(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009222
(43) 공개일자 2025년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/58 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 2800/347 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0089244
(22) 출원일자 2023년07월10일
심사청구일자 2023년07월10일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호
민상일
서울특별시 강남구 일원로 127, 107동 102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

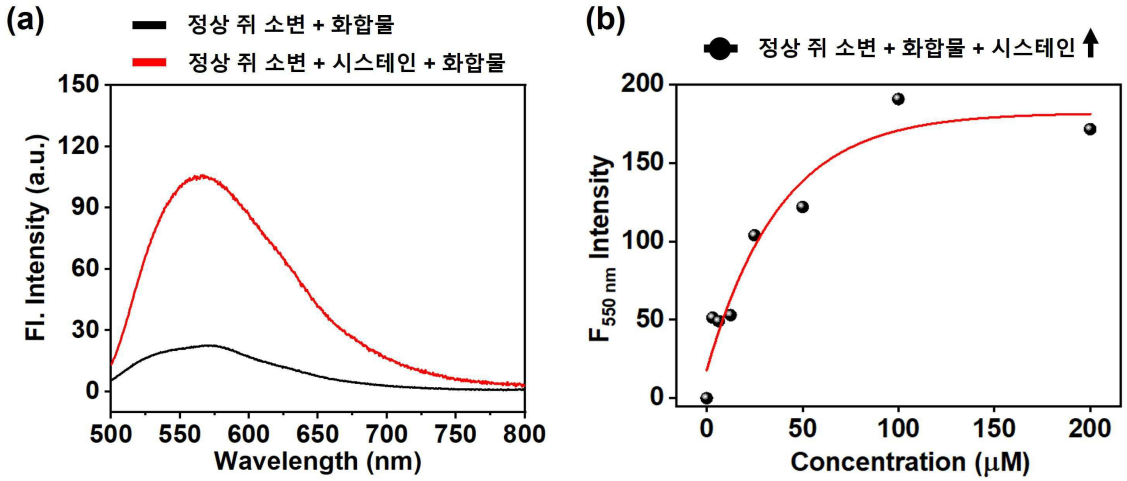
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **시스테인 감응 형광 프로브를 이용한 허혈재관류 후 급성 신장 손상 확인 및 이의 응용**

(57) 요 약

본 발명은 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로펜옥시(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다이아졸(oxadiazole) 구조를 포함하는 시스테인 감지를 위한 형광 프로브 화합물, 이를 포함하는 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단용 조성물 및 이를 이용한 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 화합물은 쉽고 간편하게 합성될 수 있으며, 뇌사자로부터의 장기이식 후 일어날 수 있는 이식신 기능 지연 환자의 소변 및 신장에서 강한 형광 값을 나타낼 수 있으므로, 세포, 동물 및 인간유래 시료, 특히, 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인 검출을 통한 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 발병 진단 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

안종민

서울특별시 성북구 아리랑로5길 50-8, 101동 1102호

우혜영

서울특별시 성북구 길음로 33, 815동 504호

박민영

서울특별시 종로구 대학로5길 15-6, 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711158125
과제번호	2021M3A9I5030523
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	형광 이미징 기반 비파괴 방식의 화상병 진단 기술개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465036238
과제번호	HI21C0239020022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	질병중심 중개연구사업
연구과제명	신경교종 특이적 대사체의 실시간 시각화 형광 탐침자개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711171698
과제번호	2022R1F1A1069954
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	단일-벤젠 기반 형광체 라이브러리 구축 및 이의 광물리적/생물학적특성 규명
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345352778
과제번호	2018R1A6A1A03025124
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	대학중점연구소지원사업
연구과제명	활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
기 여 율	1/4
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

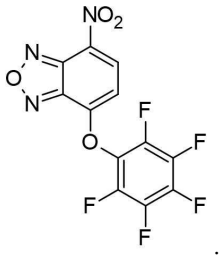
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kindy injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것인, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것인, 조성물.

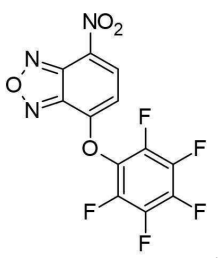
청구항 6

제1항에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것인, 조성물.

청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:

[화학식 1]



.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kindy injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것인, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 허혈 재관류 손상에 의한 것인, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 화합물이 처리되기 전의 시료보다 처리 후의 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하가 발병된 것으로 판정할 수 있는 것인, 방법.

