(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0006727
(43) 공개일자 2019년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C09K 11/06 (2006.01) *C09K 11/02* (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C09K 11/06 (2013.01)
C09K 11/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0087778
(22) 출원일자 2017년07월11일
심사청구일자 2017년07월11일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
윤주영
서울특별시 용산구 이촌로 347, 2동 501호(서빙고동, 신동아아파트)
리준
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 디동 501호 (대현동, 종합과학관)
(74) 대리인
리앤목특허법인

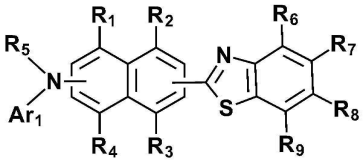
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **화합물, 이를 포함하는 형광 프로브 조성물, 및 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법**

(57) 요 약

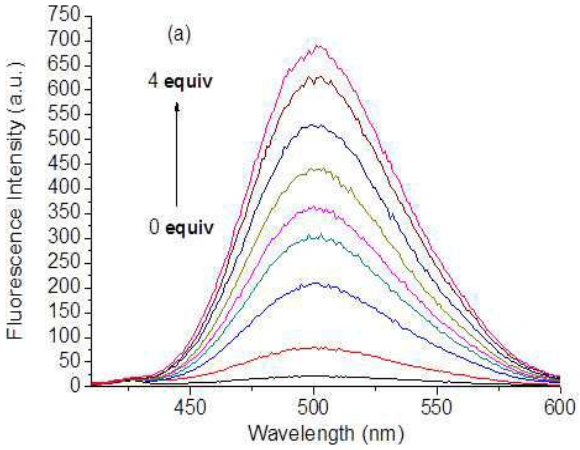
하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제시된다:

<화학식 1>



상기 식에서, R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9 및 Ar_1는 상세한 설명을 참조한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/84 (2013.01)
C09K 2211/1051 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A3A2048814
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-리더연구자지원사업-창의적연구
연구과제명 다차원 유기소재 연구
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2017.08.31

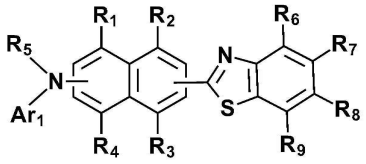
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

<화학식 1>



상기 식에서, R_1, R_2, R_3, 및 R_4가 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 7 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

R_5가 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

R_6, R_7, R_8, 및 R_9가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

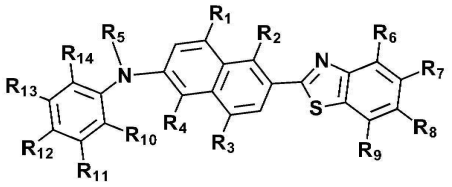
Ar_1이 2 이상의 치환기로 치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴기이며, 상기 치환기가 서로 독립적으로 F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지

10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이다.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 화합물이 하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

<화학식 2>



상기 식에서, R_1, R_2, R_3, 및 R_4가 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

R_5가 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

R_6, R_7, R_8, 및 R_9가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

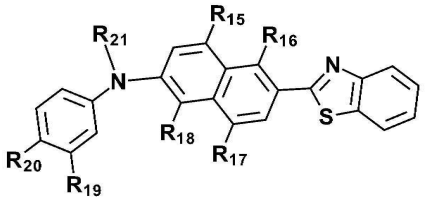
R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, 및 R_{14}가 서로 독립적으로 F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지

10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로메닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이다.

청구항 3

제1 항에 있어서, 상기 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물:

<화학식 3>



상기 식에서, R_{15}, R_{16}, R_{17}, 및 R_{18}이 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이며,

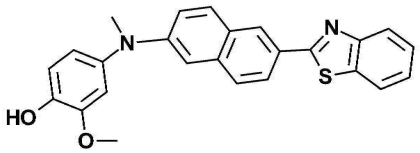
R_{21}이 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

R_{19}, 및 R_{20}이 서로 독립적으로, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 또는 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기이다.

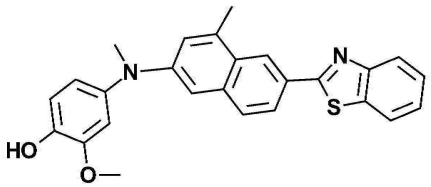
청구항 4

제1 항에 있어서, 하기 화학식 4 내지 9로 표시되는 화합물:

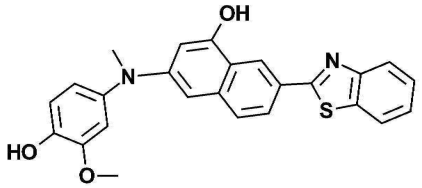
<화학식 4>



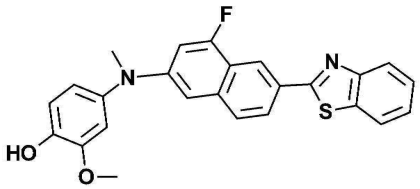
<화학식 5>



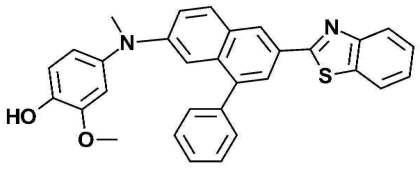
<화학식 6>



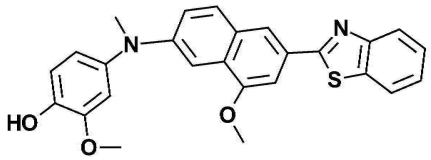
<화학식 7>



<화학식 8>



<화학식 9>



청구항 5

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항의 화합물; 및

용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 형광 프로브 조성물.

청구항 6

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항의 화합물과 시료(sample)를 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하는 단계;를 포함하는 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법.

청구항 7

제6 항에 있어서, 상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료에서 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법.

청구항 8

제6 항에 있어서, 상기 시료가 미생물(microorganism), 세포(cell), 및 조직(tissue) 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법.

청구항 9

제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항의 화합물과 목적(target) 화합물을 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료에서 목적 화합물의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함하는 목적 화합물 탐지 방법.

청구항 10

생물(organism)에 제1 항 내지 제4 항 중 어느 한 항의 화합물을 주입시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트

(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함하는 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 화합물, 이를 포함하는 형광 프로브 조성물, 및 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite, ONOO-)는 생물학적 시스템에서 중요한 역할을 수행하므로 폭넓은 관심의 대상이 되었다. 생체 내에서(in vivo), 초과산화물 자유라디칼($^{\cdot}O2^{-}$)과 산화 질소 자율라디칼(NO)의 반응 결과물인 퍼옥시나이트라이트는 세포내에서 DNA 및 단백질을 포함하는 다양한 분자를 손상시킬 수 있는 강력한 산화제이다. 따라서, 세포내에서 퍼옥시나이트라이트의 비정상적인 레벨은 허혈재관류 손상(ischemia-reperfusion injury), 염증(inflammatory) 조건, 신경 퇴행성 질환(neurodegenerative disease)과 같은 질병과 연관될 수 있다. 따라서, 생물학적 시스템에서 퍼옥시나이트라이트의 탐지는 인간 질병의 초기 진단에 유용할 수 있다. 형광 프로브(fluorescent probe)는 그것이 가지는 고감도와 간편성으로 인하여 체내에서 생물학적 분자를 탐지하는 효과적인 수단이다. 최근에 퍼옥시나이트라이트 프로브를 개발하기 위한 많은 노력이 수행되었고, 많은 프로브가 살아있는 세포나 실험용 쥐(mice)에서 우수한 성능으로 보여주었다. 그러나, 이러한 성과에도 불구하고, HOCl 과 H_2O_2에 의한 높은 간섭, 응답 소멸(turn off response), 조직 이미지화 부재(a lack of tissue imaging)과 같은 문제들이 퍼옥시나이트라이트 형광 프로브에 여전히 존재한다. 따라서, 새로운 퍼옥시나이트라이트 형광 프로브가 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 한 측면은 형광 프로브로 사용할 수 있는 새로운 화합물을 제공하는 것이다.

[0004] 다른 한 측면은 상기 화합물을 포함하는 형광 프로브 조성물을을 제공하는 것이다.

[0005] 다른 한 측면은 상기 화합물을 이용한 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법을 제공하는 것이다.

[0006] 또 다른 한 측면은 상기 화합물을 이용한 목적 화합물(target compound) 탐지 방법을 제공하는 것이다.

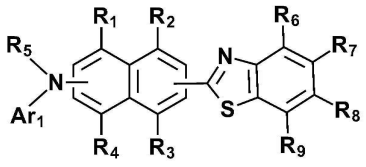
[0007] 또 다른 한 측면은 상기 화합물을 이용한 생물 체내에서의 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 한 측면에 따라,

[0009] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물이 제공된다:

[0010] <화학식 1>

[0011] 

[0012] 상기 식에서, R_1, R_2, R_3, 및 R_4가 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아

릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

[0013] R_5가 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

[0014] R_6, R_7, R_8, 및 R_9가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

[0015] Ar_1이 2 이상의 치환기로 치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴기이며, 상기 치환기가 서로 독립적으로 F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이다.

[0016] 다른 한 측면에 따라,

[0017] 상기에 따른 화합물; 및

[0018] 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 형광 프로브 조성물이 제공된다.

[0019] 또 다른 한 측면에 따라,

[0020] 상기의 화합물과 시료(sample)를 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

[0021] 상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하는 단계;를 포함하는 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법이 제공된다.

[0022] 또 다른 한 측면에 따라,

[0023] 상기의 화합물과 목적(target) 화합물을 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

[0024] 상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료에서 목적 화합물의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함하는 목적 화합물 탐지 방법이 제공된다.

