(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 5 월 20 일 (20.05.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/096263 A1

(51) 국제특허분류:
G01N 33/52 (2006.01)
G01N 21/64 (2006.01)
G01N 31/22 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/015922

(22) 국제출원일: 2020 년 11 월 12 일 (12.11.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0144581 2019 년 11 월 12 일 (12.11.2019) KR

(71) 출원인: 이화여자대학교 산학협력단 (**EWHA UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION**) [KR/KR]; 03760 서울시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교), Seoul (KR).

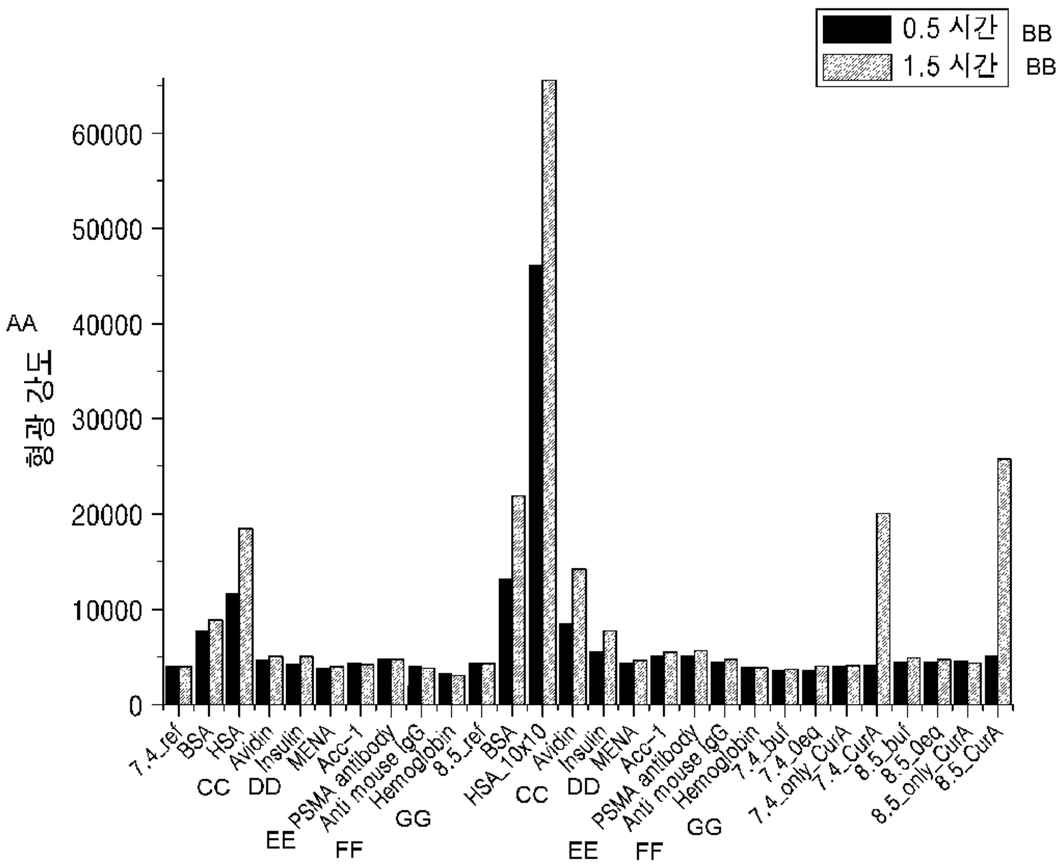
(72) 발명자: 김관묵 (**KIM, Kwan Mook**); 06502 서울시 서초구 신반포로 45, 61동 307호 (반포동, 반포아파트), Seoul (KR). 윤주영 (**YOON, Juyoung**); 04428 서울시 용산구 이촌로 347, 2동 501호 (서빙고동, 신동아아파트), Seoul (KR). 차선신 (**CHA, Sun Shin**); 03711 서울시 서대문구 가재울미래로 2, 213동 1002호 (남가좌동, DMC파크뷰자이), Seoul (KR).

(74) 대리인: 특허법인 엠에이피에스 (**MAPS INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 06239 서울시 강남구 테헤란로8길 37, 8층 (역삼동, 한동빌딩), 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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.

(54) **Title:** CELL IMAGING COMPOSITION AND CELLULAR MATERIAL IMAGING METHOD USING SAME

(54) **발명의 명칭:** 세포 이미징 조성물, 및 이를 이용한 세포 물질 이미징 방법



AA ... Fluorescence intensity
BB ... Hours
CC ... Avidin
DD ... Insulin
EE ... PSMA antibody
FF ... Anti mouse IgG
GG ... Hemoglobin

(57) **Abstract:** The present application relates to a cell imaging composition comprising, as a fluorescent probe compound, 1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid or a derivative thereof, and a cellular material imaging method using same.

(57) **요약서:** 본원은 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 [1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는 세포 이미징 조성물, 및 이를 이용한 세포 물질 이미징 방법에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]

WO 2021/096263 A1

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 세포 이미징 조성물, 및 이를 이용한 세포 물질 이미징 방법

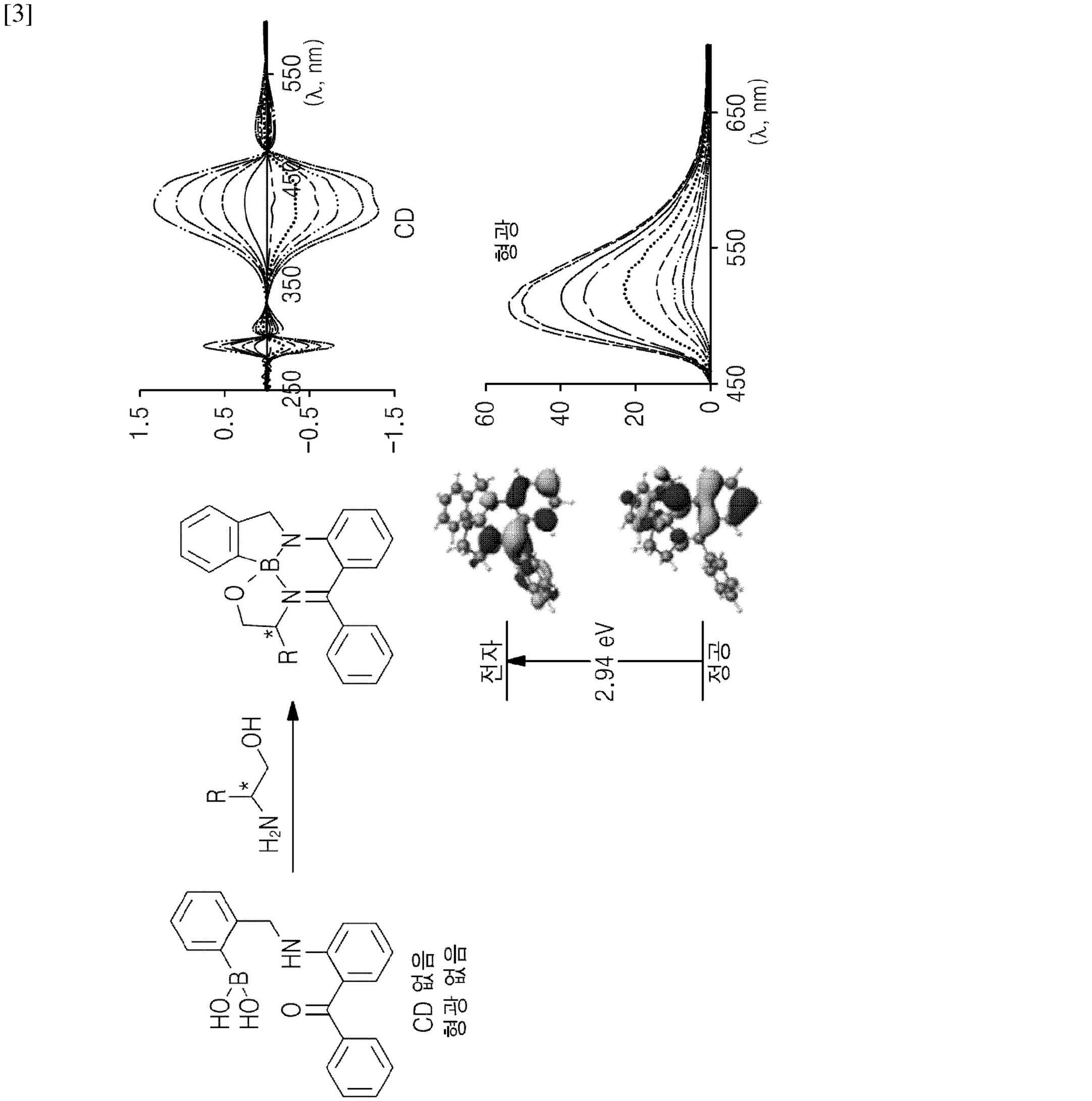
기술분야

[1] 본원은 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 [1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는 세포 이미징 조성물, 및 이를 이용한 세포 물질 이미징 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 본 발명자들은 아미노알코올과 선택적으로 반응하여 보디피(Bodipy)와 유사한 구조를 형성함으로써 강한 원평광 이색성(circular dichroism, CD)과 형광을 만들어낼 수 있는 새로운 화합물을 개발하였다.

[3]



[4] 생명체의 기본이 되는 세포 내에는 미토콘드리아, 소포체, 및 망사체와 같은 소기관; 및 지질, 아미노산유도체 및 단백질과 같은 생체분자; 들이 존재한다. 이들의 세포 내 위치를 실시간으로 형광 이미징하는 것은 자체의 기능을 규명하는 것 이외에도 관련된 질병 및 노화의 진단 및 치료예방 연구에 큰 역할을 한다. 현재 특정단백질을 이미징하기 위해서는 유전자 조작을 통해 GFP형광단백질이 결합된 채로 발현시키거나, 형광발색단을 붙인 항체를 주입하는 방법을 사용하고 있다. 형광단백질을 사용하는 경우 형광 세기와 색채의 조절에 어려움이 있고 고도의 기술과 많은 시간 및 높은 비용을 필요로 하며, 세포막을 통과하지 못하므로 세포를 스퀴징(squeezing) 한 후 세포막을

용해시켜야 하는 불편함이 있다. 이러한 이유로 단백질에 결합하여 형광을 만들어낼 수 있는 작은 분자량의 합성화합물의 필요성이 대두되었다. 이러한 화합물들은 항체를 대용할 수 있으므로 그 응용범위가 단백질의 기능연구, 단백질을 대상으로 하는 질병 진단 및 치료에 널리 활용될 수 있다.

[5] 이제까지 단백질에 형광을 유도하는 많은 화학적 태그(Chemical-tag)들이 개발되어 있기는 하지만, 이러한 태그들은 표적 단백질에 펩타이드(peptide)와 같은 어댑터(adaptor)를 도입하고 화학적 태그 자체도 구조를 변형시켜야 하는 복잡한 조작을 필요로 한다 (J. Biophotonics 4, No. 6, 391-402 (2011)).

[6] 최근에 비교적 간단한 유기화합물들을 이용하여 생체 내의 단백질이나 특정 생체분자에 특이적으로 형광을 만들어내는 생물 직교 콘쥬게이션 (bioorthogonal conjugation) 기술이 발전하고 있다. 생물 직교 콘쥬게이션의 용어는 Carolyn R. Bertozzi에 의해 처음 사용되었으며, 일반적으로 2 단계의 조작을 필요로 한다 (Sletten, Ellen M., Bertozzi, Carolyn R., "Bioorthogonal Chemistry: Fishing for Selectivity in a Sea of Functionality" Angewandte Chemie International Edition. 2009, 48(38), 6974-6998). 대표적인 생물 직교 콘쥬게이션으로는 무동 클릭 화학(copper-free click chemistry)이 알려져 있는데, 이는 아자이드(azide, $-N_3$ 화합물)를 먼저 표적이 되는 단백질이나 지방질(lipid)에 일차적으로 결합시키고 나서 시클로옥틴(cyclooctyne)이 결합된 프로브를 첨가하여 스트레인-촉진 알킨-아자이드 시클로첨가 반응(strain-promoted alkyne-azide cycloaddition reaction)이 일어나도록 한다 (Carpenter, Richard D., Hausner, Sven H., Sutcliffe, Julie L., "Copper-Free Click for PET: Rapid 1,3-Dipolar Cycloadditions with a Fluorine-18 Cyclooctyne", ACS Medicinal Chemistry Letters. 2011, 2 (12): 885-889)). 이 이외에도 여러 가지 생물 직교 콘쥬게이션 기술들이 개발되었다 (Kolb, Hartmuth C., Finn, M. G., Sharpless, K. Barry, Angewandte Chemie, International Edition (2001), 40(11), 2004-2021; Ning, X. H., Guo, J., Wolfert, M. A., 및 Boons, G.-J. Angew. Chem., Int. Ed. 2008, 47, 2253; Song, W., Wang, Y., Qu, J., Madden, M. M., and Lin, Q. Angew. Chem., Int. Ed. 2008, 47, 2832).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

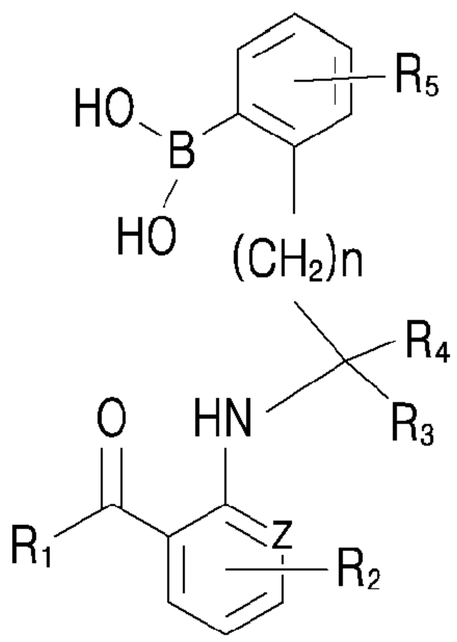
[7] 본원은 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 [1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는 세포 이미징 조성물, 및 이를 이용한 세포 물질 이미징 방법에 관한 것이다.

[8] 그러나, 본원이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[9] 본원의 제 1 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는, 세포 이미징 조성물을 제공한다:

[10] **[화학식 1]**

[11]  ;

[12] 상기 화학식 1에서,

[13] R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며,

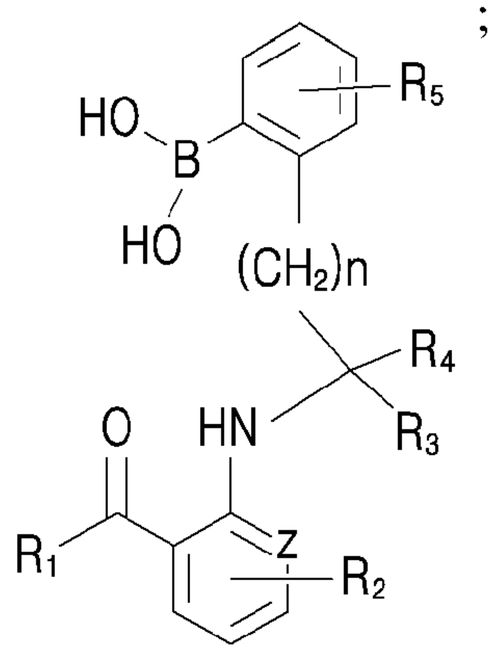
[14] 상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

[15] 상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;

[16] 상기 n은 0 내지 5의 정수임.

[17] 본원의 제 2 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체인 형광 프로브 화합물이 표적 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하는 것을 포함하는, 세포 물질 이미징 방법을 제공한다.

[18] **[화학식 1]**

[19]  ;

[20] 상기 화학식 1에서,

[21] R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며;

[22] 상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

[23] 상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;

[24] 상기 n은 0 내지 5의 정수임.

발명의 효과

[25] 본원의 구현예들에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 살아 있는 세포 내 물질, 예를 들어, 살아 있는 세포의 세포 물질 또는 세포기관의 형광 이미징을 수득하는 데 사용될 수 있다.

[26] 본원의 구현예들에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 상기 프로브가 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하여 상기 세포 내 물질을 이미징하는 것으로서, 미토콘드리아, DNA, 골기체, 레티컬럼, 라이소좀, 단백질, Hg^{2+}, Cu^{2+}, ATP, 아미노산, 또는 ROS(활성산소) 등을 포함하는 세포 내 물질의 형광 이미징에 사용될 수 있다.

[27] 본원의 구현예들에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 줄기세포, 소포체, 또는 암세포 등의 형광 이미징에 사용될 수 있다.

[28] 본원의 구현예들에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 세포 내 미토콘드리아 및/또는 단백질을 이미징하여, 줄기세포, 소포체, 또는 암세포 등의 형광 이미징에 사용될 수 있으며, 이에 따라, 질병 (특히, 종양성 질환 또는 암)의 진단 및/또는 치료에 활용될 수 있다.

[29] 본원의 구현예들에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 pH 조건 등 환경 설정에 따라 다양한 단백질을 선택적으로 센싱할 수 있다. 예를 들어, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은

다양한 단백질 중 HSA(Human Serum Albumin)에 대한 선택성이 우세하여, HSA를 포함하는 세포를 선택적으로 센싱할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[30] 도 1은, 본원의 일 실시예에 있어서, 화합물 1을 프로브로 사용하였을 때, (a) 화합물 1 + 에탄올아민(ethanolamine), (b) 화합물 1 + 알라니놀(alaninol), (c) 화합물 1 + 페닐알라니놀(phenylalaninol), (d) 화합물 1 + 아미노부타놀(aminobutanol), (e) 화합물 1 + 발리놀(valinol), (f) 화합물 1 + 류시놀(leucinol), (g) 화합물 1 + 트립토파놀(tryptophanol), (h) 비교 (화합물 1 + 알라니놀, 류시놀, 아미노부타놀, 페닐알라니놀) (생략될 수 있음)에 대한 형광스펙트럼 변화를 나타낸 것이다.

[31] 도 2는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물(adduct) 형성의 ^{1}H NMR, 및 (b) 화합물 1의 ^{1}H NMR을 나타낸 것이다.

[32] 도 3은, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물 형성의 ^{13}C NMR, 및 (b) 화합물 1의 ^{13}C NMR을 나타낸 것이다.

[33] 도 4는, 본원의 일 실시예에 있어서, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물 형성의 ^{11}B NMR, 및 (b) 화합물 1의 ^{11}B NMR을 나타낸 것이다.

[34] 도 5는, 본원의 일 비교예로서, (a) 비교화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:5 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (b) 비교화합물 1의 ^{1}H NMR, (c) 비교화합물 2와 에탄올아민의 반응에 대한 1:5 부가물 형성, 및 (d) 비교화합물 2의 ^{1}H NMR을 나타낸 것이다.

[35] 도 6은, 본원의 일 실시예에 있어서, 상기 화합물 1과 알라니놀(=아미노프로파놀)의 반응에 대한, (a) 2:1 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (b) 1:2 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (c) 1:5 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (d) 화합물 1과 알라니놀의 당량변화에 따른 ^{11}B NMR, 및 (e) 화합물 1과 다른 아미노알코올의 반응에 대한 2:1 부가물 형성의 ^{1}H NMR을 나타낸 것이다.

[36] 도 7은, 본원의 일 실시예에 있어서, 아세토니트릴(acetonitrile) 용액에서 HeLa 세포를 10 μM 프로브와 함께 (a) 0 μM, (b) 10 μM, (c) 100 μM, 및 (d) 1,000 μM의 에탄올아민을 첨가한 후, 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것이다.

[37] 도 8은, 본원의 일 실시예에 있어서, DMSO(dimethyl sulfoxide) 용액에서 HeLa 세포를 10 μM 프로브와 함께 (a) 0 μM, (b) 10 μM, (c) 100 μM, 및 (d) 1,000 μM의 에탄올아민을 첨가한 후, 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것이다.

[38] 도 9는, 본원의 일 실시예에 있어서, HeLa 세포를 (a) 10 μM 프로브, 및 (b) 10 μM 프로브 + 40 μM CCCP와 함께 30 분 동안 배양하여, 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것이다.

[39] 도 10은, 본원의 일 실시예에 있어서, HeLa 세포를 10 μm의 화합물 1 및 50

nM의 미토트랙커(Mito Tracker) 딥레드와 30 분 동안 배양하고, 공초점(confocal) 현미경을 이용하여 수득한 (a) 화합물 1에 의한 미토콘드리아의 형광이미징 (여기파장: 405 nm/ 방출파장: 490-590 nm), (b) 미토트랙커 딥레드에 의한 미토콘드리아의 형광이미징 (여기파장: 635 nm/ 방출파장: 655-755 nm), (c) 화합물 1과 미토트랙커 딥레드에 의한미토콘드리아의 병합 형광이미징, (d) 화합물1과 미토트랙커 딥레드의 코로칼라이제이션(colocalization) 분석그래프 (채널1 : 화합물1, 채널2 : 미토트랙커 딥레드) 및 (e) RO1(관심영역)의 형광강도 프로파일(짙은회색 : 화합물 1, 빗금표시 : 미토트랙커딥레드, 스케일바 : 20 μm, 피어슨계수(Pearson's coefficient) : 0.81±0.02)을 나타낸 것이다.

[40] 도 11은, 본원의 일 실시예에 있어서, HeLa 세포를 10 μM의 화합물 1과 1 μM의 ER(endoplasmic reticulum)-트랙커 레드 와 30 분 동안 배양하고, 공초점(confocal) 현미경을 이용하여 수득한 (a) 화합물 1에 의한 미토콘드리아의 형광이미징 (여기파장: 405 nm/ 방출파장: 490-590 nm), (b) ER-트랙커 레드에 의한 미토콘드리아의 형광이미징(여기파장: 559 nm/ 방출파장: 576-675 nm), (c) 화합물 1과 ER-트랙커 레드에 의한 미토콘드리아의 병합 형광이미징 (d) 화합물1과 ER-트랙커 레드의 코로칼라이제이션 분석그래프(채널1 : 화합물 1, 채널2 : ER-트랙커 레드) 및 (e) RO1(관심영역)의 형광강도 프로파일(짙은회색 : 화합물 1, 빗금표시 : ER-트랙커 레드, 스케일바: 20 μm, 피어슨계수 : 0.85±0.01)을 나타낸 것이다.

[41] 도 12는, 본원의 일 실시예에 있어서, HeLa세포를 10 μm의 화합물 1과 50 nM의 미토트랙커 딥레드로 30 분 동안 착색(co-stained)하고, 공초점(confocal) 현미경으로 수득한 (a) 위: 화합물 1에 의한 미토콘드리아의 형광이미징, 아래: 미토트랙커 딥레드에 의한 미토콘드리아의 형광이미징 (스케일바 : 20 μm)이며, (b) 스캔 횟수에 따른 미토콘드리아의 형광강도 프로파일(짙은회색 : 화합물1, 빗금표시 : 미토트랙커 딥레드)을 나타낸 것이다.

[42] 도 13은, 본원의 일 실시예에 있어서, 여러 농도의 화합물 1로 24시간 동안 처리한 HeLa 세포를 MTT를 포함하는 배지에서 4 시간 동안 배양한 후 수득한 화합물 1의 농도에 따른 세포의 생존능력 (cell viability)을 나타낸 것이다.

[43] 도 14a는, 본원의 일 실시예에 있어서, DMSO 용액에서 3 μM의 화합물 1 및 여러 종류의 단백질을 각각 0.5 시간과 1.5 시간 동안 배양한 후, 측정한 형광강도 프로파일 (슬릿 : 10 nm × 20 nm, 여기파장 : 410 nm)을 나타낸 것이다.

[44] 도 14b는, 본원의 일 실시예에 있어서, DMSO 용액에서 3 μM의 화합물 1 및 여러 종류의 단백질을 0.5 시간 동안 배양한 후 측정한 각 단백질 및 조건별 형광강도 프로파일(슬릿 : 10 nm × 20 nm, 여기파장 : 410 nm)을 나타낸 것이다.

[45] 도 14c는, 본원의 일 실시예에 있어서, DMSO 용액에서 3 μM의 화합물 1 및 여러 종류의 단백질을 1.5 시간 동안 배양한 후 측정한 각 단백질 및 조건별 형광강도 프로파일(슬릿 : 10 nm × 20 nm, 여기파장 : 410 nm)을 나타낸 것이다.

[46] 도 14d는, 본원의 일 실시예에 있어서, DMSO 용액에서 3 μM의 화합물 1 및

여러 종류의 단백질을 각각 0.5 시간과 1.5 시간 동안 배양한 후 측정한 형광이미징 (여기파장 : 410 nm)을 나타낸 것이다.

[47] 도 15a는, 본원의 일 실시예에 있어서, 화합물 1과 HSA 단백질을 여러pH의 버퍼용액에서 각각 배양한 후 측정한 형광강도 프로파일을 나타낸 것이다.

[48] 도 15b는, 본원의 일 실시예에 있어서, 화합물 1과 HSA 단백질을 여러pH의 버퍼용액에서 각각 배양한 후 측정한 형광이미징 (① 레퍼런스 MES 버퍼, pH 5.5; ② HSA을 포함한 MES 버퍼, pH 5.5; ③ HSA를 포함한 PBS 버퍼, pH 5.5; ④ 레퍼런스 PBS 버퍼, pH 7.5; ⑤ HSA를 포함한 PBS 버퍼, pH 7.5; ⑥ 레퍼런스 Tris 버퍼, pH 8.5; ⑦ HSA을 포함한 Tris 버퍼, pH 8.5; 및 ⑧ HSA을 포함한 PBS 버퍼, pH 8.5)을 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[49] 아래에서는 첨부한 도면을 참조하여 본원이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본원을 명확하게 설명하기 위해서 설명과 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.

[50] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 다른 부분과 "연결"되어 있다고 할 때, 이는 "직접적으로 연결"되어 있는 경우뿐 아니라, 그 중간에 다른 소자를 사이에 두고 "전기적으로 연결"되어 있는 경우도 포함한다.

[51] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.

[52] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~ 를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[53] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합(들)"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[54] 본원 명세서 전체에서, "A 및/또는 B"의 기재는 "A 또는 B, 또는 A 및 B"를

의미한다.