청구항 11

제7항에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 시료는 소변 또는 신장조직인 것인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 시스테인 감응 형광 프로브 화합물을 포함하는 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단용 조성물 및 이를 이용한 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 말기 장기부전증 환자의 이상적 치료방법 중 하나는 장기이식이다. 장기이식의 공여자로는 주로 뇌사 상태의 환자이다. 일반적으로 뇌사 상태 환자의 건강한 신장을 수여자에게로 이식하는 동안 건강한 신장은 허혈-재관류에 노출되게 된다. 허혈이란, 혈관의 막힘 그리고 좁아짐과 같은 현상으로 인해 조직이 손상을 입는 과정이다. 뇌사 상태의 환자로부터 수여자에게 장기이식을 진행할 때에 위의 과정은 피할 수 없는 과정이며, 허혈로 인한 손상을 최소화하기 위해서 신속한 재관류는 현재의 필수적인 처치법이다. 하지만, 신속한 재관류를 진행하더라도 많은 이식환자들은 이식 후 급성신손상(Acute kindy injury, AKI) 및 이식신 기능저하(Delayed graft function, DGF)를 겪게 되고, 이로 인한 좋지 않은 예후를 보이게 된다. 이를 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, I/R injury)라고 하며 허혈-재관류 과정에서의 혈관내피세포 기능저하 및 신장조직의 손상에 의한 것이다. 주된 손상은 허혈 후 재관류 시 유입되는 혈액 속 산소로 인한 증가된 활성산소가 원인 일 수 있다. 활성산소란, 반응성 증가된 여러 종류의 산소로 과산화수소, 초과산화물, 하이드로퍼옥실, 그리고 히드록시라디칼 등이 존재한다. 활성산소는 주로 산소를 소비하는 호기성 생물계에서 생성되며, 암을 비롯한 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 활성산소에 저항하기 위해서 세포는 외부로부터 시스틴을 가져오면서 내부에서 효소반응을 통해 시스테인의 양을 증가시킨다. 또한, 세포 내부 자체적으로 시스테인을 아미노산을 과생산한다. 시스테인은 황을 포함한 아미노산으로 높은 활성산소 레벨에서 산화되어 활성산소의 양을 억제하는 특징이 있다. 이러한 배경을 바탕으로 허혈-재관류를 겪은 공여자의 신장에서는 높은 활성산소를 바탕으로 하는 시스테인의 과생성 과정이 예측된다. 또한 이는 허혈-재관류에 의한 급성 신손상 및 이식신 기능저하에 대해 시스테인이 바이오마커로서의 가능성을 가짐을 보여줄 수 있다.

[0003] 의료현장에서 사용하는 허혈-재관류에 의한 신장 손상의 진단법은 신장 기능평가에 의존적이다. 즉, 기본적으로는 혈청 크레아틴의 농도, 시스타틴C, 소변의 양을 측정하는 것이다. 하지만, 이 방법은 조직학적으로 신손상 정도에 비의존적이기 때문에 허혈-재관류 손상을 특이적으로 예측하는 기법이 될 수 없다. 또한, 대부분 진단 과정은 단일 과정이 아닌 복합과정을 거치기 때문에 시간 및 비용 소모가 크며 의사의 경험적 판단이 기준이 된다. 따라서, 시간 및 비용의 소모를 줄이며 의사의 객관적 판단을 돕는 새로운 진단법은 극복해야할 필수적인 과제이다.

[0004] 인체의 장기 중 신장은 내인성 황화수소 생성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 황화수소는 시스타티오닌-γ-리아제(CSE)를 통해 조직 IRI에 대한 항산화 물질로서 생성된다. 또한, CSE mRNA 발현이 허혈 및 재관류 직후에 증가하는 것으로 보고됨에 따라 IRI에서 CSE를 통한 시스테인의 증가가 예측된다. 시스테인은 글루타티온의 필수 기질이며 항산화 방어 시스템에서 중요한 역할을 하며 항산화제와 관련된 다양한 메커니즘에 관여하기 때문에 질병에 대한 바이오마커로 인식된다. 하지만, 티올 그룹의 중요성에도 불구하고, 생체 내 티올 그룹을 감지하는 것에 기존의 방법은 여러 장애물이 있다. 티올 그룹을 측정하는 방법은 Mass spectromete, HPLC, voltammetry, capillary ectrophoresis 등 이 알려져 있으나, 그 분석 과정이 복잡할 뿐 아니라, 많은 시간과 비용이 소모된다는 단점이 있다. 또한, 실시간으로 생체 내에서 관찰하는 것이 불가능하다.

[0005] 형광 분자 프로브 분야는 생체 내의 다양한 분자, 분자의 활성, 단백질, 단백질의 활성 등을 시각적으로 관찰하기에 편리하여 많은 개발이 이뤄지고 있고 많은 연구들에서 활용하고 있는 분야이다. 특히, 생체 내 대사물질을 높은 민감도와 특이도를 가지고 검출하기에 뛰어난 활용도를 보인다. 덧붙여 실시간으로 대사물질 및 단백질 등을 관찰하기 용이하여, 그 중요성이 향후 더욱 부가되는 추세이다. 현재까지 개발되어 온 형광 분자 프로브 중에 티올 그룹 중 하나인 시스테인을 선택적으로 감지하는 형광 분자 프로브는 그 개발이 어려웠다. 또한 그 구조는 구조적으로도 매우 복잡하였다. 시스테인을 선택적으로 감지하기 어려운 이유는 호모시스테인과의 구조적 유사성(호모시스테인 탄소개수 - 시스테인 탄소개수 =1, 탄소 개수의 하나 차이)으로 인한 문제가 가장 크다. 시스테인과 호모시스테인을 구별하기 위해선, 높은 친전자핵(Electrophilic)과 친핵체가 공격하기 쉬운 작은 스테릭 밀도를 가진 구조가 전제되어야 했다. 또한 형광을 유발하기 위하여, intramolecular charge transfer(ICT), Forster resonance energy transfer(FRET), Photoinduced proton transfer(PET), excited state intramolecular proton transfer(ESIPT) 등과 같은 원리를 사용한 형광 분자 프로브들이 개발되어왔다. 통상적으로, 생체 대사물질을 검출하기 위한 형광 분자 프로브는 형광-켜짐, 형광-꺼짐, 그리고 형광-변화 시스템으로 디자인된다. 이중 형광-켜짐 시스템의 형광 분자 프로브는 형광-꺼짐의 시스템보다 생체 내에서 낮은 오류 잠재력을 가지고 높은 해상도와 민감도를 가진다는 것이 특징이다. 또한, 형광-켜짐 시스템은 형광-변화 시스템보다 높은 해상도로 생체 내에서의 실시간 영상화에서 안정적으로 영상화를 도와줄 수 있다. 이러한 이유로, 형광-켜짐 시스템을 가진 시스테인 감지 형광 프로브의 개발은 그 중요성에도 불구하고 여전히 매우 도전적 과제로 남아있으며, 이를 개발하는 것은 다양한 질병을 진단하고 나아가 극복하는데 중요한 과제이다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 형광 프로브를 개발하여 소변 내의 시스테인을 검출하여 뇌사자로부터의 장기이식으로 인한 IRI에 의한 DGF를 예측하였고자 하였고, 이를 세포, 동물, 인간유래물(소변)에서 검증함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 제10-2023-0019546호