[0025] 또 다른 한 측면에 따라,

[0026] 생물(organism)에 상기의 화합물을 주입시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및

[0027] 상기 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함하는 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0028] 한 측면에 따르면 이광자(two-photon) 형광 프로브로 사용할 수 있는 새로운 화합물은 물에 대한 용해도가 높으며, 높은 2-광자 단면을 가진다. 새로운 화합물을 적용함에 의하여 퍼옥시나이트라이트를 우수한 선택성과 감도로 낮은 농도에서도 탐지할 수 있다. 새로운 화합물을 적용함에 의하여 조직(tissue) 이미징을 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1a는 PBS 버퍼에서 서로 다른 $ONOO^-$ 농도에서 프로브(1 μM)의 형광 응답이다.

도 1b는 10 당량의 ROS 존재 하의 프로브(1 μM)의 형광 응답이다. 1은 프로브, 2는 $ONOO^-$, 3은 OCl^- 4는 H_2O_2, 5는 $ROO^·$, 6은 NO, 7은 $^·OH$, 8은 $^·O_2^-$, 9는 tBuOOH, 10은 GSH (10 mM), PBS 버퍼 (1% DMF 함유), 25 ℃ (λ_{ex} = 370 nm, λ_{em} = 501 nm, slit width: 5,5).

도 1c는 다른 ROS 와 4 당량의 $ONOO^-$ 농도에서 존재 하의 프로브(1 μM)의 형광 응답이다. 1은 블랭크, 2는 ClO^-, 3은 H_2O_2, 4는 $ROO^·$, 5는 NO, 6은 $^·OH$, 7은 $^·O_2^-$, 8은 tBuOOH, PBS 버퍼 (1% DMF 함유), 25 ℃ (λ_{ex} = 370 nm, λ_{em} = 501 nm, slit width: 5,5).

도 2는 RAW 264.7 세포에서 체내 $ONOO^-$의 형광이미지이다. a는 비처리(no treatment); b는 LPS, IFN-γ 처리; c는 200 μM 아미노구아니딘(aminoguanidine), LPS, IFN-γ 처리; 및 d는 100 μM 엡셀렌(ebselen), LPS, IFN-γ 처리. 형광 이미지는 공초점 마이크로스코피로 획득하였다. 도 2의 상단: ex. 405 nm / em. 490 - 590 nm, 도 2의 하단 DIC와 병합됨(merged). 스케일 바(scale bar): 10 μM.c.

도 3은 PBS 버퍼 (10 mM, 1% DMF 함유, pH 7.4)에서 $ONOO^-$의 부재 하 및 존재 하에서 프로브의 2-광자 작용 스펙트럼이다. 2광자 작용 단면 값(2-photon action cross section, $\Phi\delta$)의 평가된 불활실성은 ±15%이다.

도 4는 RAW 264.7 세포에서 체내 $ONOO^-$의 TPM 미지이다. a는 비처리(no treatment) 이미지; b는 LPS, IFN-γ 처리 후의 이미지; c는 200 μM 아미노구아니딘(aminoguanidine), LPS, IFN-γ 처리 후의 이미지; 및 d는 100 μM 엡셀렌(ebselen), LPS, IFN-γ 처리 후의 이미지이고, f는 a 내지 e의 TPEF 강도이다. 상기 이미지들은 740nm 에서의 여기에 의하여 400-650 nm에서의 발광을 수집하여 얻어졌다. 스케일 바(scale bar): 30 μm.

도 5는 1시간 동안 10 μM 프로브로 라벨된 쥐 해마 절편(rat hippocapal slices)의 10× 확대 (a 내지 d) 및 100× 확대된 (e 내지 h) TPM 이미지이다. 이미지들은 대략 90-180 μm의 깊이에서 z-방향을 따라 축적되었다. A는 PMA의 첨가 전의 이미지; b는 30분 동안 10 ng/ml PMA의 첨가 후의 이미지; c는 20분 동안 50 μM SIN-1 첨가 후의 이미지; 및 d는 40분 동안 10 ng/ml PMA 및 150 μM 엡셀렌(ebselen) 첨가 후의 이미지이다. e 내지 h의 이미지는 120 μm 깊이에서 a 내지 d의 흰색 박스의 확대된 이미지이다. i는 750nm 에서의 여기에 의하여 400-650 nm에서의 발광을 수집하여 얻어진 TPEF 강도이다. 스케일 바는 각각 a 내지 d는 300이고, e 내지 h는 30 μm이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하에서 예시적인 구현예들에 따른 화합물, 이를 포함하는 형광 프로브 조성물, 및 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법에 관하여 더욱 상세히 설명한다.

[0031] 이하에서 설명되는 본 창의적 사상(present inventive concept)은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고, 상세한 설명에 상세하게 설명한다. 그러나, 이는 본 창의적 사상을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 창의적 사상의 기술 범위에 포함되는 모든

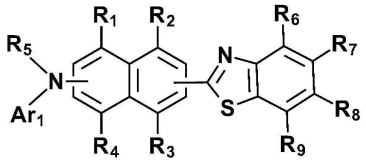
변환, 균등물 또는 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0032] 이하에서 사용되는 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 창의적 사상을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 이하에서, "포함한다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품, 성분, 재료 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 나타내려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품, 성분, 재료 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 이하에서 사용되는 "/"는 상황에 따라 "및"으로 해석될 수도 있고 "또는"으로 해석될 수도 있다.

[0033] 도면에서 여러 구성요소, 층 및 영역을 명확하게 표현하기 위하여 직경, 길이, 두께를 확대하거나 축소하여 나타내었다. 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 동일한 도면 부호를 붙였다. 명세서 전체에서 층, 막, 영역, 판 등의 부분이 다른 부분 "상에" 또는 "위에" 있다고 할 때, 이는 다른 부분의 바로 위에 있는 경우뿐만 아니라 그 중간에 또 다른 부분이 있는 경우도 포함한다. 명세서 전체에서 제1, 제2 등의 용어는 다양한 구성 요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 구성 요소들은 용어들에 의하여 한정되어서는 안 된다. 용어들은 하나의 구성 요소를 다른 구성 요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.

[0034] 일구현예 에 따른 화합물은 하기 화학식 1로 표시된다:

[0035] <화학식 1>

[0036] 

[0037] 상기 식에서, R_1, R_2, R_3, 및 R_4가 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기($-NH_2$), 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기($-OH$), 티올기($-SH$), 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기($-NO_2$), 카바모일기($-C(=O)NH_2$), 트리플루오로페닐기($-C6H_2F_3$), 페녹시기($-OC_6H_5$), 벤질옥시기($-OCH_2C_6H_5$), 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

[0038] R_5가 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

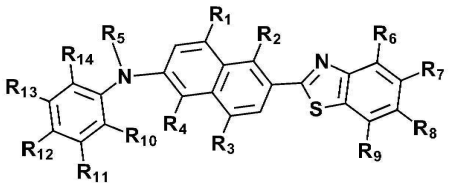
[0039] R_6, R_7, R_8, 및 R_9가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일

기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, -P(=O)(OH)$_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, -SO$_3$H)이며,

[0040] Ar_1이 2 이상의 치환기로 치환된 탄소수 6 내지 20의 아릴기이며, 상기 치환기가 서로 독립적으로 F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, -P(=O)(OH)$_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, -SO$_3$H)이다.

[0041] 상기 화합물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

[0042] <화학식 2>

[0043] 

[0044] 상기 식에서, R_1, R_2, R_3, 및 R_4가 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, -P(=O)(OH)$_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, -SO$_3$H)이며,

[0045] R_5가 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

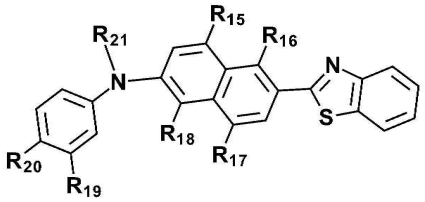
[0046] R_6, R_7, R_8, 및 R_9가 서로 독립적으로 수소, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로페닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, -P(=O)(OH)$_2$)기, 또는 술폰산기

(sulfonic acid, $-SO_3H$)이며,

[0047] R_{10}, R_{11}, R_{12}, R_{13}, 및 R_{14}가 서로 독립적으로 F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 2 내지 10의 알케닐기, 탄소수 2 내지 10의 알키닐기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기, 탄소수 1 내지 10의 하이드록시알킬기, 탄소수 1 내지 10의 아미노알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 탄소수 6 내지 10의 아릴아미노기, 탄소수 2 내지 10의 디알킬아미노기, 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴아미노기, 탄소수 12 내지 20의 디아릴아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아실아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기, 니트로기, 카바모일기, 트리플루오로메닐기, 페녹시기, 벤질옥시기, 포스폰산(phosphonic acid, $-P(=O)(OH)_2$)기, 또는 술폰산기(sulfonic acid, $-SO_3H$)이다.

