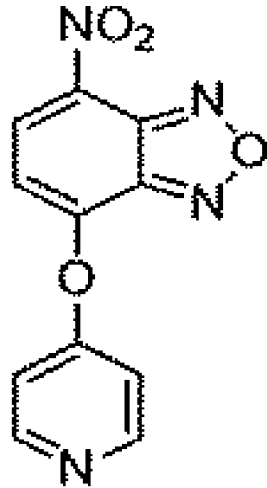
[21] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 인간 또는 동물로부터 분리된 시료에 첨가하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인 관련 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[22] 또한, 본 발명은 트리에틸아민(Triethylamine), 4-하이드록시피리딘(4-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을

반응시키는 단계;를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[23] [화학식 1]

[24]



발명의 효과

[25] 본 발명의 형광 프로브 화합물 NPO-pyr은 구조가 단순하고 짧은 시간 내에 대량 합성이 가능한 장점이 있으며, 혈액에서 분리된 체외 혈장 내 호모시스테인 감지가 가능할 뿐 아니라 변과 같이 다른 생체 유래 물질에서도 호모시스테인을 검출할 수 있으며, 특히, 호모시스테인과 유사한 구조를 가지는 시스테인의 간섭을 받지 않고 호모시스테인에만 특이적으로 배위(coordination)가 일어나는 반응을 통해 형광-켜짐을 나타냄으로써 호모시스테인 선택적 검출이 가능한 효과가 있다. 이에, 시스테인과 호모시스테인 검출용 형광 분자 프로브가 가지는 복잡한 구조와 선택성을 극복하였으며, 빠른 반응 속도, 민감도, 및 선택성을 가짐으로써 교모세포종을 포함한 호모시스테인 관련 질병의 조기 진단 도구로 효율적으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[26] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)에 대하여 수용액(phosphate-buffered saline; PBS buffer, pH 7.4) 조건하에서 호모시스테인과 반응 시 흡광(Abs) 및 형광(Emi) 변화를 확인한 결과를 동시에 나타낸 그래프이다.

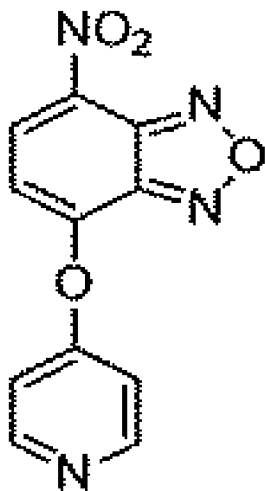
[27] 도 2는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)에 대하여 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 호모시스테인(Hcy), 시스테인(Cys), 글루타티온(GSH) 및 황화수소(H₂S)와 각각 반응 후 460 nm 여기 시 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

[28] 도 3은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)에 대하여 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 호모시스테인(Hcy), 티올류(thiols), 다양한 금속 이온(metal ions) 및 생체 내 분자(biomolecules)들과 각각 반응 후 460 nm 여기 시 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

- [29] 도 4는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)에 대하여 산성도를 달리한 수용액(pH 3-9)에서 각각 호모시스테인과 반응 후 460 nm 여기 시 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [30] 도 5는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)이 대조군(정상 마우스)과 실험군(교모세포종 마우스)의 혈장(plasma, a,b,c) 및 변(feces, d,e,f) 내 호모시스테인과 반응 시 흡광 및 형광 변화와 검출 한계(Limit Of Detection; LOD)를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [31] 도 6은 교모세포종 유발 후 시간이 경과(교모세포종세포 투여 후 7일, 14일)함에 따른 실험군(GBM) 및 정상군(Normal)의 뇌 영상화 결과(a) 및 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)이 대조군과 실험군(교모세포종 유발 후 7일, 14일)의 혈장에서 호모시스테인과 반응 후 460nm 여기 시 형광 그래프(b)를 나타낸 것이다.
- [32] 도 7은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-Pyr)과 호모시스테인에 배위(coordination)가 유발되어 선택적으로 형광-켜짐 특성을 나타낼 수 있음을 도식적으로 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [34] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:
- [35] [화학식 1]
- [36]



- [37] 본 발명의 실시예에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 4-니트로-7-(피리딘-4-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사다리아졸 (4-nitro-7-(pyridine-4-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)을 합성 및 동정하였고, 상기 화합물을 NPO-pyr로 명명하였다 (실시예 1 참조).
- [38] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있다.
- [39] 본 발명의 상기 화합물은 호모시스테인(homocysteine)과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있고, 호모시스테인과 반응하여 형광을 발하여, 호모시스

테인 검출을 위해 사용될 수 있다. 이에, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 호모시스테인 검출용 형광 프로브(probe)로 사용될 수 있다.

- [40] 본 발명의 상기 “형광-켜짐(fluorescence turn-on)” 특성은 검출 대상 물질의 비 존재(부재) 하에서는 형광을 발하지 않거나, 혹은 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 정도의 형광을 발하다가, 검출 대상 물질 존재시 검출 대상 물질과 반응하여 형광을 발하는 특성을 의미한다. 상기 “형광-켜짐” 특성은 검출 대상 물질과 반응하기 전에는 형광을 발하지 않거나 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 정도의 형광을 발한다는 점에서 “형광-비율” 특성과 구별된다. 상기 “형광-비율” 특성은 검출 대상 물질과 반응하기 전에도 특정 파장대의 형광을 발하고 있으며, 검출 대상 물질에 의해 형광의 색깔이 변화하는 특성을 의미한다.
- [41] 예를 들어, 상기 “형광-켜짐” 특성은 검출 대상 물질이 존재하지 않을시 발하던 형광 세기보다 적어도 10배 이상, 또는 15배 이상의 형광 세기를 검출 대상 물질과 반응하여 발하는 것일 수 있다.
- [42] 본 발명의 상기 “형광-켜짐” 기준 시스템은 “형광-비율” 기준 시스템의 단점을 보완할 수 있으며, 구체적으로 “형광-비율” 기준 시스템의 경우 기준이 되는 파장대를 설정하여 데이터를 수집 및 분석해야 하는 한계가 있으며, 형광이 연속적으로 변화하기 때문에 형광 변화를 시각적으로 추적하기 어려운 점이 있고, 형광 변화 전의 스펙트럼과 형광 변화 후의 스펙트럼이 중첩될 경우, 형광 변화의 폭이 크지 않아 형광 변화를 시각적으로 구분하기 어려운 한계가 있다. 반면, 본 발명의 일 예에 따른 NPO-pyr 화합물과 같은 “형광-켜짐” 기준 시스템의 경우 형광이 존재하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 형광만이 존재하다가, 검출 대상 물질에 의해 명확한 형광(최소 10배 이상의 형광 세기 증가)이 발생하게 되므로, 검출 대상 물질의 검출여부를 시각적으로 명확히 판별할 수 있다.
- [43] 본 발명의 상기 화합물이 나타내는 형광 켜짐은 호모시스테인과 접촉하기 전 형광을 발하지 않고, 호모시스테인과 접촉하여 반응시 형광을 발하는 것을 의미하는 것일 수 있다.
- [44] 본 발명의 상기 화합물은 피리딘 분자 내 아민기에 호모시스테인의 티올이 배위(coordination)를 이루어 호모시스테인의 아민기($-NH_2$)가 상기 화합물의 피리딘 부분의 C_1 을 친핵체 공격함으로써 결합하는 반응을 통해 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있다. 본 발명의 화합물이 형광 프로브로 작용하는 매커니즘은 도 7에 의해 설명될 수 있다(실시예 8 및 도 7 참조).
- [45] 본 발명의 상기 화합물은 pH 6 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있고, 바람직하게는 pH 6.5 내지 8의 조건, 더욱 바람직하게는 pH 6.8 내지 7.6의 조건에서 형광 켜짐을 통한 호모시스테인 검출이 가능한 것일 수 있으며, pH 7 내지 7.5의 조건이 가장 바람직한 것일 수 있다.
- [46] 본 발명의 상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 또는 생체 분자들을 포함하는 시료 중에서 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것으로서, 호모시스테인을 선택적으로 감지할 수 있는 형광 프로브 화합물일 수 있다.