발명의 내용

해결하려는 과제

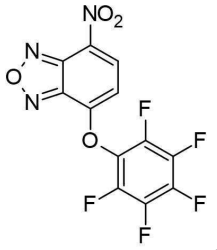
[0008] 본 발명의 목적은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 제조 가능한 시스테인 감응 형광 프로브 화합물을 이용하여, 소변 또는 신장조직 내 시스테인 검출을 통한 허혈-재관류 손상(IRI)에 의한 이식신 기능 지연(DGF)을 예측하기 위한 조성물 및 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0010] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물을 제공한다:

[0011] [화학식 1]

[0012] 
.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0014] 일 구현예에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kindy injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것일 수 있고, 바람직하게는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것일 수 있다.

[0015] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것일 수 있다.

[0016] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것일 수 있다.

[0017] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것일 수 있다.

[0018] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내 시스테인의 티올기(-SH)가 상기 화합물의 분자 내 탄소를 공격하여 에테르결합(ether linkage)이 깨어지고 시스테인과 결합한 뒤 스마일 재배열(Smile-rearrangement) 후 형광을 나타내는 것일 수 있다.

[0019] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내의 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.

[0020] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물이 처리되기 전의 시료보다 처리 후의 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하가 발병된 것으로 판정할 수 있는 것일 수 있다.

[0021] 일 구현예에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것일 수 있고, 바람직하게는 소변 또는 신장조직인 것일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로펜옥시(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다이아졸(oxadiazole) 화합물(화합물 1)은 쉽게 제조할 수 있고, 상기 화합물 1을 이용하여 소변 내, 그리고 신장 내의 시스테인을 영상화할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 상기 화합물 1을 이용하여 세포 수준, IRI 동물모델의 소변 및 신장의 영상화 분석, 더 나아가 뇌사기증자로부터의 소변을 분석함으로써 IRI에 의한 DGF를 조기 예측 및 진단이 가능한 효과가 있다.

[0023] 본 발명의 화합물 1을 이용한 IRI에 의한 DGF 진단용 조성물 및 진단 방법 기술은 세포, 동물, 그리고 인간유래물(소변 및 신장조직)에서 검증됨에 따라, 결과에 대한 신뢰도가 높으며 충분한 임상적 가치를 가지며, 즉각적인 사업화가 가능함을 제시함에 부족함이 없고, 향후 기술의 사업화 전망이 분명하다고 할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 1은 분자 진단 분야에서 접근하기 어려운 대사물질에 초점을 맞추었기 때문에 기존의 분자 진단법, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR) 및 웨스턴 블랏(Western blot)으로는 검출하기 힘든 대사물질을 빠른시간 내에 검출 할 수 있음에 높은 기술 혁신성이 부여된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 정상 쥐 소변에서 시스테인을 추가했을 때, 화합물 1의 형광 변화를 스펙트럼으로 확인한 결과이다. 형광 스펙트럼은 488 nm 여기 파장으로부터 획득하였다.

도 2는 시스테인 및 시스테인의 억제제를 처리한 정상 쥐 신장에서 화합물 1의 형광 변화를 형광 조직 영상화

시스템으로 측정(a) 및 광점 효율값(b)을 확인한 결과이다.

도 3은 저산소조건상의 HK-1 세포 수준에서 화합물 1의 형광 영상화 결과를 공초점 현미경으로 확인한 결과(a) 및 형광강도를 정량화한 결과(b)이다.

도 4는 허혈-재관류 동물모델로부터의 신장을 화합물 1로 처리하여 형광 조직 영상화 시스템으로 측정(a) 및 광점 효율값(b)을 확인한 결과와 이광자 여기 형광 현미경(c)으로 확인한 결과이다.

도 5는 허혈-재관류 동물모델의 소변과 뇌사자로부터의 장기이식 후 환자의 소변을 화합물 1로 처리하여 형광 강도를 측정한 결과이다.

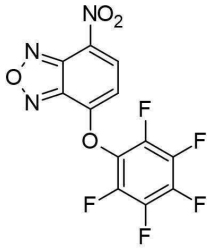
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0026] 본 발명자들은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 시스테인 감응 형광 프로브 화합물을 개발하여, 소변 내의 시스테인을 검출하여 뇌사자로부터의 장기이식으로 인한 IRI에 의한 DGF를 예측하였고자 한 결과, DGF 환자군의 소변에서 높은 형광-켜짐 신호가 관찰됨을 확인하였으며, 이를 통해 소변 내의 시스테인의 DGF의 새로운 바이오마커로서의 가능성 및 본 형광 프로브 화합물의 IRI에 의한 DGF의 기준지표로서의 적용 가능성을 확인하고, 이를 세포, 동물, 인간유래물(소변)에서 검증함으로써, 본 발명을 완성하였다(실시예 1 내지 6 참조).