[0048] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 3으로 표시될 수 있다:

[0049] <화학식 3>

[0050] 

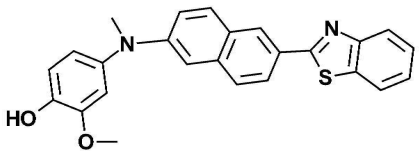
[0051] 상기 식에서, R_{15}, R_{16}, R_{17}, 및 R_{18}이 서로 독립적으로 수소, F, Cl, Br, I, 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 아미노기, 탄소수 1 내지 10의 아킬아미노기, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기이며,

[0052] R_{21}이 탄소수 1 내지 10의 알킬기, 탄소수 1 내지 10의 할로겐화알킬기, 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴기, 탄소수 6 내지 20의 알크아릴기, 탄소수 2 내지 10의 헤테로사이크릴기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알킬기, 탄소수 5 내지 10의 시클로알케닐기, 또는 탄소수 5 내지 10의 시클로알키닐기이며,

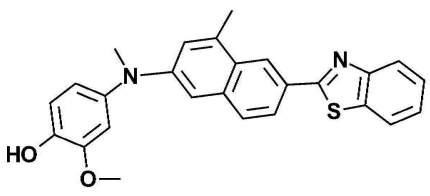
[0053] R_{19}, 및 R_{20}이 서로 독립적으로, 하이드록시기, 티올기, 탄소수 1 내지 10의 티오알킬기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시기, 탄소수 1 내지 10의 알킬티오기, 탄소수 1 내지 10의 알콕시알킬기, 탄소수 6 내지 20의 아릴옥시기, 탄소수 7 내지 20의 아릴알콕시, 또는 탄소수 7 내지 20의 아실옥시기이다.

[0054] 예를 들어, 상기 화합물은 하기 화학식 4 내지 9로 표시될 수 있다:

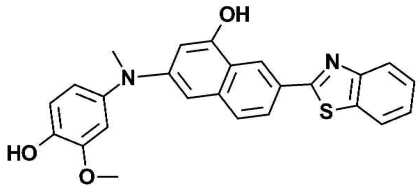
[0055] <화학식 4>

[0056] 

[0057] <화학식 5>

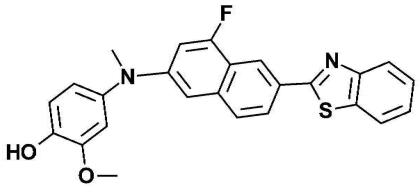
[0058] 

[0059] <화학식 6>



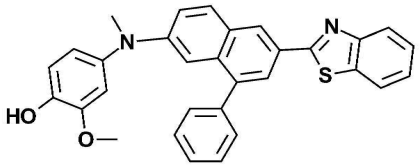
[0060]

[0061] <화학식 7>



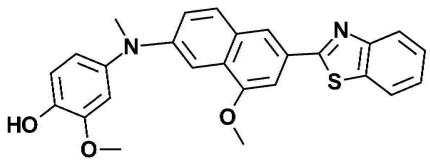
[0062]

[0063] <화학식 8>



[0064]

[0065] <화학식 9>

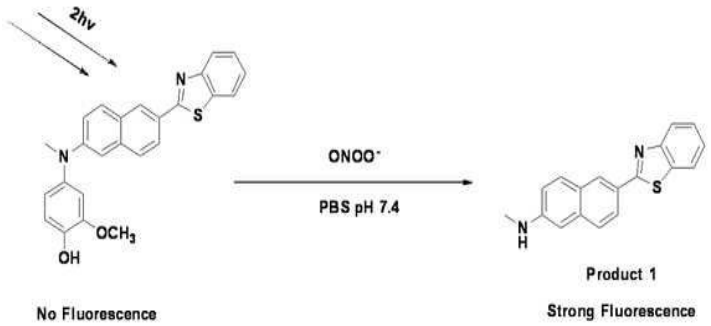


[0066]

[0067] 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물은 퍼옥시나이트라이트와 반응하여 N-디아릴레이션 반응에 의하여 형광을 발광하는 형광 화합물을 형성할 수 있다.

[0068] 예를 들어, 하기 스킴 1에 보여지는 바와 같이, 화학식 5의 화합물은 퍼옥시아니트라이트와 반응하여 형광을 발광하는 생성물 1을 형성한다. 따라서, 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물은 퍼옥시나이트라이트를 탐지하는 형광 프로브로 사용할 수 있다.

[0069] <스킴 1>



[0070]

[0071] 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 2광자 형광 프로브로 작용하므로 종래의 1광자 형광 프로브에 비하여 현저히 향상된 감도를 제공할 수 있다. 예를 들어, 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물은 PBS 버퍼의 120um 깊이에서 10GM 이상, 20GM 이상, 30GM 이상, 40GM 이상, 50GM 이상, 60GM 이상, 70GM 이상, 80GM 이상, 90GM 이상, 또는 100GM 이상의 이광자 단면 (two-photon cross section, Φδ)를 제공할 수 있다.

[0072] 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물은 물에 대한 용해도가 높으므로 수용액으로 제조할 수 있다. 예를 들어,

화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 포함하는 수용액에서 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물의 농도는 1mM 이상, 10mM 이상, 20mM 이상, 50mM 이상, 100mM 이상, 200mM 이상, 500mM 이상, 또는 1M 이상일 수 있다.

[0073] 다른 일구현예에 따른 형광 프로브 조성물은 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물; 및 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 포함한다.

[0074] 형광 프로브 조성물은 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 첨가하여, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한, 형광 프로브 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 형광 프로브 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 형광 프로브 조성물은 시료(sample)와 혼합되거나 생물(organism)에 주입될 수 있다.

[0075] 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 포함하는 프로브 조성물의 퍼옥시나이트라이트($ONOO^-$) 탐지 한도는 1×10^{-3} M 이상, 1×10^{-4} M 이상, 1×10^{-5} M 이상, 1×10^{-6} M 이상, 1×10^{-7} M 이상, 3.5×10^{-8} M(CDL = 3 Sb/ m) 이상일 수 있다.

[0076] 다른 일구현예에 따른 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법은 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물과 시료(sample)를 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및 형광 화합물의 형광 특성을 결정하는 단계;를 포함한다. 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물이 퍼옥시나이트라이트를 포함하는 시료와 접촉하면, 형광 화합물을 형성한다. 미지의 시료와 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 접촉시킨 후, 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료로부터 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 용이하게 결정할 수 있다. 형광 화합물의 형광 특성은 통상적인 형광 측정 기기를 사용하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0077] 퍼옥시나이트라이트 탐지 방법에 사용되는 시료는 화학적 시료, 또는 생물학적 시료일 수 있다. 생물학적 시료는 미생물(microorganism), 세포(cell), 및 조직(tissue) 중에서 선택된 하나 이상을 포함하는 시료일 수 있으나, 반드시 이들로 한정되지 않으며 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0078] 다른 일구현예에 따른 목적 화합물 탐지방법은 화학식 1 내지 9으로 표시되는 화합물과 목적(target) 화합물을 접촉시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료에서 목적 화합물의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함한다. 미지의 시료와 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 접촉시킨 후, 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 시료로부터 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)를 포함하거나 생성하는 목적 화합물의 존재 및 함량 중 하나 이상을 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들어, 퍼옥시나이트라이트가 초과산화물 자유라디칼($^{\cdot}O_2^-$)과 산화 질소 자유라디칼(NO)의 반응 결과물이므로, 퍼옥시아니트라이트의 존재로서부터 시료가 초과산화물 자유라디칼($^{\cdot}O_2^-$) 및/또는 산화 질소 자율라디칼(NO)을 포함하는지 탐지할 수 있다. 또한, 퍼옥시나이트라이트를 발생시키거나 다른 분자와 반응하여 퍼옥시나이트라이트를 생성하는 전구체를 발생시키는 목적 화합물의 존재 및 농도를 탐지할 수 있다. 이러한 목적 화합물은 다양한 질병과 관련되므로, 결과적으로 다양한 질병의 존재 여부를 조기에 탐지할 수 있다.

[0079] 다른 일구현예에 따른 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite) 탐지 방법은 생물(organism)에 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 주입시켜 하나 이상의 형광 화합물을 형성하는 단계; 및 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 생물 체내(in vivo in an organism)에서의 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 결정하는 단계;를 포함한다. 생물, 예를 들어, 사람, 실험용 쥐 등에 화학식 1 내지 9로 표시되는 화합물을 주사기 등을 사용하여 주입한 후, 형광 화합물의 형광 특성을 결정하여 생물 체내(in vivo in an organism)에서 퍼옥시나이트라이트(peroxynitrite)의 존재 및 함량 중 하나 이상을 용이하게 결정할 수 있다. 따라서, 다양한 질병의 진단 방법으로서 사용할 수 있다.

[0080] 본 명세서에서, 치환기는 치환되지 않는 모그룹(mother group)에서 하나 이상의 수소가 다른 원자나 작용기를 교환됨에 의하여 유도된다. 다르게 기재하지 않으면, 어떠한 작용기가 "치환된"것으로 여겨질 때, 그것은 상기 작용기가 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 2 내지 40의 알케닐기, 탄소수 2 내지 40의 알키닐기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알킬기, 탄소수 3 내지 40의 시클로알케닐기, 탄소수 7 내지 40의 아릴기에서 선택된 하나 이상의 치환기로 치환됨을 의미한다. 작용기가 "선택적으로 치환된다"고 기재되는 경우에, 상기 작용기가 상술한 치환기로 치환될 수 있다는 것을 의미한다.

[0081] 본 명세서에서, "탄소수 a 내지 b"의 a 및 b는 특정 작용기(group)의 탄소수를 의미한다. 즉, 상기 작용기는 a부터 b까지의 탄소원자를 포함할 수 있다. 예를 들어, "탄소수 1 내지 4의 알킬기"는 1 내지 4의 탄소를 가지는 알킬기, 즉, CH_3-, CH_3CH_2-, $CH_3CH_2CH_2$-, $(CH_3)_2CH$-, $CH_3CH_2CH_2CH_2$-, $CH_3CH_2CH(CH_3)$- and $(CH_3)_3C$-를 의미한다.