[55] 본원 명세서 전체에서, 용어 "알킬(기)"은, 각각 선형 또는 분지형의 포화 또는 불포화의 C_{1-20} 알킬(기)을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵실, 옥틸, 노닐, 데실, 운데실, 도데실, 트리데실, 테트라데실, 펜타데실, 헥사데실, 헵타데실, 옥타데실, 노나데실, 에이코사닐, 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[56] 본원 명세서 전체에서, 용어 "알케닐(기)"는 상기 정의된 알킬(기) 중 탄소수 2 이상의 알킬(기)에 적어도 하나의 탄소-탄소 이중 결합이 포함된 형태의 1 가의 탄화수소기를 의미하는 것으로서, 선형 또는 분지형의 C_{2-20} 알케닐(기)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[57] 본원 명세서 전체에서, 용어 "알키닐(기)"은, 상기 정의된 알킬(기) 중 탄소수 2 이상의 알킬(기)에 적어도 하나의 탄소-탄소 삼중 결합이 포함된 형태의 1 가의 탄화수소기를 의미하는 것으로서, 선형 또는 분지형의 C_{2-20} 알키닐(기)을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[58] 본원 명세서 전체에서, 용어 "아릴(기)"은, 아렌(arene)의 하나 이상의 고리에 존재하는 수소 원자의 제거에 의해 형성되는 1 가의 작용기를 의미하며, 예를 들어 페닐, 바이페닐, 터페닐 (terphenyl), 나프틸 (naphthyl), 안트릴 (anthryl), 페난트릴 (phenanthryl), 피레닐 (pyrenyl), 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 아렌은 방향족 고리를 가지는 탄화수소기로서, 단일환 또는 복수환 탄화수소기를 포함하며, 상기 복수환 탄소수소기는 하나 이상의 방향족 고리를 포함하고, 부가적인 고리로서 방향족 고리 또는 비방향족 고리를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[59] 본원 명세서 전체에서, 용어 "시클로알킬(기)"은 포화 탄화수소 고리를 가지는 1 가의 작용기의 형태로서, C_{3-8} 시클로알킬(기)을 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵실, 시클로옥틸 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[60] 본원 명세서 전체에서, 용어 "알콕시(기)"는 상기 정의된 알킬기와 산소 원자가 결합된 형태로서, C_{1-20} 알콕시(기)를 포함하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 부톡시, 펜톡시, 헥실옥시, 헵실옥시, 옥틸옥시, 노닐옥시, 데실옥시, 운데실옥시, 도데실옥시, 트리데실옥시, 테트라데실옥시, 펜타데실옥시, 헥사데실옥시, 헵타데실옥시, 옥타데실옥시, 노나데실옥시, 에이코사닐옥시, 또는 이들의 가능한 모든 이성질체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

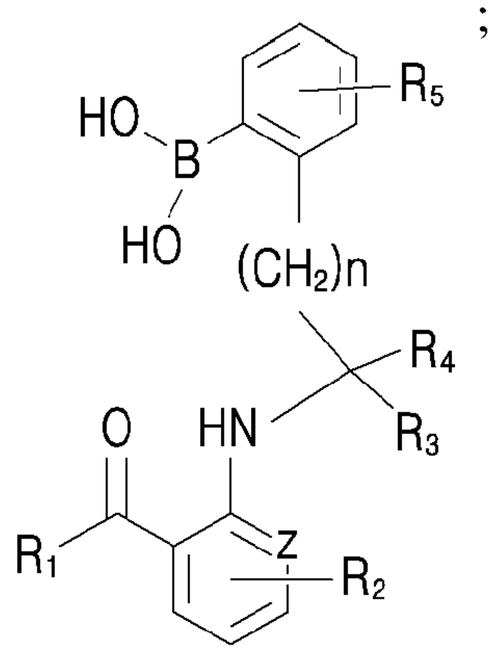
[61] 본원 명세서 전체에서, 용어 "할로기"는 주기율표의 17 족에 속하는 할로겐 원소가 작용기의 형태로서 화합물에 포함되어 있는 것을 의미하는 것으로서,

상기 할로겐 원소는, 예를 들어 F, Cl, Br, 또는 I일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[62] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본원의 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되지 않을 수 있다.

[63] 본원의 제 1 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는, 세포 이미징 조성물을 제공한다:

[64] **[화학식1]**

[65] 
;

[66] 상기 화학식 1에서,

[67] R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며,

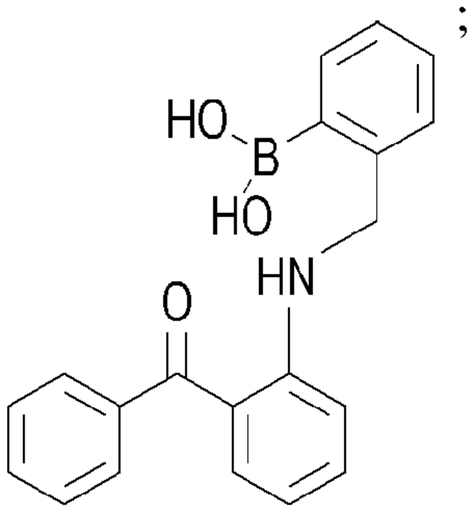
[68] 상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

[69] 상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;

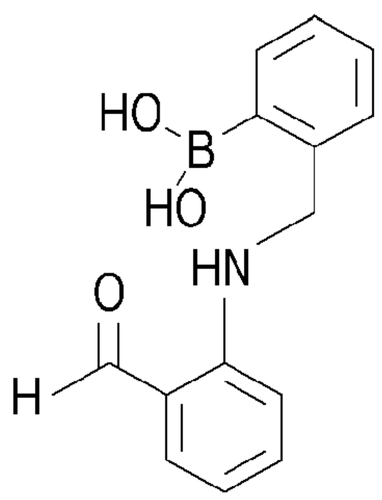
[70] 상기 n은 0 내지 5의 정수임.

[71] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 프로브 화합물은 하기의 화합물 중 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다:

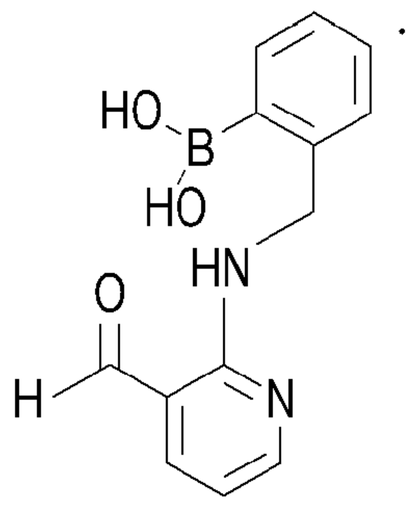
[72] **[화합물 1]**

[73] 
;

[74] **[화합물 2]**

[75]  ; 및

[76] **[화합물 3]**

[77]  .

[78] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물은 살아 있는 세포 내 물질을 이미징하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[79] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물은 상기 프로브가 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하여 상기 세포 내 물질을 이미징하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 내 물질은 세포 물질 또는 세포 기관을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[81] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 내 물질은 세포질, 미토콘드리아, 단백질, 또는 생체 분자를 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[82] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 내 물질은 미토콘드리아, DNA, 골기체, 레티컬럼, 라이소좀, 단백질, Hg^{2+}, Cu^{2+}, ATP, 아미노산, 또는 ROS(활성산소)을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[83] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 기관이 미토콘드리아 및/또는 단백질을 포함함으로써 줄기세포, 소포체, 또는 암세포가 이미징되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[84] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 세포 내 미토콘드리아 및/또는 단백질을 이미징하여, 줄기세포, 소포체, 또는 암세포 등의 형광 이미징에 사용될 수 있으며, 이에 따라, 질병 (특히, 종양성 질환 또는 암)의 진단 및/또는 치료에 활용될 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 pH 조건 등 환경 설정에 따라 다양한 단백질을 선택적으로 센싱할 수 있으며, 상기 세포

이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법이 적용됨에 있어서 실험 및/또는 배양 환경에 따라 센싱할 수 있는 단백질의 종류는 확장될 수 있으므로, 단백질의 종류에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[85] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 상기 단백질 중 HSA를 형광 이미징함에 있어서 우수한 효과를 나타내며, HSA에 대한 월등한 형광 강도 및 선택성을 나타내어, HSA를 포함하는 세포를 선택적으로 센싱할 수 있다.

[86] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물로 상기 HSA를 선택적으로 형광 이미징하기 위한 적정 pH 범위는 약 pH 7 내지 약 pH 11 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 pH 범위는 약 pH 7 내지 약 pH 11, 약 pH 7 내지 약 pH 10, 약 pH 7 내지 약 pH 9, 약 pH 7 내지 약 pH 8.5, 약 pH 7.5 내지 약 pH 11, 약 pH 7.5 내지 약 pH 10, 약 pH 7.5 내지 약 pH 9, 또는 약 pH 7.5 내지 약 pH 8.5일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물로 상기 HSA를 선택적으로 형광 이미징 하기 위한 적정 pH 범위는 약 pH 7.5 내지 약 pH 8.5일 수 있다.

[87] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 물질 또는 세포 기관의 형광 이미징 방법에 있어서, 상기 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 또는 그의 유도체가 상기 미토콘드리아를 형광 이미징하는 메커니즘은 상기 미토콘드리아 막에 존재하는 포스파티딜-에탄올아민과의 반응에 의해 생성되는 형광발색단 때문인 것으로 추정된다.

[88] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물을 세포에 처리할 경우 미토콘드리아 기관에서 특정한 형광을 발생하는 성질을 보여주고 있으므로 미토콘드리아의 형태, 미토콘드리아의 활성을 파악하는 프로브로 사용할 수 있다.

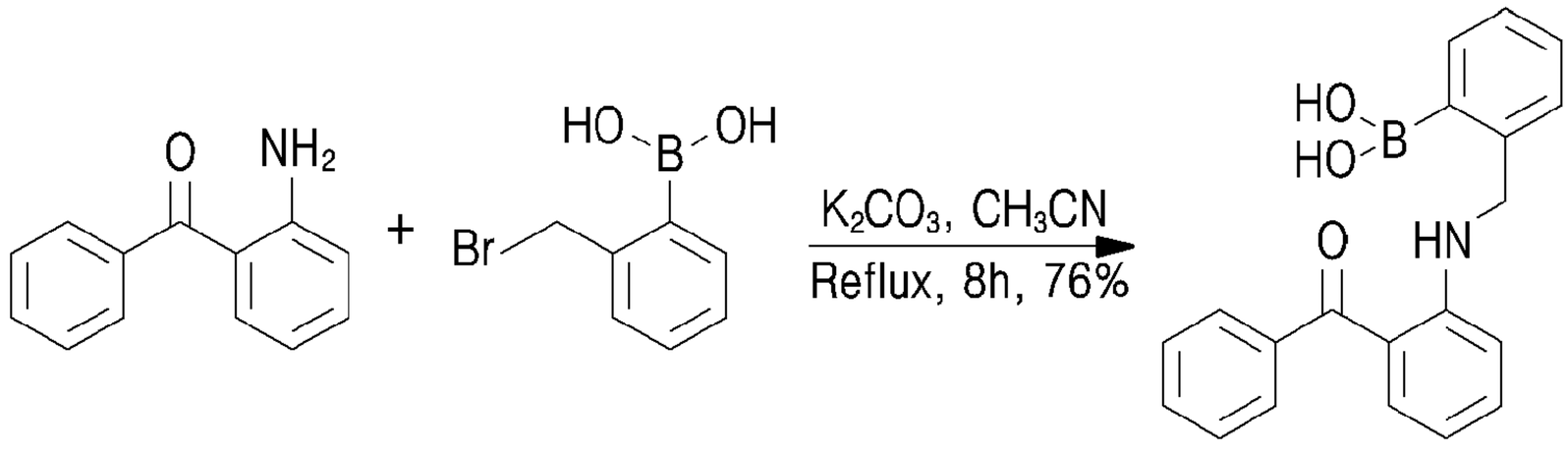
[89] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 내 물질은 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물을 포함하는 아미노산, 핵산 염기, 아미노산 에스터, 아미노산 아마이드 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 생체물질을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[90] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 프로브 화합물은 상기 세포 내 물질에 포함된 상기 아민 화합물에 포함된 아미노기와 이민 결합을 형성하고 상기 프로브 화합물에 포함된 보론(B)이 상기 프로브 화합물에 포함된 질소(N) 원자와 상기 아민 화합물에 포함된 질소(N) 원자를 연결하여 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리를 포함하는 형광발색단을 in-situ 형성하는 것이고, 상기 형광발색단을 이용하여 형광 및 원편광 이색성(Circular dichroism, CD)가 각각 또는 동시에 분석될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[91] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물 1을 합성하는 방법은 본 기술분야에 공지된 방법을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 하기 반응식 1의 방법으로 합성할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

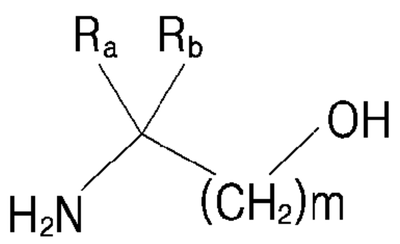
[92] **[반응식 1]**

[93]



[94] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물은 하기 화학식 2로서 표시되는 아민 화합물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[95] **[화학식 2]**

[96]  ;

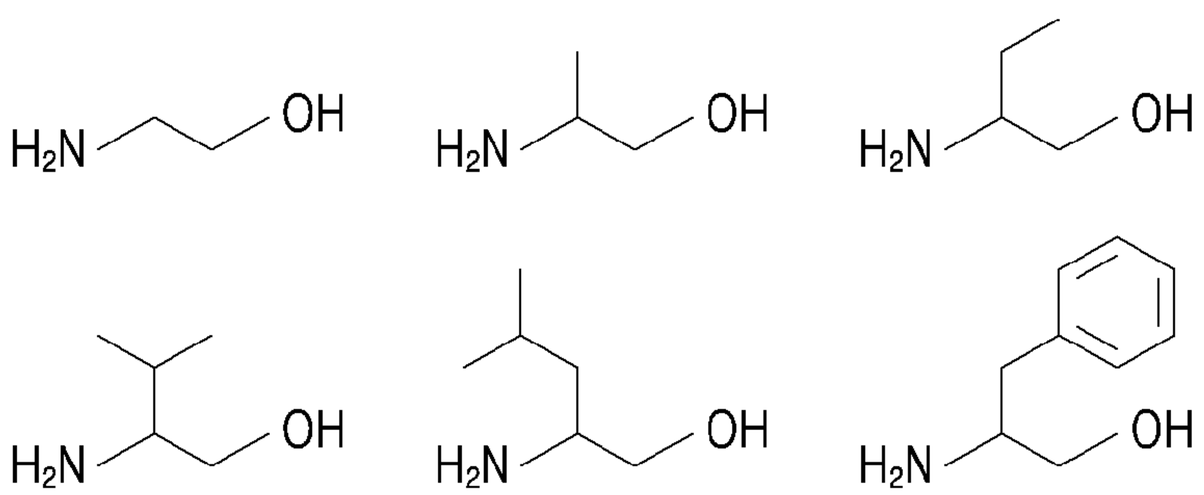
[97] 상기 화학식 2에서,

[98] R_a 및 R_b는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며,

[99] 상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

[100] 상기 m은 0 내지 5의 정수임.

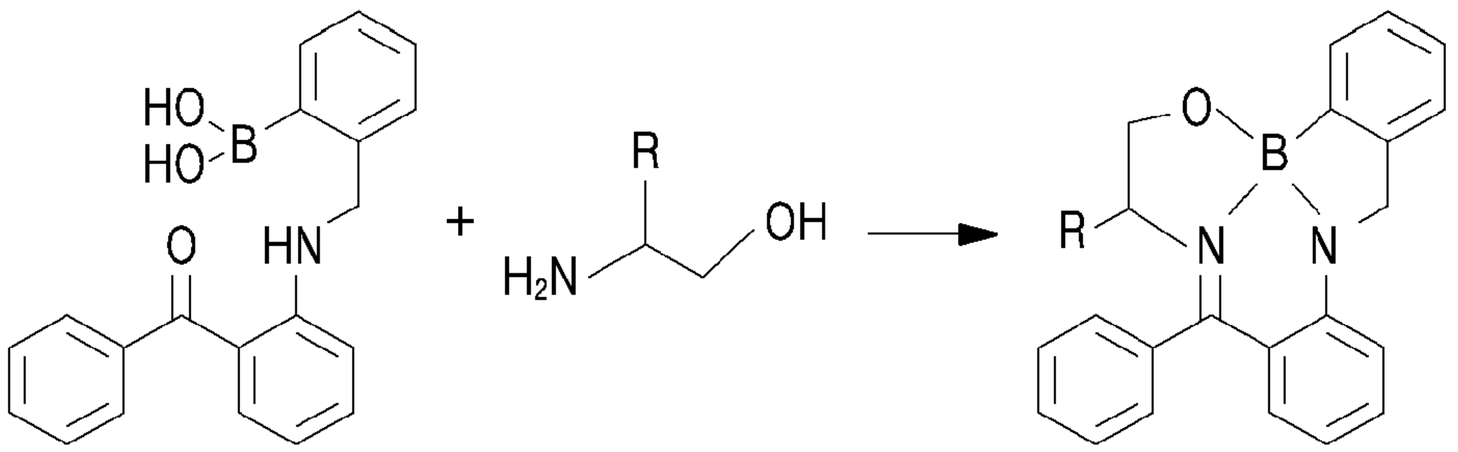
[101] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 아민 화합물은 하기 화합물들 중 하나 이상을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[102] 

[103] 본원의 일 구현예에 있어서, 카보닐기(C=O), 보레이트기(-$B(OH)_2$) 및 아민기를 가지고 있는 상기 화학식 1의 화합물은 그 자체로는 형광발색단이 없어 형광신호를 만들어내지 못하지만, 하기 반응식 2에 나타낸 것과 같이, 상기 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물과 이민 결합함으로써 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리를 형성하여 형광신호를 만들어낼 수 있다. 예를 들어,

카보닐기(C=O), 보레이트기(-$B(OH)_2$) 및 아민기를 가지고 있는 상기 화학식 1에 따른 화합물 1은 그 자체로는 형광발색단이 없어 형광신호를 만들어내지 못하지만, 하기 반응식 2에 나타낸 것과 같이, 상기 화합물 1과 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물이 이민 결합함으로써 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리를 형성하여 형광신호를 만들어낼 수 있다 (도 1).

[104] **[반응식 2]**

[105] 

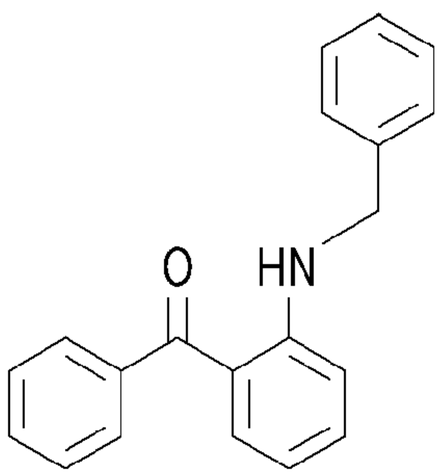
형광 없음
CD 없음

강한 형광
강한 CD

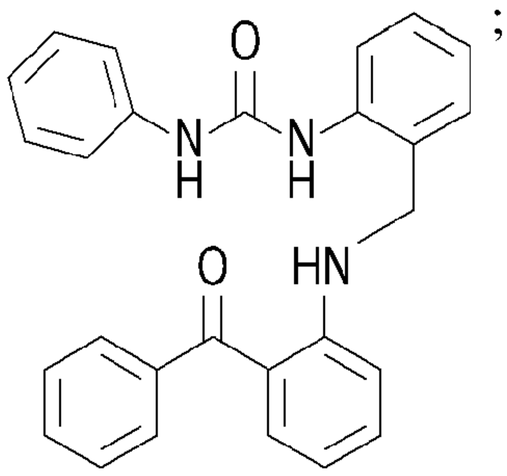
[106] 즉, 상기 화합물 1은 상기 반응식 2처럼 아미노알코올과 이민 결합을 하고, 보론이 N과 N을 연결함으로써 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리를 가지는 형광발색단을 만들어 형광신호를 발생할 수 있다. 이러한 방식으로 아미노알코올로부터 형광을 만들어 내는 것은 이제까지 어떤 문헌에서도 보고된 바가 없는 신규한 것이다. 즉, 상기 화학식 1에 따른 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 또는 그의 유도체는 각종 아민기와 반응하여 이민을 형성할 수 있는 작용기인 카르보닐기(C=O)를 가지고 있고, 또한 상기 이민을 형성하기 위한 보론산기(-$B(OH)_2$)도 포함하고 있다.

[107] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물의 카보닐기(C=O)와 보론산기(-$B(OH)_2$) 및 아미노알코올이 상기 반응식 2에서 보여준 것과 같은 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리 구조를 가지는 부가물(adduct)을 만들어낸다는 것은, 상기 화합물 1과 같은 상기 화학식 1의 화합물과 에탄올아민의 반응에서 보여주는 HRMS 데이터 및 ^{11}B NMR, ^{1}H NMR, ^{13}C NMR등의 데이터로부터 예측할 수 있다 (도 2 내지 도 4).

[108] 한편, 상기 화합물 1과 유사하지만 보론산[boric acid(-$B(OH)_2$)] 기능기가 없는 하기 비교화합물 1과 비교화합물 2의 경우, 카보닐기(C=O)를 가지고 있지만 일반적인 상온 조건에서는 아미노알코올과 이민형성 반응을 하지 못하므로 (도 5), 형광 신호나 CD신호를 만들어내지 못한다. 상기 비교화합물 2의 유릴기는 보론산과 같은 루이스 산으로서의 성질을 가지고 있으나 아미노알코올과 반응하지 못하는 것으로 보아 상기 화합물 1의 보론산이 이민 형성 및 N-B-N 헤테로 고리 형성에 특별한 역할을 하는 것을 알 수 있다.

[109] 

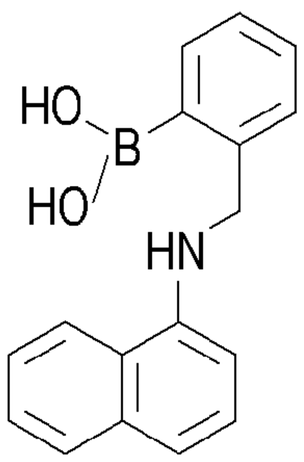
<비교화합물 1>



;

<비교화합물 2>

[110] 또한, 하기 비교화합물 3의 경우 나프틸아민기의 형광발색단을 가지고 있지만, 일반적인 조건에서는 N에 존재하는 비공유전자쌍에 의해 형광이 퀜칭(quenching)된 상태로 있으며, 상기 아미노알코올의 존재 하에서도 의미있는 형광이나 CD 변화를 만들어내지 못하였다. 따라서 상기 화합물 1이 아미노알코올의 존재 하에서 형광이나 CD를 만들어내는 것은 N-B-N 헤테로고리 형성과 밀접한 관련이 있음을 알 수 있다.

[111] 

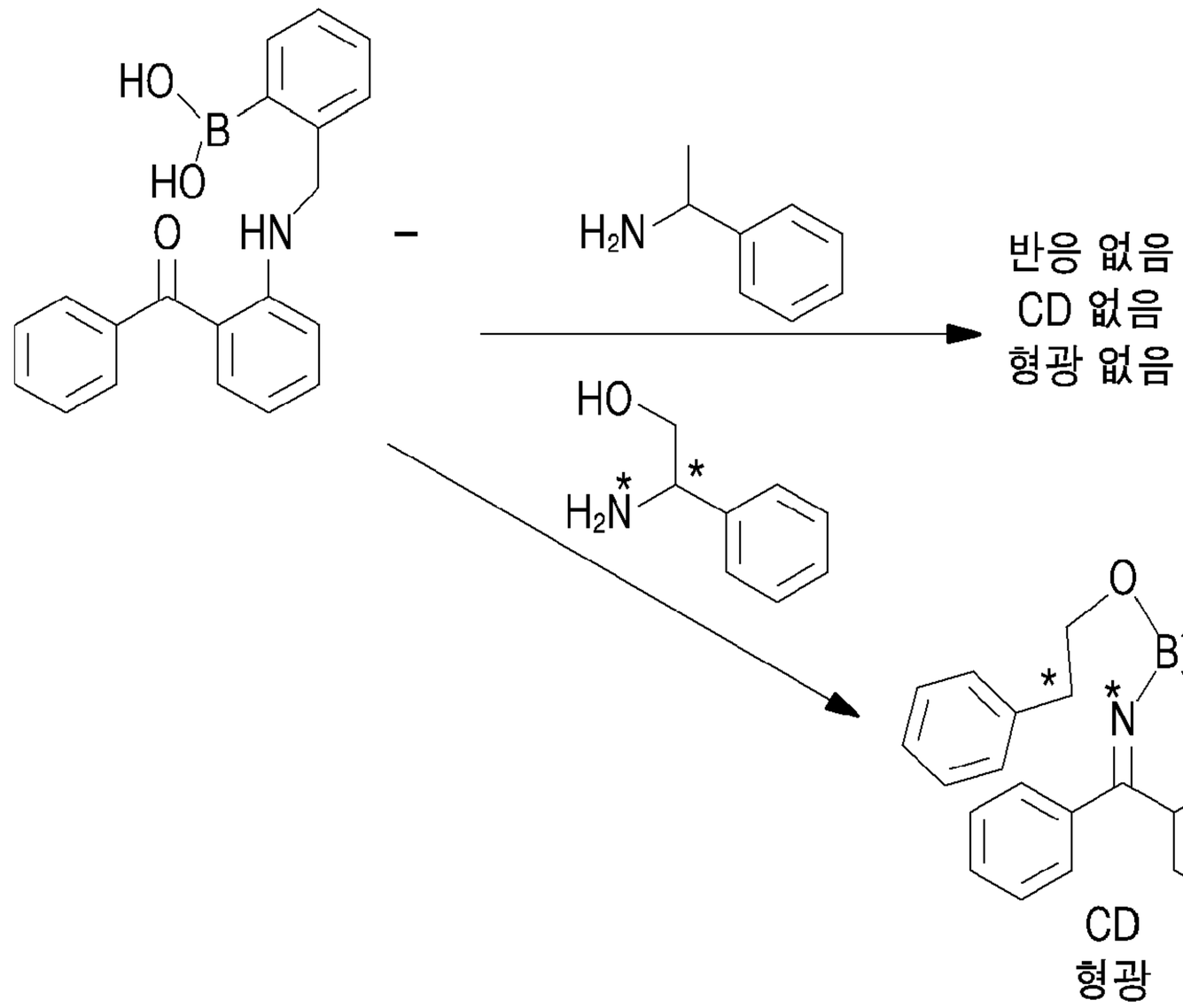
;

<비교화합물 3>

[112] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화합물 1은 보론과 상호 결합할 수 있는 -OH나 -NH와 같은 기능기가 추가적으로 존재하지 않는 아민과는 이민을 형성하지 않는다. 예를 들면 메틸아민, 에틸아민, 페닐에틸아민 등과는 일반적인 상온 조건에서는 반응하지 않는다. 결과적으로 상기 화합물 1은 -OH나 -NH와 같은 기능기를 추가적으로 가지는 아민 화합물과 그렇지 않은 아민 화합물을 구별할 수 있다 (반응식 3).