[0028] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물에 관한 것이다:

화학식 1

[0029] 

[0030] 본 발명의 실시예에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로펜옥시(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다이아졸(oxadiazole)로 동정하였고, 본 명세서에서는 이를 '화합물 1'로 표기하였다(실시예 1 참조).

[0031] 일 구현예에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kindy injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것일 수 있고, 바람직하게는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것일 수 있다.

[0032] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것일 수 있다.

[0033] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것일 수 있다.

[0034] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 호모시스테인, 글루타치온, 및 황화수소로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상이 포함된 시료와 반응하였을 때보다, 시스테인이 포함된 시료와 반응하였을 때 더 높은 세기의 형광 신호를 발하는 것일 수 있다. 상기 생체 분자들은 호모시스테인, 글루타치온, 황화수소, 아스파르트산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 아데노신 삼인산, 당(Sucrose), 암모늄(Ammonium), HSA(Human serum slbumin), $PbCl_2$, $MGCl_2$, $FeCl_3$, $Hg(NO_3)_2$, $CdCl_2$, $ZnCl_2$, $NiCl_2$, $CoCl_2$, NaCl, $AuCl_3$, AgCl, $CuCl_2$, 및 KCl으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내 시스테인의 티올기(-SH)가 상기 화합물의 분자 내 탄소를 공격하여 에테르결합(ether linkage)이 깨어지고 시스테인과 결합한 뒤 스마일 재배열(Smile-rearrangement) 후 형광을 나타내는 것일 수 있다.

[0036] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내의 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 상기 "형광-켜짐(fluorescence turn-on)" 특성은 검출하고자 하는 대상 물질의 비존재(부재) 하에서는 형광을 발하지 않으며, 육안으로 식별하지 못하지만, 검출 대상 물질이 존재할 경우 검출 대상 물질과 반응하여 형광을 발하는 특성을 의미한다.

[0038] 본 발명의 일 예에 따른 화합물 1과 같은 "형광-켜짐" 기준 시스템의 경우, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질이 존재하지 않을시 형광이 존재하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 형광만이 존재하다가, 검출 대상 물질의 존재에 의해 명확한 형광(최소 10배 이상의 형광 세기 증가)이 발생하게 되므로, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질의 검출 여부를 시각적으로 명확히 판별할 수 있다.

[0039] 본 발명의 상기 화합물이 나타내는 형광 켜짐은 시스테인과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않고, 시스테인과 접촉하여 형광을 발하는 것을 의미할 수 있다. 이에, 상기 화합물을 시스테인 감응성 형광 프로브(probe)로 사용될 수 있으며, 소변 또는 신장조직 내 시스테인 검출을 통한 IRI에 의한 DGF 진단을 위해 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에서, 용어 '프로브'는 '센서'라고도 하며 생체 내/외 표적을 검출하거나, 영상화할 수 있는 것으로 정의된다. 일반적으로 영상화제, 조영제, 방사성 의약품 등의 용어로 대체하여 사용되고 있다.

[0041] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 전자를 당기는 이산화질소(NO_2) 그룹과 이의 파라(-para) 위치에 전자를 당기는 펜타플루오로페놀이 존재하여 형광이 보이지 않지만, 시스테인과 결합하여 파라 위치에 전자를 주는 시스테인의 아민기(NH_2)가 도입되었을 때, 550 nm 근방에서 형광-켜짐 현상이 관찰되고, 전자가 부족한 방향족 고리 화합물이 존재하였을 때, 호모시스테인 그리고 글루타치온 등의 티올의 간섭을 받지 않고 시스테인에서만 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명의 일실시예에서는 상기 화합물 1이 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며(실시예 2 내지 4), 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어남을 확인하여 허혈-재관류 환자 유래 소변 또는 신장조직 내에 시스테인이 정상군보다 많이 존재할 수 있다는 것을 확인하였다(실시예 5 내지 6). 이러한 결과를 통해, 상기 화합물 1은 소변 또는 신장조직 내 시스테인 형광 검출을 통해 IRI에 의한 DGF를 조기에 진단할 수 있는 가능성을 확인하였다.

[0043] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재, 특징, 질병의 진행 경과, 치료 시 질환의 치료 효과 등을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 시스테인을 소변 또는 신장조직에서 검출함으로써 신장 손상 또는 신기능 저하, 바람직하게는 IRI에 의한 DGF를 진단하는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 화합물을 정맥투여 하였을 때, 4시간 후 IRI 동물모델의 소변 및 신장 내에서 형광-켜짐 현상이 일어남에 따라 상기 동물모델의 소변 및 신장에서 시스테인을 검출하는 것일 수 있으나, 투여 방법 및 순환시간에 대한 것은 특정한 시점이 아닌 것으로 위 조건으로 한정되지는 않는다.

[0045] 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 상기 화합물 외에 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 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.

[0046] 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 뇨(소변), 신장세포 또는 신장조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0047] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 화합물은 소변 및 신장조직 내 시스테인 감지가 가능할 뿐 아니라, 시스테인이 소변 또는 신장조직 내 많이 축적된 질병들에 대한 조기 진단 예측용 소재로서의 활용가치가

높다.

[0049] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0050] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 화합물, 신장 손상, 신기능 저하 및 진단에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0051] 일 구현예에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것일 수 있고, 바람직하게는 소변 또는 신장조직인 것일 수 있다.

[0052] 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 처리된 시료에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 단계 3은 측정 대상 시료의 형광 발광 세기가 화합물이 처리되기 전의 형광 발광 세기에 비해 증가된 것을 확인할 수 있는 방법을 포함한다.