- [47] 상기 시료는 물, 버퍼(buffer) 용액 또는 생체 시료인 것일 수 있고, 상기 생체 시료는 인간, 동물(설치류, 포유류 등)로부터 분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 혈장 또는 변일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.
- [48] 본 발명의 일실시예에서는 호모시스테인을 빠른 시간 내에 선택적으로 검출할 수 있는 새로운 형광 분자 프로브 화합물을 개발하였으며, 새로 합성된 분자명은 NPO-Pyr이라 명명되었다(실시예 1 참조). 본 발명의 NPO-pyr은 생물학적 조성인 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 안정성을 보였으며, 수용액에서 호모시스테인과 유사 구조를 갖는 시스테인을 포함한 아미노 티올 및 생체 분자 중에서 호모시스테인과 선택적으로 반응할 수 있음을 보여주었다(실시예 2 내지 5 참조). 본 발명의 화합물은 호모시스테인과 배위(coordination)가 일어나 반응할 수 있는 특성을 보이며, 호모시스테인에 대하여 높은 민감도 및 특이도, 빠른 반응 시간(5분 내) 등의 감지 특성을 보였고, 마우스 혈액에서 분리된 혈장 내에 존재하는 호모시스테인을 선택적으로 감지하여 형광-켜짐을 나타냄을 확인하였다(실시예 3, 4 및 6 참조). 이를 통해, 본 발명 화합물 NPO-pyr을 이용하여 호모시스테인 선택적 검출이 가능함을 확인하였다. 또한, 대조군(정상 마우스)과 실험군(교모세포종 마우스)의 혈장에서 본 화합물이 호모시스테인과 반응하여 대조군보다 실험군에서 더 강한 형광 세기를 보여주었다(실시예 7 참조). 이를 통해, 본 발명의 화합물 NPO-pyr을 이용하여 교모세포종을 구별해낼 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [49] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 검출용 화학센서를 제공한다.
- [50] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 검출용 조성물을 제공한다.
- [51] 본 발명의 상기 호모시스테인 검출용 화학센서 또는 조성물은, 생체 시료 중에서 호모시스테인을 선택적으로 검출하는 것일 수 있다.
- [52] 상기 호모시스테인 검출용 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 상기 호모시스테인 검출용 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 호모시스테인 검출용 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, N,N-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또는 상기 조성물은 생체 시료와 혼합될 수 있다. 상기 생체 시료는 인간, 동물(설치류, 포유류 등)로부터

분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 혈장 또는 변일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

- [53] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 시료에 첨가하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인의 검출방법을 제공한다.
- [54] 본 발명에 따른 호모시스테인의 검출방법에 있어서, 상기 시료는 전술한 바와 같다.
- [55] 본 발명에 따른 호모시스테인의 검출방법에 있어서, 상기 여기광원은 440 내지 480 nm의 여기파장을 갖는 광원일 수 있고, 바람직하게는, 450 내지 470nm의 여기파장일 수 있다. 여기서, 상기 광원은 형광 분광광도계 또는 UV 흡수분광법을 사용하여 조사하는 것이 바람직하다.
- [56] 본 발명에 따른 호모시스테인의 검출방법에 있어서, 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 호모시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 호모시스테인 존재시 형광 발광 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있다.
- [57] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.
- [58] 본 발명에 따른 진단용 조성물에 있어서, 상기 호모시스테인 관련 질환은 뇌종양, 신경 퇴행성 질환, 암 및 심혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종일 수 있다.
- [59] 본 발명에 따른 상기 진단용 조성물은, 생체 시료, 바람직하게는, 혈장 또는 변, 더욱 바람직하게는 체외 혈장 내 존재하는 호모시스테인을 검출함으로써, 교모세포종을 조기에 진단하는 것일 수 있다.
- [60] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 인간 또는 동물로부터 분리된 시료에 첨가하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인 관련 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [61] 상기 호모시스테인 관련 질환은 뇌종양, 신경 퇴행성 질환, 암 및 심혈관질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종일 수 있다.
- [62] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 시료는 인간 또는 동물(설치류, 포유류 등)로부터 분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수

액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 혈장 또는 변일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[63] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 여기광원은 440 내지 480 nm의 여기파장을 갖는 광원일 수 있고, 바람직하게는, 450 내지 470nm의 여기파장일 수 있다. 여기서, 상기 광원은 형광 분광광도계 또는 UV 흡수분광법을 사용하여 조사하는 것이 바람직하나 이에 제한되지는 않는다.

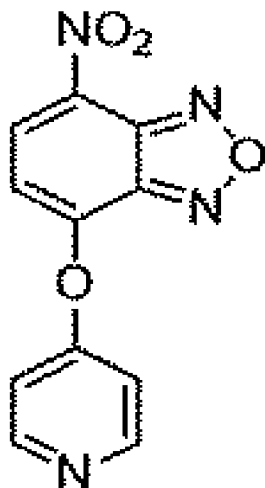
[64] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 단계 3은 측정 대상 시료의 형광 발광 세기가 화합물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료의 형광 발광 세기에 비해 증가된 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다.

[65] 보다 구체적으로 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 호모시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 호모시스테인 존재시 형광 커짐 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화합물을 첨가하기 전의 시료 또는 정상 대조군 시료에 비해 측정 대상 시료에서 형광 발광 및 형광 세기가 증가가 확인되는 경우, 교모세포종이 유발된 것으로 판단할 수 있다.

[66] 일 측면에서, 본 발명은 트리에틸아민(Triethylamine), 4-하이드록시피리딘(4-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 반응시키는 단계;를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[67] [화학식 1]

[68]



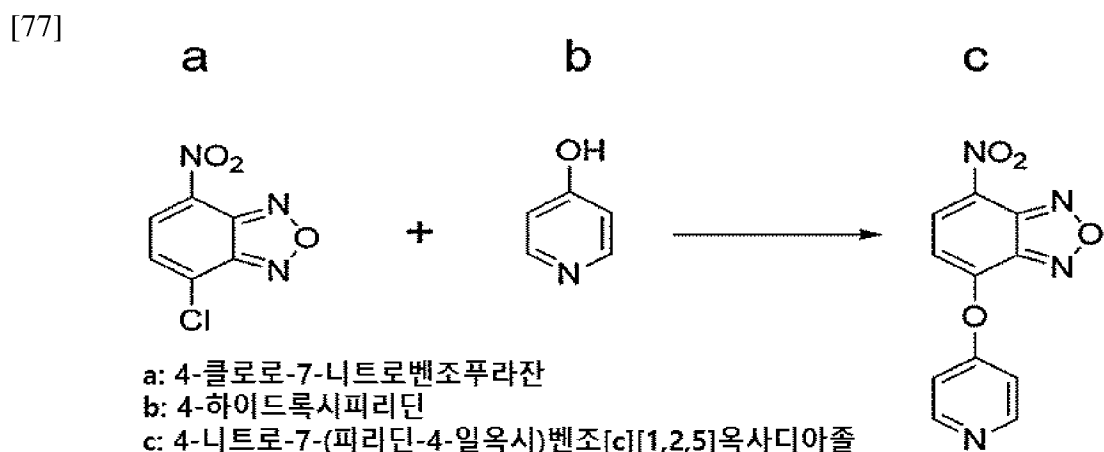
[69] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 반응은 질소로 산소를 제거한 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)을 반응 용매로 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

- [70] 바람직하게는, DMF에 트리에틸아민 및 4-하이드록시피리딘을 첨가하여 1차 반응시킨 다음, 다시 DMF를 추가 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란을 첨가하여 2차 반응 시키는 것일 수 있다.
- [71] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 이후, 반응시킨 용액에 에틸아세테이트(EtOAc)와 물을 혼합하여 섞어준 후, 유기층(EtOAc층)만을 따로 회수하여 건조 및 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 정제하는 과정을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [72] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 과정은 하기 실시예 1의 반응식 1과 같이 나타낼 수 있다.
- [73] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [74] 실시예 1. 혈장 내 호모시스테인 검출용 화합물의 합성 및 구조 분석
- [75] 본 발명자들은 생체 유래 물질 중 하나인 혈장에 대해서 호모시스테인을 신속하게 측정하기 위해, 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)에 방향족 고리 화합물인 4-하이드록시피리딘(4-hydroxypyridine)을 작용기로 하여 디자인하였다. 상세하게는, 호모시스테인의 티올기가 피리딘의 아민기와 배위하고 이후, 호모시스테인의 아민기가 화합물 1의 C₁을 친핵체 공격을 하도록 분자 구조를 설계하였으며, 하기 반응식 1에 따라 상기 화합물 1(4-니트로-7-(피리딘-4-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사디아졸)을 합성하였다.