[0082] 특정 라디칼에 대한 명명법은 문맥에 따라 모노라디칼(mon-radical) 또는 디라디칼(di-radical)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 치환기가 나머지 분자에 대하여 두개의 연결지점을 요구하면, 상기 치환기는 디라디칼로 이해되어야 한다. 예를 들어, 2개의 연결지점을 요구하는 알킬기로 특정된 치환기는 $-CH_2-$, $-CH_2CH_2-$, $-CH_2CH(CH_3)CH_2-$, 등과 같은 디라디칼을 포함한다. "아킬렌"과 같은 다른 라디칼 명명법은 명확하게 상기 라디칼이 디라디칼임을 나타낸다.

[0083] 본 명세서에서, "알킬기" 또는 "알킬렌기"라는 용어는 분지된 또는 분지되지 않은 지방족 탄화수소기를 의미한다. 일 구현예에서 알킬기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 알킬기는 메틸기, 에틸기, 프로필기, 이소프로필기, 부틸기, 이소부틸기, tert-부틸기, 펜틸기, 헥실기, 시클로프로필기, 시클로펜틸기, 시클로헥실기, 시클로헵틸기 등을 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않으며, 이들 각각은 선택적으로 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서 알킬기는 1 내지 6의 탄소원자를 가질 수 있다. 예를 들어, 탄소수 1 내지 6의 알킬기는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소-부틸, sec-부틸, 펜틸, 3-펜틸, 헥실 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.

[0084] 본 명세서에서 "할로겐화알킬기"는 수소 중에서 하나 내지 전부가 할로겐으로 치환된 지방족 탄화수소기를 의미한다. 할로겐은 불소일 수 있다. 일구현예에서 할로겐화알킬기는 모노플루오로메틸기, 디플루오로메틸기, 트리플루오로메틸기, 테트라플루오로메틸기 등일 수 있으나 반드시 이들로 한정되지 않는다.

[0085] 본 명세서에서, "알케닐기"라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 이중결합을 포함하는 2 내지 20의 탄소원자를 포함하는 탄화수소기로서 에테닐기, 1-프로페닐기, 2-프로페닐기, 2-메틸-1-프로페닐기, 1-부테닐기, 2-부테닐기, 시클로프로페닐기, 시클로펜테닐기, 시클로헥세닐기, 시클로헵테닐기 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 알케닐기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 알케닐기는 2 내지 10의 탄소원자를 가질 수 있다.

[0086] 본 명세서에서, "알키닐기"라는 용어는 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중결합을 포함하는 2 내지 20의 탄소원자를 포함하는 탄화수소기로서 에티닐기, 1-프로피닐기, 1-부티닐기, 2-부티닐기 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일 구현예에서, 알키닐기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다. 일 구현예에서, 알키닐기는 2 내지 10의 탄소원자를 가질 수 있다.

[0087] 본 명세서에서, "아랄킬기(aralkyl)"라는 용어는 탄소수 7 내지 20의 아랄킬기 등과 같이, 알킬렌기를 경유하여 치환기로서 연결된 아릴기를 의미하며, 벤질기, 2-페닐에틸기, 3-페닐프로필기, 나프틸알킬기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 일 구현에에서, 알킬렌기는 저급 알킬렌기(즉, 탄소수 1 내지 4의 알킬렌기)이다.

[0088] 본 명세서에서, "아릴기"라는 용어는 고리 골격이 오직 탄소만을 포함하는 방향족 고리, 고리 시스템(즉, 2개의 인접하는 탄소 원자들을 공유하는 2 이상의 융화된(fused) 고리), 또는 복수의 방향족 고리가 단일결합, -O-, -S-, -C(=O)-, $-S(=O)_2-$, -Si(Ra)(Rb)-(Ra 및 Rb는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 의미한다. 상기 아릴기가 고리 시스템이면, 상기 시스템에서 각각의 고리는 방향족이다. 예를 들어, 아릴기는 페닐기, 비페닐기, 나프틸기, 페날트레닐기(phenanthrenyl), 나프타세닐기(naphthacenyl) 등을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 상기 아릴기는 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

[0089] 본 명세서에서, "알크아릴기(alkaryl)"라는 용어는 탄소수 7 내지 20의 알킬아릴기 등과 같이, 아릴렌기를 경유하여 치환기로서 연결된 아릴기를 의미하며, 메틸페닐기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0090] 본 명세서에서 "헤테로사이클릴기"는 고리 골격에 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 비방향족 고리 또는 고리 시스템이다.

[0091] 본 명세서에서, "시클로알킬기"라는 용어는 완전히 포화된 카보사이클 고리 또는 고리시스템을 의미한다. 예를 들어, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실을 의미한다.

[0092] 본 명세서에서, "시클로알케닐기"는 하나 이상의 이중결합을 가지는 카보사이틀 고리 또는 고리시스템으로서, 방향족 고리가 없는 고리 시스템이다. 예를 들어, 시클로헥세닐기이다.

[0093] 본 명세서에서, "시클로알키닐기"는 하나 이상의 삼중결합을 가지는 카보사이클 고리 또는 고리시스템으로서, 방향족 고리가 없는 고리 시스템이다. 예를 들어, 시클로헥시닐기이다.

[0094] 본 명세서에서, "하이드록시알킬"는 하이드록시기를 가지는 알킬기이다. 예를 들어, 하이드록시메틸기이다.

[0095] 본 명세서에서, "아미노알킬기"는 수소 중의 하나가 아미노기로 치환된 알킬기를 의미한다. 예를 들어, 아미노메틸기이다.

[0096] 본 명세서에서, "아미노기"는 $-NH_2$이다.

[0097] 명세서에서, "알킬아미노기"는 수소 중 하나가 알킬기로 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 메틸아미노기이다.

[0098] 명세서에서, "아릴아미노기"는 수소 중 하나 이상이 아릴기로 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 페닐아미노기이다.

[0099] 명세서에서, "디알킬아미노기"는 모든 수소가 알킬기로 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 디메틸아미노기이다.

[0100] 명세서에서, "알킬아릴아미노기"는 모든 수소 알킬기와 아릴기로 각각 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 메틸페닐아미노기이다.

[0101] 명세서에서, "디아릴아미노기"는 모든 수소가 아릴기로 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 디페닐아미노기이다.

[0102] 명세서에서, "아실아미노기"는 하나의 수소가 아실기로 치환된 아미노기를 의미한다. 예를 들어, 아세틸아미노기이다.

[0103] 본 명세서에서, "티오알킬기(alkaryl)"라는 용어는 하나 이상의 수소가 티올기로 치환된 알킬기를 의미한다. 예를 들어, 티오메틸기이다.

[0104] 본 명세서에서, "알콕시기(alkoxy)"라는 용어는 산소를 경유하여 치환기로서 연결된 알킬기를 의미하며, 메톡시기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0105] 본 명세서에서, "알킬티오기(alkylthio)"라는 용어는 황을 경유하여 치환기로서 연결된 알킬기를 의미한다. 예를 들어, 메틸티오기이다.

[0106] 본 명세서에서, "알콕시알킬기(alkoxyalkyl)"라는 용어는 알킬렌기를 경유하여 치환기로서 연결된 알킬콕시기를 의미하며, 메톡시메틸기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0107] 본 명세서에서, "아릴옥시기(aryloxy)"라는 용어는 산소를 경유하여 치환기로서 연결된 아릴기를 의미하며, 페녹시기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0108] 본 명세서에서, "아릴알콕시기(arylalkoxy)"라는 용어는 하나의 수소가 아릴기로 치환된 알콕시기를 의미하며, 페닐메톡시기를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0109] 본 명세서에서 "아릴렌기"라는 용어는 2 이상의 연결지점을 요구하는 아릴기이다. 4가 아릴렌기는 4개의 연결지점을 요구하는 아릴기이며, 2가 아릴렌기는 2개의 연결지점을 요구하는 아릴기이다. 예를 들어, $-C_6H_5-O-C_6H_5-$ 등이다.

[0110] 본 명세서에서, "헤테로아릴기"라는 용어는 하나의 고리, 복수의 융화된 고리, 또는 복수의 고리가 단일결합, -O-, -S-, -C(=O)-, $-S(=O)_2-$, -Si(Ra)(Rb)-(Ra 및 Rb는 서로 독립적으로 탄소수 1 내지 10의 알킬기), 할로겐으로 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 10의 알킬렌기, 또는 -C(=O)-NH-에 의하여 서로 연결된 고리를 가지며, 하나 이상의 고리 원자가 탄소가 아닌, 즉 헤테로원자인, 방향족 고리 시스템을 의미한다. 융화된 고리 시스템에서, 하나 이상의 헤테로원자는 오직 하나의 고리에 존재할 수 있다. 융화된 고리 시스템에서, 하나 이상의 헤테로원자는 오직 하나의 고리에 존재할 수 있다. 예를 들어, 헤테로원자는 산소, 황 및 질소를 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않는다. 예를 들어, 헤테로아릴기는 퓨라닐기(furanyl), 티에닐기(thienyl), 이미다졸릴기(imidazolyl), 퀴나졸리닐기(quinazolinyl), 퀴놀리닐기(quinolinyl), 이소퀴놀리닐기(isoquinolinyl), 퀴녹살리닐기(quinoxalinyl), 피리디닐기(pyridinyl), 피롤릴기(pyrrolyl), 옥사졸릴기(oxazolyl), 인돌릴기

(indolyl), 등일 수 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0111] 본 명세서에서 "헤테로아릴렌기"라는 용어는 2 이상의 연결지점을 요구하는 헤테로아릴기이다. 4가 헤테로아릴렌기는 4개의 연결지점을 요구하는 헤테로아릴기이며, 2가 헤테로아릴렌기는 2개의 연결지점을 요구하는 헤테로아릴기이다.