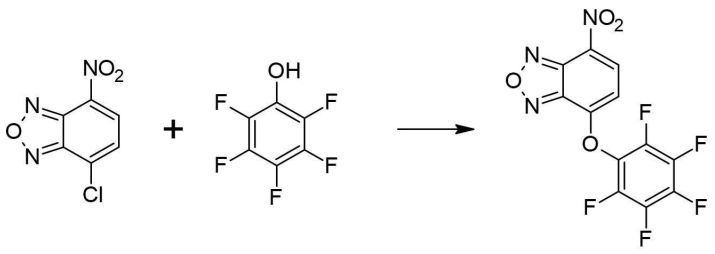
[0054] 보다 구체적으로 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 시료 내 시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 시료 내 시스테인 존재 시 형광-켜짐 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화합물을 시료에 처리한 후에 처리되기 전의 시료보다 형광 발광 및 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하, 바람직하게는, 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연이 발병된 것으로 판정할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0055] 상기 단계 3의 여기광원은 450 내지 500nm, 바람직하게는 480 내지 490 nm의 여기파장의 광원일 수 있고, 488 nm인 것이 가장 바람직한 것일 수 있다.

[0057] 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.

[0059] **실시예 1. 소변 내 시스테인 검출용 화합물의 합성 및 구조 분석**

[0060] 본 발명자들은 시스테인을 생체 내 유래물인 소변에서 신속하게 측정하기 위하여 본 형광 분자 프로브를 개발하고자, 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)에 전자가 부족한 방향족 고리 화합물인 펜타플루오로페놀기(pentafluorophenol)를 도입하여 친핵체 공격을 수월히 하도록 분자 구조를 설계하였으며, 하기 반응식에 따라 상기 화합물 1을 합성하였다.



1

[0061]

[0062] <u>(1) 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로펜옥시(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다이아졸(oxadiazole)의 합성</u>

[0063] 구체적으로, 합성 출발 물질인 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)(20 mg, 0.1 mol, TCI, A55921G)과 펜타플루오로페놀(Pentafluorophenol)(55.2 mg, 0.3 mol, TCI, 771-61-9)을 질소로 산소를 제거한 3 mL의 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)에 녹이고 25℃에서 교반해주었다(분당

회전수: 300 rpm). 이후, 상기 교반된 용액에 30 μL의 엔,엔-디아이소프로필에틸아민(N,N-diisopropylethylamine; DIPEA)과 20.7 mg의 탄산 칼륨(Potassium carbonate; K_2CO_3)을 추가해주고 실리콘 오일 용기 상에서 온도를 60℃까지 올려주었다. 온도가 60℃에 도달하면 10분간 교반해준 뒤 온도를 다시 25℃로 낮춰주고, 물(30 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 이용하여, 37℃ 및 20~500 mmHg의 조건으로 농축하였다. 이렇게 얻은 진한 갈색 고체화합물은 실리카겔(silica gel, Merck-silica gel 60, 230-400 mesh)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(직경 6 cm, 높이 15 cm) 방법을 이용하여 분리(전개액: EtOAc/Hexane=10/90)하여 진한 노란색 고체 화합물(화합물 1, 12.5 mg, 35.9%)을 얻었다.

[0064] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance)을 수행하였다. 분석을 통해 화합물 1이 성공적으로 합성되었음을 확인 할 수 있었다. NMR 분석 결과는 다음과 같다:

[0065] ^{1}H-NMR($CDCl_3$, 500 MHz); δ 8.52(d, 1H, J=8.0 Hz), 6.85(d, 1H, J=8.0 Hz). ^{19}F-NMR($CDCl_3$ containing hexafluoro-benzene, 471 MHz); δ -155.9(s, 2F), -158.1(d, 1F), -162.8(d, 2F).

[0066] 이를 통해, 상기 화합물 1을 '4-니트로-7-(펄플루오로펜옥시)벤조[c][1,2,5]옥사다이아졸(4-nitro-7-(perfluorophenoxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)'로 동정하였다.

[0068] **실시예 2. 정상 쥐 소변 내에서 화합물 1의 형광 방출 특성 확인**

[0069] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 1의 형광 방출 특성을 확인하기 위해서, 정상 쥐 소변 내에서 시스테인과 반응 후 형광 방출 그래프를 측정하였다.

[0070] 구체적으로, 화합물 1은 10 mM로 DMSO 용액에 녹여 사용하였으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 DMSO의 양이 각 용기별 동일하도록 통제되었다(1% 이하). 화합물 1과 소변 내 시스테인의 반응을 확인하기 위해, 전처리를 하지 않은 쥐의 소변(198 μL)에 시스테인을 농도별(3.125 - 200 μM)로 처리한 뒤 화합물 1(100 μM)을 처리하여 37℃ 교반기에서 40분 교반 후 형광 스펙트럼을 측정하였다(여기파장:488 nm). 방출 스펙트럼을 분석하기 위해서 형광 측정장비(Spectro-fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였으며, 형광 측정에 사용되는 유리 큐벳은 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(Internal volume= 0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.

[0071] 도 1(a)는 정상 쥐의 소변에 화합물 1(100 μM) 처리, 그리고 정상 쥐의 소변에 시스테인(100 μM) 처리 후 화합물 1(100 μM) 처리한 뒤 40분간 37℃ 교반기에서 교반하여 488 nm 여기 후 얻은 결과이다. 도 1(b)에 따르면, 정상 쥐의 소변에 시스테인을 처리하였을 때의 형광 변화는 시스테인의 농도의존적으로 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 도 1(a)에서 형광 방출 스펙트럼은 550 nm 이상 600 nm 이하에서 가장 높은 형광 값을 보였다.