[76] [반응식 1]



[78] 1-1. 4-니트로-7-(피리딘-4-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사디아졸(4-nitro-7-(pyridine-4-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)의 합성

[79] 구체적으로 상기 반응식 1에서, 트리에틸아민(Triethylamine)(36.6 μ L, 0.50257 mmol, TCI, S0377)과 4-하이드록시피리딘(4-hydroxypyridine)(44.7 mg, 0.50257 mmol, TCI, 626-64-2)을 질소로 산소를 제거한 3 mL의 엔,엔-다이메틸포름아마

이드(N,N-dimethylformamide; DMF)에 녹였으며, 회전막대(stirring bar)를 이용해 화합물이 잘 섞일 수 있게 해준 후, 30 분간 0 °C에서 교반해주었다(분당 회전 수: 250 rpm). 이후, 합성 출발 물질인 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)(50 mg, 0.00025 mol, TCI, A55921G)과 질소로 산소를 제거한 3 mL의 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)를 추가해주고 실리콘 오일 용기 상에서 온도를 25 °C까지 올려준다. 온도가 25 °C까지 도달하면 30 분간 교반 해준 뒤 물(6 mL)로 반응을 멈추어주었다. 유기층을 추출하기 위해서 분별 깔때기를 이용하여 에틸아세테이트(Ethylacetate; EtOAc)와 물을 1:1로 혼합하여 섞어주었고, 이 과정을 통해 유기층만을 따로 획득할 수 있었다. 이후, 유기층을 무수황산나트륨(Na_2SO_4 , 2 g)으로 건조하고 회전농축기(Evaporator)를 이용(37 °C, 20~500 mmHg)하여 농축하였다. 이렇게 얻은 진한 갈색 고체 화합물은 실리카겔(silica gel, Merck-silica gel 60, 230-400 mesh)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(직경 6 cm, 높이 15 cm) 방법을 이용하여 분리(전개 액: MeOH/DCM=5/95)하여 노란색 고체 화합물(화합물 1, 28.1 mg, 63.2%)을 얻었다.

- [80] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance)을 수행하였다. 분석을 통해 화합물 1이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과는 다음과 같다:
- [81] ^1H -NMR (500 MHz, Acetonitrile- D_3) δ 8.67 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.11 (dd, J = 6.0, 2.0 Hz, 2H), 7.66 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 6.41 (dd, J = 6.0, 2.0 Hz, 2H). ^{13}C -NMR (126 MHz, Acetonitrile- D_3) δ 148.1, 145.8, 140.6, 138.3, 134.1, 122.9, 120.4, 2.3, 2.1, 1.9, 1.8, 1.6.
- [82] 이때, 상기 화합물 1을 '4-니트로-7-(피리딘-4-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사다리아졸'로 동정하였으며, 'NPO-pyr'로 명명하였다.
- [83] 실시예 2. 화합물 1(NPO-pyr)의 형광 방출 특성 확인
- [84] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 1(NPO-pyr)의 형광 방출 특성을 확인하기 위하여, 중성 조건의 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 호모시스테인과 반응 후 흡광 및 형광 방출 그래프를 측정하였다.
- [85] 구체적으로, 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 화합물 1(10 μM)과 호모시스테인(DL-homocysteine, 10 μM)을 10 분간 교반 후, 형광 방출 및 흡광 값을 측정하였다(여기파장: 460 nm). 흡광 스펙트럼(UV/Vis absorption spectra) 분석을 위해서는 UV/Vis 분광광도계(Agilent Technologies Cary 8454, USA)을 사용하였고, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra) 분석을 위해서는 형광 광도계(SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)을 사용하였다. 이때 각 기기에 본 화합물을 넣어주는 셀(cell)은 1 cm 두께의 표준 석영 셀(standard quartz cell, internal volume=0.1 cm)을 이용하였다. 측정된 결과를 도 1에 나타내었다.
- [86] 도 1은 중성의 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1과 호모시스테인이 반응함에 따른 흡광(Abs) 및 형광 방출(Emi) 그래프 변화의 결과이며, 흡광 스펙트럼은 488 nm에서 증가하고, 형광 방출 스펙트럼은 550 nm에서 증가하는 것

이 확인되었다. 또한, 화합물 1과 호모시스테인이 반응함에 따라 550 nm 근방에서 형광-켜짐 현상을 나타냄을 확인하였다.

[87] 실시예 3. 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인 반응 시간 및 선택성 확인

[88] 화합물 1(NPO-pyr)이 중성(pH 7.4) 조건에서 호모시스테인을 포함한 다양한 종류의 아미노 티올(aminothiol)과의 반응을 나타낼지 확인하기 위해, 중성의 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에 화합물 1과 아미노 티올을 첨가 후 형광 방출 그래프를 측정하였다.

[89] 구체적으로, 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 화합물 1(10 μ M)과 호모시스테인(DL-homocysteine, 10 μ M), 시스테인(Cysteine, 10 μ M), 글루타티온(L-glutathione, 10 μ M), 및 황화수소(hydrogen sulfide, 10 μ M)를 각각 반응시켜 형광 값을 측정하였다(여기 파장: 460 nm). 호모시스테인을 포함한 아미노 티올은 Sigma, TCI 사의 제품을 사용하였으며, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra) 분석을 위해서는 형광 광도계(SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 이때 각 기기에 본 화합물을 넣어주는 셀(cell)은 1 cm 두께의 표준 석영 셀(standard quartz cell, internal volume=0.1 cm)을 이용하였다. 측정된 결과를 도 2에 나타내었다.

[90] 도 2는 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1과 아미노 티올에 대한 반응을 시간 경과(0-30분)에 따라서 그래프로 나타낸 것이다. 호모시스테인을 추가한 후 5분 내에 화합물 1의 형광 증가가 관찰되었으며, 형광 세기가 30분까지 유지된 반면에, 호모시스테인을 제외한 다른 아미노 티올에 대해서는 형광 방출을 보이지 않아 낮은 반응성을 가짐을 확인하였다. 이를 통해, 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1이 다양한 아미노 티올 중 호모시스테인에 가장 높은 선택성과 빠른 반응 시간이 있음을 확인하였다.

[91] 실시예 4. 화합물 1(NPO-pyr)의 생체 분자에 대한 선택성 확인

[92] 화합물 1(NPO-pyr)이 다양한 종류의 생체 분자 중에서도 호모시스테인에 대해서만 선택성을 발휘할지 형광 변화를 통해 확인하였다.

[93] 구체적으로, 화합물 1의 호모시스테인에 대한 선택성 여부를 확인하기 위하여 형광-켜짐 여부를 확인하였다. 수용액(pH 7.4, PBS buffer)을 사용하였으며, 금속 이온은 Aldrich, Oriental Chemicals, Samchun chemicals 및 Duksan chemicals 사의 제품을 사용하였다. 화합물 1은 10 mM로 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹여 사용하였으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 디메틸설폭사이드의 양이 각 용매에 동일하도록 통제되었다(1% 미만). 화합물 1의 농도는 10 μ M, 생체 분자는 10 μ M로 동일하게 처리하였고, 여기 파장은 460 nm를 사용하여, 형광분광광도계로 형광 파장 550 nm에서의 형광 값을 측정하여 도 3에 나타내었다.

[94] 도 3의 그래프는 화합물 1이 포함된 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에 다양한 생체 내 분자(molecule) 및 이온(anion)을 처리한 후 형광 세기를 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 3의 그래프에서 화합물 1만 처리한 결과는 밝은 회색 바그래프(bar-graph)로 표시하였으며, 호모시스테인(hcy)을 포함한 생체 분자와 화합물 1을 반

응시킨 결과는 어두운 회색 바그래프로 표시되었다. 도 3의 그래프에 보여진 가로축 표시한 이온들의 종류는 다음과 같다:

- [95] (A) Probe 1 with DL-Homocysteine;
- [96] (B) Probe 1 with L-Cysteine;
- [97] (C) Probe 1 with L-Glutathion;
- [98] (D) Probe 1 with Hydrogen sulfide;
- [99] (E) Probe 1 with Bovine Serum Albumin;
- [100] (F) Probe 1 with Holmium(III) chloride;
- [101] (G) Probe 1 with Iron(II) chloride;
- [102] (H) Probe 1 with Iron(III) chloride;
- [103] (I) Probe 1 with Magnesium chloride;
- [104] (J) Probe 1 with Nickel(II) chloride;
- [105] (K) Probe 1 with Phosphorus pentachloride;
- [106] (L) Probe 1 with Gold trichloride;
- [107] (M) Probe 1 with Palladium (II) chloride;
- [108] (N) Probe 1 with potassium chloride;
- [109] (O) Probe 1 with Silver nitrate;
- [110] (P) Probe 1 with Sodium chloride; 및
- [111] (Q) Probe 1 with Cobalt chloride.