[0112] 본 명세서에서 "할로겐"은 원소주기율표의 17족에서 속하는 안정한 원소로서 예를 들어, 불소, 염소, 브롬 또는 요오드이며, 특히 불소 및/또는 염소이다.

[0113] 이하의 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명이 더욱 상세하게 설명된다. 단, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로서 이들만으로 본 발명의 범위가 한정되는 것이 아니다.

[0114] (프로브의 합성)

[0115] 실시예 1: 화학식 4의 화합물(프로브)의 합성

[0116] 6-(benzo[d]thiazol-2-yl)naphthalen-2-yl trifluoromethanesulfonate (2)의 합성:

[0117] 하기 반응식 1의 화합물 1 (4 mmol, 1.11 g) 과 피리딘 (6 mmol, 0.48 g) 이 무수 CH_2Cl_2에 용해되어 혼합물이 준비되었다. 혼합물이 질소(N_2) 보호 하에 -78°C까지 냉각되었다. 트리플루오로메탄술폰산 무수물 (Trifluoromethanesulfonic anhydride, 6 mmol, 1.72 g)이 상기 혼합물에 천천히 첨가되었다. 첨가 후에, 상기 혼합물이 상온으로 가온되고 밤새도록 교반되었다. 이어서, 혼합물이 구연산과 물로 세척되고, CH_2Cl_2으로 추출된 후, 무수 $MgSO_4$ 하에서 건조되었다. 잔류물이 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제되어 1.1g의 흰색 고체의 화합물 2가 얻어졌다. 수율은 67%이었다.

[0118] ^{1}H NMR (300 MHZ, $CDCl_3$): 8.62 (S, 1H), 8.34 (dd, $J_1 = J_2 = 1.8$ Hz, 1H), 8.16-8.13 (m, 4H), 7.81 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 7.58-7.55 (m, 1H), 7.53-7.42 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHZ, $CDCl_3$): 166.99, 154.16, 148.02, 135.16, 134.51, 132.41, 132.19, 131.51, 128.94, 127.19, 126.62, 126.22, 125.62, 123.45, 121.74, 120.68, 119.34. EI-MS: calcd for m/z: 409.00, found: 409.01.

[0119] 6-(benzo[d]thiazol-2-yl)-N-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)naphthalen-2-amine (3)의 합성:

[0120] 화합물 2 (1 mmol, 409 mg), 치환된 아닐린 (1.28 mmol, 254 mg), $Pd(OAc)_2$ (0.05 mmol, 25 mg), BINP (0.08 mmol, 49 mg) 및 세슘 카보네이트 (1.4 mmol, 455 mg) 가 무수 톨루엔에 용해되어 혼합물이 준비되었다. 혼합물이 밤새도록 리플럭스되었고, 이어서 용매가 감소된 압력 하에서 제거되었다. 잔류물이 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제되어 0.39g의 노란색 고체의 화합물 3이 얻어졌다. 수율은 89%이었다.

[0121] ^{1}H NMR (300 MHZ, $CDCl_3$): 8.39 (s, 1H), 8.08 (t, J = 6.9, 2H), 7.83 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.71 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.49-7.44 (m, 2H), 7.35-7.11 (m, 2H), 6.74 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 6.24-6.18 (m, 1H), 5.21 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.56 (s, 3H). EI-MS: calcd for m/z: 442.13, found 442.14.

[0122] 6-(benzo[d]thiazol-2-yl)-N-(3-methoxy-4-(methoxymethoxy)phenyl)-N-methylnaphthalen-2-amine (4)의 합성:

[0123] 화합물 3 (0.9 mmol, 0.4 g) 및 60 % NaH (1 mmol, 40 mg) 가 무수 THF에 용해되어 혼합물이 준비되고, CH_3I (2 mmol, 0.28 g) 가 혼합물에 천천히 첨가되고, TLC에 의하여 반응이 관찰되었다. 반응 완료 후에, 고체가 여과되고 소량의 THF로 세척되었다. 여과액(filtrate)이 감압하에서 제거되고, 잔류물이 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제되어 200mg의 노란색 고체의 화합물 4가 얻어졌다. 수율은 40%이었다.

[0124] ^{1}H NMR (300 MHZ, $CDCl_3$): 8.42 (s, 1H), 8.12-8.06 (m, 2H), 7.90 (t, J = 6.0 Hz, 1H), 7.72 (t, J = 9.0 Hz, 2H), 7.51-7.46 (m, 2H), 7.39-7.34 (m, 1H), 7,17 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.12-7.09 (m, 2H), 6.79 (s, 1H), 5.26 (s, 2H), 3.83 (s, 3H), 3.58 (s, 3H), 3.41 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHZ, $CDCl_3$): 168.69, 154.34, 150.66, 148.46, 143.96, 143.27, 136.40, 134.93, 129.38, 127.76, 127.38, 127.02, 126.24, 124.99, 124.85, 122.88, 121.56, 119.65, 117.91, 117.43, 109.94, 108.48, 95.81, 56.31, 55.99, 40.83. EI-MS:

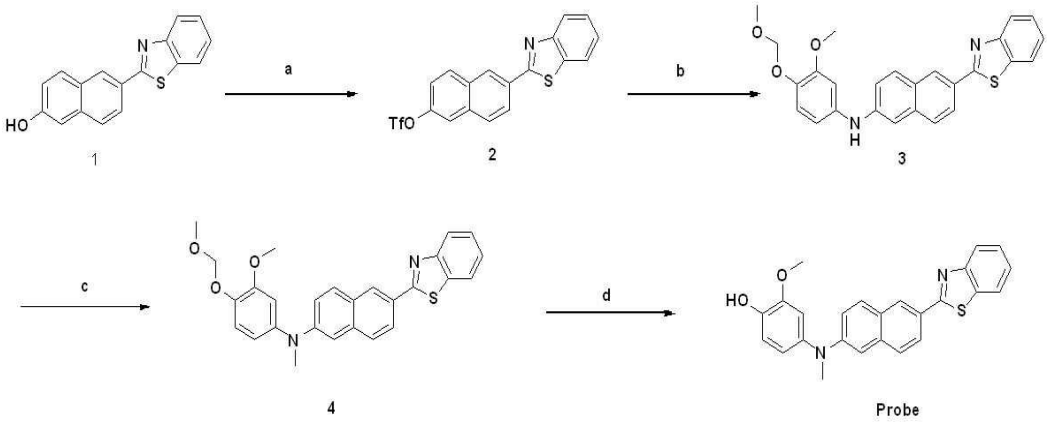
calcd for m/z: 456.15, found: 456.15

[0125] 4-((6-(benzo[d]thiazol-2-yl)naphthalen-2-yl)(methyl)amino)-2-methoxyphenol (프로브)의 합성:

[0126] 화합물 4 (0.33 mmol, 150 mg)가 얼음조(ice bath)에서 2 mL 무수 CH_2Cl_2 에 용해되어 혼합물이 준비되고, 여기에 2mL 트리플루오로아세트산이 천천히 첨가되었다. 반응 완료 후에, 용애가 감압하에서 제거되고, 잔류물이 실리카 컬럼 크로마토그래피로 정제되어 30mg의 노란색 고체의 최종 생성물(프로브)이 얻어졌다.

[0127] ^{1}H NMR (300 MHZ, $CDCl_3$): 8.41 (s, 1H), 8.10-8.06 (m, 2H), 7.91 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.71 (t, J = 9.0 Hz, 2H), 7.51-7.37 (m, 2H), 7.06-6.95 (m, 3H), 6.77 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 5.60 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.39 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHZ, $CDCl_3$) δ: 168.82, 154.14, 148.82, 147.20, 143.57, 140.95, 136.49, 134.80, 129.40, 127.47, 126.94, 126.88, 126.28, 124.97, 124.86, 122.80, 121.55, 119.46, 119.12, 115.06, 109.54, 107.44, 56.04, 40.92. EI-MS: calcd for m/z: 412.12, found 412.12. FAB-MS: calcd for [M+H$^+$]: 413.1324, found: 413.1321.

[0128] <반응식 1>



[0129]

[0130] 시약 및 조건: (a) Tf_2O, 피리딘, -78 ^{0}C, CH_2Cl_2; (b) 치환된 방향족 아민, Pd $(OAc)_2$, Cs_2CO_3, BINP, 톨루엔, 리플럭스; (c) CH_3I, NaH, DMF, 상온(room temperature); (d) TFA, CH_2Cl_2, 상온

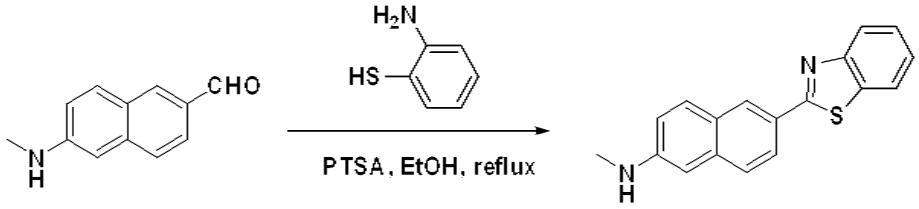
[0131] 참고예 1: 생성물 1의 합성

[0132] 생성물 1 (6-(benzo[d]thiazol-2-yl)-N-methylnaphthalen-2-amine)의 합성:

[0133] 하기 반응식 2의 화합물 5 (1.57 mmol, 290 mg) 와 2-아미노벤젠티올 (1.57 mmol, 196 mg) 이 무수 EtOH에 용해되어 혼합물이 준비되고, 상기 혼합물에 PTSA (0.3 mmol, 54 mg) 가 첨가되었다. 상기 반응이 밤새도록 리플럭스되어 고체가 형성되었다. 형성된 고체가 여과되고 차가운 에탄올로 세척되어 0.29g의 노란색 고체의 생성물 1이 얻어졌다. 수율은 63%이었다.