[0073] **실시예 3. 화합물 1의 정상 쥐 신장조직 영상화 확인**

[0074] 본 발명자들은 화합물 1이 정상 쥐의 신장 내에서 시스테인 결합 후 영상화가 가능한지 확인하기 위해서 조직 형광 영상화 시스템을 이용하여 그 결과를 측정하였고, 이를 도 2에 나타내었다.

[0075] 구체적으로, 화합물 1이 정상 쥐의 신장 내 시스테인에 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여, 정상 쥐의 신장에 시스테인 억제제인 엔-에틸말레이마이드(N-ethylmaleimide; NEM)(500 μM)를 사용하였다. 또한, 시스테인의 농도를 높여주기 위해 시스테인을 추가로 넣어주었다. 시스테인 및 NEM을 신장 내로 넣기 위해, 신장을 시스테인 또한 NEM이 포함된 용액에 넣어 삼투현상을 유도시켰다.

[0076] 도 2(a)는 상기 전처리 과정을 거친 정상 쥐 신장을 화합물 1로 영상화 한 결과이다. 도 2(a)에 따르면, 시스테인을 전처리한 군에서 높은 형광 강도가 보였으며, NEM 및 시스테인을 순차적으로 처리한 그룹에서는 낮은 형광 강도를 가짐을 영상화로 확인하였고, 이는 화합물 1이 신장 내에서 시스테인과 반응할 수 있다는 것을 나타낸다. 이의 결과는 광자 효율성 분석을 통해 도 2(b)에 나타내었고, 유의적 결과를 확인하기 위한 통계방법은 다음과 같다; The error bar represents mean±S.D(n=3) with one-way ANOVA, Turkey's multiple

comparisons tests; $^{**}p < 0.01$.

[0078] **실시예 4. 저산소조건의 신장조직에서 화합물 1의 형광 반응 테스트**

[0079] 본 발명자들은 저산소조건(1.0% O_2)에서 증가된 시스테인을 화합물 1이 영상화할 수 있는지 세포 수준에서 확인하고자 하였고, 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0080] 도 3(a)는 인간 신장조직 세포(HK-2)에 저산소조건을 각각 1시간(1h) 및 5시간(5h) 주었을 때의 형광변화를 공초점현미경으로 확인한 결과이다. 이때, 형광변화를 관찰하기 위해 화합물 1을 37℃에서 15분간 5 μM로 처리해주었다. 그 결과, 1시간의 저산소조건보다 5시간의 저산소조건에서 더 높은 형광 강도 및 영상화 결과를 보여주었다. 형광강도에 대한 결과는 도 3(b)에 나타내었다. 유의적 결과를 확인하기 위한 통계방법은 다음과 같다; The error bar represents mean±S.E.M. with one-way ANOVA, Turkey's multiple comparisons tests; **p < 0.001(A vs B), ***p < 0.001(C vs D). The dot plots represent Jitter points.

[0082] **실시예 5. 허혈-재관류 동물 모델의 신장조직에서 화합물 1의 형광 반응테스트**

[0083] 본 발명자들은 화합물 1이 허혈-재관류 설치류 모델의 신장조직을 영상화 할 수 있는지 확인하기 위해, 형광 조직 영상화 시스템 분석 및 이광자 여기 형광 현미경 분석을 수행하였다.

[0084] 본 실험에 앞서, 생쥐 (C57BL/6, 구입처: 오리엔트 바이오)들은 7~9주 된 마우스들이었으며, 무작위로 세 그룹으로 나누었다: 정상군(대조 그룹, n=9), 20분 동안의 허혈-재관류군(n=16), 그리고 45분 동안의 허혈-재관류군(n=16). 또한, 생쥐의 허혈-재관류 모델은 다음과 같이 확립하였다: 호흡 마취 후 복부 중간의 개복술을 통해 좌측 신장 혈관경을 해부하여 실험 그룹별로 지정된 시간 동안 비외상성의 혈관 클램프로 폐쇄하였다. 폐쇄 동안 복부 절개 부위는 체온과 수분 손실을 최소화하기 위해 닫았다. 클램프를 제거한 후, 왼쪽 신장의 재관류가 시각적으로 확인되었고 오른쪽 신장을 절개하였다. 절재한 복부는 4-0 비크릴 봉합사를 사용하여 봉합하였다.

[0085] 상기 방법으로 정상 쥐 및 허혈-재관류 쥐로부터 각각 얻어진 신장 조직에 대하여 형광 조직 영상화 시스템 분석 및 이광자 여기 형광 현미경 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 4에 명시하였다.

[0086] 도 4(a)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상 쥐의 신장조직 및 허혈-재관류 쥐 모델의 신장조직에 각각 100 μM로 처리하고 2시간 교반하였을 때, 허혈-재관류 쥐 모델의 신장조직에서 높은 형광강도가 보이는 것을 확인하였고, 이를 광자 효율성 분석을 통하여 통계적 유의성을 도출하였다(도 4b). 또한, 이광자 여기 형광현미경 분석 결과 허혈-재관류 쥐 모델에서 높은 형광 강도를 보였으며, 이는 60 μm의 깊이에서도 확인되었다(도 4c).

[0087] 이러한 결과를 바탕으로, 허혈-재관류 모델 유래 신장조직 내에 시스테인이 정상군보다 많이 존재할 수 있다는 것을 확인하였고, 본 발명의 화합물 1을 이용하여 허혈-재관류로 인한 손상을 진단 가능함을 명시할 수 있다.