[112] 그 결과, 도 3의 그래프에서 나타난 바와 같이, NPO-pyr 자체(Only NPO-pyr)에서는 형광 세기 값이 거의 나타나지 않았으나, 호모시스테인이 존재하는 A에서는 강한 형광 세기 값을 보였다. 반면, NPO-pyr는 호모시스테인을 제외한 다른 아미노 티올, 금속 이온 및 생체분자 조건 내에서는 형광 켜짐 현상을 거의 나타내지 않았다. 이를 통해 화합물 1이 호모시스테인에 대하여 높은 선택성을 가짐을 확인하였다.

[113] 실시예 5. 화합물 1(NPO-pyr)의 pH에 따른 호모시스테인 감지 능력 확인

[114] 본 발명자들은 산성도(pH)에 따른 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인 감지 능력을 확인하였다.

[115] 구체적으로, 화합물 1의 형광-켜짐을 바탕으로 호모시스테인에 대한 산성도(pH)의 민감도를 관찰하기 위해, 화합물 1(10 μ M)과 호모시스테인(10 μ M)의 농도를 고정한 상태에서 다양한 산성도 조건 (pH 3-9)에 따른 민감도를 확인하였다. 즉, pH 3, 5, 7, 7.4, 9의 조건에서 각각 호모시스테인을 10 μ M씩 처리하고, 화합물 1 10 μ M과 10 분간 교반 해준 뒤 형광 세기를 측정하였다. 이때, 460 nm의 여기파장을 사용하였으며, 550 nm의 형광 방출 파장을 측정하여 형광 세기를 바그래프로 도 4에 나타내었다.

[116] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, pH 7 및 7.4에서 가장 민감하게 호모시스테인과 반응이 관찰되었으며, 다른 pH에서는 상대적으로 약하게 나타남을 확인하

여, 이를 통해, NPO-pyr가 생물학적 시료에서 호모시스테인 검출에 적용 가능함을 확인하였다.

[117] 실시예 6. 마우스 혈장과 변 내에서 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인 감지 능력 확인

[118] 화합물 1(NPO-pyr)의 마우스 혈장과 변 내에 존재하는 호모시스테인에 대한 검출 능력을 확인하기 위해, 혈액으로부터 분리한 혈장(20 μ L)과 마우스 변으로부터 추출한 추출물(9.5 mg)을 수용액(DI. H₂O), (5 mL)에 녹여, 호모시스테인을 농도별(1-160 ng/ μ L)로 처리한 뒤 화합물 1(10 μ M)을 처리하였다. 반응을 위해 37 °C 교반기에서 10분 교반 후 형광 스펙트럼을 측정하였다(여기파장: 460 nm). 화합물 1은 10 μ M로 DMSO 용액에 녹여 사용되었으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 DMSO의 양이 각 용기별로 동일하도록 하였다(1% 미만).

[119] 그 결과, 도 5(a,b,c,d,e,f)에 나타난 바와 같이, 마우스 혈장에서 호모시스테인을 감지할 수 있는 능력이 더 높은 것으로 확인되었으며, LOD 값은 0.176 ppm(= 0.01 μ M)으로 계산되었다. 또한, 마우스 혈장뿐만 아니라 마우스 변에서도 호모시스테인을 감지할 수 있는 잠재력이 확인되었다.

[120] 실시예 7. 교모세포종 마우스의 혈장내에서 화합물 1(NPO-pyr)의 형광 세기 차이 확인

[121] 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인 감지 능력을 검증하기 위해, 대조군으로 정상 마우스 및 실험군으로 교모세포종 마우스를 이용하여 이들 각각의 혈장 내에서의 화합물 1의 형광세기 차이 및 교모세포종 진행 정도를 분석하였다.

[122] 먼저, 실험군 준비를 위해, LUC-U87MG 세포(교모세포종세포)를 사용하여, 소태아혈청(FBS; Fetal Bovine Serum)을 제거한 세포 배양 배지(Cell Culture Media) 5 μ L에 5.0×10^5 세포가 있는 상태의 용액을 마우스 뇌(시상)에 투여하여 교모세포종 마우스 모델을 만들었다.

[123] 이후, 마우스 뇌 영상화를 통한 교모세포종의 진행 정도를 파악하기 위해, 루시페린(D-Luciferin, 150 mg/kg, n=10)을 마우스의 복강 내에 투여하여 형광 조직 영상촬영 시스템(FTIS; Fluorescence tissue imaging system; VISQUE InVivo Elite. Vieworks)을 이용하여 교모세포종 형광 발광 신호(세기)를 확인하였다.

[124] 본 화합물 1과 마우스 혈장 반응을 확인하기 위해서 형광 측정장비(Spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였다. 형광 측정에 사용되는 유리 큐벳은 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(Internal volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.

[125] 또한, 본 화합물 1과 마우스 혈장의 반응을 확인하기 위해서, 대조군과 실험군으로부터 혈액을 채혈한 뒤 혈장을 분리하여 본 화합물 1과 반응시킨 뒤 형광 측정장비(Spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하여 550nm의 방출 파장에서 형광 세기를 측정하였다(여기파장: 460 nm). 형광 측정에 사용되는 유리 큐벳은 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(Internal volume=

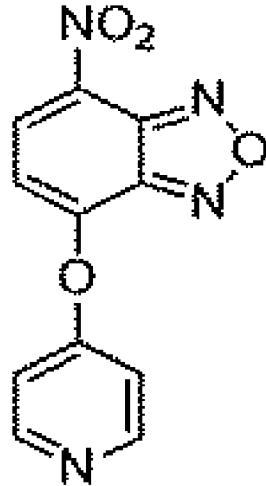
0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다. 마우스 뇌 영상화 결과는 도 6의 (a)에 나타내었고, 대조군과 실험군의 혈장 내에서 화합물 1의 형광 세기 차이를 도 6의 (b)에 바그래프로 나타내었다.

- [126] 그 결과, 도 6(a)에서 나타낸 바와 같이, 교모세포종 마우스에서 시간이 경과(교모세포종세포 투여 후 7일, 14일)함에 따라 형광 발광 세기가 증가하여 교모세포종이 진행되고 있음을 확인하였다. 또한, 도 6(b)에 나타난 바와 같이, 대조군 대비 실험군의 혈장과 화합물 1이 반응하였을 때 더 강한 형광 세기를 나타냄을 확인하였다. 결과적으로, NPO-pyr의 혈장 내 호모시스테인 감지 능력을 확인하였으며, 이를 이용하여 NPO-pyr을 교모세포종 조기 진단에 활용할 수 있음을 확인하였다.
- [127] 실시예 8. 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인과 반응 메커니즘 도식도
- [128] 도 7은 본 발명 실시예 1에서 제조된 화합물 1(NPO-pyr)의 호모시스테인 감지 메커니즘을 도식적으로 나타낸 것이다. 본 발명에서 제안된 메커니즘은 NPO-pyr과 호모시스테인이 배위(coordination)를 이루어 NPO-pyr의 피리딘(pyridine) 부분에 호모시스테인의 아민기(-NH₂)가 추가되어 NPO-pyr과 결합할 수 있다. 또한, NPO-pyr과 호모시스테인의 배위(coordination)가 유발되어 선택적으로 형광-켜짐 특성을 나타낼 수 있다.
- [129] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 호모시스테인(Homocystein)과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 것인, 화합물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 화합물은 pH 6 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타내는 것인, 화합물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 또는 생체 분자들을 포함하는 시료 중에서 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것인, 화합물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 시료는 물, 버퍼(buffer) 용액 또는 생체 시료인 것인, 화합물.
- [청구항 6] 제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 검출용 화학센서.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 화학센서는 생체 시료 중에서 호모시스테인을 선택적으로 검출하는 것인, 호모시스테인 검출용 화학센서.
- [청구항 8] 제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 검출용 조성물.
- [청구항 9] 제6항에 있어서,
상기 조성물은 생체 시료 중에서 호모시스테인을 선택적으로 검출하는 것인, 호모시스테인 검출용 조성물.
- [청구항 10] 제1항의 화합물을 시료에 첨가하는 단계(단계 1);
상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및

방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인의 검출방법.