[113] **[반응식 3]**

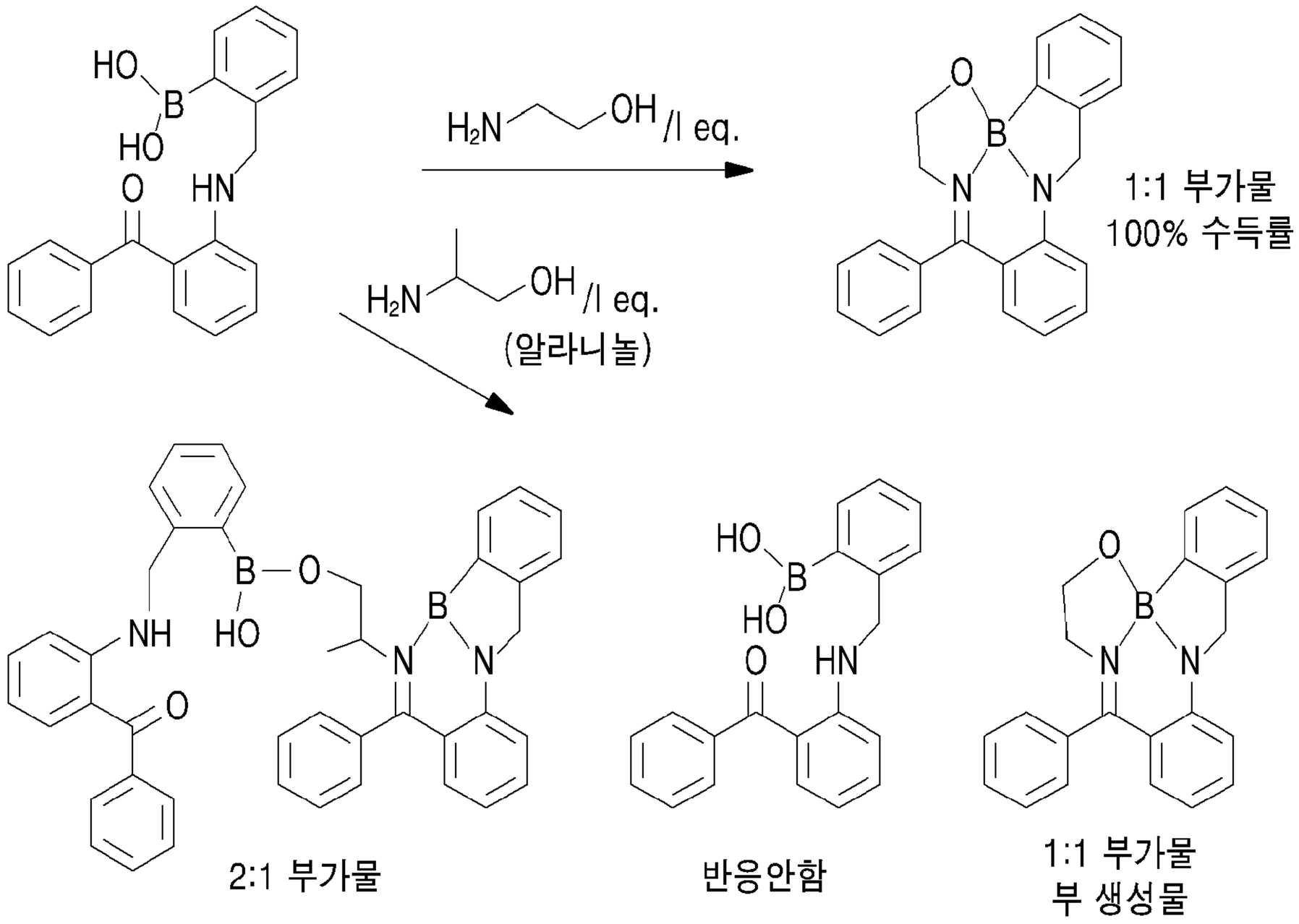
[114]



[115] 본원의 일 실시예에 있어서, 상기 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물의 종류에 따라 형광도 다소 다르게 나타나므로, 상기 화합물 1을 프로브 화합물로서 사용할 경우 기질의 종류까지도 구별할 수 있다는 것을 보여준다 (반응식 4).

[116] **[반응식 4]**

[117]

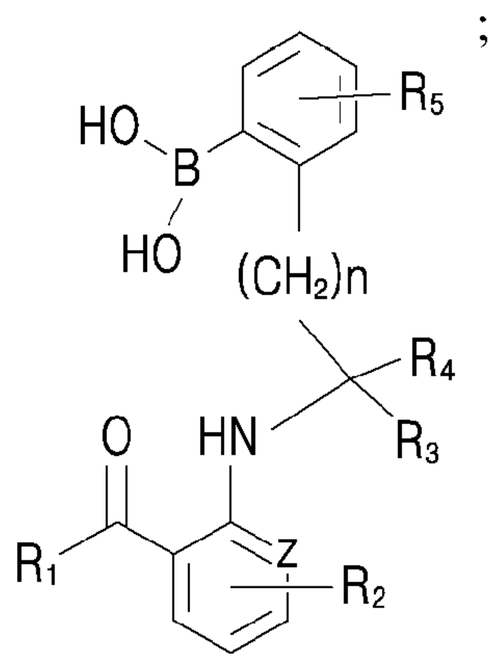


[118] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 자체적으로 형광발색단을 가지고 있지 않지만, 상기 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물과 반응하여 형광발색단을 만든다. 결과적으로, 상기 아민 화합물 내에 아미노알코올 부분이 존재할 때와 존재하지 않을 때 형광의 세기가 매우 커다란 차이가 난다. 따라서, 이러한 결과는 상기 화학식 1의 화합물이 형광센서로서 매우 유용함을 말한다.

[119] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 또는 그의 유도체와 반응하여 형광신호를 만들어낼 수 있는 기질로는 상기 화학식 2로 표현되는 아미노알코올을 포함하며, 아미노산, 핵산 염기, 아미노산 에스터, 아미노산 아마이드 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 생체물질을 의미한다.

[120] 본원의 제 2 측면은, 하기 화학식 1로서 표시되는, 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체인 형광 프로브 화합물이 표적 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하는 것을 포함하는, 세포 물질 이미징 방법을 제공한다:

[121] **[화학식1]**

[122] 
;

[123] 상기 화학식 1에서,

[124] R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며;

[125] 상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

[126] 상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;

[127] 상기 n은 0 내지 5의 정수임.

[128] 본원의 제 1 측면과 중복되는 부분들에 대해서는 상세한 설명을 생략하였으나, 본원의 제 1 측면에 대해 설명한 내용은 본원의 제 2 측면에서 그 설명이

생략되었더라도 동일하게 적용될 수 있다.

[129] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 세포는 살아 있는 세포인 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[130] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 물질 이미징 방법은 상기 프로브 화합물이 상기 표적 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하여 상기 표적 세포 내 물질의 이미지를 수득하는 것을 추가 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[131] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 세포 내 물질은 세포 물질 또는 세포 기관을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[132] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 세포 내 물질은 세포질, 미토콘드리아, 단백질, 또는 생체 분자를 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[133] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 세포 내 물질은 미토콘드리아, DNA, 골기체, 레티컬럼, 라이소좀, 단백질, Hg^{2+}, Cu^{2+}, ATP, 아미노산, 또는 ROS (활성산소)을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[134] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 기관이 미토콘드리아 및/또는 단백질을 포함함으로써 줄기세포, 소포체, 또는 암세포가 이미징되는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[135] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 세포 내 미토콘드리아 및/또는 단백질을 이미징하여, 줄기세포, 소포체, 또는 암세포 등의 형광 이미징에 사용될 수 있으며, 이에 따라, 질병 (특히, 종양성 질환 또는 암)의 진단 및/또는 치료에 활용될 수 있다. 본원의 일 구현예에 따르면, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법은 pH 조건 등 환경 설정에 따라 다양한 단백질을 선택적으로 센싱할 수 있으며, 상기 세포 이미징 조성물 및 상기 세포 물질 이미징 방법이 적용됨에 있어서 실험 및/또는 배양 환경에 따라 센싱할 수 있는 단백질의 종류는 확장될 수 있으므로, 단백질의 종류에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[136] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 상기 단백질 중 HSA를 형광 이미징함에 있어서 우수한 효과를 나타내며, HSA에 대한 월등한 형광 강도 및 선택성을 나타내어, HSA를 포함하는 세포를 선택적으로 센싱할 수 있다.

[137] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물로 상기 HSA를 선택적으로 형광 이미징하기 위한 적정 pH 범위는 약 pH 7 내지 약 pH 11 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 상기 pH 범위는 약 pH 7 내지 약 pH 11, 약 pH 7 내지 약 pH 10, 약 pH 7 내지 약 pH 9, 약 pH 7 내지 약 pH 8.5, 약 pH 7.5 내지 약 pH 11, 약 pH 7.5 내지 약 pH 10, 약 pH 7.5 내지 약 pH 9, 또는 약 pH 7.5 내지 약 pH 8.5일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 이미징 조성물로 상기 HSA를 선택적으로 형광이미징 하기 위한 적정 pH 범위는 약 7.5 내지 약 8.5일 수 있다.

[138] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 세포 물질 또는 세포 기관의 형광 이미징

방법에 있어서, 상기 1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산 또는 그의 유도체가 상기 미토콘드리아를 형광 이미징하는 메커니즘은 상기 미토콘드리아 막에 존재하는 포스파티딜-에탄올아민과의 반응에 의해 생성되는 형광발색단 때문인 것으로 추정된다.

[139] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물을 세포에 처리할 경우 미토콘드리아 기관에서 특정한 형광을 발생하는 성질을 보여주고 있으므로 미토콘드리아의 형태, 미토콘드리아의 활성을 파악하는 프로브로 사용할 수 있다.

[140] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 표적 세포 내 물질은 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물을 포함하는 아미노산, 핵산 염기, 아미노산 에스터, 아미노산 아마이드 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 생체물질을 포함하는 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[141] 본원의 일 구현예에 있어서, 상기 프로브 화합물은 상기 세포 내 물질에 포함된 상기 아민 화합물에 포함된 아미노기와 이민 결합을 형성하고 상기 프로브 화합물에 포함된 보론(B)이 상기 프로브 화합물에 포함된 질소(N) 원자와 상기 아민 화합물에 포함된 질소(N) 원자를 연결하여 N-B-N 결합-함유 헤테로 고리를 포함하는 형광발색단을 in-situ 형성하는 것이고, 상기 형광발색단을 이용하여 형광 및 원편광 이색성 (Circular dichroism, CD)가 각각 또는 동시에 분석될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

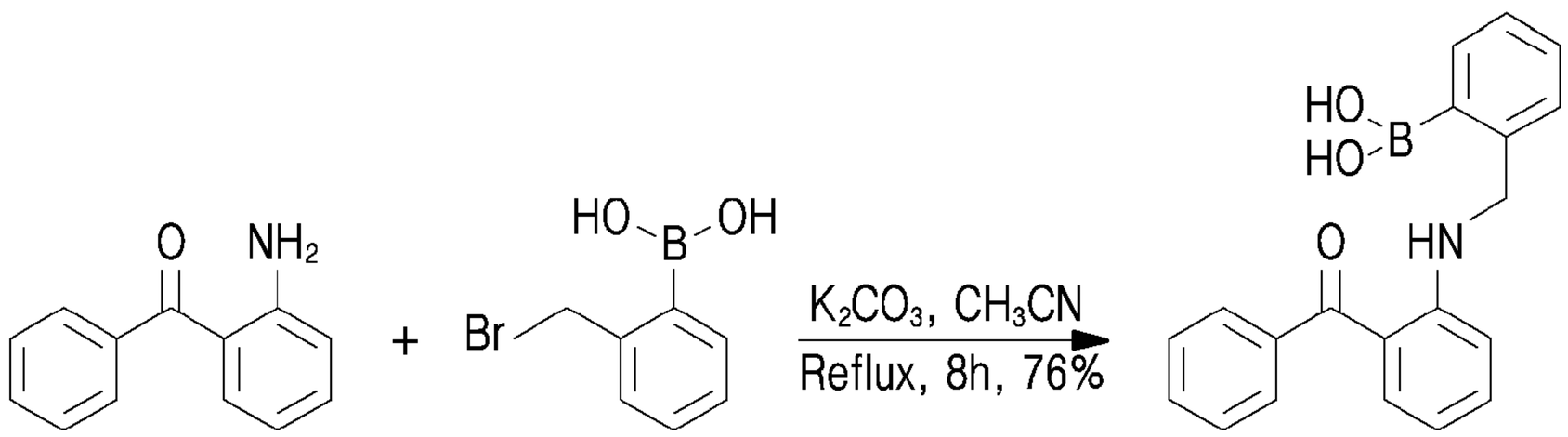
[142] 이하, 본원의 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 본원의 이해를 돕기 위하여 예시하는 것 일뿐, 본원의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[143] **[실시예]**

[144] **<실시예 1: 화합물 1의 합성>**

[145]



화합물 1

[146] 2-아미노벤조페논(2-Aminobenzophenone) (2.00 g, 10.1 mmol), 2-브로모메틸페닐 보론산(2-bromomethylphenyl boronic acid) (2.59 g, 12.1 mmol), 탄산 칼륨(potassium carbonate) (1.39 g, 10.1 mmol)을 아세토니트릴 용매(15 mL)에 넣고 8 시간 동안 환류(reflux)시켰다. 반응 용액을 증발기(evaporator)를 사용하여 건조시킨 후 곧바로 EA/헥산 (1/4) 전개제를 사용하여 실리카 컬럼으로

화합물 1 (2.5 g, 7.6 mmol)을 수득하였다.

[147] 수율: 76%. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 7.64-7.61(m, 1H), 7.60-7.59(m, 1H), 7.58-7.55(m, 2H), 7.53-7.52(m, 1H), 7.51-7.47(m, 1H), 7.43-7.39(m, 2H), 7.38-7.33(m, 2H), 7.30-7.25(m, 1H), 6.88(d, 1H, 9Hz), 6.59-6.54(m, 1H), 4.65(s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$): 199.58, 151.38, 143.75, 140.62, 135.42, 135.20, 134.56, 131.24, 129.91, 129.11, 128.39, 128.01, 126.77, 114.63, 112.68, 46.99. HRMS (EI): $C_{20}H_{19}N_1O_1B_1$ $[M+H]^+$에 대한 계산치: 332.1850; 실측치: 332.2168.

[148] **<실시예 2: 화합물 1과 아미노알코올 혼합물의 형광 스펙트럼 측정>**

[149] 사용 기기: Scinco FS-2

[150] 화합물 1의 농도: 1.5 mM

[151] 결과 도 1.

[152] 도 1의 형광스펙트럼을 참조하면, 화합물 1을 프로브로 사용하였을 때의 형광스펙트럼 변화를 알 수 있다: (a) 화합물 1 + 에탄올아민, (b) 화합물 1 + 알라니놀(alaninol), (c) 화합물 1 + 페닐알라니놀, (d) 화합물 1 + 아미노부타놀, (e) 화합물 1 + 발리놀(valinol), (f) 화합물 1 + 류시놀(leucinol), (g) 화합물 1 + 트립토파놀(tryptophanol), (h) 비교 (화합물 1 + 알라니놀, 류시놀, 아미노부타놀, 페닐알라니놀) (생략될 수 있음).

[153] **<실시예 3: 화합물 1과 다른 아민들과의 반응 및 형광 스펙트럼 측정>**

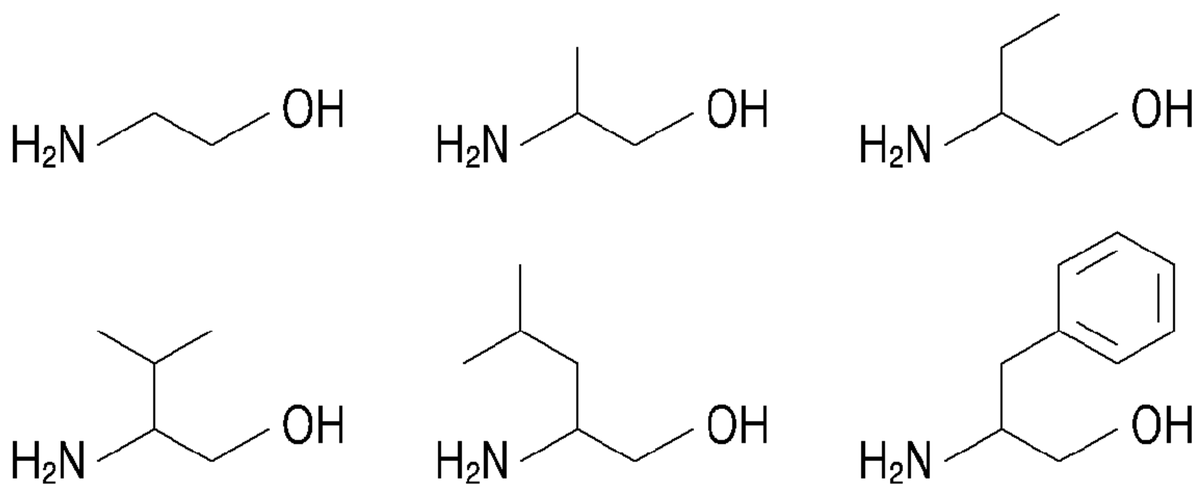
[154] 사용 기기, 농도 및 파라미터는 에탄올아민 및 알라니놀의 경우와 동일하다.

[155] 결과 도 1

[156] **<실시예 4: 화합물 1과 아미노알코올의 반응성 비교>**

[157] 상기 화합물 1 (30 mg)을 $CDCl_3$ 1 mL에 녹인 후 아미노알코올을 0.5 당량, 1 당량, 2 당량, 5 당량, 및 10 당량씩 순차적으로 첨가하고 그 때 마다 30 분 저어준 후 ^{1}H NMR스펙트럼을 얻었다 (도 2a). 실험에 사용한 상기 아미노알코올은 하기와 같다:

[158]



[159] 비교예로서, 상기 비교화합물 1, 2, 및 3이 각각 녹아있는 바이알에는 아미노프로판올을 10 당량까지 첨가하여도 아무런 반응이 일어나지 않았다. 상기 비교화합물 1, 2, 및 3 각각과 아미노프로판올의 혼합물에 대하여 CD 및 형광을 측정하여 보았으나 역시 아무런 변화가 일어나지 않았다.

[160] 도 2를 참조하면, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물(adduct) 형성의 ^{1}H NMR 및 (b) 화합물 1의 ^{1}H NMR을 알 수 있다.

[161] 도 3을 참조하면, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물 형성의 ^{13}C NMR 및 (b) 화합물 1의 ^{13}C NMR을 알 수 있다.

[162] 도 4를 참조하면, (a) 화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:1 부가물 형성의 ^{11}B NMR 및 (b) 화합물 1의 ^{11}B NMR을 알 수 있다.

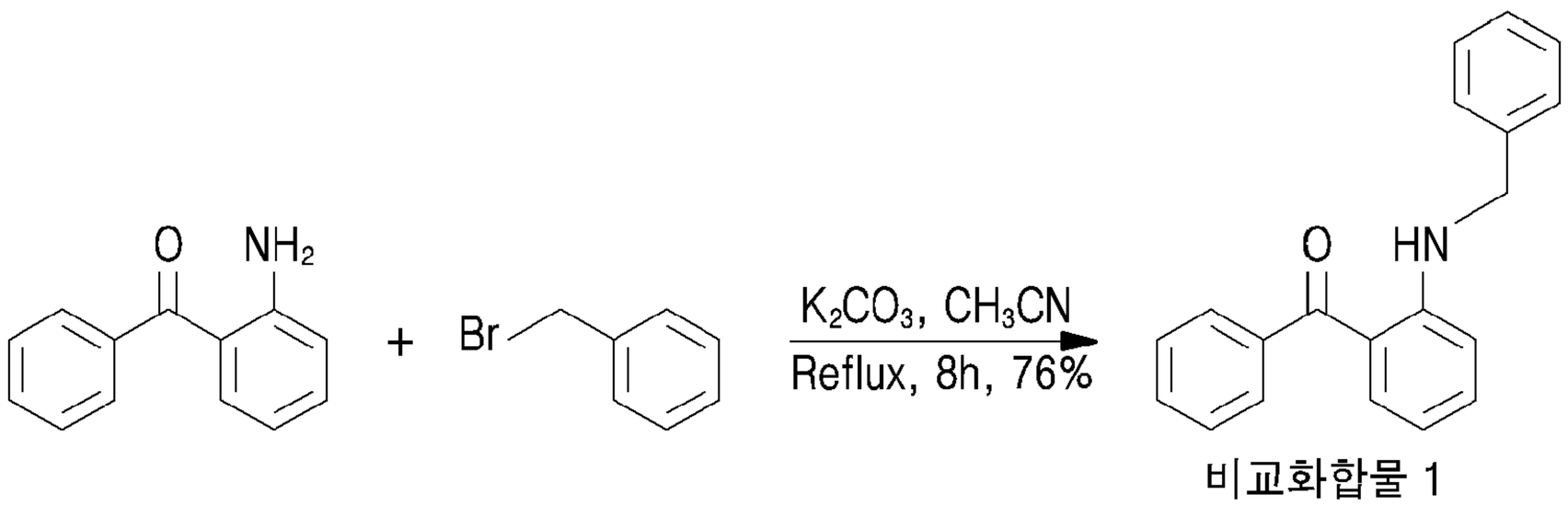
[163] 도 6을 참조하면, 상기 화합물 1과 알라니놀(=아미노프로파놀)의 반응에 대한, (a) 2:1 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (b) 1:1 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (c) 1:5 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (d) 화합물 1과 알라니놀의 당량변화에 따른 ^{11}B NMR, 및 (e) 화합물 1과 다른 아미노알코올의 반응에 대한 2:1 부가물 형성의 ^{1}H NMR을 알 수 있다. 1 당량의 알라니놀이 첨가되었을 때 에탄올아민의 경우와 달리 ^{1}H NMR이 매우 복잡한 형태를 보여준다.

[164] 상기 화합물 1은 아민기에 연결된 탄소의 입체적 성질에 따라 반응성의 차이를 보여준다. 에탄올아민의 경우 입체적 장애가 없기 때문에 상기 화합물 1과 매우 빠르게 1:1 부가물을 형성하지만 (도 2 내지 도 4), 알라니놀(alaninol)과 같은 경우 입체장애 때문에 1:1 부가물 대신에 2:1 (상기 화합물 1:알라니놀) 부가물이 잘 형성되며, 상기 알라니놀 당량을 높이면 1:1 내지 1:2 부가물이 형성된다 (도 6).

[165] 상기 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물의 종류에 따라 형광도 다소 다르게 나타나며, 특히 CD 스펙트럼이 상기 아미노알코올의 종류에 따라 서로 구별될 정도로 많은 차이를 보여준다. 이는 상기 화합물 1을 프로브로 사용할 경우 기질의 종류까지도 구별할 수 있다는 것을 보여준다 (상기 반응식 4).

[166] **<비교예 1: 비교화합물 1의 합성>**

[167]



비교화합물 1

[168] 2-아미노벤조페논(2-Aminobenzophenone) (0.10 g, 0.51 mmol), 벤질브로마이드(benzylbromide) (0.24 g, 1.4 mmol), 탄산 칼륨(potassium carbonate) (0.17 g, 1.2 mmol)을 아세토니트릴(1.5 mL)에 넣고 8 시간 동안 환류(reflux)시켰다. EA/헥산 (1/50)의 전개제를 사용하여 실리카 컬럼으로 화합물 2 (0.083 g, 0.29 mmol)을 수득하였다.

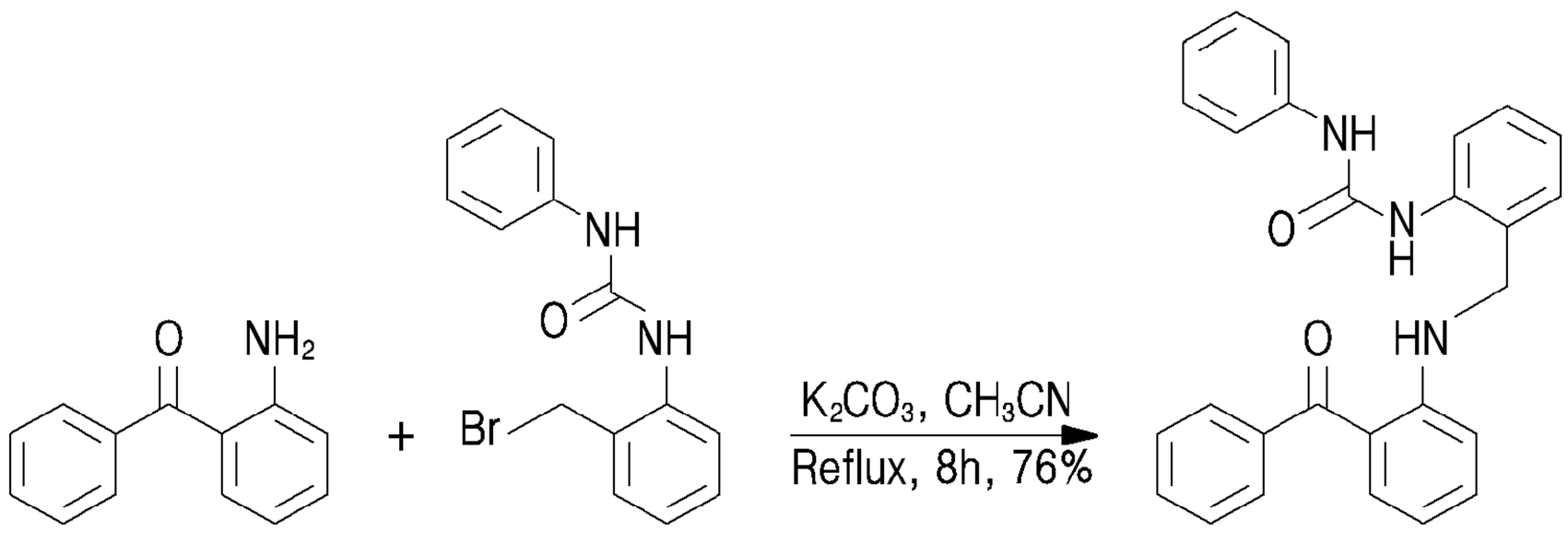
[169] 수율: 57%. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.11(t, J=3Hz, 1H), δ 7.72-6.59(m, 14H), δ 4.58(d, J=6Hz, 2H).

[170] 비교예로서, 도 5를 참조하면, (a) 비교화합물 1과 에탄올아민의 반응에 대한 1:5 부가물 형성의 ^{1}H NMR, (b) 비교화합물 1의 ^{1}H NMR, (c) 비교화합물 2와 에탄올아민의 반응에 대한 1:5 부가물 형성, 및 (d) 비교화합물 2의 ^{1}H NMR을 알

수 있다. 상기 화합물 1과 유사하지만 보론이 없는 비교화합물 1, 보론 대신 유릴기로 치환된 비교화합물 2, 및 아미노알코올 사이의 반응성을 나타내었다. 보론이 없는 경우 아미노알코올과 전혀 반응이 일어나지 않는다는 것을 알 수 있다. 상기 유릴기의 경우 상기 보론과 유사한 루이스산으로서의 성질을 가지지만 이민을 형성하는데 기여를 하지 못하는 것을 알 수 있다.