[0089] **실시예 6. 허혈-재관류 동물 모델 및 뇌사자로부터 장기이식을 받은 환자 유래 소변에서 화합물 1의 형광 반응 테스트**

[0090] 본 발명자들은 허혈-재관류 설치류 모델의 소변 및 뇌사자로부터 장기이식을 받은 후 허혈-재관류 손상(IRI)에 의한 급성 신장 손상 및 이식신 기능 지연(DGF) 증상을 갖는 환자의 소변에서 시스테인의 증가가 일어났는지 확인하기 위해서, 화합물 1을 이용하여 형광강도 분석을 수행하였다. 또한, 그 결과를 도 5에 명시하였다.

[0091] 도 5(a)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상 쥐의 소변, 허혈-재관류 쥐 모델의 소변에 각각 100 μM로 처리하고 37℃에서 40분 교반하였을 때, 허혈-재관류 쥐 모델의 소변에서 높은 형광 강도를 보였으며, 이는 허혈의 시간에 따른 증가 경향성을 보여주었다. 또한, 이의 통계적 유의성은 다음과 같다: The error bar represents mean±S.E.M. with one-way ANOVA, Turkey's multiple comparisons tests; *p < 0.05.

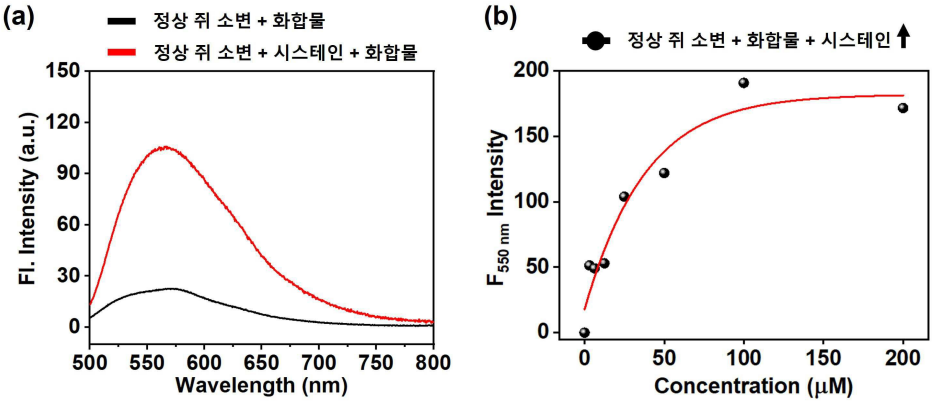
[0092] 또한, 도 5(b)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상군과 뇌사자로부터의 장기이식을 받은 환자(수여자)의 소변에 각각 100 μM로 처리하고 37℃에서 40분 교반하였을 때, 뇌사자로부터 장기이식을 받은 환자의 소변에서 정상군의 소변보다 높은 형광 강도를 보이는 것을 확인하였고, 이의 통계적 유의성을 도출하였다: The error bar represents mean±S.E.M. with unpaired t-test; *p < 0.05.

[0093] 따라서, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어남에 따라 상기 환자군의 소변 내에 시스테인이 존재할 수 있고, 본 발명의 화합물 1을 이용하여 이를 검출할 수 있으며, 이를 통해 IRI에 의한 DGF를 소변으로 진단 가능함을 확인하였다.

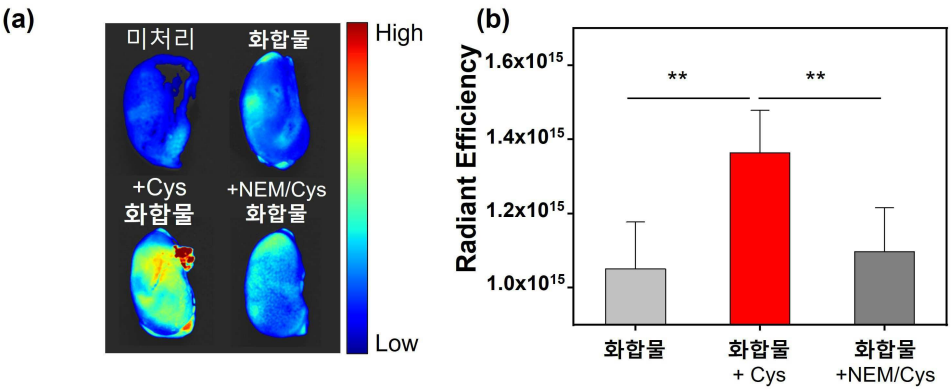
[0095] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