[0134] ^{1}H NMR (300 MHZ, DMSO-d_6): 8.40 (s, 1H), 8.12 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 8.01-7.98 (m, 2H), 7.83 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.72 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 7.50-7.40 (m, 2H), 7.04 (dd, J_1 = J_2 = 3.0 Hz, 1H), 6.72 (s, 1H), 6.41 (d, J = 6.0 Hz, 1H), 2.81 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHZ, DMSO-d_6): 168.49, 154.27, 149.89, 137.47, 134.65, 130.07, 127.81, 126.96, 126.67, 126.16, 125.70, 124.65, 122.82, 122.64, 119.56, 29.96.

[0135] <반응식 2>



5 Product 1

[0136]

[0137] 평가예 1: 프로브의 퍼옥시나이트라이트 형광 응답 분석

[0138] (재료와 화학물질)

[0139] 달리 언급되지 않으면, 무수 DMF, 디클로로메탄(DCM), 트리에틸아민(Et3N)와 같은 모든 출발물질과 시약들은, 상업적으로 입수하였다. 1H와 13C NMR 스펙트럼들은 내부 표준(internal standard)로서 테트라메틸실란(tetramethylsilane, TM)을 사용한 Bruker AM-300 분광계를 이용하여 CDCl3와 DMSO-d6 용액에서 수집되었다. 질량(Mass) 스펙트럼들은 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI) 또는 메트릭스-보조 레이저 탈착 / 이온화(matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI) 모드에서 측정되었다. UV/Vis 스펙트럼은 25℃에서 Scinco 3000 분광 광도계 (1cm 석영 셀)을 사용하며 얻어졌다. 형광 스펙트럼은 25℃에서 RF-5301/PC(Shimada) 형광 분광 광도계 (1cm 석영 셀)에 기록되었다. 탈이온수는 모든 수용액을 준비하기 위하여 사용되었다. 1H와 13C NMR 스펙트럼 데이터는 Varian Inova 300 MHz 분광계에 내부 표준으로서 Me_4Si을 포함하는 CDCl3 또는 DMSO-d6 용액에서 기록되었다. 13C NMR 스펙트럼들은 Bruker Avance III 300 (75 MHz) 분광계에서 취득되었다. 저해상도(low-resolution) LC/ MS 데이타는 역상(reversed-phase) C18 컬럼(Phenomenex Luna, 4.6 mm × 100 mm, 5 μm)을 사용하는 Hewlett-Packard series 1100 에서 수집되었다.

[0140] (세포 배양)

[0141] RAW 264.7세포(ATCC, Manassas, VA, USA)는 10 % FBS(WelGene)와 페니실린(100 units/ml)이 보충된 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Media, WelGene Inc, Seoul,Korea)에서 배양되었다. 세포는 화상 촬영 전에 2일 동안 유리바닥(glassbottomed) 접시(NEST)에 통과(passed)되고 평판배양(plated)되었다. 모든 세포는 37℃에서 5/95 (v/v)의 CO_2/공기의 함습 분위기(humidified atmosphere)에서 유지되었다. 라벨링을 위해 성장 배지(growth medium)는 제거되고 장액(serum)이 없는 DMEM로 교환되었다. 세포들은 37℃의 5% CO_2 하에서 20분 동안 5μM의 프로브로 처리되고 배양되었다.

[0142] (다양한 ROS 용액 준비)

[0143] 과산화수소(H_2O_2), 차아염소산염(ClO^-) 및 tert-부틸 하이드로퍼옥사이드(TBHP)는 각각 상업적 수용액으로부터 전달되었다. 초과산화물($-O_{2-}$) 용액은 건조된 디메틸술폭시드에 KO_2을 첨가하고 10 분간 격렬하게 교반하여 준비되었다. ROO-는 2,2'-아조비스(2-아미디노프로판)디하이드로클로라이드로부터 생성되었다. 하이드록실 라디칼(-OH)은 Fenton 반응에 의하여 생성되었다. 산화질소(Nitric oxide, NO)는 SNP (sodium nitroferricyanide (III) dihydrate)에 의하여 준비된 스톡(stock) 용액으로부터 사용되었다. 퍼옥시나이트라이트(Peroxynitrite, ONOO-) 용액은 문헌에 보고된대로 합성되었다. 간단히, 아질산나트륨(sodium nitrite, 0.6 M)과 과산화수소(H_2O_2, 0.7 M)의 혼합물이 염산(HCl, 0.6 M)으로 산성화되고, 수산화나트륨(NaOH, 1.5M)이 1-2초 내에 첨가되어 상기 용액을 염기성으로 만들었다. 퍼옥시나이트라이트 농도는 302nm에서 1670 $M^{-1}cm^{-1}$의 소멸 계수(extinction coefficient)를 사용하여 평가하였다.

[0144] (신선한 쥐(rat) 해마 절편의 준비와 착색)

[0145] 승인된 기관들의 리뷰 위원회 규정에 의하면 쥐 해마 절편(rat hippocampal slices)들은 2주된 쥐(SD)의 해마로부터 준비된다. 두정(coronal) 절편은 인공 뇌척수액(ACSF; 138.6 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 21 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4, 9.9 mM D-glucose, 1 mM $CaCl_2$, 및 3 mM $MgCl_2$)에서 진동-블레이드 마이트로톰(vibrating-blade microtome)을 사용하여 400μm-두께로 절단되었다. 절편들은 37℃에서 1시간 20분동안 95% O_2와 5% CO_2로 버블

링되는 ACSF에서 20μM 프로브로 배양되었다. 절편들은 이어서 ACSF로 3회 세척되고 유리바닥 접시(NEST)에 옮겨지고 분광 공초점 다중광자 현미경(spectral confocal multiphoton microscope)으로 관찰되었다.

[0146] (2-광자(two-photon) 형광 마이크로스코피)

[0147] 프로브-라벨된 세포와 조직의 2광자 형광 마이크로스코피 이미지가, 각각 ×10 건조 및 ×100 오일 피사체(objectives), 개구수(NA) = 0.30 및 1.30을 가지는 분광 공초점 및 다중광자 현미경 (Leica TCS SP8 MP)으로 얻어졌다. 2-광자 형광 마이크로스코피 이미지는 파장 750 nm와 출력에서 잠김 모드(mode-locked) 티타늄-사파이어(titanium-sapphire) 레이저 광원(Mai Tai HP; Spectra Physics, 80 MHz pulse frequency, 100 fs 펄스 진폭)(파장 750nm 및 출력 3110mW로 설정되며, 이것은 근사적으로 초점면(focal plane)에서 15mW의 평균 파워에 해당됨)으로 프로브를 여기시켜 DMI6000B 현미경 (Leica)으로 얻어졌다. 400내지 650 nm 범위에서 이미지를 얻기 위하여, 내부 PMT는 각각 400 Hz 및 200Hz 스캔 속도에서 8비트의 부호없는(unsigned) 512 × 512 및 1024 × 1024 화소를 수집하기 위하여 사용되었다.

[0148] (2-광자 단면(cross section)의 측정)

[0149] Makarov (Optics Express, Vol. 16, Issue 6, pp. 4029-4047, 2008)에 개시된 바와 같은 펨토 초(femto second) 형광 측정 기법을 사용하여 2-광자 단면(δ)이 결정되었다. 프로브(1.0×10^{-6} M)는 PBS 버퍼(10mM, 1 % DMF 포함, pH = 7.4)에 용해되었고, 2-광자 유도 형광 스펙트럼의 강도가 레퍼런스로서 로다민(rhodamine) 6G를 사용하여 720-880nm에서 측정되었고, 2-광자 특성은 상기 문헌에 잘 특정되어있다. 동일한 여기 파장에서 방출된 레퍼런스와 시료의 2-광자 유도 형광 스펙트럼의 강도들이 결정되었다. TPA 단면이 하기 수학식을 사용하여 계산되었다: $\delta = \delta_r(S_s\Phi_r f_r c_r)/(S_r\Phi_s f_s c_s)$. 아래첨자 s 및 r은 시료와 레퍼런스 분자를 각각 나타낸다. CCD 탐지기에 의하여 수집된 신호의 강도가 S로서 표시된다. Φ는 형광 양자 수율이다. f는 실험용 장치의 전체 형광 수집 효율이다. 용액에서 분자의 수 밀도(number sensity)는 c로서 표시된다. δ_r는 레퍼런스 분자의 TPA 단면이다.