[171] **<비교예 2: 비교화합물 2의 합성>**

[172]



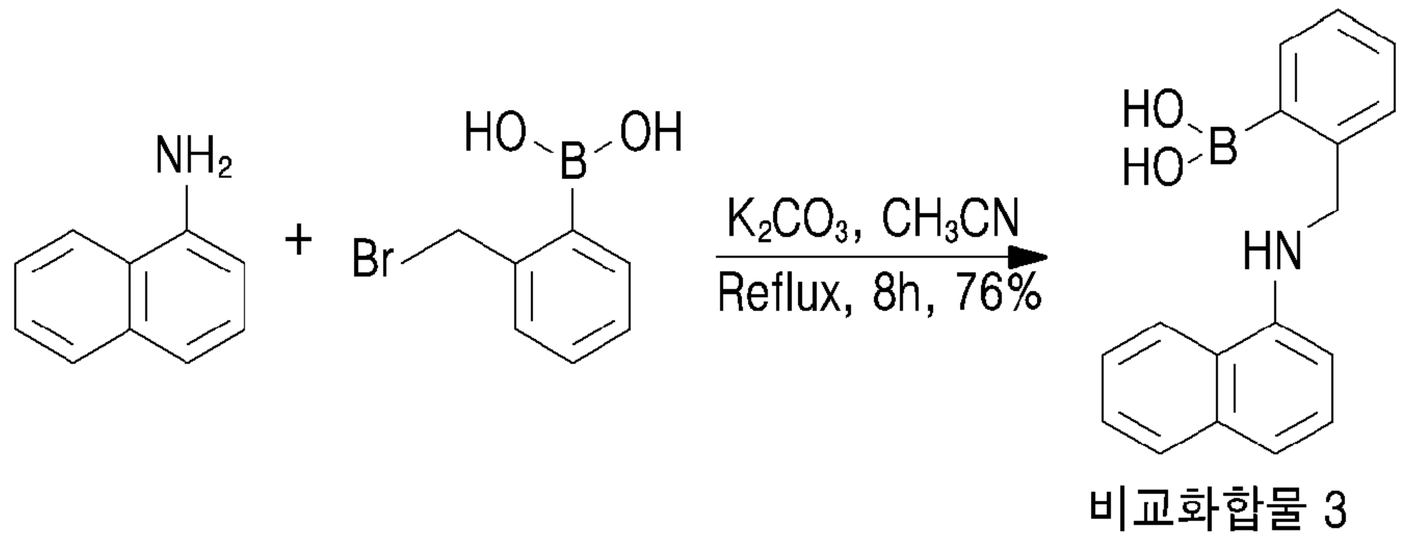
비교화합물 2

[173] 1-브로모메틸-2-페닐우릴벤젠(1-bromomethyl-2-phenylurylbenzene) (0.92 g, 3.0 mmol) 화합물과 탄산 칼륨(potassium carbonate) (0.41 g, 3.0 mmol)을 ACN (3 mL) 용액 하에서 2-아미노벤조페논(2-Aminobenzophenone) (0.50 g, 2.5 mmol)에 넣고, 85℃에서 8 시간 동안 교반하였다. 반응 후 TLC 테스트를 모니터링하였고, EA/헥산 (1:9) 전개제를 사용하여 실리카 컬럼 크로마토그래피로 비교화합물 2(0.60 mg, 1.4 mmol)를 수득하였다.

[174] 수율: 56%. ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.91(br, 1H), δ 7.62-6.57(m, 20H), δ 4.34(s, 2H).

[175] **<비교예 3: 비교화합물 3의 합성>**

[176]



비교화합물 3

[177] 2-(브로모메틸)페닐 보론산 [2-(bromomethyl)phenyl boronic acid] (0.150g, 0.70 mmol)과 탄산 칼륨(potassium carbonate) (0.19g, 1.37 mmol)을 ACN (1.5 mL) 용액 하에서 1-나프틸아민(1-Naphthylamine)(0.10 mg, 0.70 mmol)에 넣고, 실온에서 8 시간 동안 교반하였다. EA/헥산 (1:9) 전개제를 사용하여 실리카 컬럼으로 비교화합물 3(0.04g, 0.14mmol)을 수득하였다.

[178] 수율: 20%. ^{1}H NMR (300 MHz, CD_3CN): δ 7.98-6.79(m, 11H), δ 4.53(s, 2H).

[179] **<실시예 5: 화합물 1을 이용한 미토콘드리아의 형광 이미지 시험>**

[180] HeLa 세포를 30 분간 10 μM 프로브와 함께 배양하고 잔류 프로브를 제거하였다. 그 후 30 분 동안 (a) 0 μM, (b) 10 μM, (c) 100 μM, 및 (d) 1,000 μM의 에탄올아민을 첨가한 후, DPBS로 세척하여 공초점(confocal) 현미경에 의해 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타내었다 (여기파장: 405 nm/방출파장: 490 nm 내지 590 nm).

[181] 도 7을 참조하면, 아세토니트릴 용액에서 HeLa 세포를 30 분간 10 μM 프로브와 함께 배양하고, 잔류 프로브를 제거한 다음 30 분 동안 (a) 0 μM, (b) 10 μM, (c) 100 μM, 및 (d) 1,000 μM의 에탄올아민을 첨가한 후, DPBS로 세척하여 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것을 알 수 있다.

[182] 도 8을 참조하면, DMSO 용액에서 HeLa 세포를 30 분간 10 μM 프로브와 함께 배양하고, 잔류 프로브를 제거한 다음 30 분 동안 (a) 0 μM, (b) 10 μM, (c) 100 μM, 및 (d) 1,000 μM의 에탄올아민을 첨가한 후, DPBS로 세척하여 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것을 알 수 있다.

[183] <실시예 6: 화합물 1을 이용한 미토콘드리아의 형광 이미지 시험-언커플러 처리>

[184] HeLa 세포를 (a) 10 μM 프로브 및 (b) 10 μM 프로브 + 40 μM CCCP와 함께 30 분 동안 배양하고, DPBS로 세척하여 공초점(confocal) 현미경에 의해 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타내었다 (여기파장: 405 nm/방출파장: 490-590 nm).

[185] 도 9를 참조하면, HeLa 세포를 (a) 10 μM 프로브 및 (b) 10 μM 프로브 + 40 μM CCCP와 함께 30 분 동안 배양하고, DPBS로 세척하여 공초점(confocal) 현미경에 의해 관찰된 세포 내의 미토콘드리아의 형광 이미징을 나타낸 것이다. 상기 세포 내의 미토콘드리아를 언커플러(uncoupler)인 cccp로 처리한 후 상기 화합물 1 프로브를 사용하여 세포를 이미징한 실험 결과를 나타낸 것을 알 수 있다.

[186] <실시예 7: 화합물1과 미토트랙커 딥레드에 의한 미토콘드리아 형광이미징 비교>

[187] 도 10을 참조하면, HeLa 세포를 10 μM의 화합물 1 및 50 nM의 미토트랙커 딥레드와 30 분 동안 배양하고, 공초점(confocal) 현미경으로 세포 내의 미토콘드리아의 형광이미징을 얻었다. 화합물 1 및 미토트랙커 딥레드에 의해 얻어진 미토콘드리아의 형광이미징은 일치도가 약 81 %로 나타났다 (피어슨상관계수 : 0.81±0.02).

[188] <실시예 8: 화합물 1과 ER(Endoplasmic reticulum)-트랙커 레드에 의한 미토콘드리아 형광이미징 비교 실험>

[189] 도 11을 참조하면, HeLa 세포를 10 μM의 화합물 1 및 1 μM의 ER-트랙커 레드와 30 분 동안 배양하고, 공초점(confocal) 현미경으로 세포 내의 미토콘드리아의

형광이미징을 얻었다. 화합물 1과 ER-트랙커 레드에 의해 얻어진 미토콘드리아의 형광이미징은 일치도가 약 85 %로 나타났다 (피어슨상관계수 : 0.85±0.01).

[190] <실시예 9: 화합물 1과 미토트랙커 딥레드에 의한 미토콘드리아 형광의 광안정성 비교 실험>

[191] 도 12를 참조하면, 화합물1과 미토트랙커 딥레드에 의한 미토콘드리아 형광 광안정성을 비교하기 위하여, HeLa 세포를 10 μm의 화합물 1 및 50 nM의 미토트랙커 딥레드로 각각 30분 동안 착색(co-stained)하고, 형광이미지와 형광강도를 90회 스캔(20 sec/scan)하여 수득했으며, 형광강도는 Olympus Fluoview Ver.4.0b software를 이용하여 분석하였다. 스캔횟수 및 시간에 따른 형광이미징 및 형광강도를 통하여 화합물 1의 광안정성을 확인하였으며, 도 13b에 따르면 화합물 1의 형광강도가 미토트랙커 딥레드 보다 높게 나타났다.

[192] **<실시예 10: 화합물1의 세포독성 실험>**

[193] 도 13을 참조하면, HeLa 세포를 여러 농도의 화합물 1로써 24 시간 동안 처리하고, MTT를 포함하는 배지에서 4 시간 동안 배양한 후, 화합물 1의 농도에 따른 세포의 생존능력을 확인하였다. 화합물 1로 처리하지 않은 샘플의 흡광도를 100%로 기준하여 측정했을 때, 30 μM의 화합물 1로 처리한 세포가 약 80% 생존 했음을 확인하였다.

[194] **<실시예 11: 화합물 1에 의한 단백질의 형광 이미징 비교 실험>**

[195] 3μM 의 화합물 1과 DMSO안의 여러 종류의 단백질을 0.5 시간과 1.5 시간 동안 배양한 후, 단백질의 종류에 따른 형광강도 프로파일과 형광이미징을 비교하였다.

[196] 도 14a 내지 14d 를 참조하면, 화합물 1은 HSA에 특이적인 형광이미징 성능 및 선택성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[197] <실시예 12: 여러 pH조건에서 화합물 1에 의한 HSA단백질의 형광이미징 비교>

[198] 여러 pH조건의 버퍼용액에서 화합물 1 및HSA단백질을 배양한 후, pH에 따른 형광강도 프로파일과 형광이미징을 비교하였다.

[199] 도 15a 및 15b 를 참조하면, pH7.4, pH7.5 및 pH8.5에서 화합물 1은 HSA 단백질에 특이적인 형광이미징 성능을 보여주었다.

[200] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

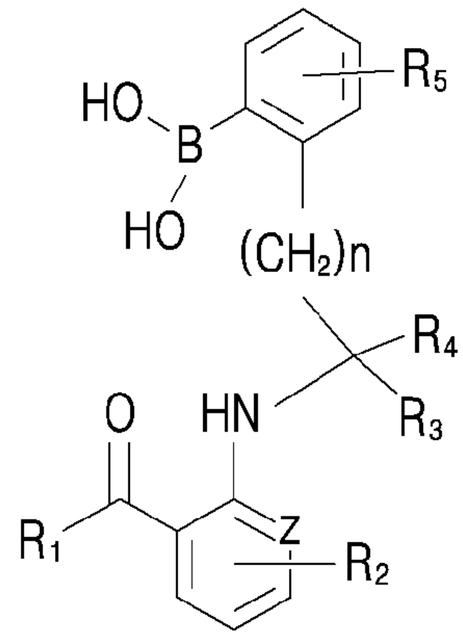
[201] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여

나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로서 표시되는,
1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체를 형광 프로브 화합물로서 포함하는, 세포 이미징 조성물:

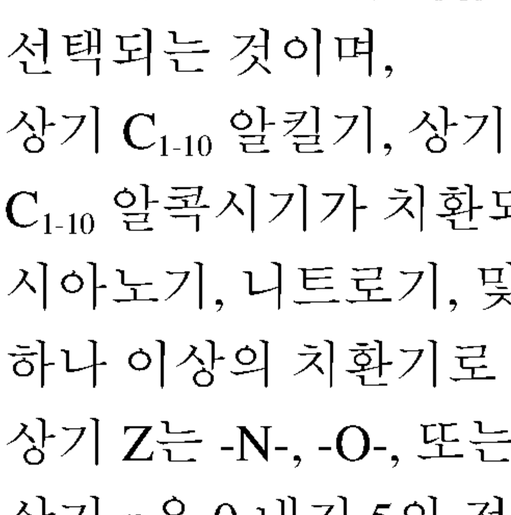
[화학식 1]



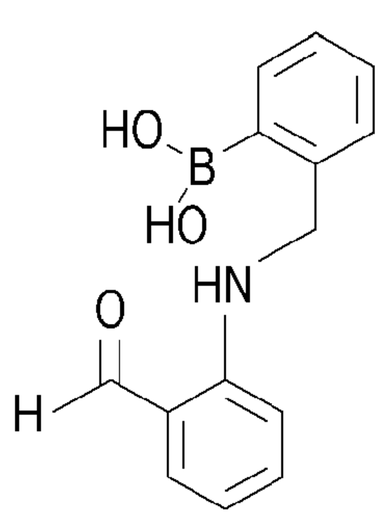
상기 화학식 1에서,
R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며,
상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;
상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;
상기 n은 0 내지 5의 정수임.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 프로브 화합물은 하기의 화합물 중 하나 이상을 포함하는 것인, 세포 이미징 조성물:

[화합물 1]

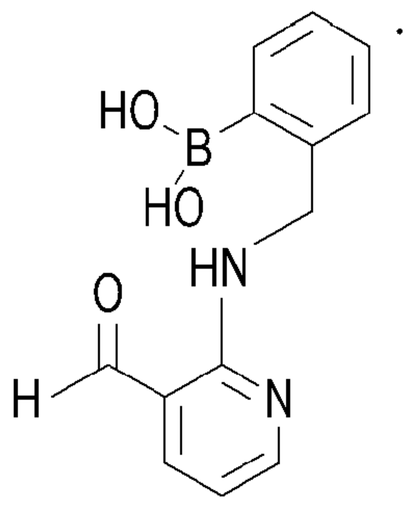


[화합물 2]



; 및

[화합물 3]



[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
살아 있는 세포 내 물질을 이미징하는 것인, 세포 이미징 조성물.

[청구항 4] 제 3 항에 있어서,
상기 세포 내 물질은 세포 물질 또는 세포 기관을 포함하는 것인, 세포 이미징 조성물.

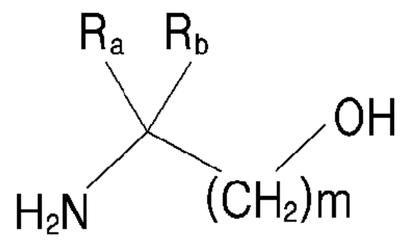
[청구항 5] 제 3 항에 있어서,
상기 세포 내 물질은 세포질, 미토콘드리아, 단백질, 또는 생체 분자를 포함하는 것인, 세포 이미징 조성물.

[청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 세포 기관이 미토콘드리아 및/또는 단백질을 포함함으로써 줄기세포, 소포체, 또는 암세포가 이미징되는 것인, 세포 이미징 조성물.

[청구항 7] 제 3 항에 있어서,
상기 세포 내 물질은 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물을 포함하는 아미노산, 핵산 염기, 아미노산 에스터, 아미노산 아마이드 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 생체물질을 포함하는 것인, 세포 이미징 조성물.

[청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 아민 화합물은 하기 화학식 2로서 표시되는 아민 화합물을 포함하는 것인, 세포 이미징 조성물:

[화학식 2]



;

상기 화학식 2에서,

R_a 및 R_b는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며,

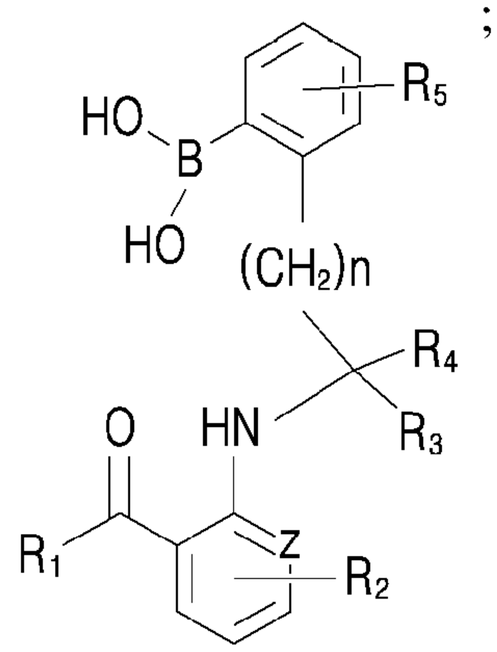
상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

상기 m은 0 내지 5의 정수임.

[청구항 9] 하기 화학식 1로서 표시되는,

1-(ortho-벤조페닐아미노알킬)-페닐보론산[1-(ortho-benzophenylaminoalkyl)-phenylboric acid] 또는 그의 유도체인 형광 프로브 화합물이 표적 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하는 것을 포함하는, 세포 물질 이미징 방법:

[화학식 1]



,

상기 화학식 1에서,

R_1, R_2, R_3, R_4, 및 R_5는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며;

상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

상기 Z는 -N-, -O-, 또는 -CH이며;

상기 n은 0 내지 5의 정수임.

[청구항 10] 제 9 항에 있어서,
상기 표적 세포는 살아 있는 세포인 것인, 세포 물질 이미징 방법.

[청구항 11] 제 9 항에 있어서,
상기 프로브 화합물이 상기 표적 세포 내 물질과 반응하여 발생되는 형광을 측정하여 상기 표적 세포 내 물질의 이미지를 수득하는 것을 추가 포함하는, 세포 물질 이미징 방법.

[청구항 12] 제 9 항에 있어서,
상기 표적 세포 내 물질은 세포 물질 또는 세포 기관을 포함하는 것인, 세포 물질 이미징 방법.

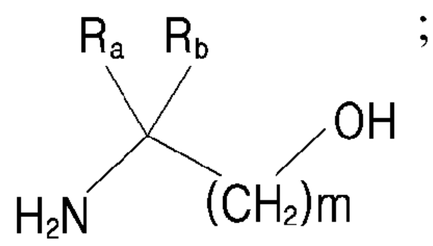
[청구항 13] 제 9 항에 있어서,
상기 표적 세포 내 물질은 세포질, 미토콘드리아, 단백질, 또는 생체 분자를 포함하는 것인, 세포 물질 이미징 방법.

[청구항 14] 제 12 항에 있어서,
상기 세포 기관이 미토콘드리아 및/또는 단백질을 포함함으로써 줄기세포, 소포체, 또는 암세포가 이미징되는 것인, 세포 물질 이미징 방법.

[청구항 15] 제 9 항에 있어서,
상기 표적 세포 내 물질은 아미노알코올을 포함하는 아민 화합물을 포함하는 아미노산, 핵산 염기, 아미노산 에스터, 아미노산 아마이드 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택되는 생체물질을 포함하는 것인, 세포 물질 이미징 방법.

[청구항 16] 제 15 항에 있어서,
상기 아민 화합물은 하기 화학식 2로서 표시되는 것을 포함하는 것인, 세포 물질 이미징 방법:

[화학식 2]

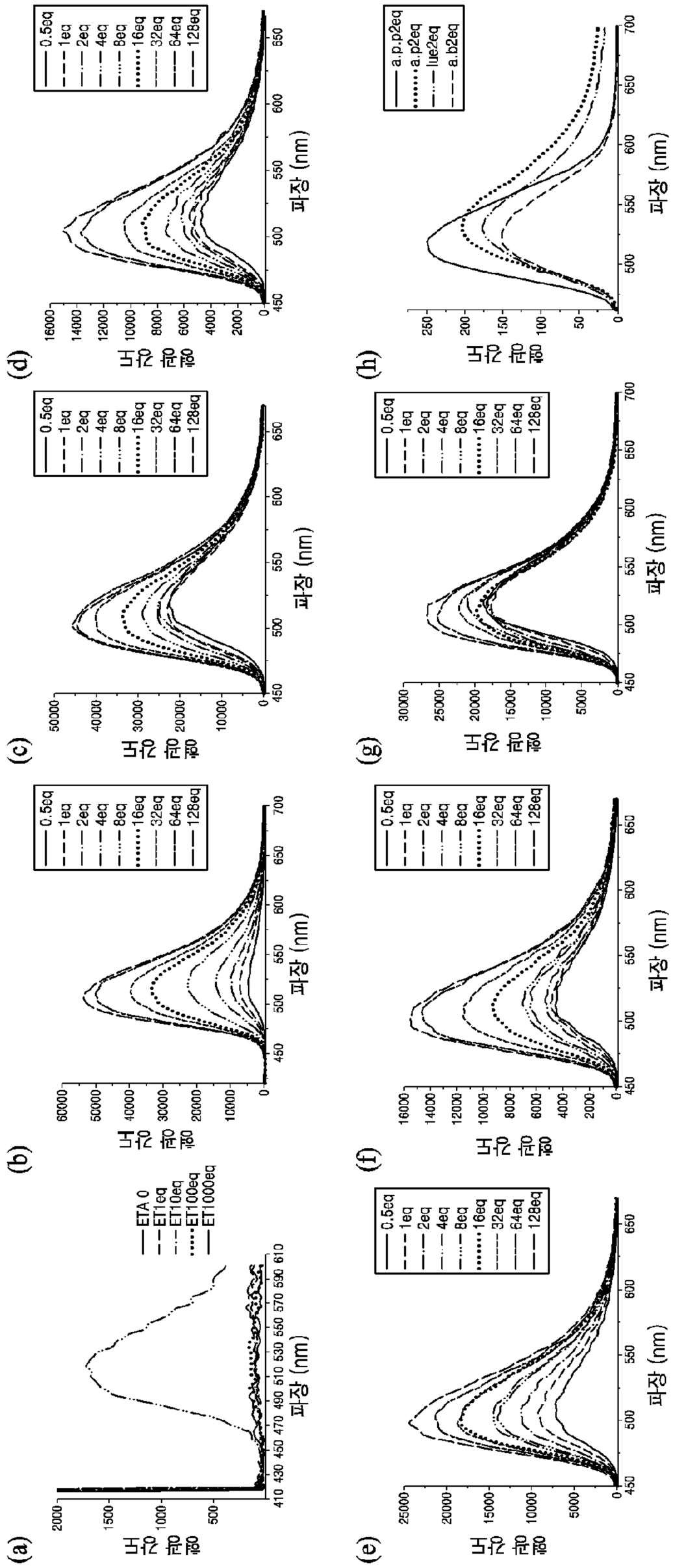


;

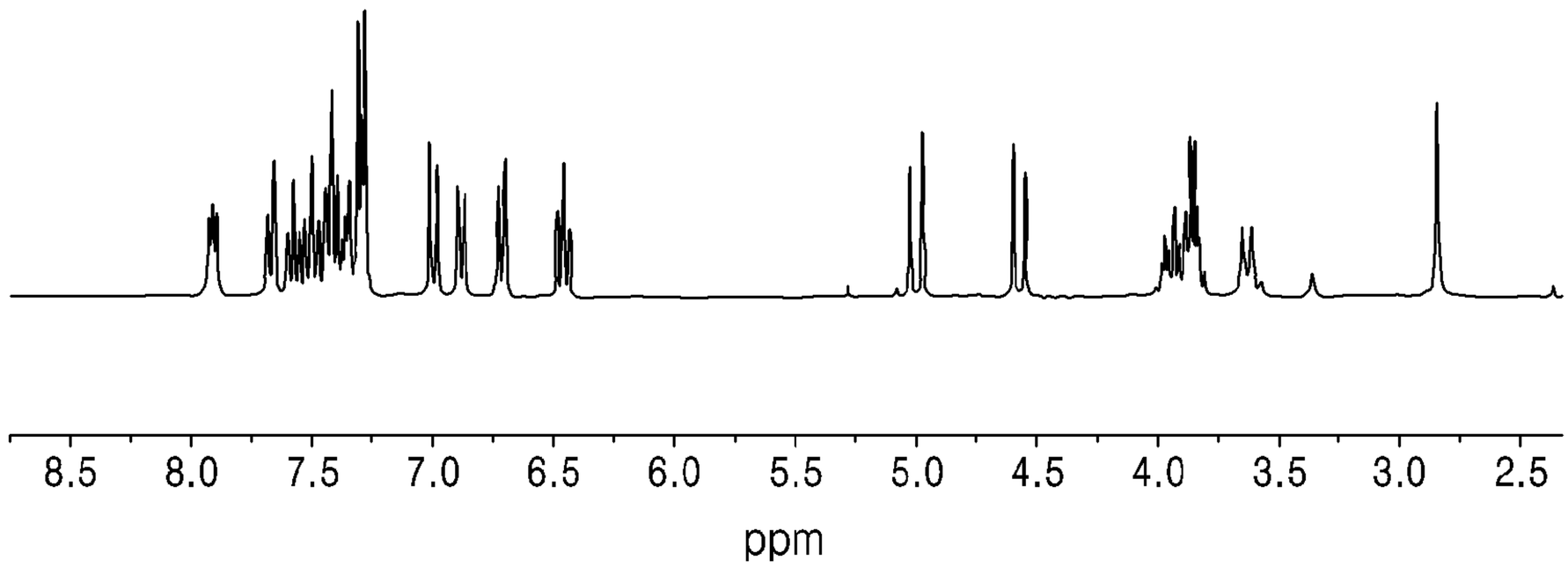
상기 화학식 2에서,
R_a 및 R_b는, 각각 독립적으로, 수소; 할로겐기; 아미노기; 니트로기; 시아노기; 포밀기; 카르복실기; C_{1-10} 알킬기; C_{1-10} 알킬카르보닐기; C_{6-10} 아릴기; 및 C_{1-10} 알콕시기로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이며;
상기 C_{1-10} 알킬기, 상기 C_{1-10} 알킬카르보닐기, 상기 C_{6-10} 아릴기, 또는 상기 C_{1-10} 알콕시기가 치환되는 경우, 할로겐기, 히드록시기, 아미노기, 시아노기, 니트로기, 및 C_{6-10} 아릴기로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 치환기로 치환되는 것이고;

상기 m은 0 내지 5의 정수임.