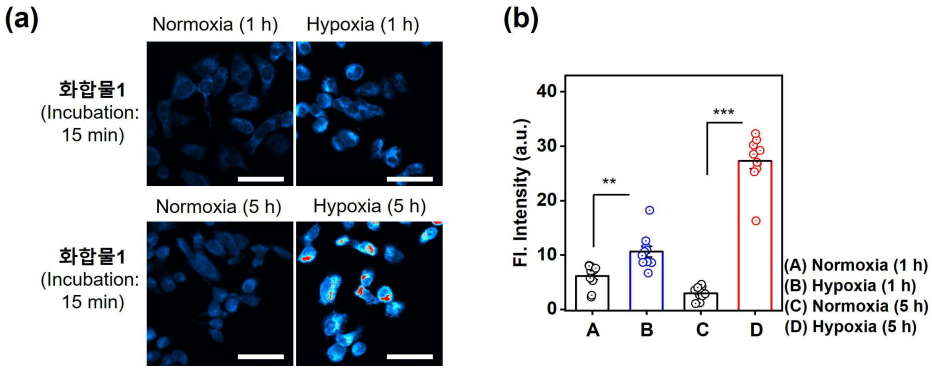
도면1



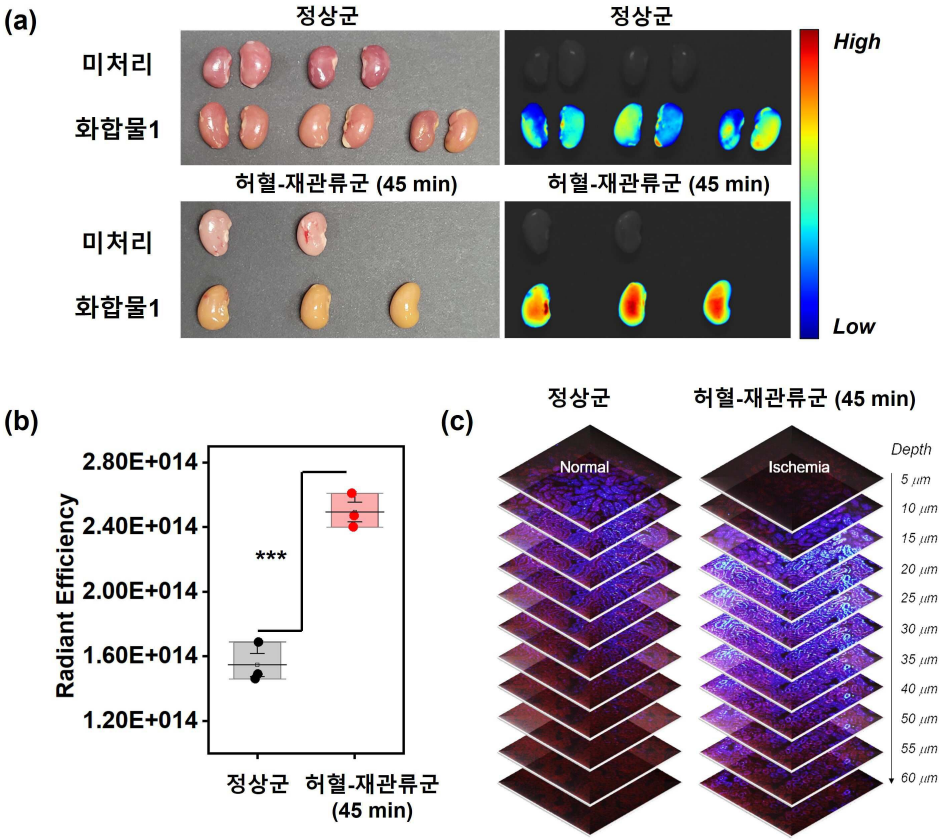
도면2



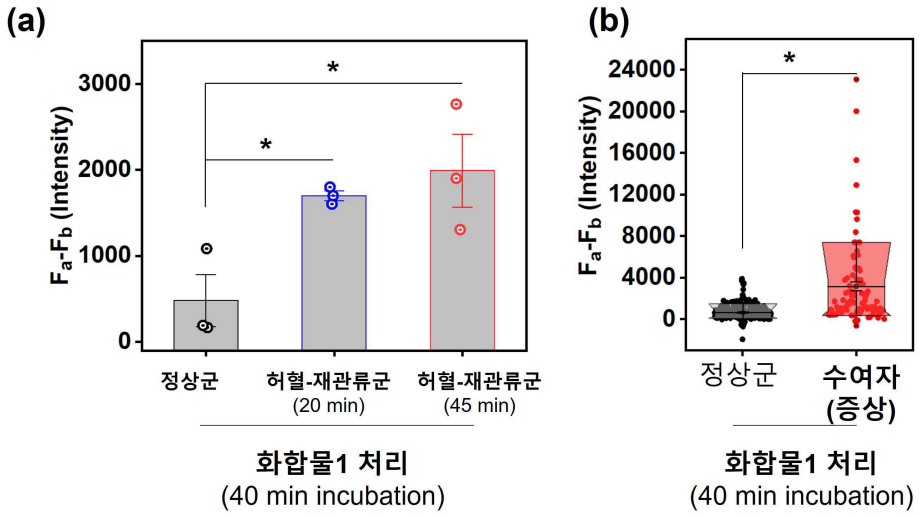
도면3


(a)
Normoxia (1 h)
Hypoxia (1 h)
화합물1
(Incubation:
15 min)
Normoxia (5 h)
Hypoxia (5 h)
화합물1
(Incubation:
15 min)
(b)
Fl. Intensity (a.u.)
40
30
20
10
0
**
***
A
B
C
D
(A) Normoxia (1 h)
(B) Hypoxia (1 h)
(C) Normoxia (5 h)
(D) Hypoxia (5 h)

도면4


(a)
정상군
정상군
미처리
화합물1
High
Low
허혈-재관류군 (45 min)
허혈-재관류군 (45 min)
미처리
화합물1
(b)
Radiant Efficiency
2.80E+014
2.40E+014
2.00E+014
1.60E+014
1.20E+014
***
정상군
허혈-재관류군
(45 min)
(c)
정상군
허혈-재관류군 (45 min)
Normal
Ischemia
Depth
5 μm
10 μm
15 μm
20 μm
25 μm
30 μm
35 μm
40 μm
50 μm
55 μm
60 μm

도면5


(a)
3000
2000
1000
0
F_a-F_b (Intensity)
*
*
정상군
허혈-재관류군
(20 min)
허혈-재관류군
(45 min)
화합물1 처리
(40 min incubation)
(b)
24000
20000
16000
12000
8000
4000
0
F_a-F_b (Intensity)
*
정상군
수여자
(증상)
화합물1 처리
(40 min incubation)