[청구항 11] 제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는, 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물.

[청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 호모시스테인 관련 질환은 뇌종양, 신경 퇴행성 질환, 암 및 심혈관 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 진단용 조성물.

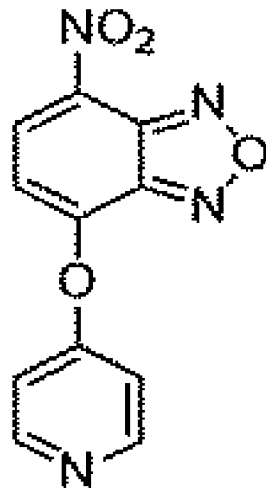
[청구항 13] 제11항에 있어서,
상기 호모시스테인 관련 질환은 교모세포종인 것인, 진단용 조성물.

[청구항 14] 제1항의 화합물을 인간 또는 동물로부터 분리된 시료에 첨가하는 단계(단계 1);

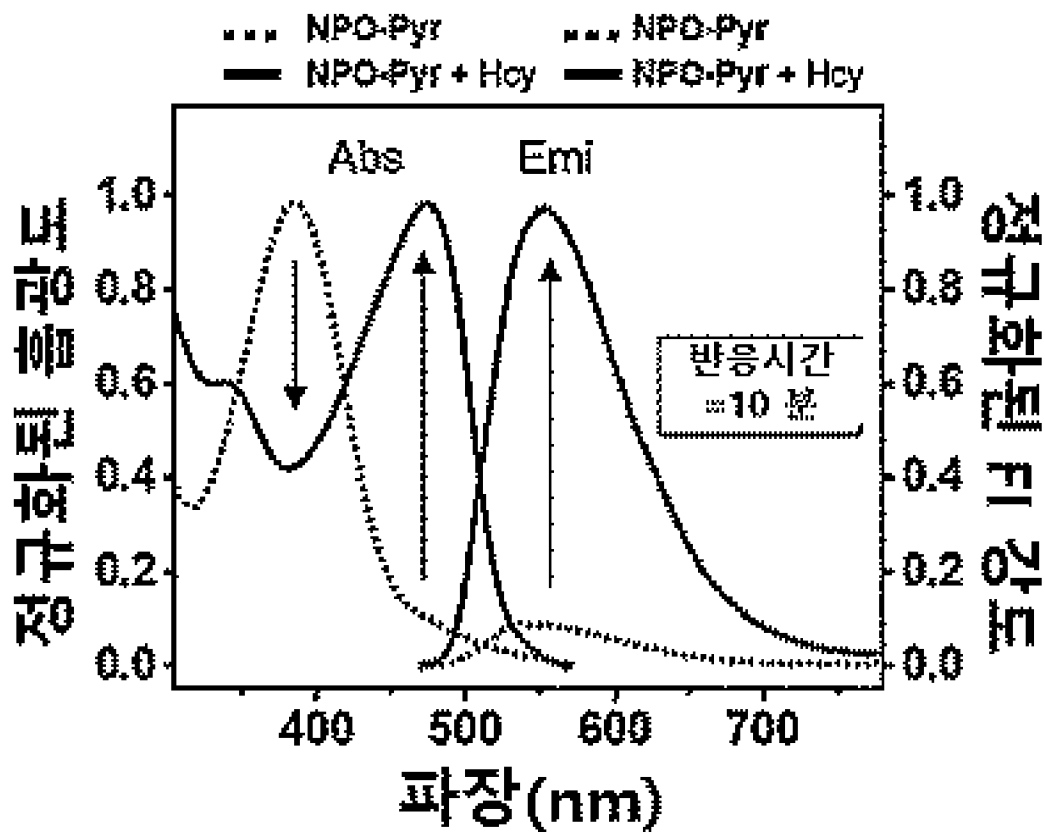
상기 단계 1에서 준비한 시료에 여기광을 조사하는 단계(단계 2); 및
방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 호모시스테인 관련 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

[청구항 15] 트리에틸아민(Triethylamine), 4-하이드록시피리딘(4-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 반응시키는 단계;를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

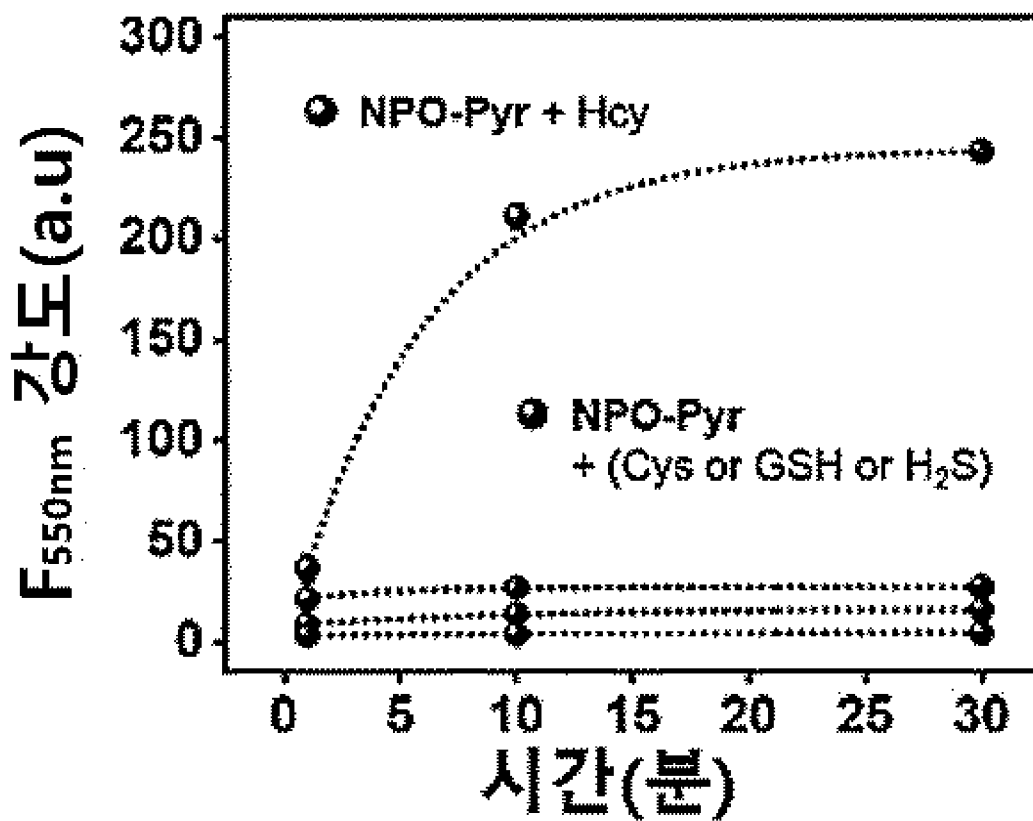
[화학식 1]



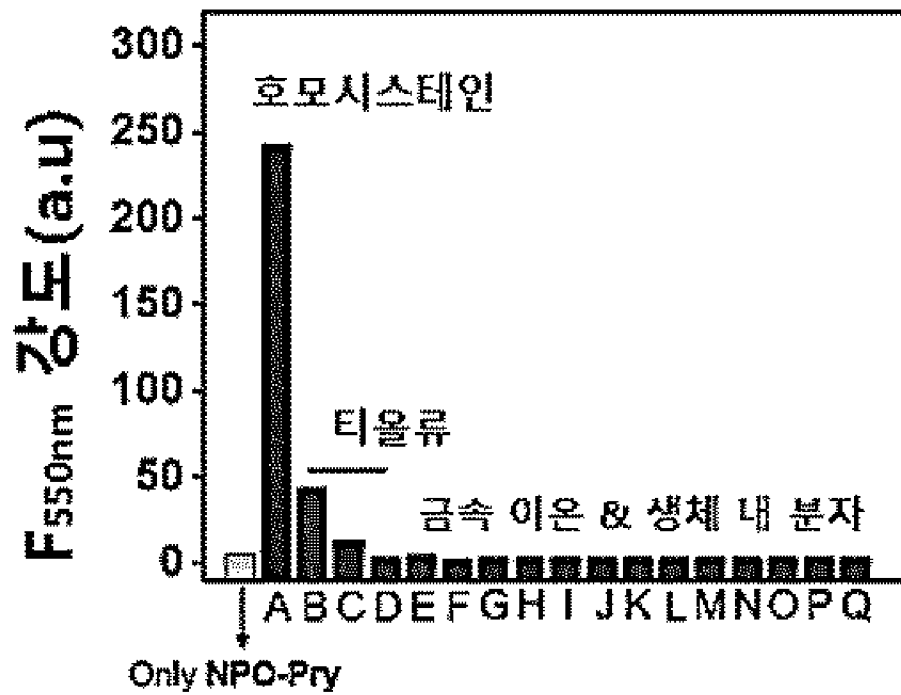
[도1]