[0150] (퍼옥시나이트라이트에 프로브의 형광 응답)

[0151] 프로브를 얻은 후에, PBS 용액(1 % DMF함유)에 대한 프로브(1μM)의 광 물리적 성질들을 평가하였다. 프로브는 여기 파장(excitation wavelength)으로 선택된 370nm의 피크에서 명백한 흡수를 나타내고, 매우 약한 형광 강도(f=0.007)를 보여주었다. 10 당량의 $ONOO^-$의 첨가 후에, 페놀기는 $ONOO^-$에 의해 N-C 결합 절단을 수반하며, 벤조퀴논으로 산화되었고(상세한 설명의 스킴 1 참조), 방출된 생성물 1은 강한 형광 강도(f=0.1)를 나타내었다. 이에 반해, OCl^-(차아염소산염), H_2O_2(과산화수소), $\cdot O_2^-$(슈퍼옥사이드 라디칼), NO(산화질소), ·OH(하이드로실 라디칼), ROO·(지질 퍼옥시 라디칼) 및 tBu-OOH(tert-부틸 하이드록시퍼옥사이드)를 포함하는 다른 ROS들은, 형광(도 1a와 1b)에 있어서 어떠한 향상도 야기하지 않았다. 많은 형광체(fluorophores)와 인식 부위(recognition site)가 $ONOO^-$외에 다른 ROS에 대하여 망가지기 쉽기 때문에, 다른 ROS와 동시에 존재하는 경우에, 상기 프로브가 $ONOO^-$ 탐지에 적절한지 추가적으로 평가하였다. 도 1c에 보여진 바와 같이, 프로브는 다른 ROS와 탁월한 상용성을 가지며, 이러한 프로브가 체내(endogenous) $ONOO^-$을 탐지하고 이미지화하는데 적용될 수 있다. pH의 영향은 형광 프로브의 안전성을 평가하는 중요한 펙터로 간주될 수 있다. 4 당량의 $ONOO^-$첨가 후에, pH 4~10에서 매우 안정하며, 형광 강도가 pH에 따라 증가였고, 프로브의 탐지 한도가 3.5×10^{-8} M(CDL = 3 Sb/ m)로 결정되었다. 또한, 프로브와 $ONOO^-$의 반응은 수용액에서 매우 빠른 속도를 나타내며, 4 당량의 $ONOO^-$ 첨가 후에서 1분 내에 시간 의존 곡선이 플랫폼(flatform)에 도달할 수 있으며, 프로브 자체는 매우 안정하며, 파장 370nm의 레이저의 연속적인 여기 하에서 명백한 변화를 보여주지 않았다.

[0152] (감지 메커니즘(sensing mechanism))

[0153] 감지 메카니즘은 LC-질량 분석(mass)을 통하여 확인되었고, 질량 분석은 291에서의 새로운 피크를 보여주고, 이것은 스킴 1에 도시된 생성물 1의 분자량과 부합하였다. 또한, 참고예 1에 개시된 바와 같이 합성 방법을 통하여 생성물 1을 수득하였고, NMR와 LC-질량 분석을 통하여 확인하였다. 생성물 1에 대한 UV 흡수 및 형광 발광 파장은 이전의 용액상 데이터와 거의 중첩되어, 요구되는 생성물의 형성을 확인하였다.

[0154] 평가예 2: 프로브의 1-광자 세포 이미징

[0155] (1-광자 세포 이미징)

[0156] 프로브는 체내(endogenous) $ONOO^-$ 이미징을 위하여 RAW 264.7 세포(생쥐 대식세포(mouse macrophase cell))를 사용하여 수행되었다. 세포는 500 ng/ml LPS(Lipopolysaccharide) 및 50 ng/ml IFN -γ(interferon-gamma)으로 4시간 배양하고, DPBS로 세척하고, 5 μM 프로브로 20분동안 착색되었다. 프로브는, 세포에 어떠한 처리도 없는 대조군(도 2의 a)에 비하여 명백하고, 강해진 형광 강도(도 2의 b)를 나타내었다. 세포에서 니트릭 옥사이드(nitric oxide)에 의하여 $ONOO^-$이 생성되므로, 만일 세포에서 니트릭 옥사이드의 생성이 차단된다면, $ONOO^-$ 이미징은 소멸되어야 한다. 니트릭 옥사이드 합성효소 차단제(nitric oxide synthase inhibitor)인 아미노구아니딘(aminoguanidine)은 형광을 소멸시키기 위하여 사용되었다. 예상된 바와 같이 도 2의 c와 도 2의 d에서, 아미노구아니딘과 에베셀렌(ebselen)의 전처리 후에, 형광 강도가 효과적으로 소멸되었고, 이것은 프로브가 체내 $ONOO^-$ 탐지에서 우수한 성능를 달성할 수 있음을 보여준다. 또한, HeLa 세포를 사용하는 표준 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT) 검정(assay)은 서로 다른 프로브 농도로 수행되었다. 검정 결과는, 10 μMvmfhqmfh 24시간 배양한 후에도, 90%의 HeLa 세포가 생존하여, 프로브가 살아있는 세포에 낮은 세포독성을 야기함을 확인하였다.

[0157] 평가예 3: 프로브의 2-광자 세포 이미징

[0158] (2-광자 세포 이미징)

[0159] 프로브의, 1-광자 마이크로스코피로 살아있는 세포에서 체내 $ONOO^-$의 성공적인 발견을 참고하여, 2-광자 모드에서의 유용성도 평가하였다.

[0160] 먼저, 로다민(rhodamine)-6G을 레퍼런스로 사용하여, 프로브와 반응 생성물 1(스킴 1)의 2-광자 작용(action) 단면($\Phi\delta_{max}$)(도 3)을 측정하였다. 1-광자 모드에서 관찰한 바와 같이, PBS 버퍼(1 % DMF함유)에서의 프로브의 $\Phi\delta_{max}$ 값은 무시할 수준이었으나, $ONOO^-$와 함께하는 프로브의 $\Phi\delta_{max}$ 값은 동일한 조건 하에서 740 nm에서 약 100 GM이었다. 이러한 결과는 $ONOO^-$와의 반응에서 2-광자 프로세스에서 민감한 활성(turn-on) 응답을 제시한다.

[0161] 또한, 프로브 라벨된 RAW 264.7세포의 2-광자 마이크로스코피 이미지는 약한 강도(도 4의 a)를 보여주었다. 그러나, 상기 강도는 500 ng/ml LPS 와 50 ng/ml IFN -γ로 전처리하여 극적으로 증가하였다(도 4의 b와 도 4의 f).

[0162] 유사한 결과가 잘 정립된 퍼옥시나이트라이트 공여자(donor)인, 3-몰포리노시드노민(3-morpholinosydnonimine, SIN-1)(도 5의 c)에 의하여 얻어졌다. 상기 강도는 아미노구아니딘(aminoguanidine)과 엡셀렌(ebselen)의 전처리에 의하여 바닥 수준까지 감소하였다(도 4의 d 및 도 4의 e).

[0163] 평가예 4: 프로브의 조직 이미징

[0164] (조직(tissue) 이미징)

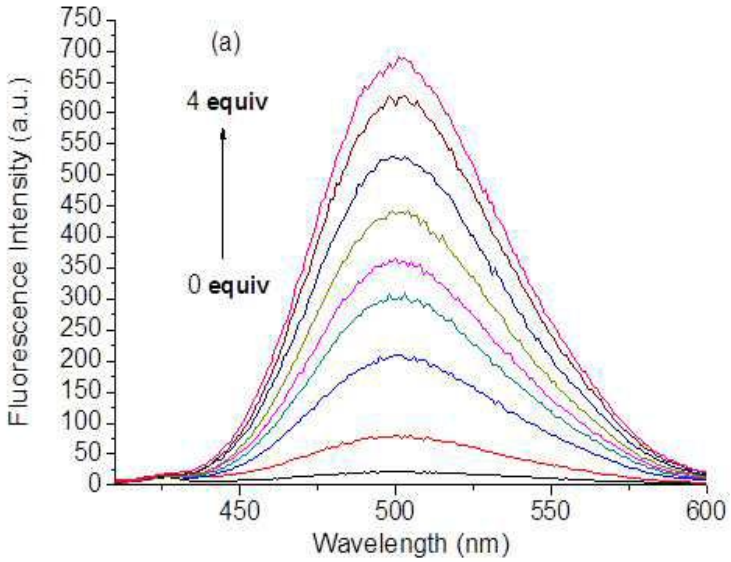
[0165] 프로브가 살아있는 조직(tissue)(도 5)에서 $ONOO^-$를 탐지하는데 사용할 수 있는지를 확인하기 위하여 실험하였다.

[0166] 2일된(2-day-old) 쥐(rat)로부터 해마(hippocampus)를 분리하고, 절편이 즉시 37 ℃에서 1시간동안 10μM의 프로브로 배양하였다. CA1와 CA3 지역(도 5)에서 전체적인 퍼옥시나이트라이트의 분포를 시각화하기 위하여 약 90-180 μm의 깊이에서 TPM 이미지를 얻었다. 세포에서 관찰된 것처럼, 조직 이미지는 매우 약한 형광(5의 a 및 도 5의 e)을 보여주었다. 그러나, 밝은 신호가 포르볼미리스테이트 아세테이트(phorbolmyristate acetate, PMA)으로 전처리에 의하여 얻어졌다(도 5의 b 및 도 5의 c). 포르볼미리스테이트 아세테이트(phorbolmyristate acetate, PMA)는 H_2O_2의 생산을 야기하고, 이어서 미엘로퍼옥시다제(myeloperoxidase, MPO)와 SIN-1에 의해 $ONOO^-$로 변형되었다. 엡셀렌(ebselen)으로 40분 동안 전치라된 경우에, 감소된 신호(도 5의 d)를 보여주었다. 또한, 더 높은 해상도에서 살아있는 조직의 세포 수준에서 $ONOO^-$를 성공적으로 관찰하였다(도 5의 e 및 도 5의

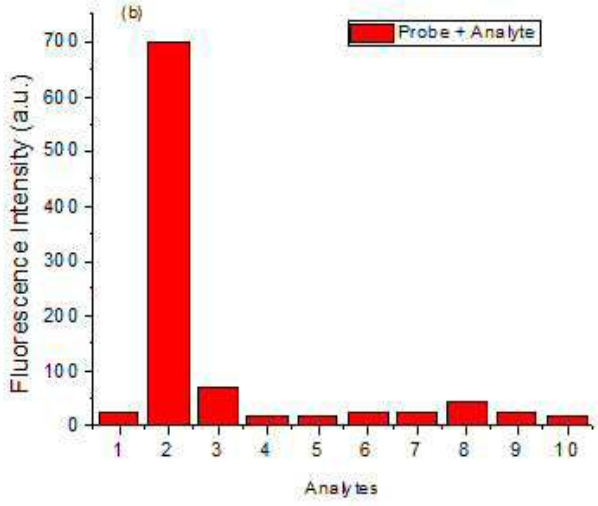
h). 이러한 결과는 프로브가 TPM을 사용하여 $ONOO^-$를 관찰할 수 있음을 보여준다.