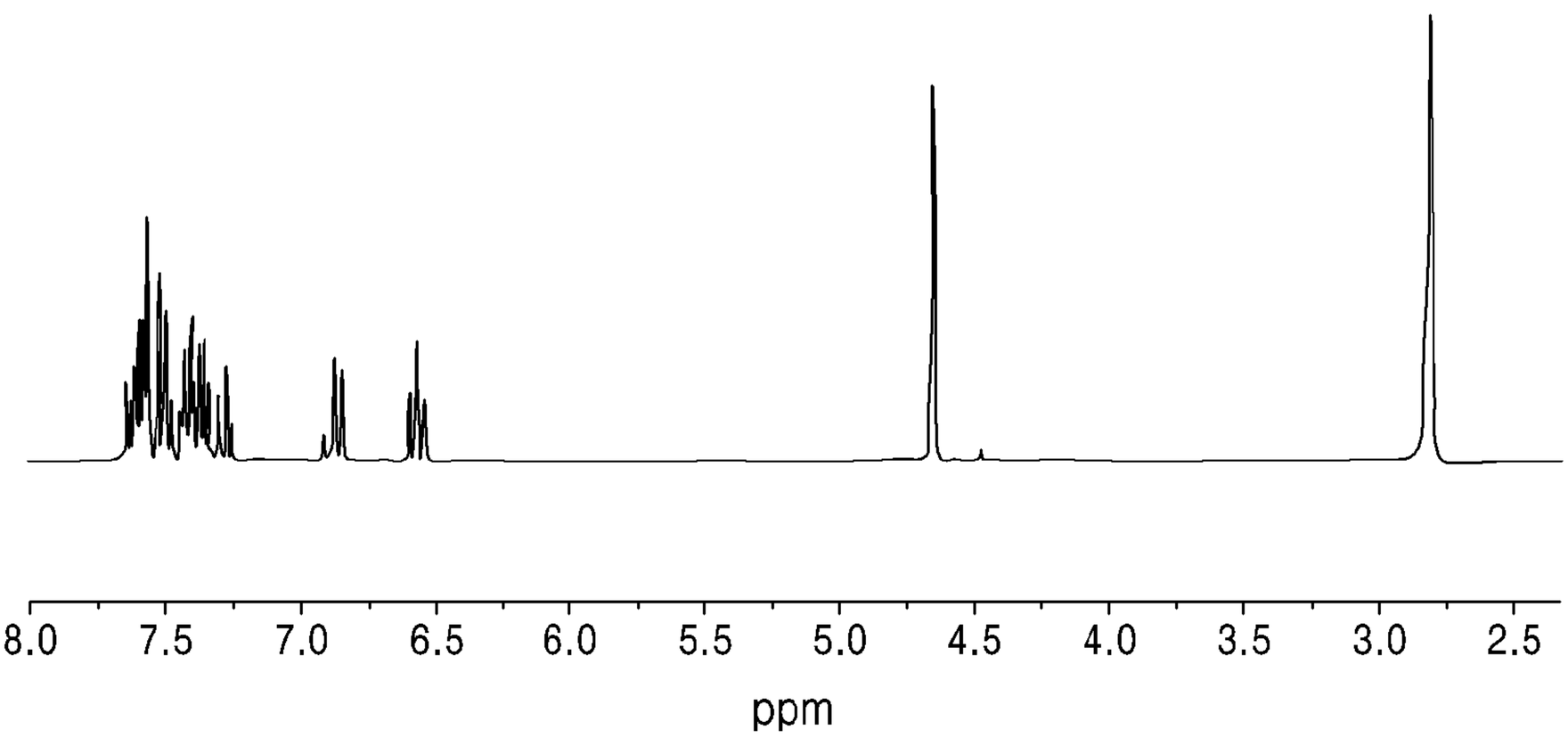
[도1]


(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
0.5eq
1eq
2eq
4eq
8eq
16eq
32eq
64eq
128eq
ETA 0
ET1eq
ET10eq
ET100eq
ET1000eq
a.p.p2eq
a.p2eq
lue2eq
a.b2eq
파장 (nm)
형광 강도

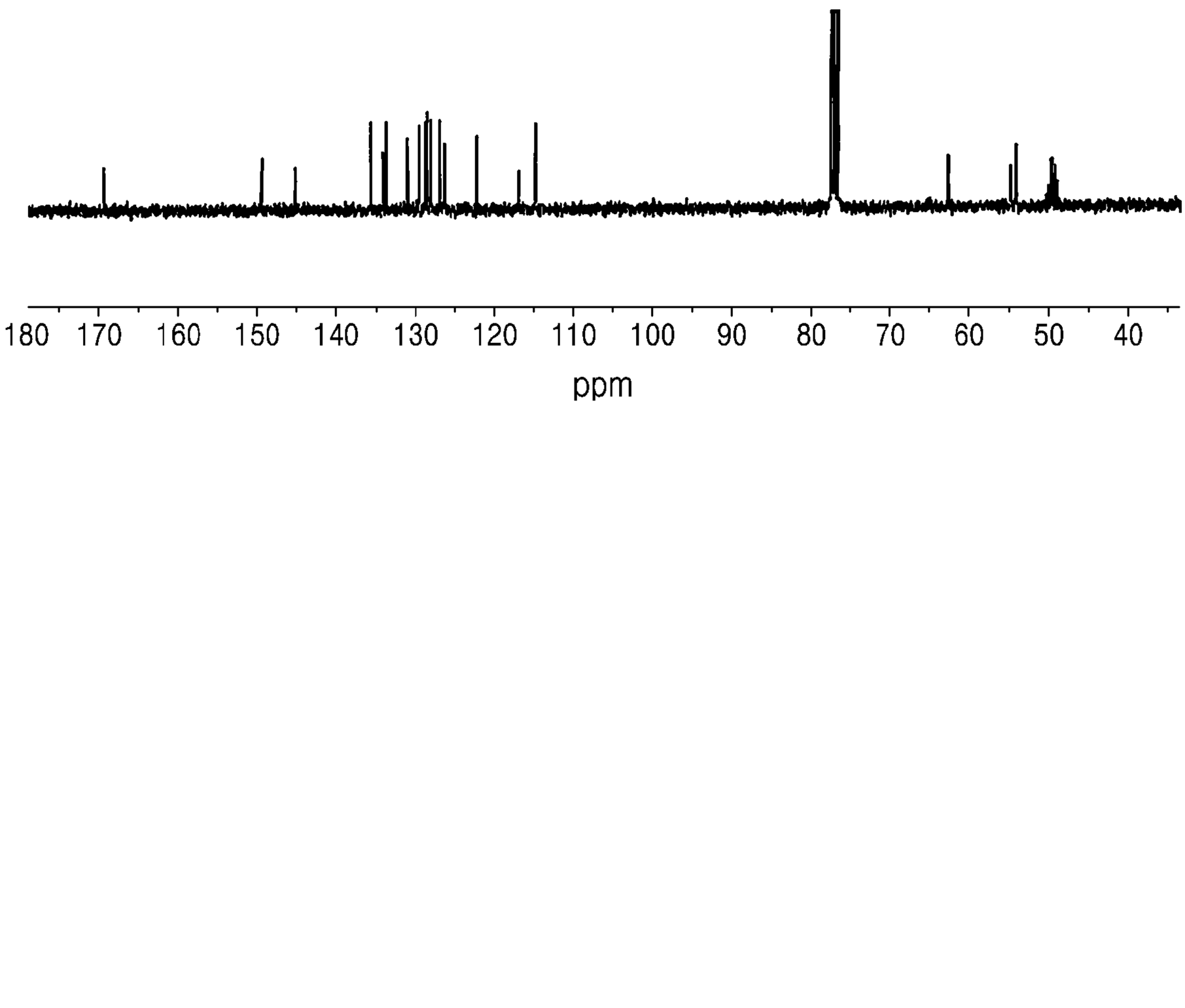
[도2a]


8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm

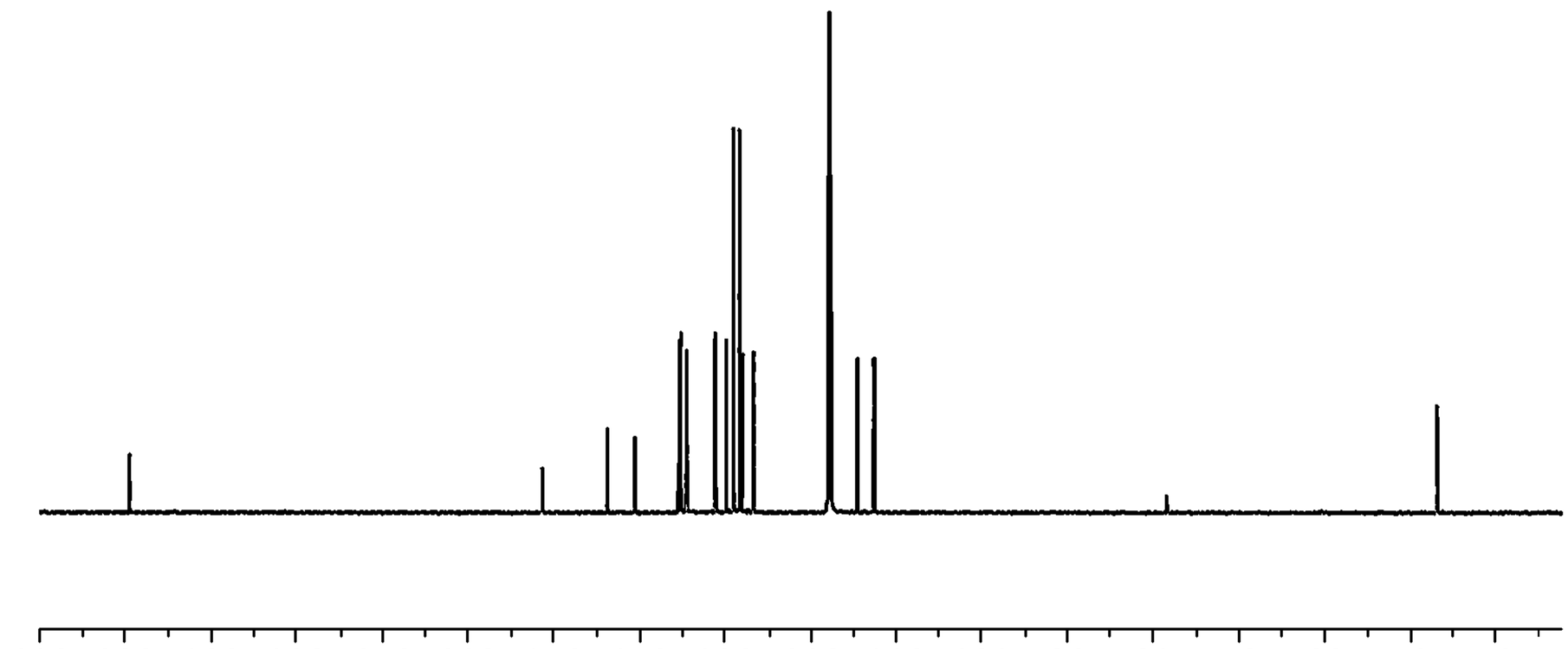
[도2b]


8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
ppm

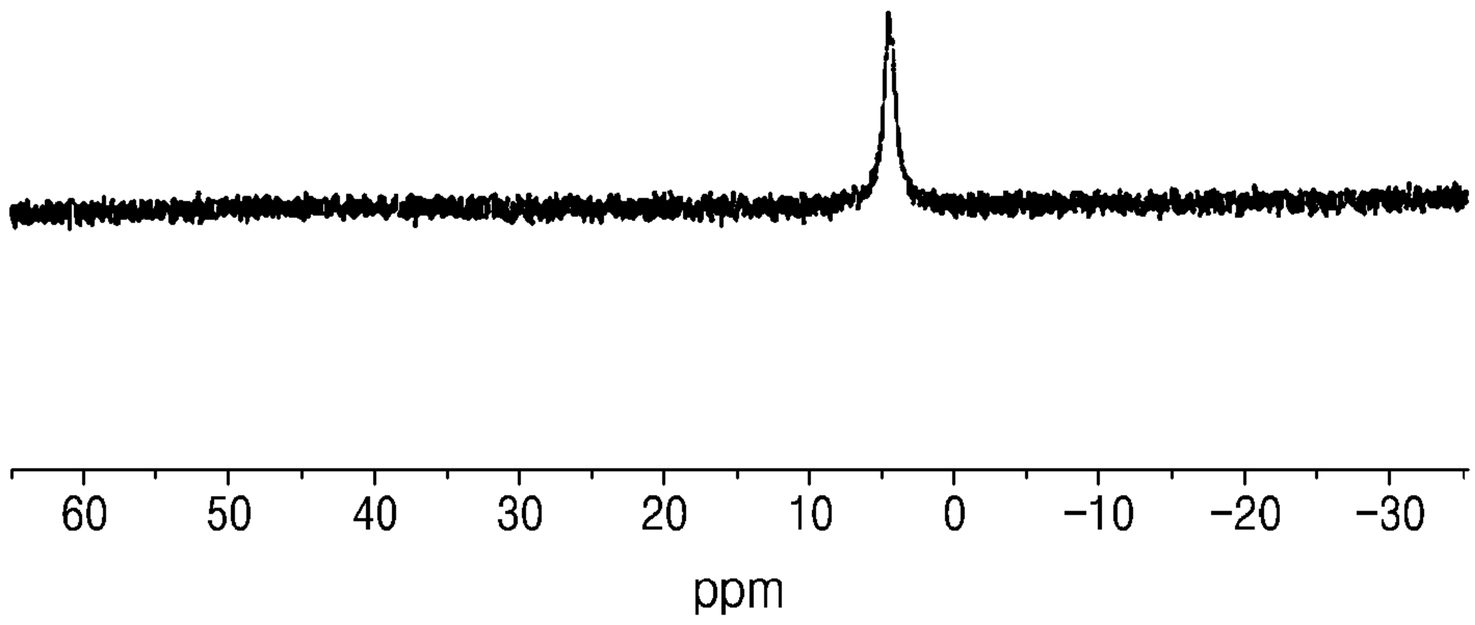
[도3a]


180
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
ppm

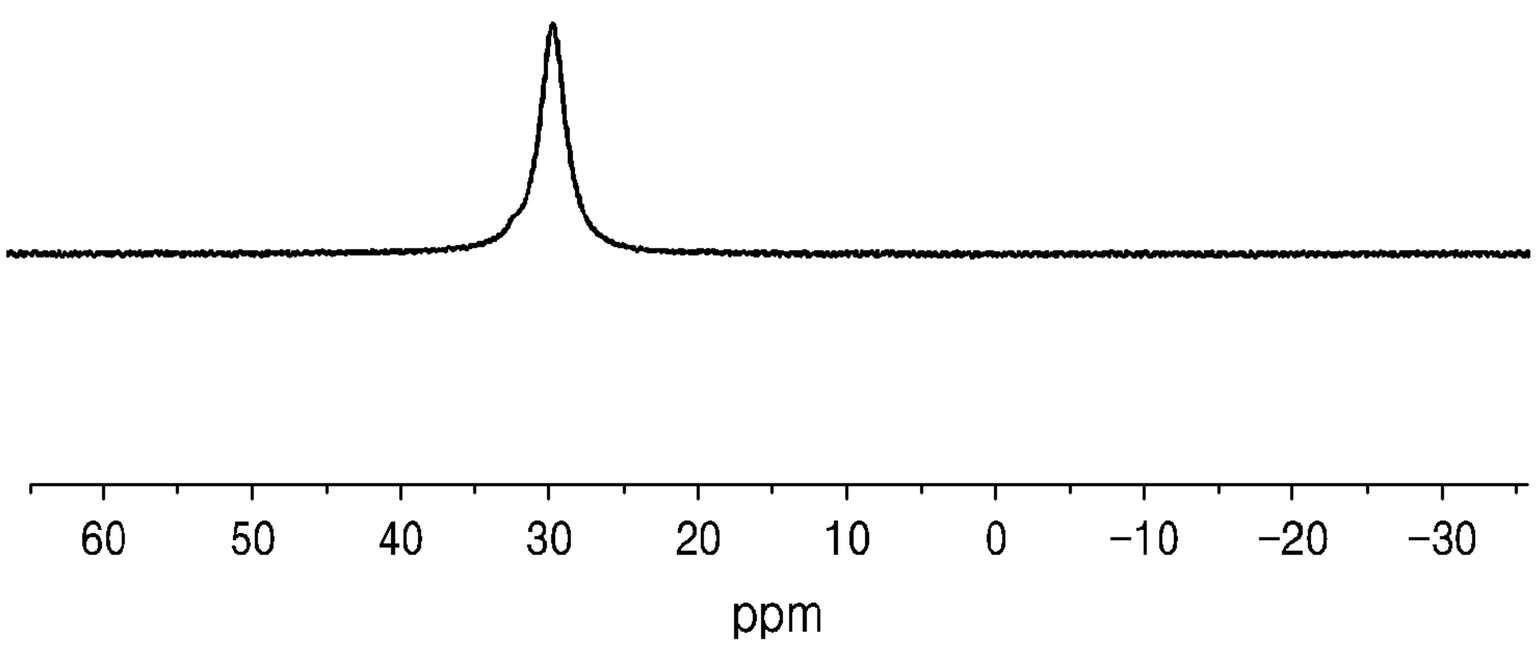
[도3b]


210 200 190 180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40
ppm

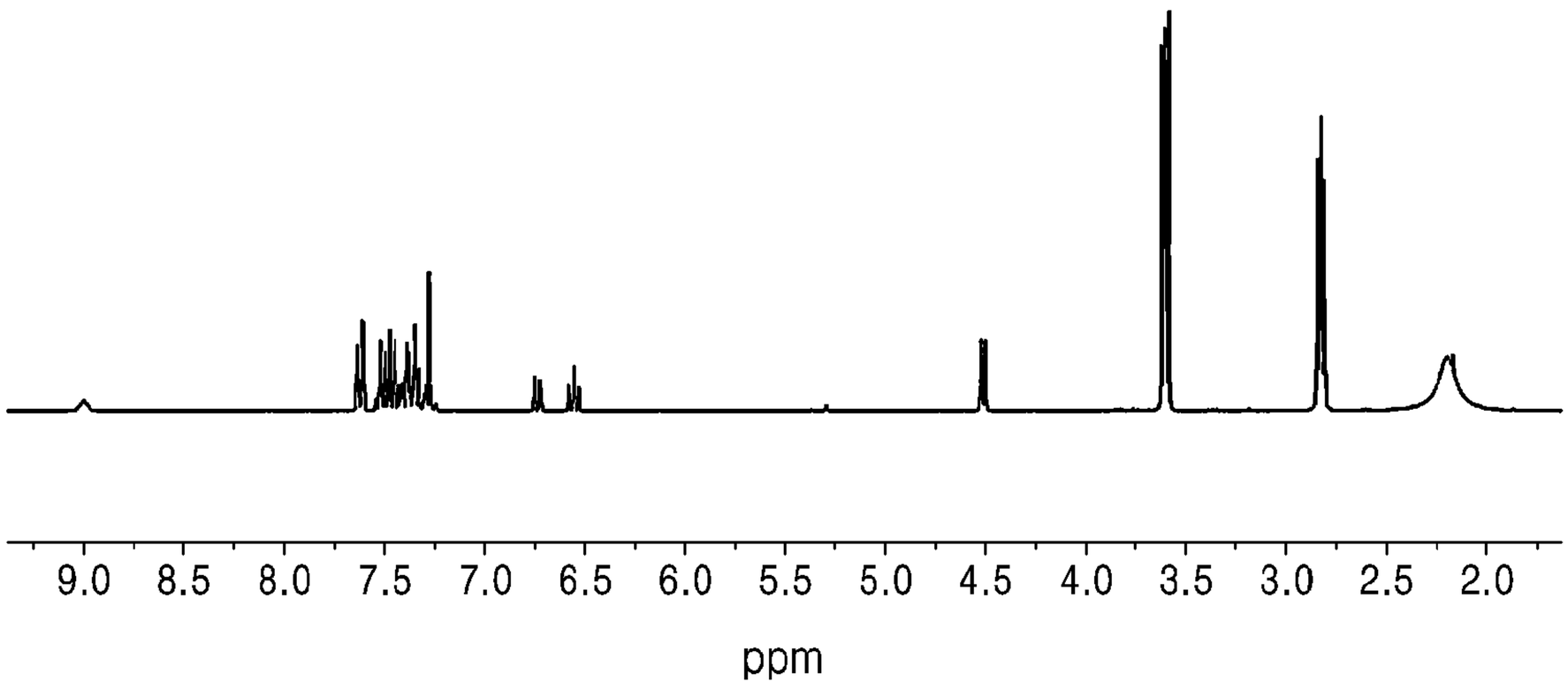
[도4a]


60 50 40 30 20 10 0 −10 −20 −30
ppm

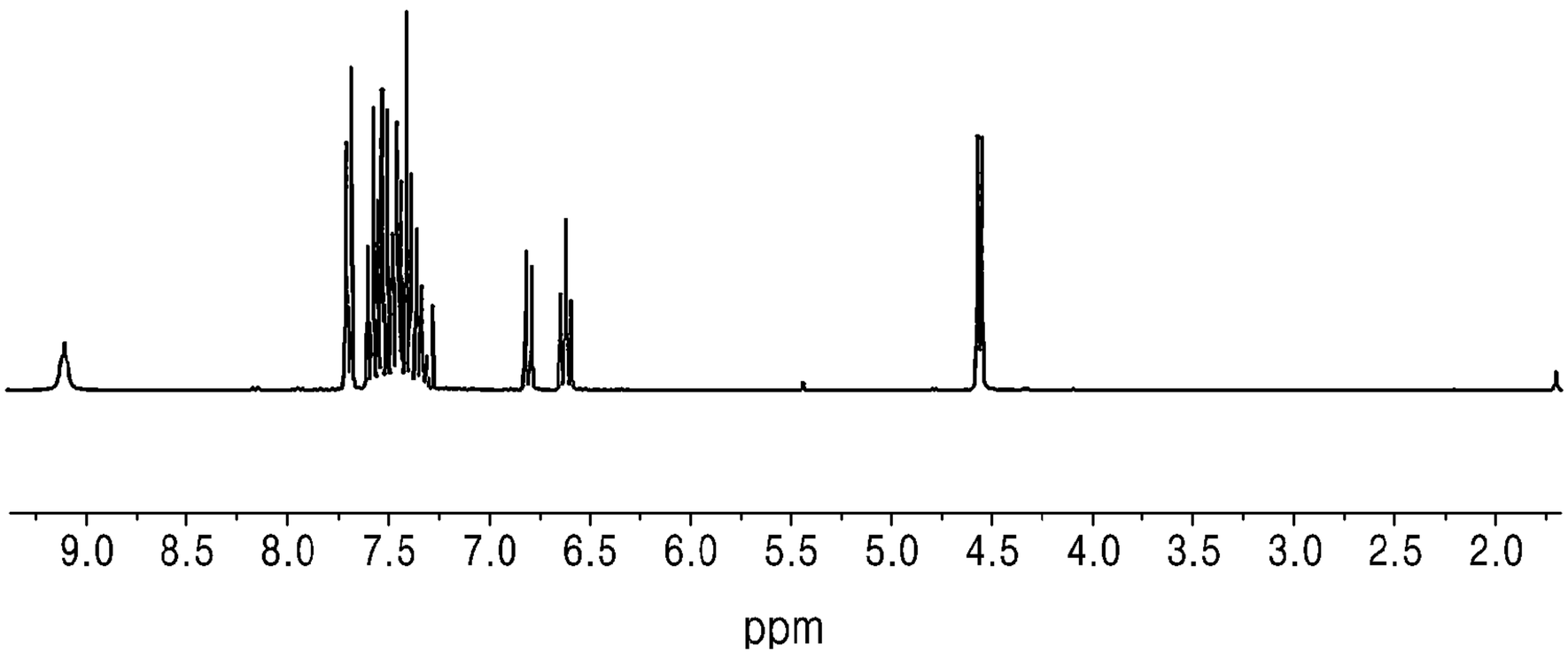
[도4b]


60 50 40 30 20 10 0 −10 −20 −30
ppm

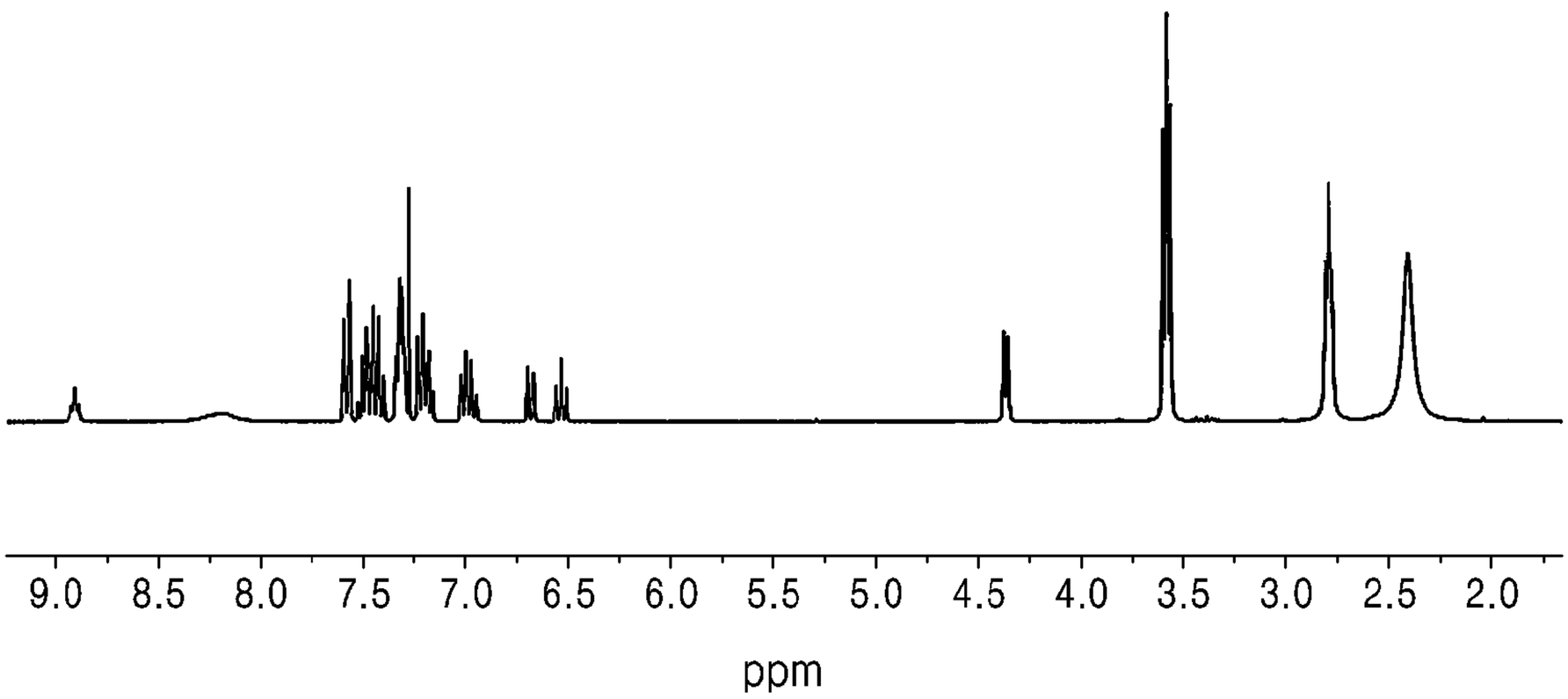
[도5a]