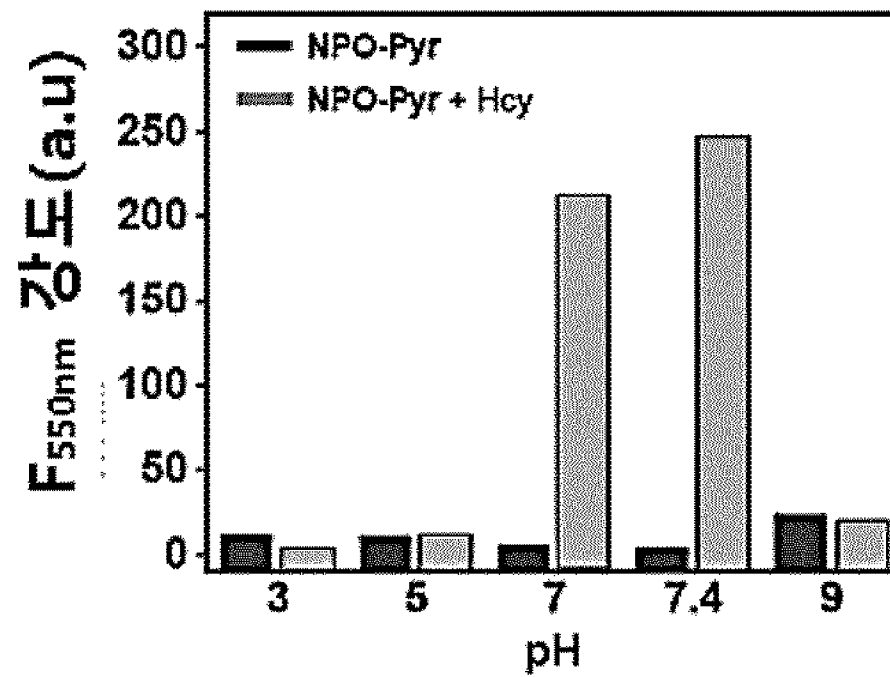
[도2]



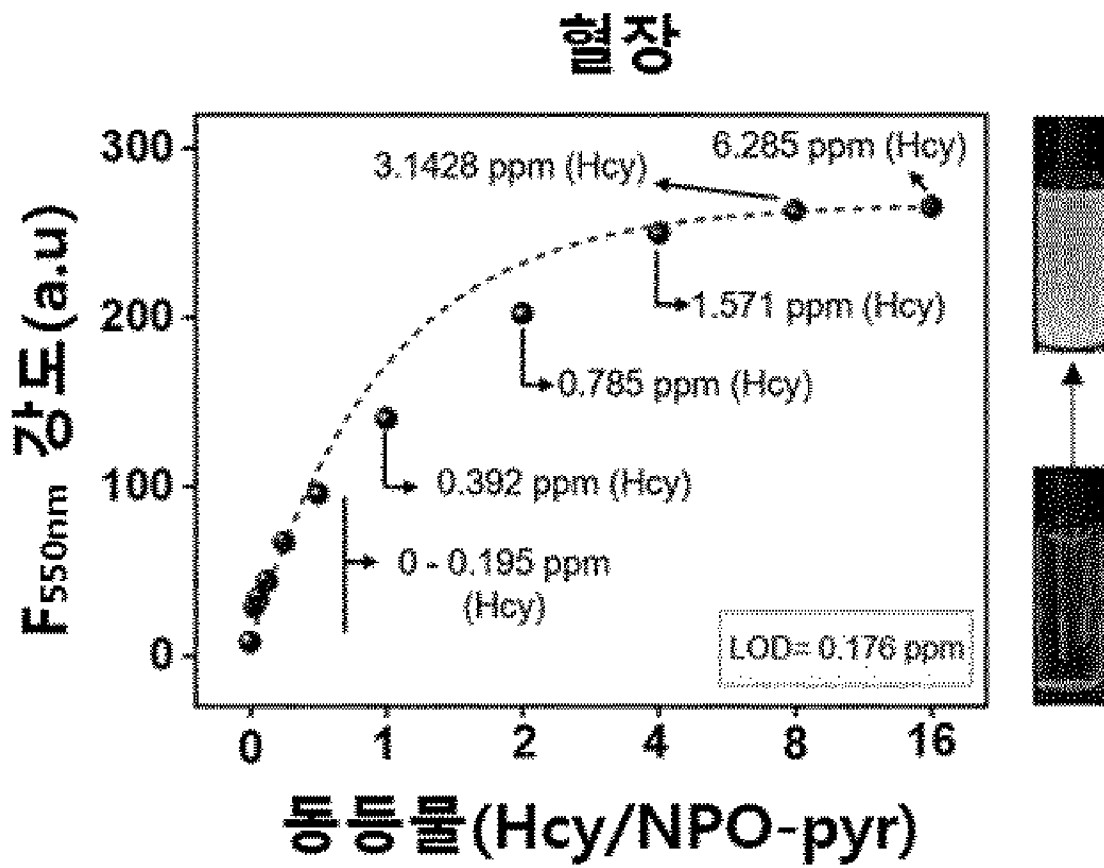
[도3]



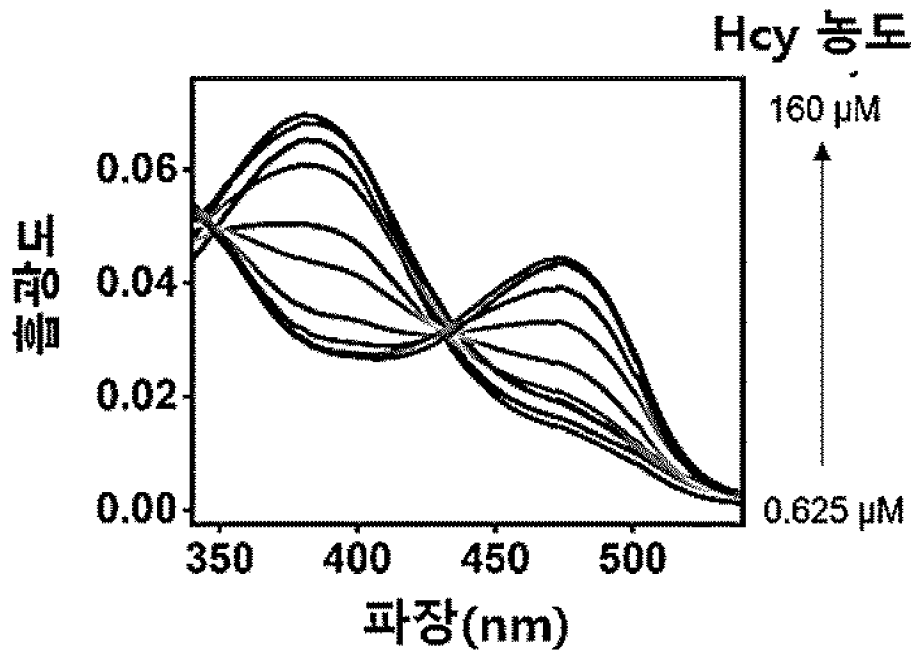
[도4]