도면

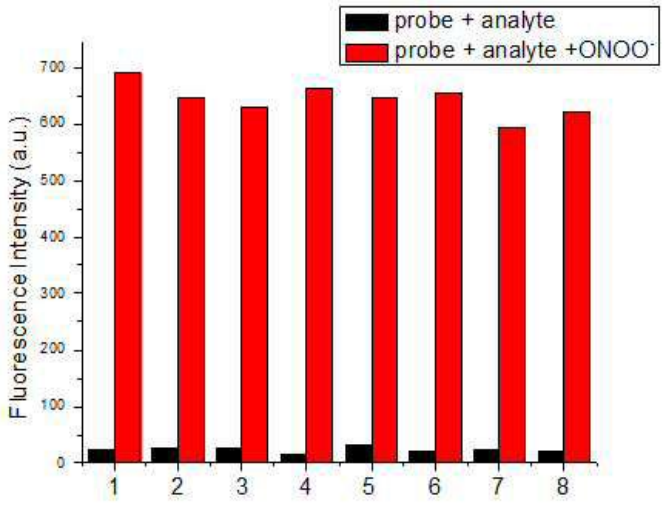
도면1a



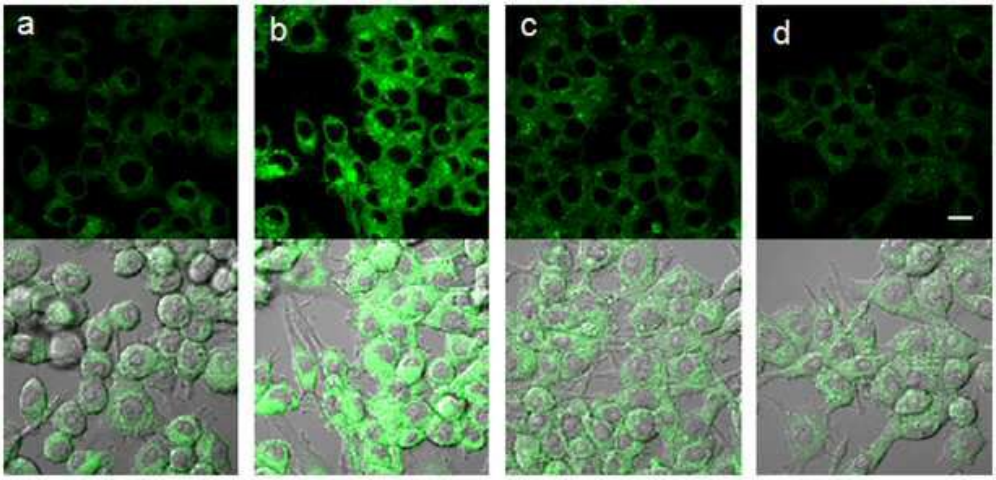
도면1b



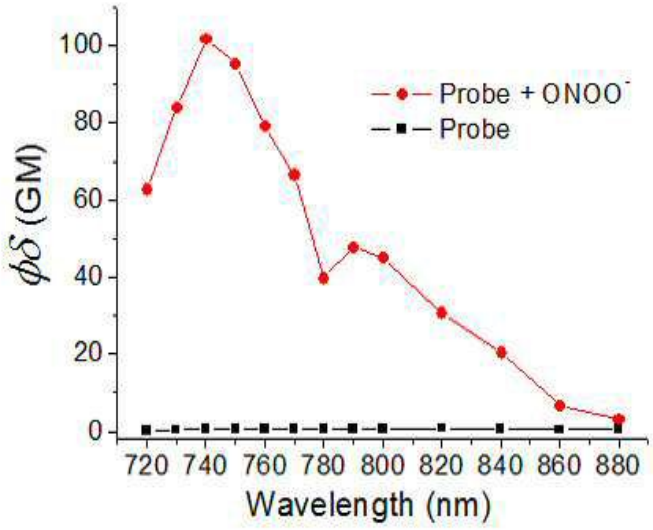
도면1c


probe + analyte
probe + analyte +ONOO-
Fluorescence Intensity (a.u.)
0
100
200
300
400
500
600
700
1
2
3
4
5
6
7
8

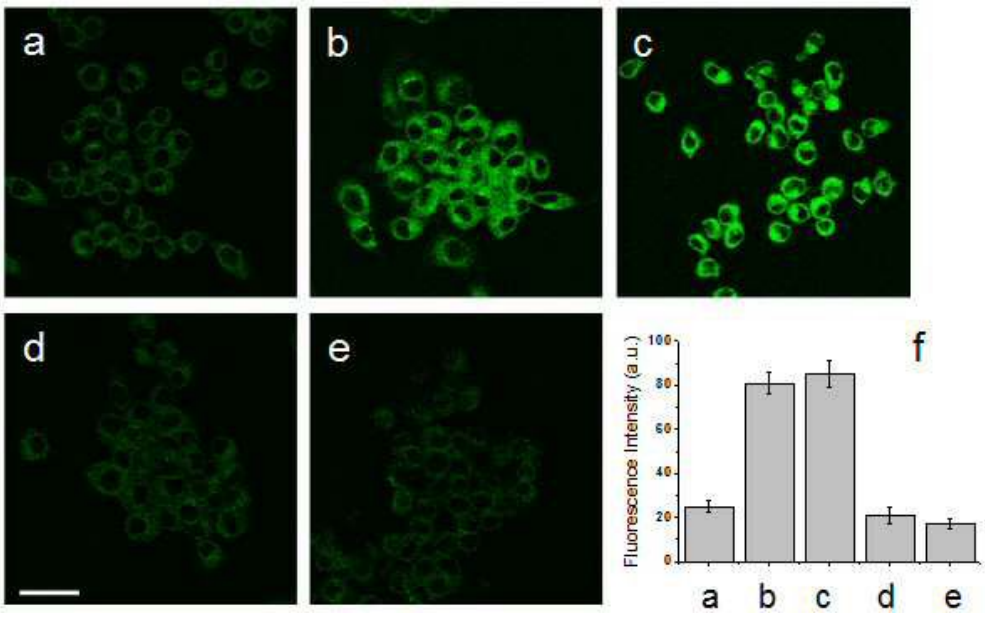
도면2


a
b
c
d

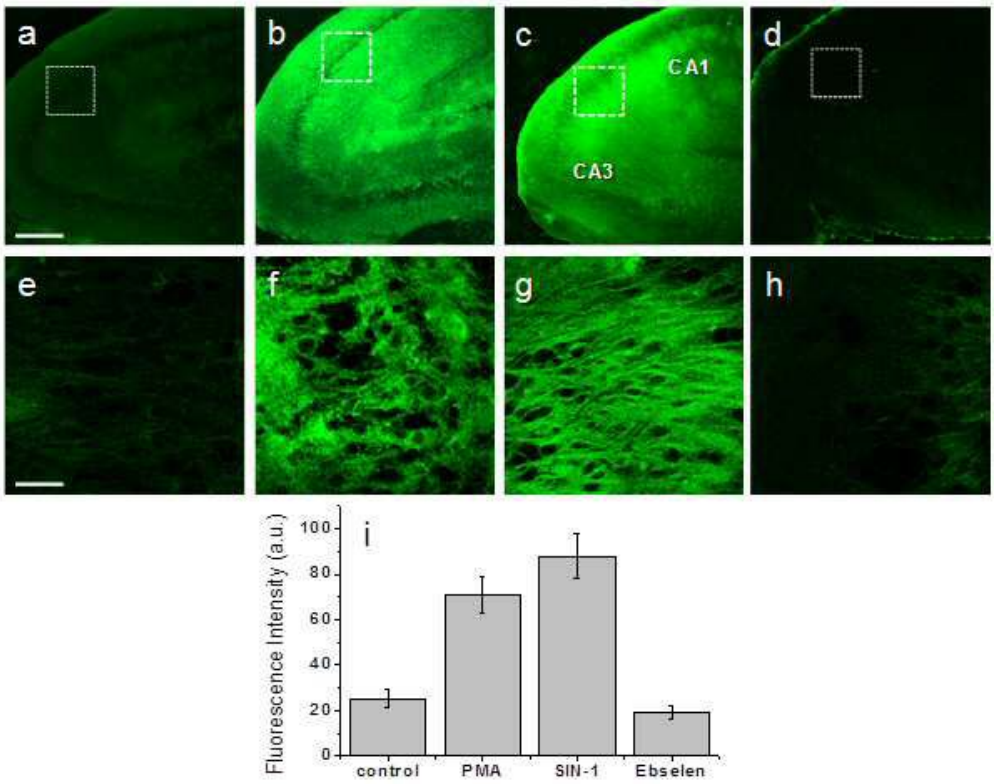
도면3


100
80
60
40
20
0
$\phi\delta$ (GM)
720 740 760 780 800 820 840 860 880
Wavelength (nm)
Probe + ONOO⁻
Probe

도면4


a
b
c
d
e
f
Fluorescence Intensity (a.u.)
100
80
60
40
20
0
a b c d e

도면5


a
b
c
CA1
CA3
d
e
f
g
h
i
Fluorescence Intensity (a.u.)
100
80
60
40
20
0
control
PMA
SIN-1
Ebselen