9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

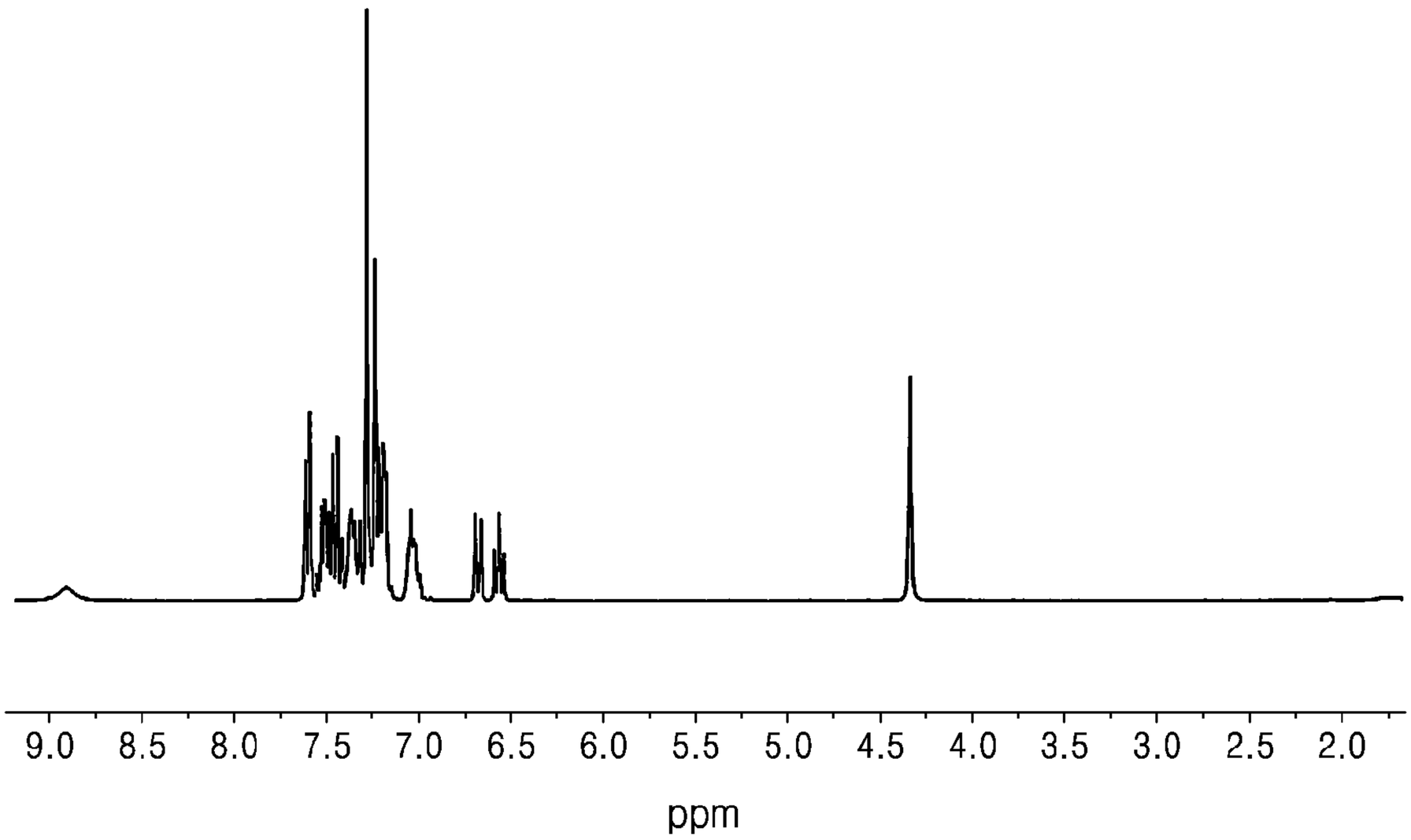
[도5b]


9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

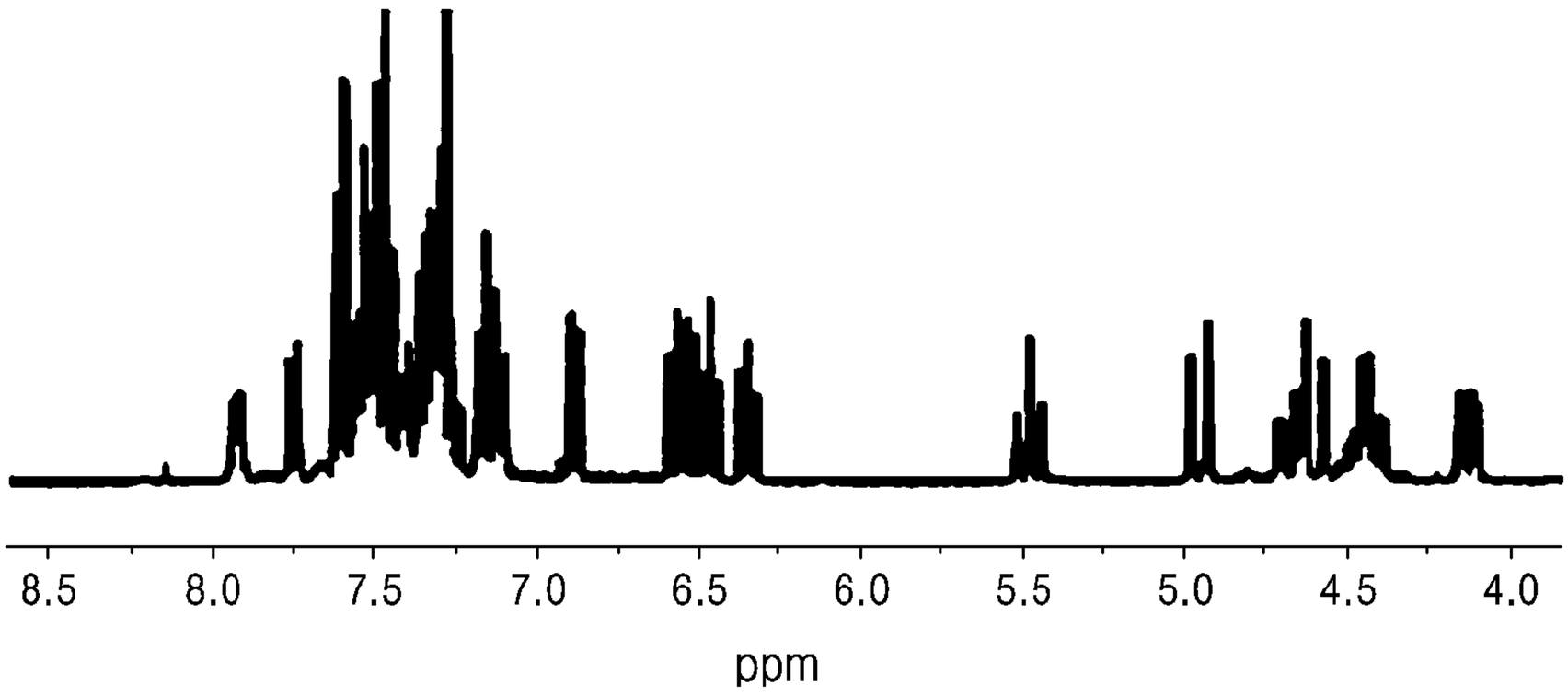
[도5c]


9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm

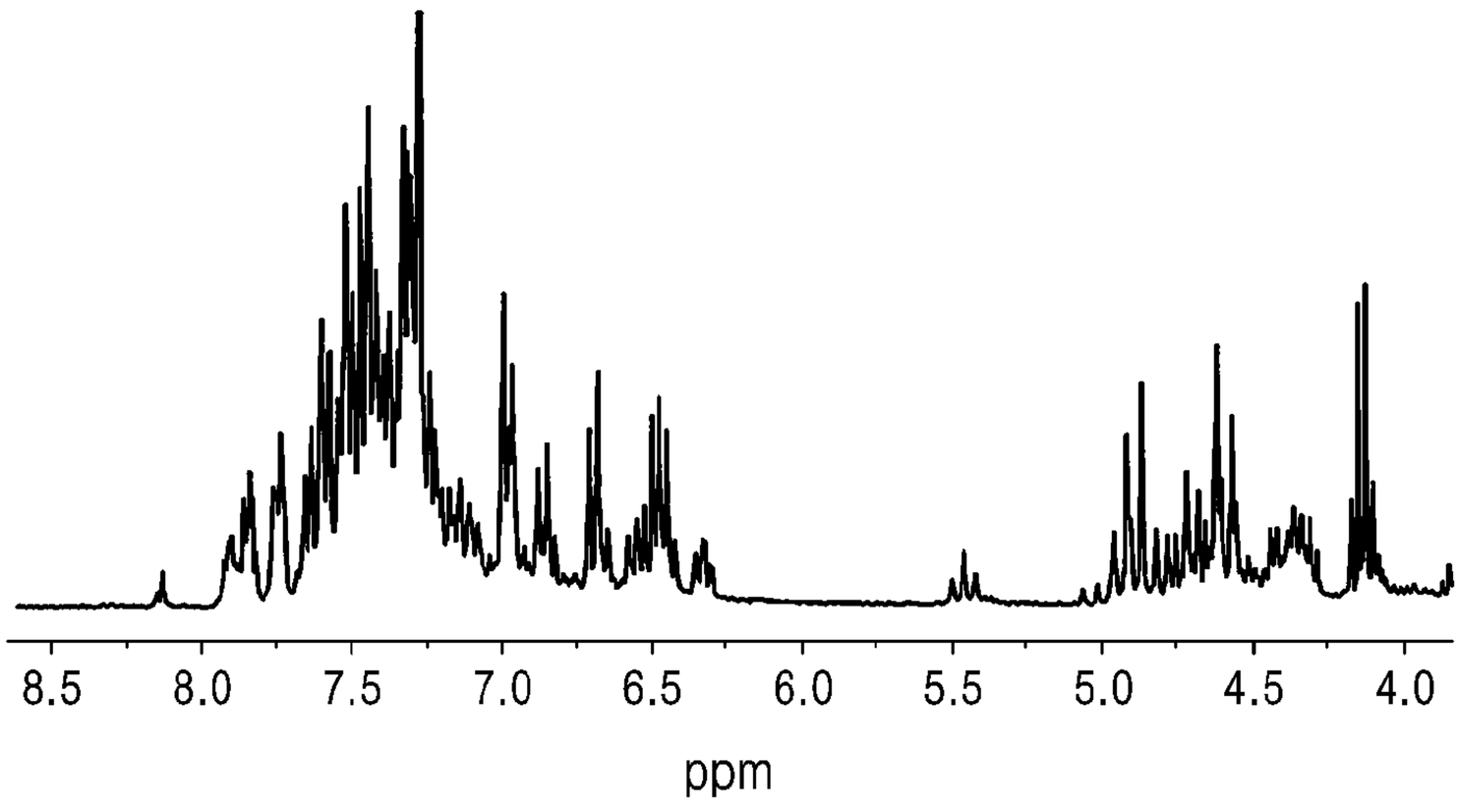
[도5d]


9.0
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
ppm

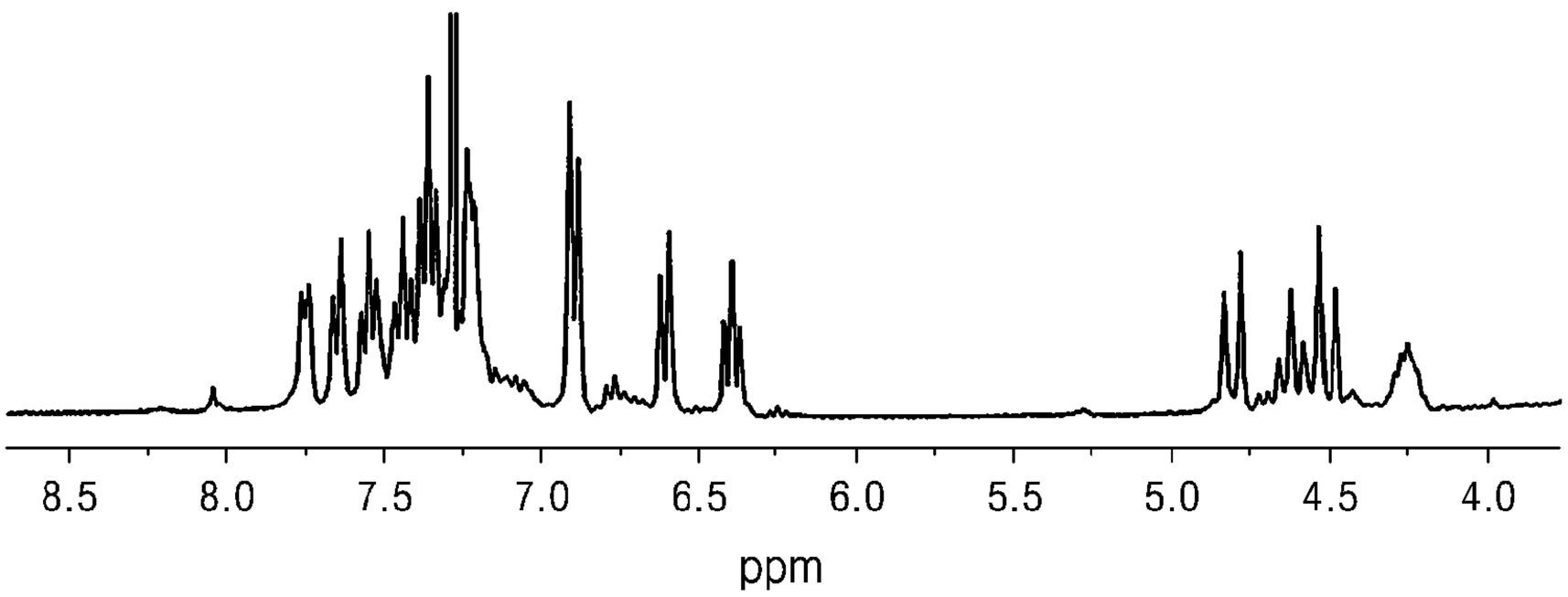
[도6a]


8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

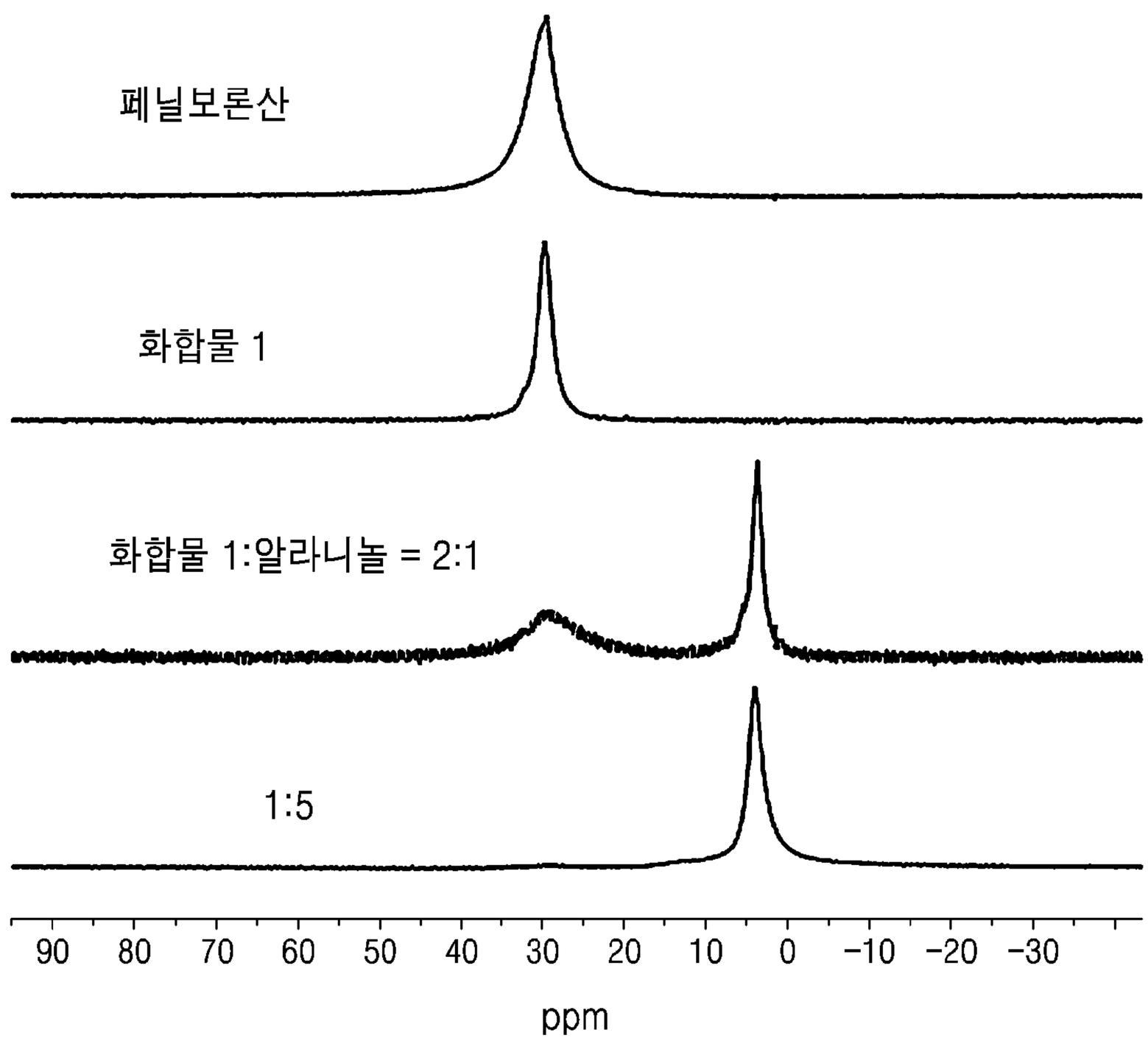
[도6b]


8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

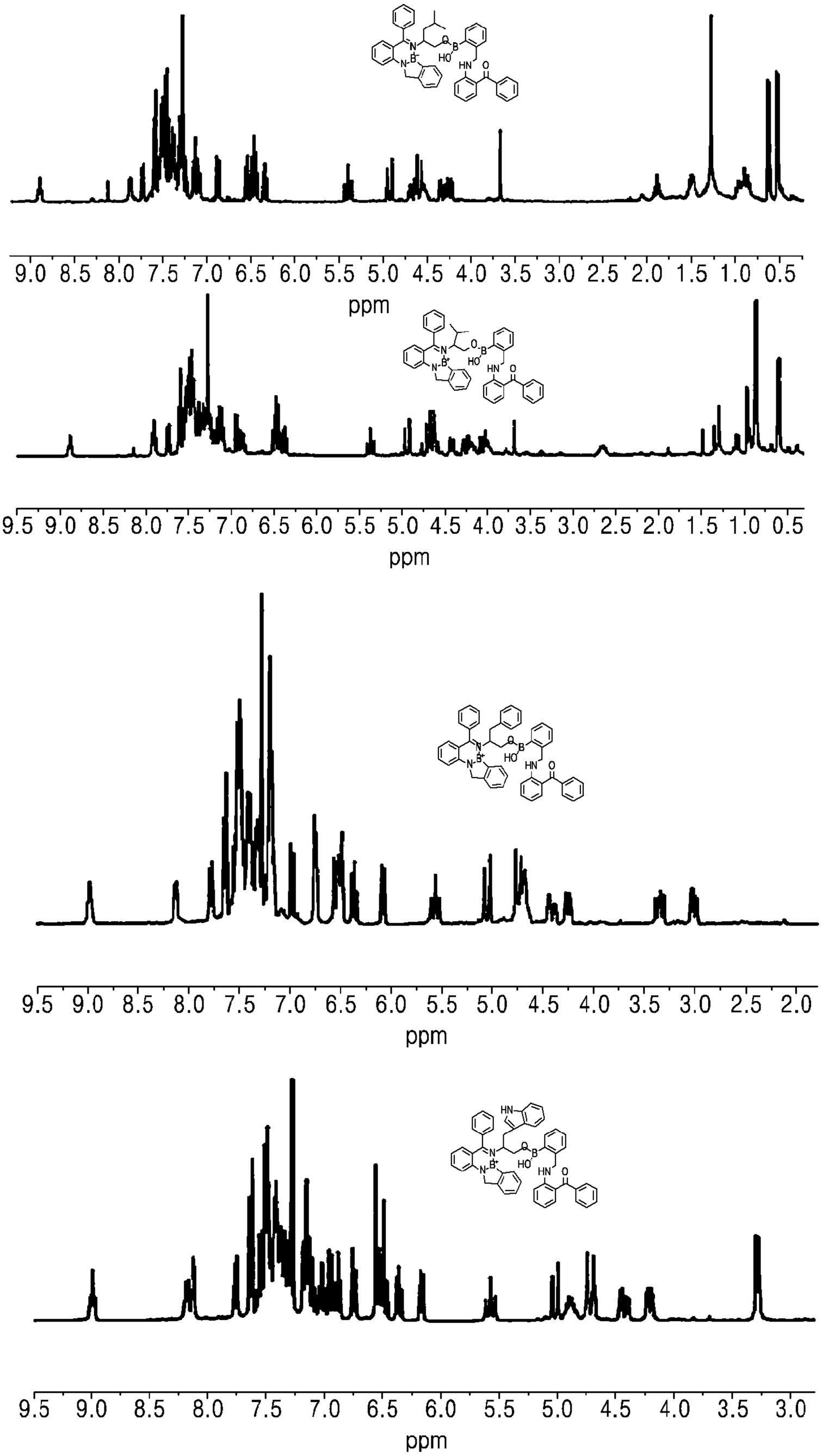
[도6c]


8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
ppm

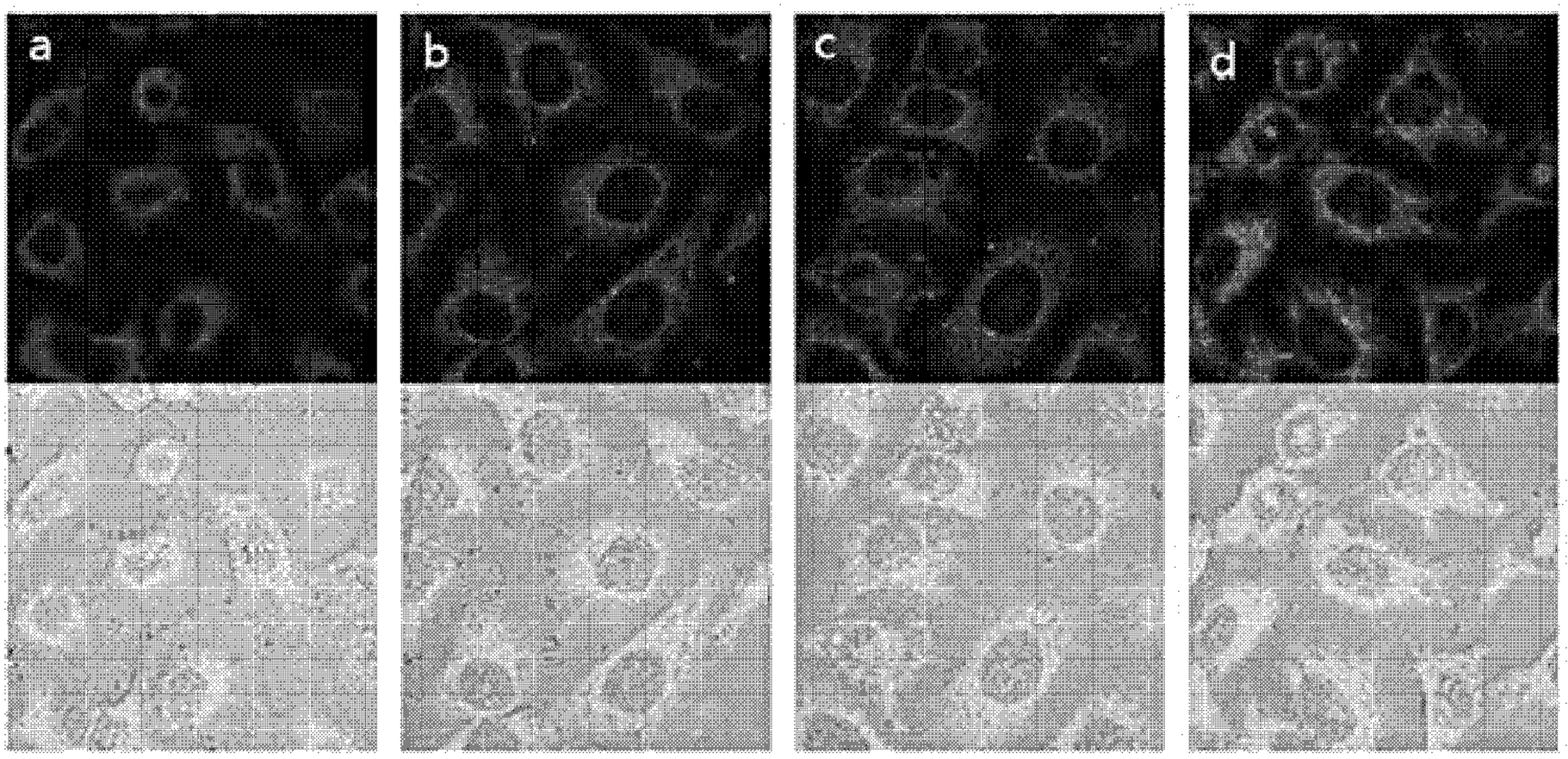
[도6d]


페닐보론산
화합물 1
화합물 1:알라니놀 = 2:1
1:5
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
−10
−20
−30
ppm