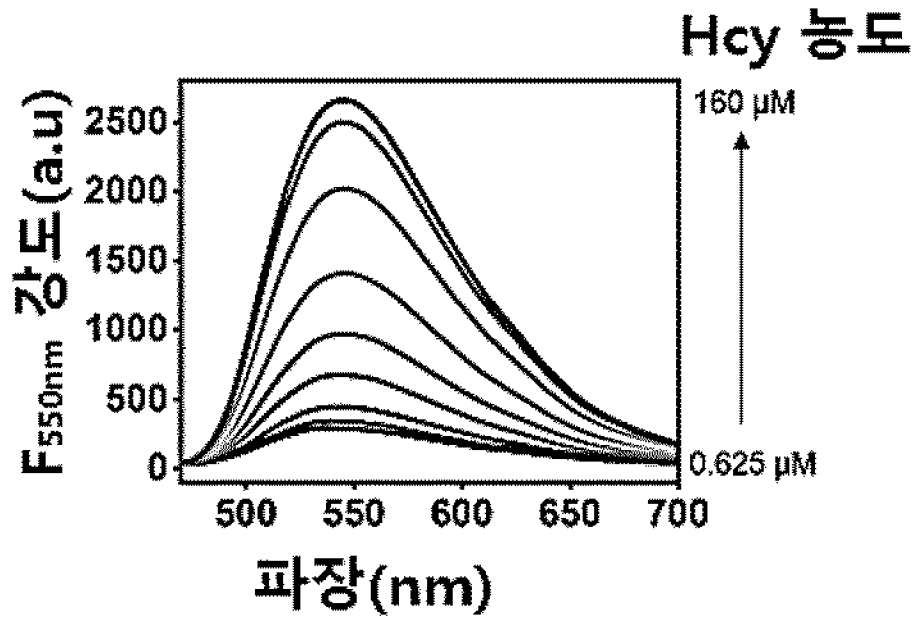
[도5a]



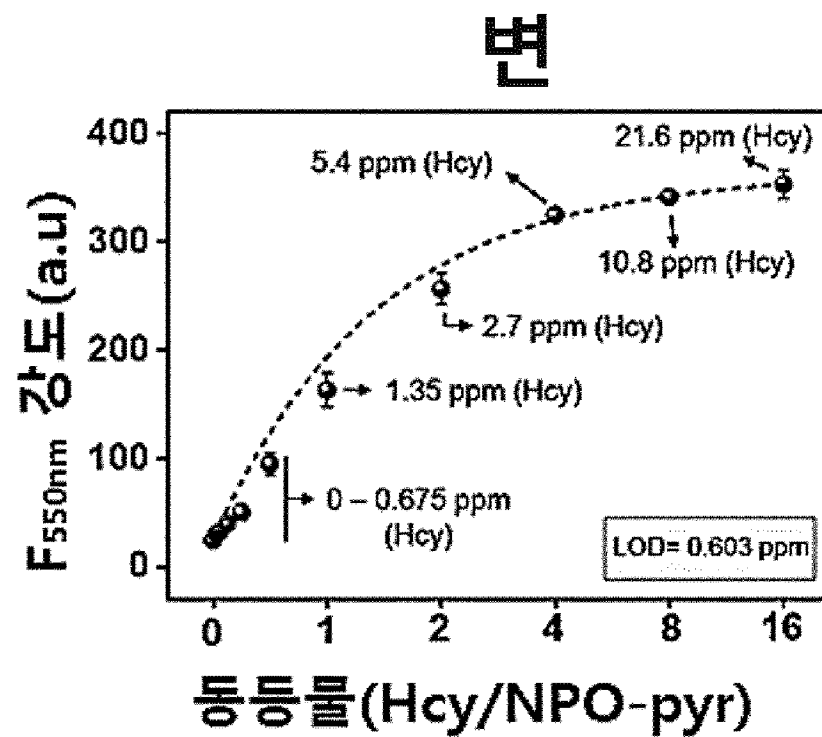
[도5b]



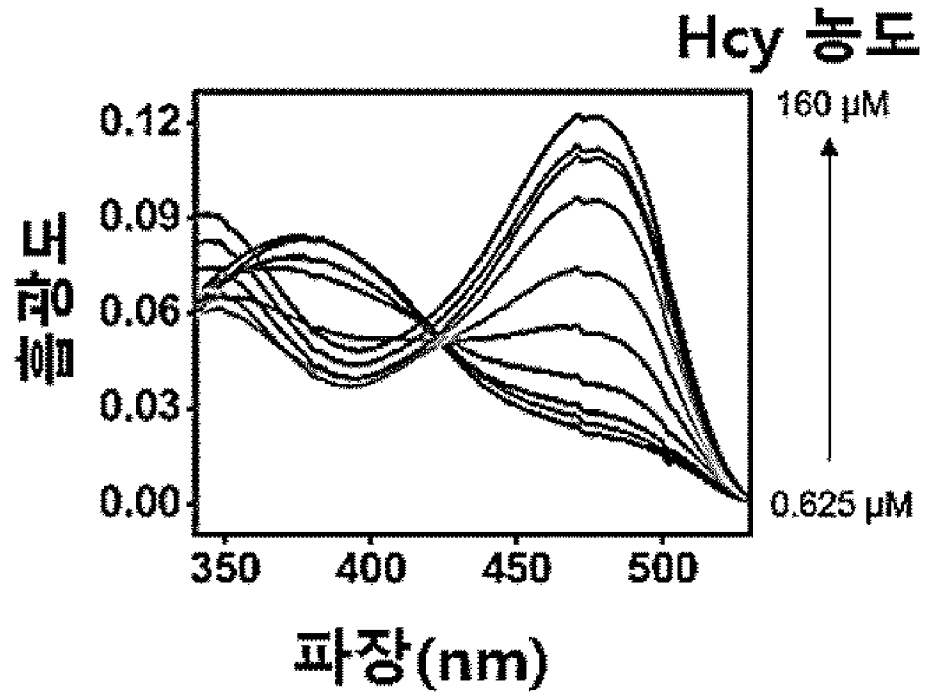
[도5c]



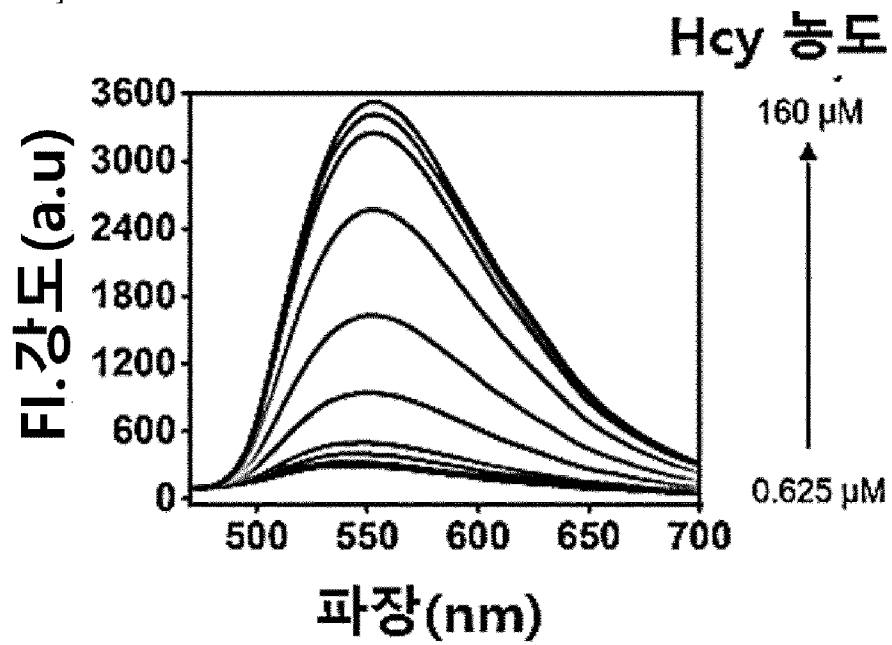
[도5d]



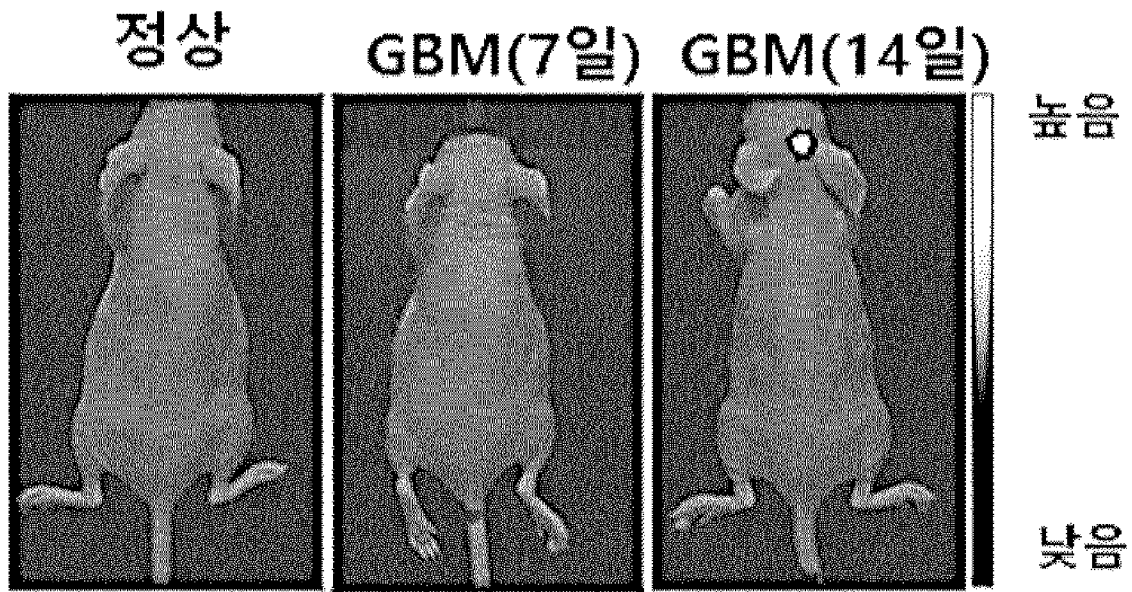
[도5e]