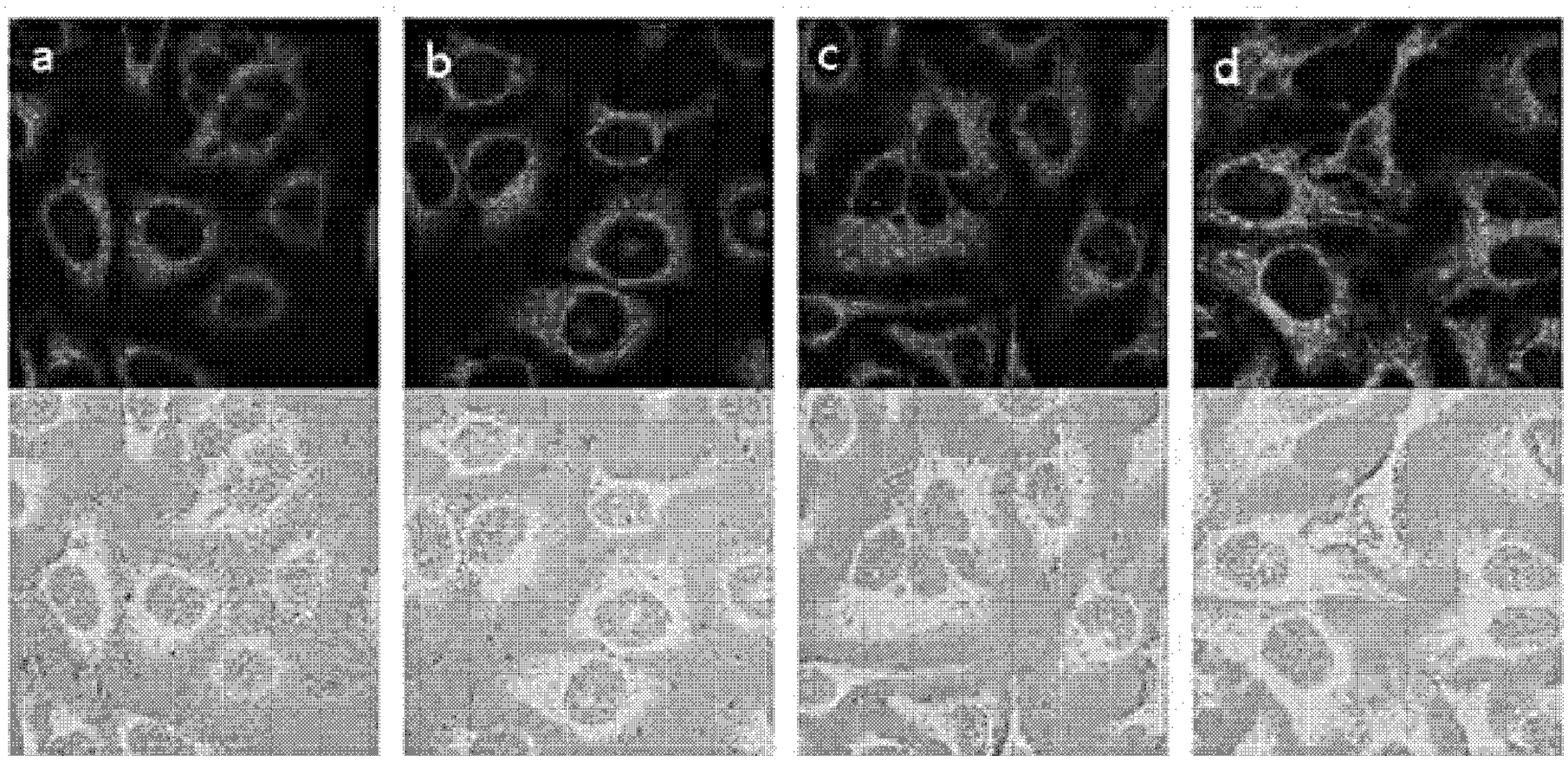
[도6e]


9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0
ppm
9.5 9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0
ppm

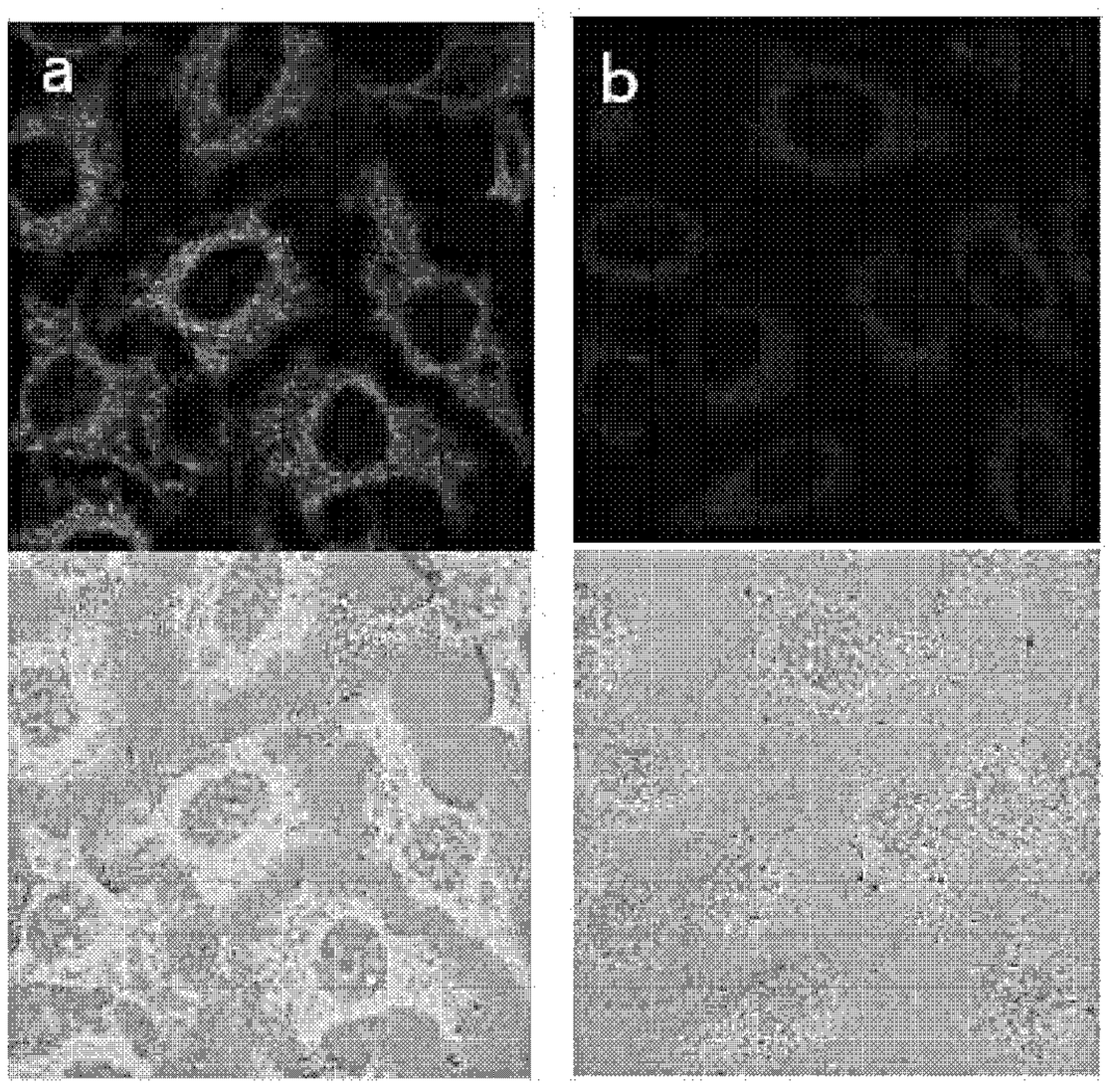
[도7]



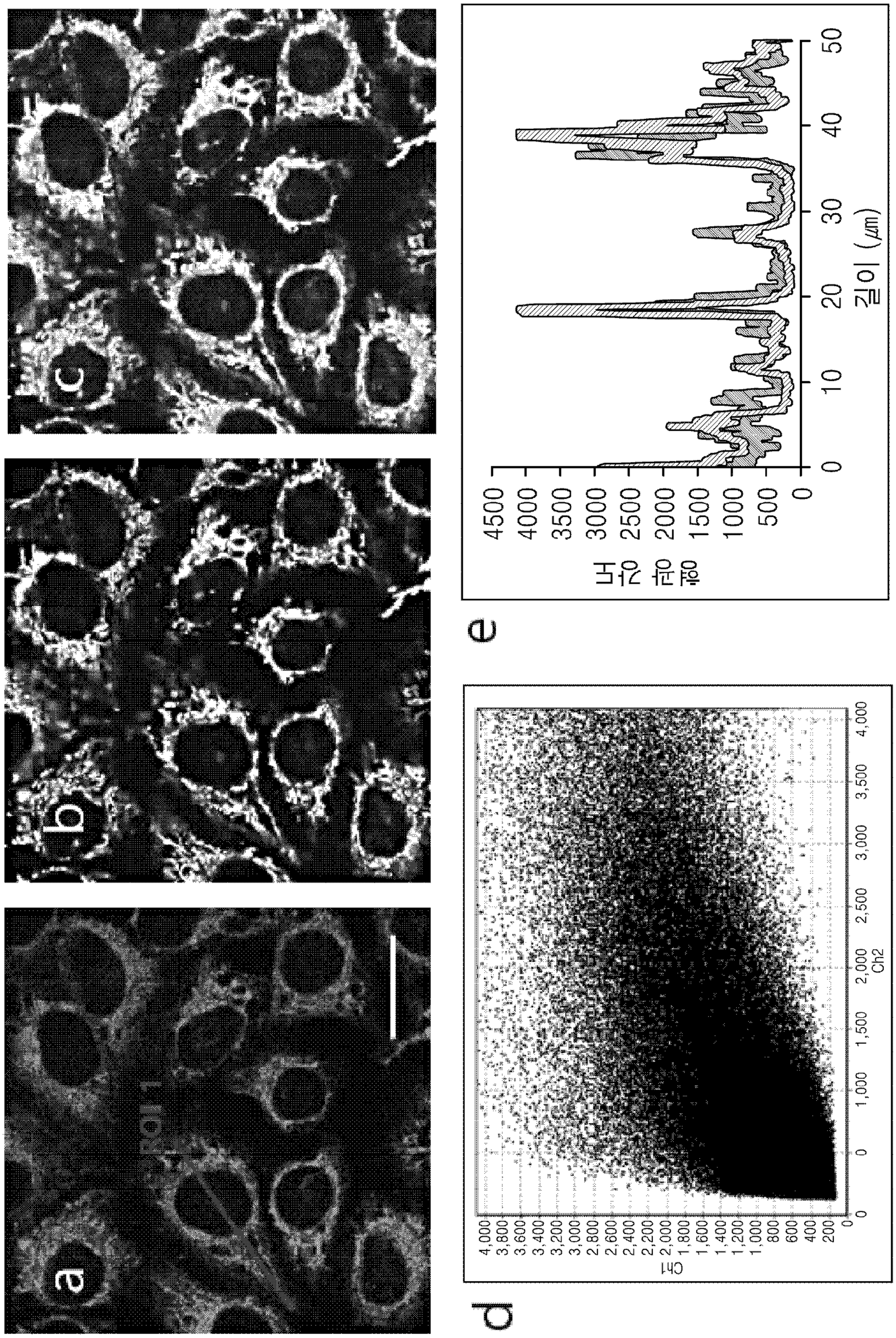
[도8]



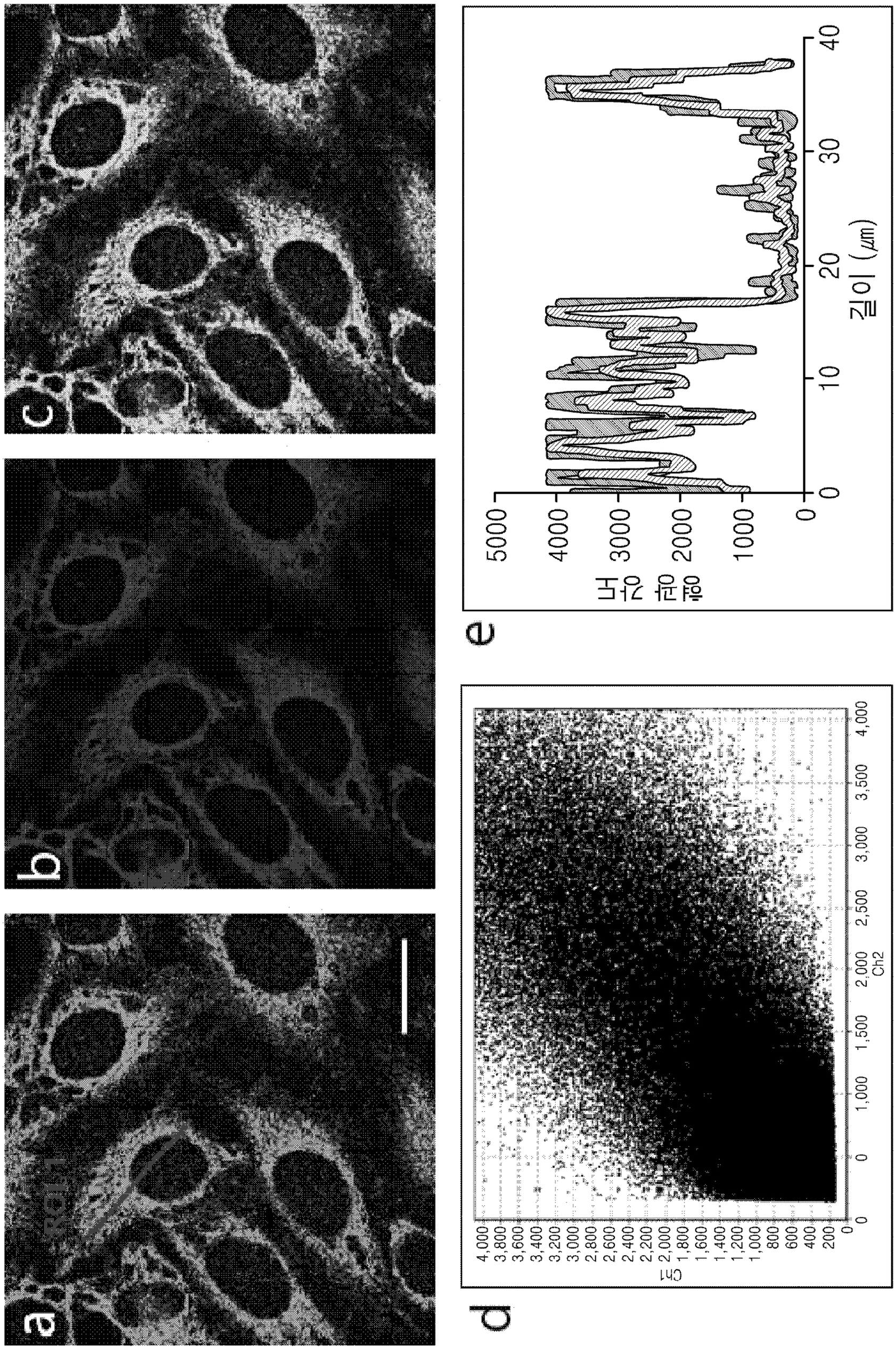
[도9]



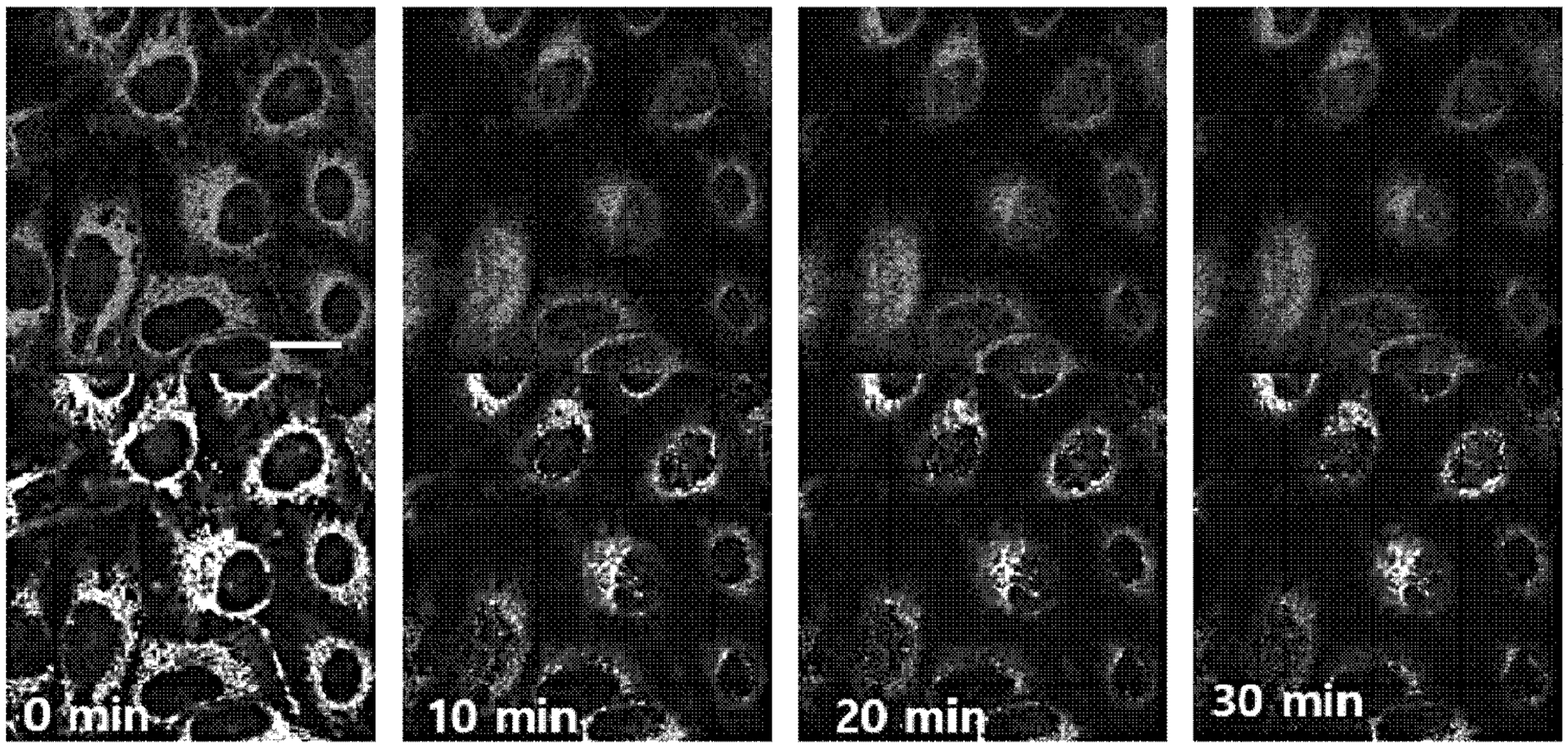
[도10]


a
b
c
d
e
Ch1
Ch2
0
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
10
20
30
40
50
길이 (μm)
높이 (nm)

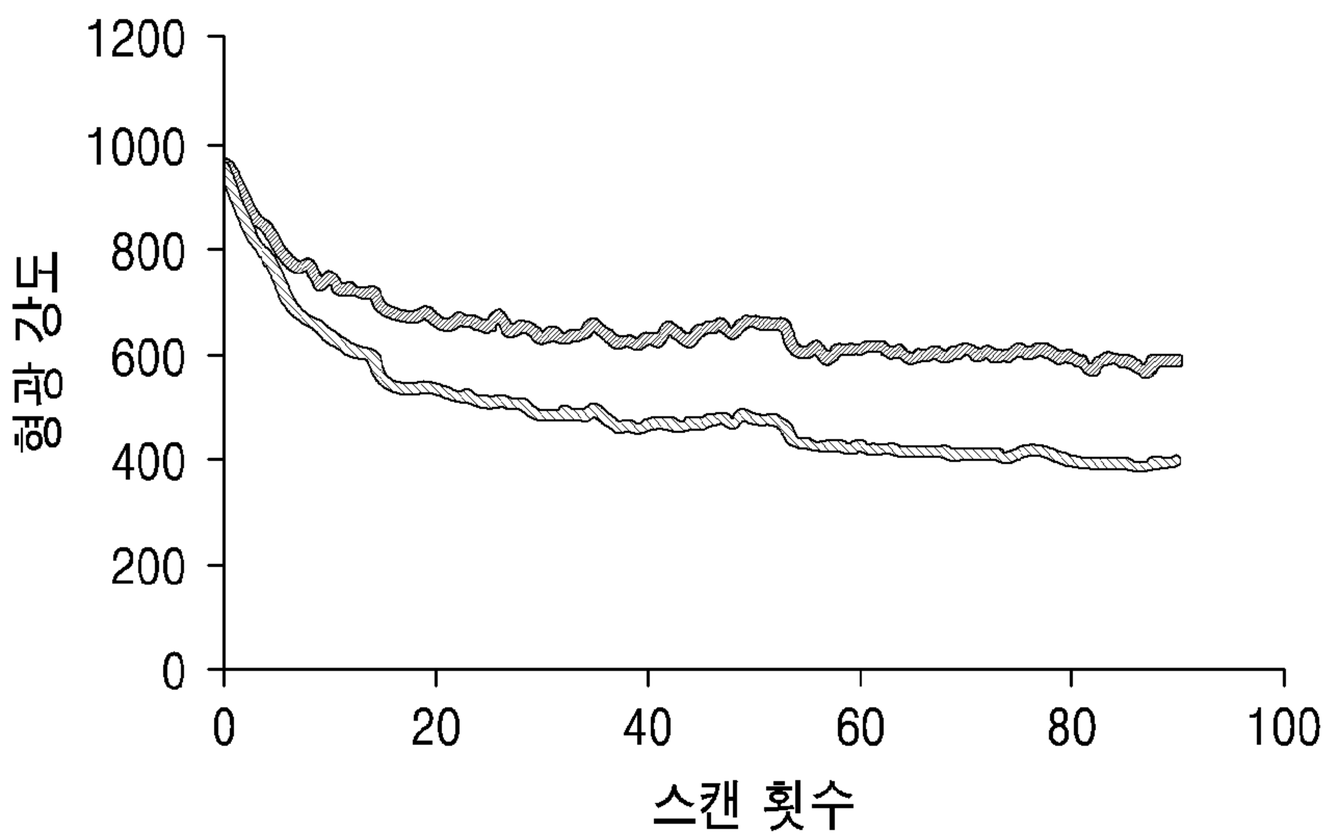
[도11]


a
b
c
d
e
Ch1
Ch2
0
1,000
1,500
2,000
2,500
3,000
3,500
4,000
200
400
600
800
1,000
1,200
1,400
1,600
1,800
2,000
2,200
2,400
2,600
2,800
3,000
3,200
3,400
3,600
3,800
4,000
형광 강도
길이 (μm)
0
10
20
30
40
1000
2000
3000
4000
5000

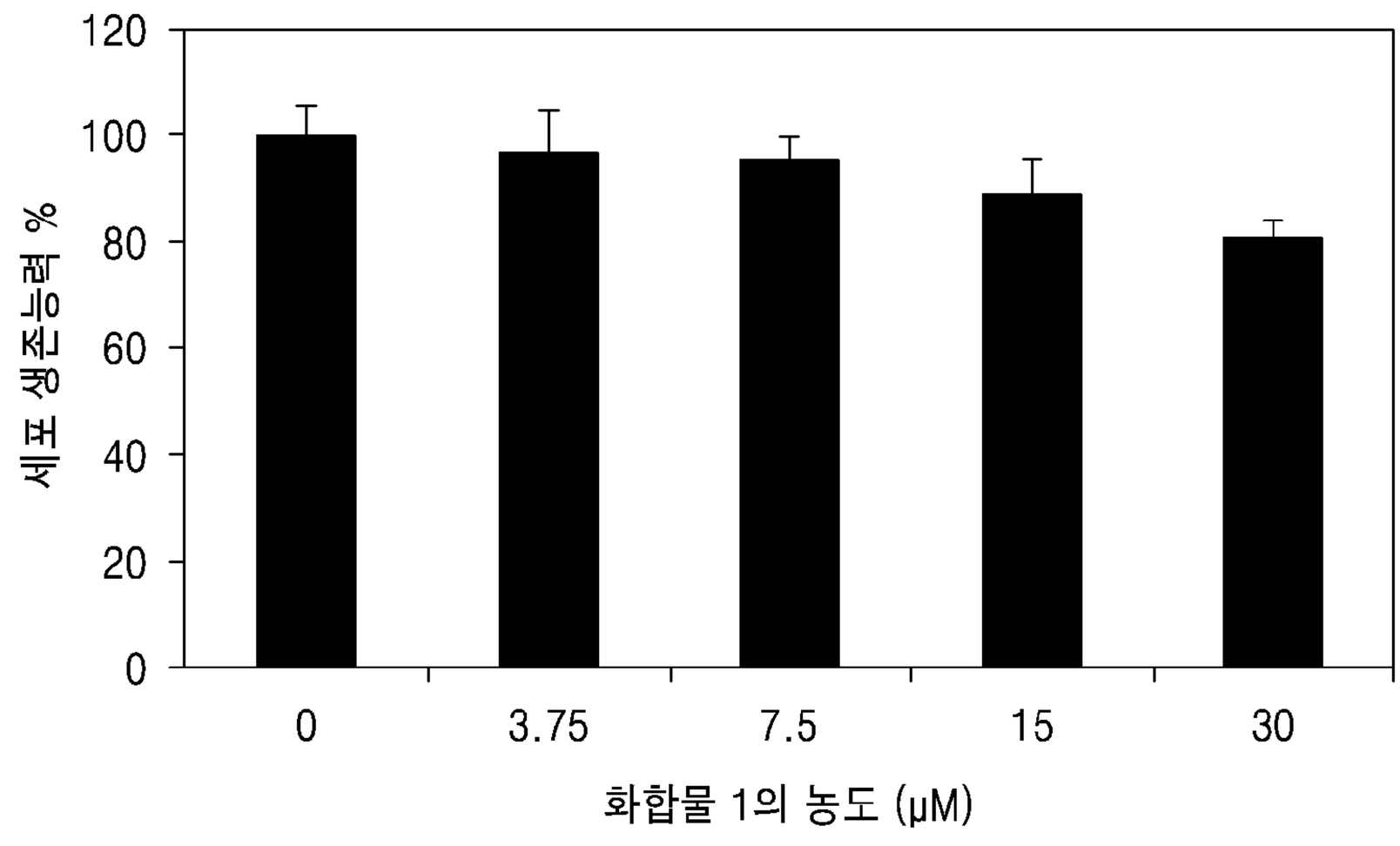
[도12a]