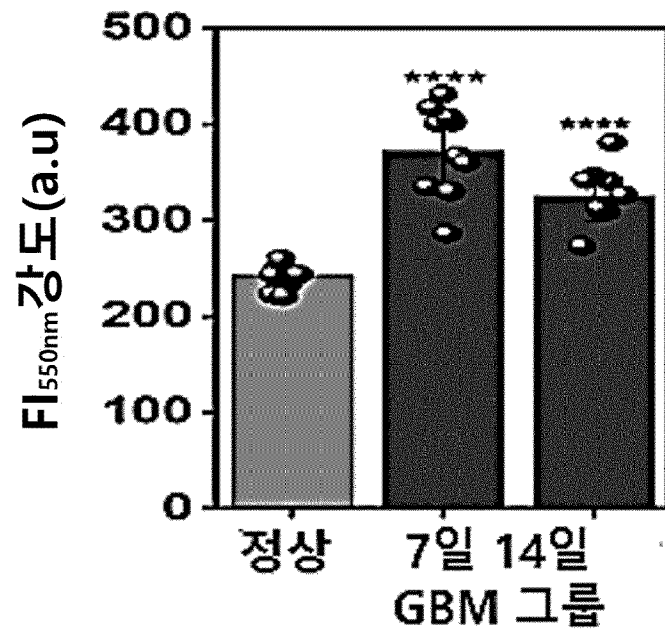
[도5f]



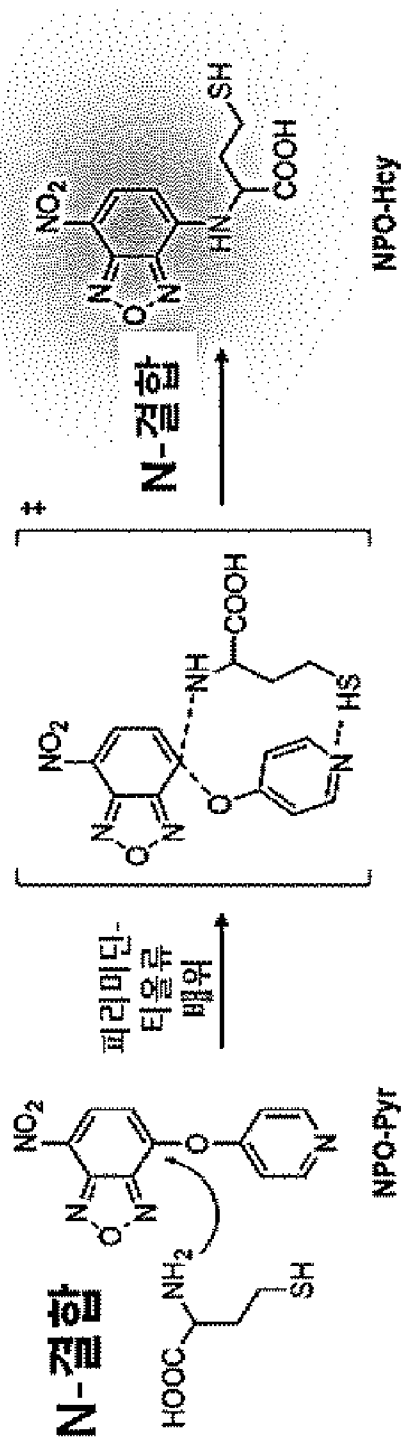
[도6a]



[도6b]



[도7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003721

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07D 413/12(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07D 413/12(2006.01) Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal), STN (Registry, CAplus) & keywords: 형광(fluorescence), 프로브(probe), 호모시스테인(homocysteine), 검출(detection), 진단(diagnosis), 교모세포종(glioblastoma)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, Y. et al. Pyridine-NBD: A homocysteine-selective fluorescent probe for glioblastoma (GBM) diagnosis based on a blood test. Analytica chimica acta. 04 March 2022, vol. 1202, article no. 339678, pp. 1-10. See abstract; paragraph 3.1. Probe design and synthesis; paragraph 3.2. Sensing properties of NPO-Pyr and paragraph 4. Conclusion; and figures 1, 3 and 4.	1-13,15
A	ZHU, H. et al. A simple long-wavelength fluorescent probe for simultaneous discrimination of cysteine/homocysteine and glutathione/hydrogen sulfide with two separated fluorescence emission channels by single wavelength excitation. Analytical sciences. 2020, vol. 36, pp. 255-262. See entire document.	1-13,15
A	ZHU, H. et al. A novel highly sensitive fluorescent probe for bioimaging biothiols and its applications in distinguishing cancer cells from normal cell. Analyst. 2019, vol. 144, pp. 7010-7016. See entire document.	1-13,15
A	GOZDOWSKA, M. et al. Determination of arginine-vasotocin and isotocin in fish plasma with solid-phase extraction and fluorescence derivatization followed by high-performance liquid chromatography. Journal of chromatography B. 2004, vol. 807, pp. 229-233. See entire document.	1-13,15
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 17 July 2023		Date of mailing of the international search report 17 July 2023
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003721

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SUDHEER et al. Detection of Al 3+ and Fe 3+ ions by nitrobenzoxadiazole bearing pyridine-2,6-dicarboxamide based chemosensors: effect of solvents on detection. New journal of chemistry. 2020, vol. 44, pp. 13285-13294. See entire document.	1-13,15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/003721

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body by diagnosis (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07D 413/12(2006.01)i; G01N 33/58(2006.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07D 413/12(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템), STN(Registry, CAplus) & 키워드: 형광(fluorescence), 프로브(probe), 호모시스테인(homocysteine), 검출(detection), 진단(diagnosis), 교모세포종(glioblastoma)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KIM, Y. 등, "Pyridine-NBD: A homocysteine-selective fluorescent probe for glioblastoma (GBM) diagnosis based on a blood test", Analytica chimica acta, 2022.03.04, 제1202권, 아티클 넘버 339678, 페이지 1-10 초록; 단락 3.1. Probe design and synthesis; 단락 3.2. Sensing properties of NPO-Pyr; 단락 4. Conclusion; 도면 1, 3, 4	1-13,15
A	ZHU, H. 등, "A simple long-wavelength fluorescent probe for simultaneous discrimination of cysteine/homocysteine and glutathione/hydrogen sulfide with two separated fluorescence emission channels by single wavelength excitation", Analytical sciences, 2020, 제36권, 페이지 255-262 전체 문헌	1-13,15
A	ZHU, H. 등, "A novel highly sensitive fluorescent probe for bioimaging biothiols and its applications in distinguishing cancer cells from normal cells", Analyst, 2019, 제144권, 페이지 7010-7016 전체 문헌	1-13,15
A	GOZDOWSKA, M. 등, "Determination of arginine-vasotocin and isotocin in fish plasma with solid-phase extraction and fluorescence derivatization followed by high-performance liquid chromatography", Journal of chromatography B, 2004, 제807권, 페이지 229-233 전체 문헌	1-13,15
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☐ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2023년07월17일(17.07.2023)		국제조사보고서 발송일 2023년07월17일(17.07.2023)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	SUDHEER 등, "Detection of Al 3+ and Fe 3+ ions by nitrobenzoxadiazole bearing pyridine-2, 6-dicarboxamide based chemosensors: effect of solvents on detection", New journal of chemistry, 2020, 제44권, 페이지 13285-13294 전체 문헌	1-13,15

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: **14**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14는 진단에 의한 사람의 처치방법에 관한 것입니다(PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.