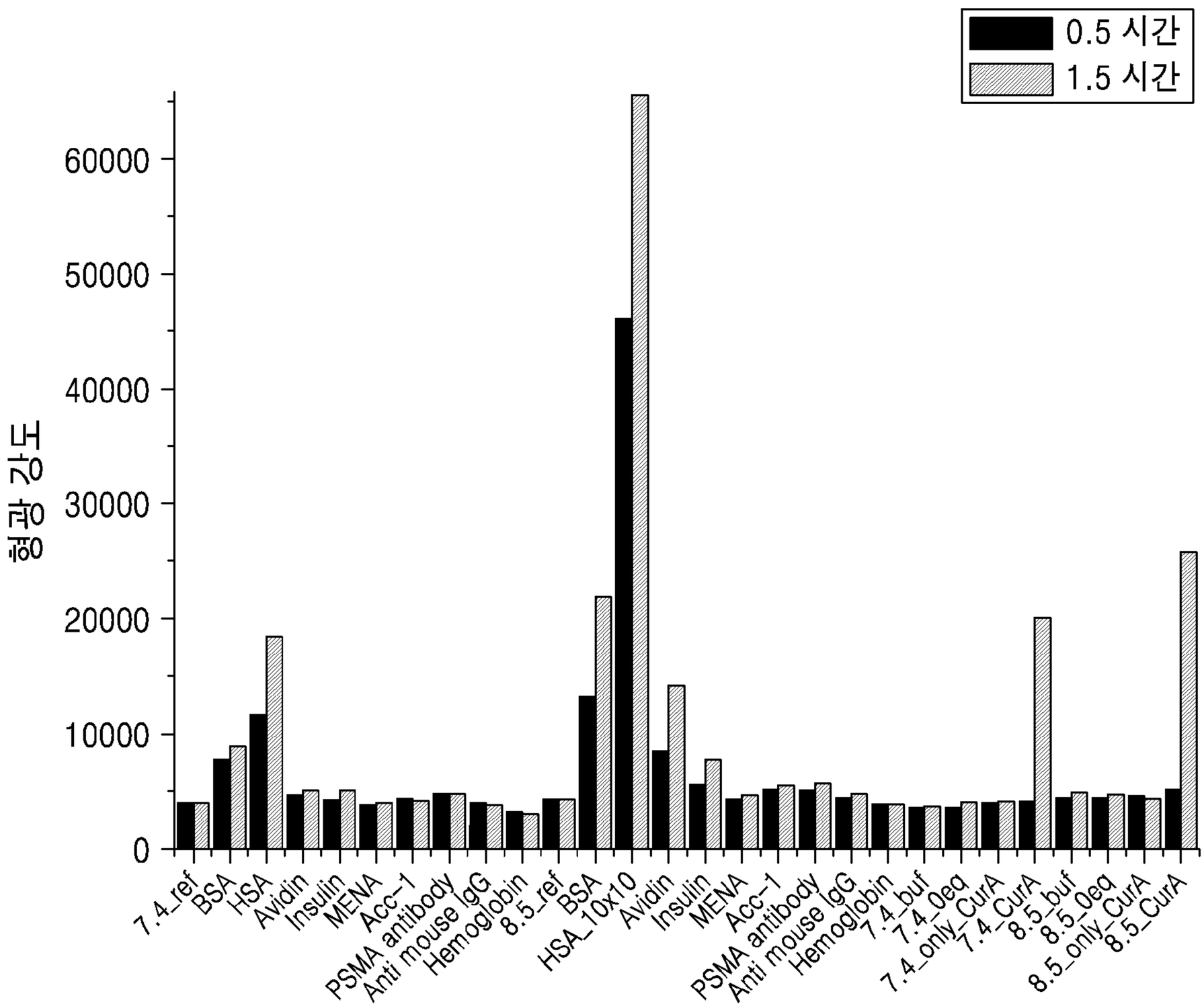
[도12b]



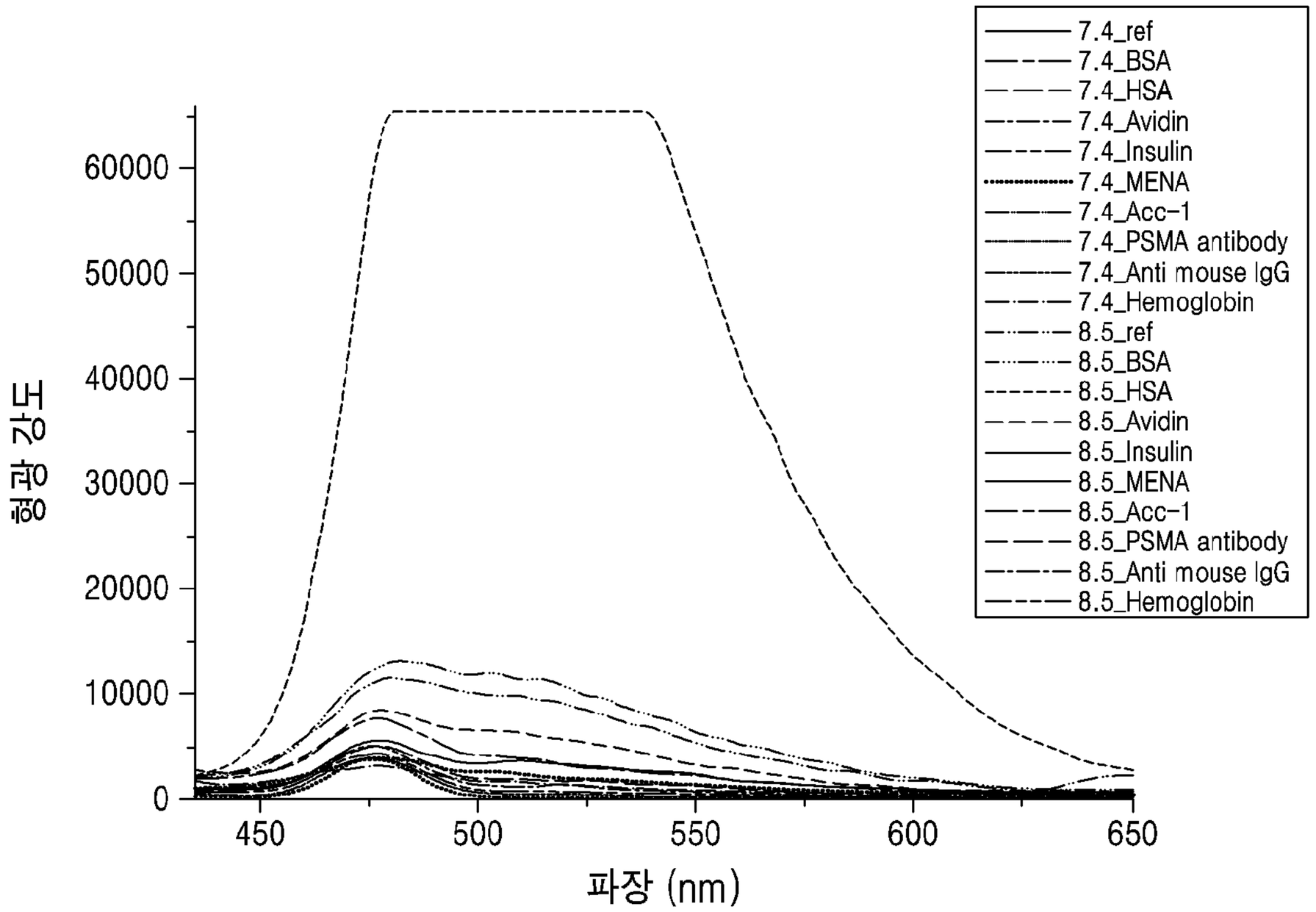
[도13]



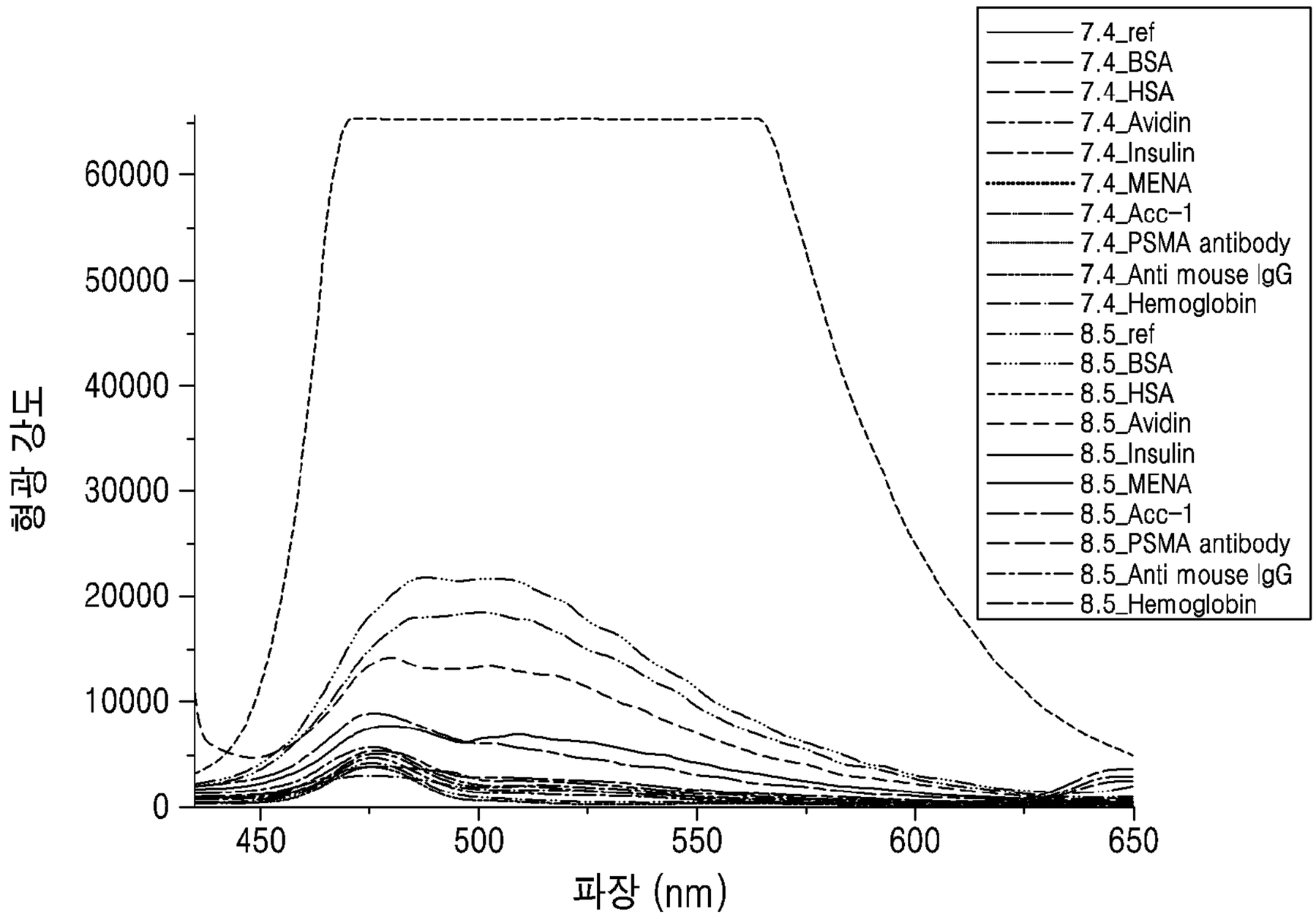
[도14a]


0.5 시간
1.5 시간
형광 강도
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
7.4_ref
BSA
HSA
Avidin
Insulin
MENA
Acc-1
PSMA antibody
Anti mouse IgG
Hemoglobin
8.5_ref
BSA
HSA_10x10
Avidin
Insulin
MENA
Acc-1
PSMA antibody
Anti mouse IgG
Hemoglobin
7.4_buf
7.4_0eq
7.4_only_CurA
7.4_CurA
8.5_buf
8.5_0eq
8.5_only_CurA
8.5_CurA

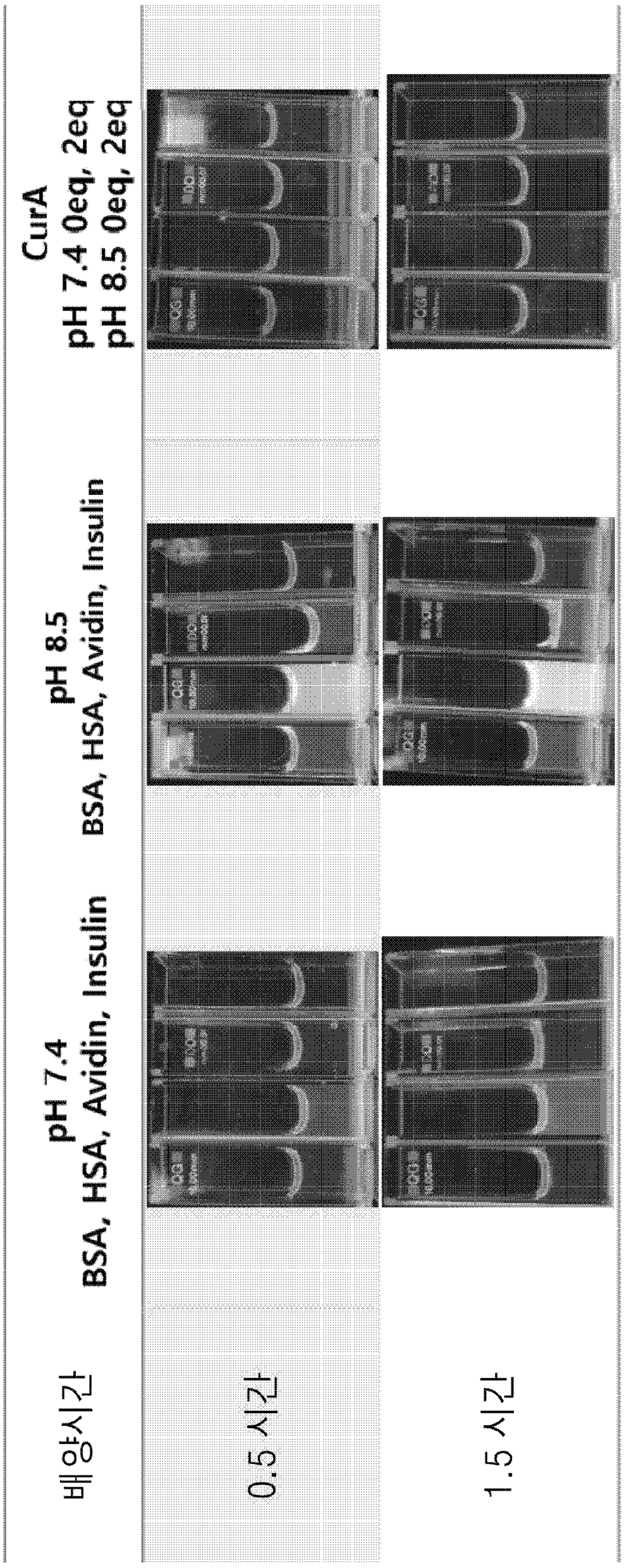
[도14b]


7.4_ref
7.4_BSA
7.4_HSA
7.4_Avidin
7.4_Insulin
7.4_MENA
7.4_Acc-1
7.4_PSMA antibody
7.4_Anti mouse IgG
7.4_Hemoglobin
8.5_ref
8.5_BSA
8.5_HSA
8.5_Avidin
8.5_Insulin
8.5_MENA
8.5_Acc-1
8.5_PSMA antibody
8.5_Anti mouse IgG
8.5_Hemoglobin
형광 강도
0
10000
20000
30000
40000
50000
60000
450
500
550
600
650
파장 (nm)

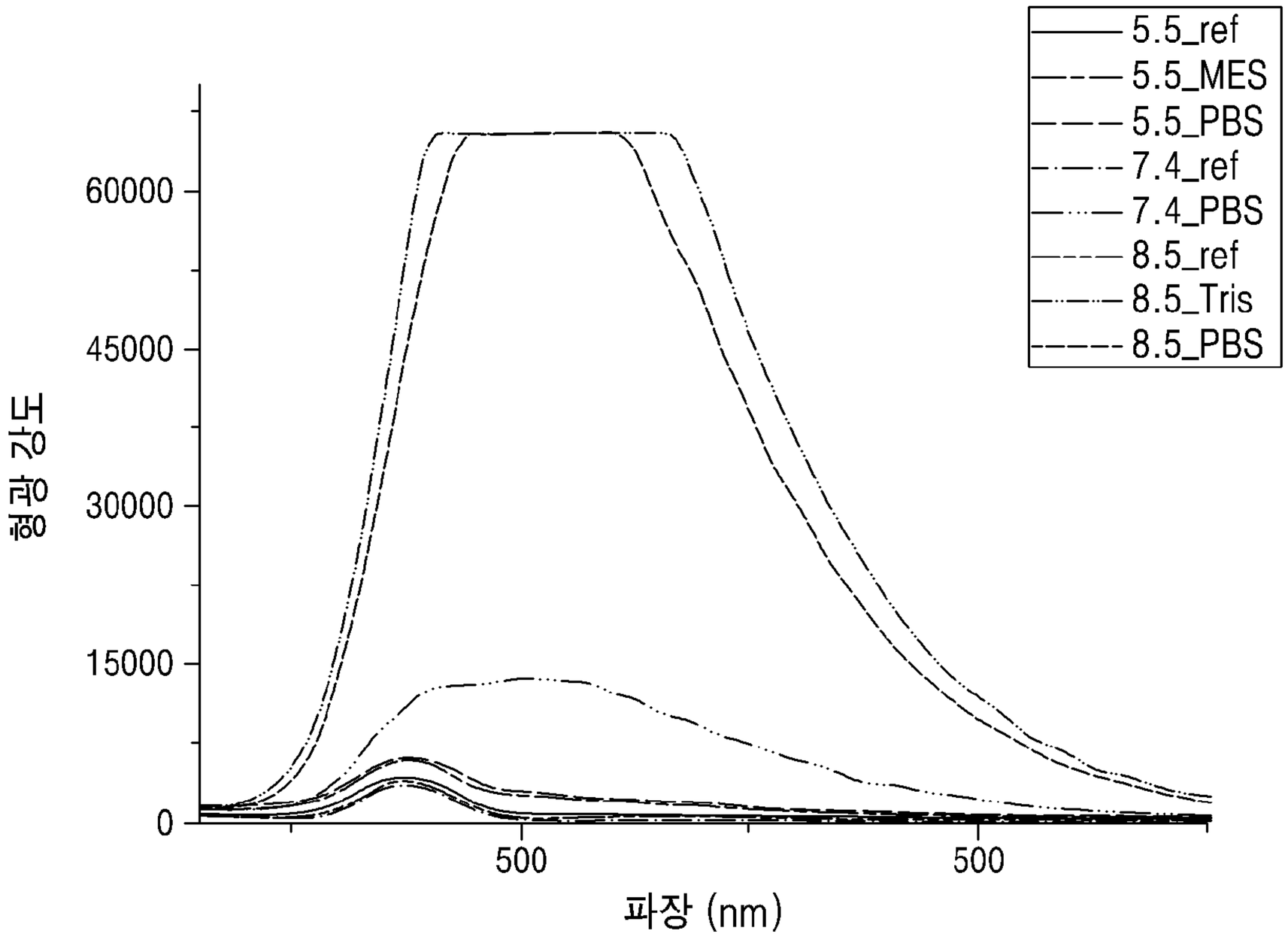
[도14c]


60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
450
500
550
600
650
파장 (nm)
7.4_ref
7.4_BSA
7.4_HSA
7.4_Avidin
7.4_Insulin
7.4_MENA
7.4_Acc-1
7.4_PSMA antibody
7.4_Anti mouse IgG
7.4_Hemoglobin
8.5_ref
8.5_BSA
8.5_HSA
8.5_Avidin
8.5_Insulin
8.5_MENA
8.5_Acc-1
8.5_PSMA antibody
8.5_Anti mouse IgG
8.5_Hemoglobin

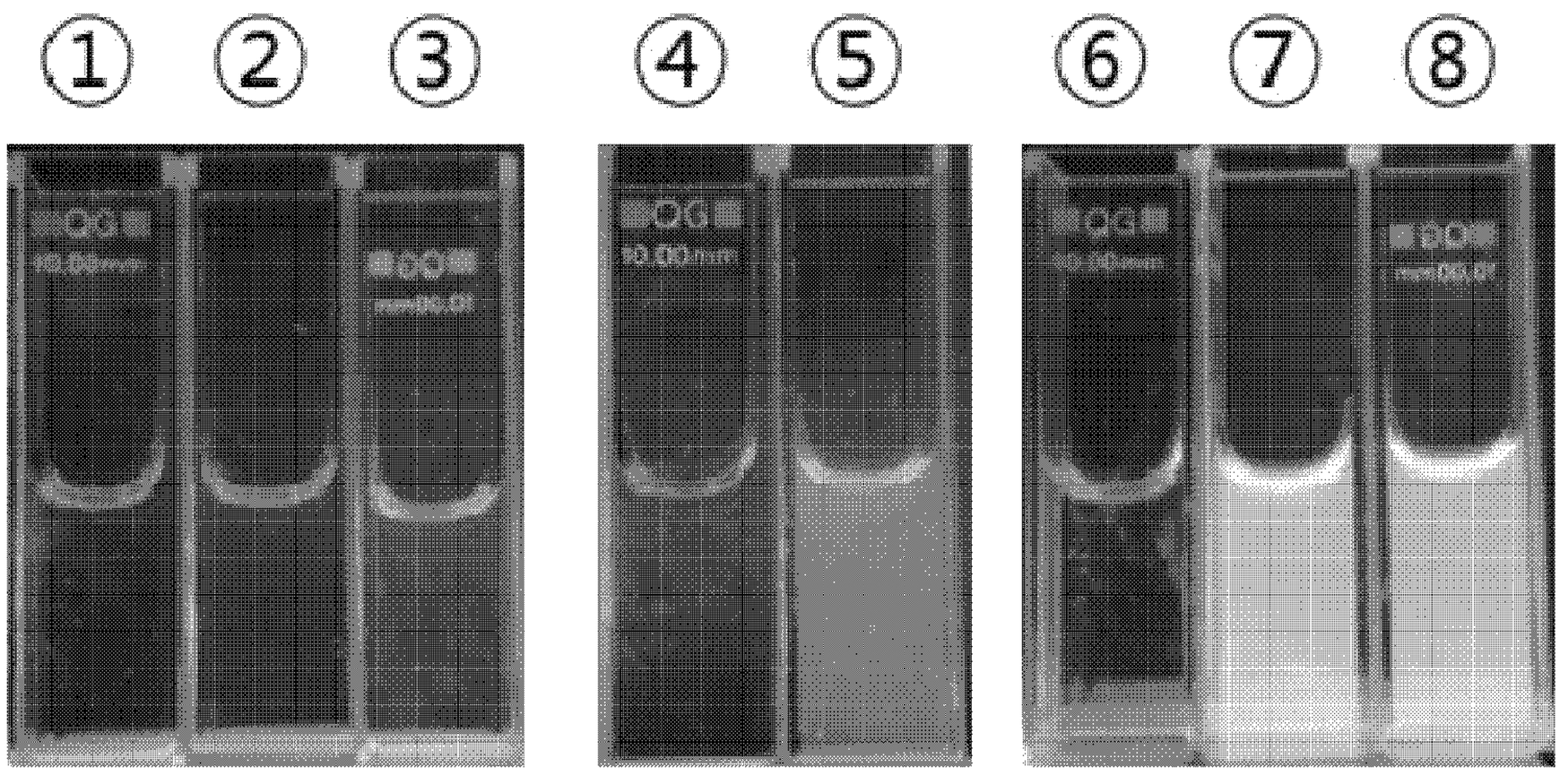
[도14d]


CurA
pH 7.4 0eq, 2eq
pH 8.5 0eq, 2eq
pH 8.5
BSA, HSA, Avidin, Insulin
pH 7.4
BSA, HSA, Avidin, Insulin
배양시간
0.5 시간
1.5 시간

[도15a]


5.5_ref
5.5_MES
5.5_PBS
7.4_ref
7.4_PBS
8.5_ref
8.5_Tris
8.5_PBS
60000
45000
30000
15000
0
평균 강도
500
500
파장 (nm)

[도15b]


①
②
③
④
⑤
⑥
⑦
⑧

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/015922

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/52(2006.01)i; **G01N 21/64**(2006.01)i; **G01N 31/22**(2006.01)i; **C12Q 1/04**(2006.01)i; **C09K 11/06**(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)

G01N 33/52(2006.01); C07F 5/02(2006.01); C09K 11/06(2006.01); G01N 27/26(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, Marpat), Google & keywords: 페닐 보론산 (phenyl boronic acid), 이미징 (imaging), 형광 프로브 (fluorescent probe)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ZHANG, R. et al. Mono-and di-phenylboronic acid receptors with fluorescence sensitivity to d-fructose. Sensors and Actuators B: Chemical. 2014, vol. 198, pp. 260-267. See abstract; and formula 1.	1-16
A	SUN, X. et al. The mechanisms of boronate ester formation and fluorescent turn-on in ortho-aminomethylphenylboronic acids. Nature Chemistry. September 2019, vol. 11, pp. 768-778. See abstract; and figures 1-3.	1-16
A	PHILLIPS, M. D. et al. Boronic acid based modular fluorescent sensors for glucose. Journal of Fluorescence. 2004, vol. 14, pp. 549-559. See entire document.	1-16
A	KR 10-2014-0098436 A (INHA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 08 August 2014 (2014-08-08) See entire document.	1-16
PX	KR 10-2020-0122259 A (EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) 27 October 2020 (2020-10-27) See claims 1-10.	1-16

☑ 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	Date of mailing of the international search report
19 February 2021	**19 February 2021**
Name and mailing address of the ISA/KR **Korean Intellectual Property Office** **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208** Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2020/015922

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	SHIRBHATE, M. E. et al. Optical and Fluorescent Dual Sensing of Aminoalcohols by in situ Generation of BODIPY-like Chromophore. Journal of the American Chemical Society. 29 February 2020, vol. 142, pp. 4975-4979. See abstract; charts 1 and 2; figures 1-2; and formula 1.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2020/015922

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2014-0098436 A	08 August 2014	KR 10-1665046 B1	11 October 2016
KR 10-2020-0122259 A	27 October 2020	US 2020-0347080 A1	05 November 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호

PCT/KR2020/015922

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

G01N 33/52(2006.01)i; **G01N 21/64**(2006.01)i; **G01N 31/22**(2006.01)i; **C12Q 1/04**(2006.01)i; **C09K 11/06**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/52(2006.01); C07F 5/02(2006.01); C09K 11/06(2006.01); G01N 27/26(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 내부검색 시스템), STN (Registry, Caplus, Marpat), Google & 키워드: 페닐 보론산 (phenyl boronic acid), 이미징 (imaging), 형광 프로브 (fluorescent probe)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	ZHANG, R. 등, "Mono-and di-phenylboronic acid receptors with fluorescence sensitivity to d-fructose", Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 198권, 페이지 260-267 초록; 도식 1	1-16
A	SUN, X. 등, "The mechanisms of boronate ester formation and fluorescent turn-on in ortho-aminomethylphenylboronic acids", Nature Chemistry, 2019.09, 11권, 페이지 768-778 초록; 도면 1-3	1-16
A	PHILLIPS, M. D. 등, "Boronic acid based modular fluorescent sensors for glucose", Journal of Fluorescence, 2004, 14권, 페이지 549-559 전문	1-16
A	KR 10-2014-0098436 A (인하대학교 산학협력단) 2014.08.08 전문	1-16
PX	KR 10-2020-0122259 A (이화여자대학교 산학협력단) 2020.10.27 청구항 1-10	1-16

☑ 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	국제조사보고서 발송일
2021년02월19일(19.02.2021)	**2021년02월19일(19.02.2021)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 **+82-42-481-8578**

심사관

정다원

전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2020/015922

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
PX	SHIRBHATE, M. E. 등, "Optical and Fluorescent Dual Sensing of Aminoalcohols by in situ Generation of BODIPY-like Chromophore", Journal of the American Chemical Society, 2020.02.29, 142권, 페이지 4975-4979 초록; 차트 1, 2; 도면 1-2; 도식 1	1-16

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2020/015922

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0098436 A	2014/08/08	KR 10-1665046 B1	2016/10/11
KR 10-2020-0122259 A	2020/10/27	US 2020-0347080 A1	2020/11/05