(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0052483
(43) 공개일자 2025년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 321/00 (2006.01) *C07D 487/04* (2006.01)
C07F 9/655 (2006.01) *C09K 11/06* (2006.01)
C12Q 1/04 (2017.01) *C12Q 1/06* (2006.01)
G01N 21/76 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 321/00 (2013.01)
C07D 487/04 (2022.08)
(21) 출원번호 10-2025-7011217(분할)
(22) 출원일자(국제) 2019년05월24일
심사청구일자 2025년04월07일
(62) 원출원 특허 10-2020-7037220
원출원일자(국제) 2019년05월24일
심사청구일자 2022년04월12일
(85) 번역문제출일자 2025년04월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2019/063418
(87) 국제공개번호 WO 2019/224338
국제공개일자 2019년11월28일
(30) 우선권주장
18174403.8 2018년05월25일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
네미스 테크놀로지스 아게
스위스 8600 뒤벤도르프 위벨란트슈트라쎄 109
라모트 앳 텔-아비브 유니버시티 리미티드
이스라엘 6139201 텔-아비브, 피.오.박스 39296
(72) 발명자
샤밧 도론
이스라엘, 6941136 텔 아비브, 42/7 요체벳 밧 미리암 에스티.
로스-콘포티 미갈 엘리
이스라엘, 6139201 텔 아비브, 피.오.박스 39296, 씨/오 라모트 앳 텔-아비브 유니버시티 리미티드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

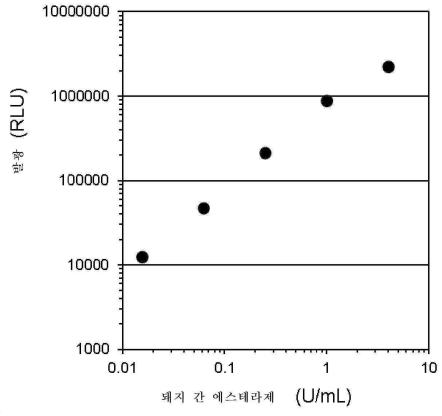
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **디옥세탄 화합물 및 미생물의 검출을 위한 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 디옥세탄 화합물, 화학발광 수단에 의한 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인에서의 용도 및 해당 방법에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07F 9/65512 (2013.01)
C09K 11/06 (2022.01)
C12Q 1/04 (2013.01)
C12Q 1/045 (2013.01)
C12Q 1/06 (2013.01)
G01N 21/76 (2013.01)
G01N 21/763 (2013.01)
C12Q 2304/00 (2024.08)

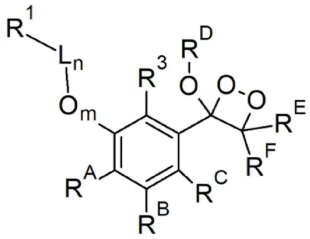
(72) 발명자
하나냐 니르
이스라엘, 6139201 텔 아비브, 피.오.박스 39296, 씨/오 라모트 앳 텔-아비브 유니버시티 리미티드
그린 오리
이스라엘, 6139201 텔 아비브, 피.오.박스 39296, 씨/오 라모트 앳 텔-아비브 유니버시티 리미티드
스피츠 우르스
스위스, 9000 생 갈렌, 헤벨슈트라쎄 17
윅 루카스
스위스, 8409 빈터투어, 게른슈트라쎄 51
이쎈 줄리안
스위스, 9014 생 갈렌, 볼프강호프 15
보버그 라파엘
스위스, 8153 뤔랑, 흰리슈트라쎄 4
크리비우 리카르도
스위스, 8051 취리히, 루에기스란드슈트라쎄 29
밥야코바 주자나
슬로바키아, 920 01 코플로토브, 코플로토브스 164
야오 춘얀
독일, 78315 라돌프젤 암 보덴시, 줌 레첸탈 7 에이

명 세 서

청구범위

청구항 1

화학식 I의 화합물로서,



(화학식 I),

상기 식에서

R^1은 분석물-반응성 기로서, 아세틸, 부티릴, 옥타노일, 노나노일, 에틸아세틸, 미오-이노시톨 포스포릴, 포스포릴, 아미노 아시딜 기, L-피로글루타믹 아시딜, 디펩타이드 기, 트리펩타이드 기, 베타-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루쿠로닐, 베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염, n-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜, N-아세틸뉴라미니딜, 셀로비오시딜, 알파-D-리보푸라노시딜, 베타-D-리보푸라노시딜, 콜린 포스포릴, $-NO_2$, 스테아로일, 팔미토일, 올레오일, 리놀레일, Tos-L-알라닐, 알파-만노실, 베타-만노실, 알파-푸코실, 베타-푸코실, 알파-이두로노실, 베타-이두로노실, 알파-(올리고)말토실, 옥살릴에스테르, SucOMe-Arg-Pro-티로시닐, 베타-락타마제-불안정성 기, 5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드, 아크릴산 에스테르, Ac-QLQ-, Ac-FQLQ-, Ac-EFQLQ-, 및 Ac-DEFQLQ-로부터 선택되는 효소-불안정성 (enzyme-labile) 기, 및 화학식 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$를 갖는 붕소-포함 기로부터 선택되는 분석물-반응성 기이고;

Z 및 Z'는 R^4 및 OR^5로부터 독립적으로 선택되고,

R^4는 -OH, $-O^- \ Kat^+$, C1-C4 알킬, C2-C4 헤테로알킬, C2-C4 알케닐, C2-C4 헤테로알케닐, C2-C4 알키닐, C2-C4 헤테로알키닐, C5-C6 아릴, C5-C6 헤테로아릴, C6-C10 아르알킬, 및 C6-C10 헤테로아르알킬로부터 선택되고,

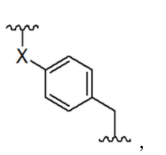
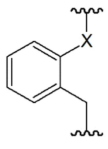
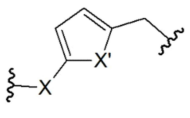
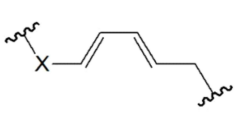
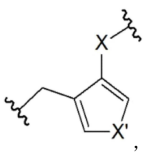
R^5는 -H, C1-C4 알킬, C2-C4 헤테로알킬, C2-C4 알케닐, C2-C4 헤테로알케닐, C2-C4 알키닐, C2-C4 헤테로알키닐, C5-C6 아릴, C5-C6 헤테로아릴, C6-C10 아르알킬, 및 C6-C10 헤테로아르알킬로부터 선택되거나,

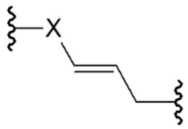
2개의 R^4, 2개의 R^5 또는 1개의 R^4 및 1개의 R^5는 개재하는 원자 (intervening atom)와 함께 5 내지 7원의 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

Z"는 F, Cl, Br, 및 I로부터 선택되고;

Kat^+는 유기 또는 무기 양이온이고;

L은 분석물-반응성 기 R^1 상의 분석물의 작용시, 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되는,

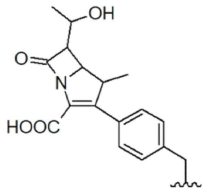
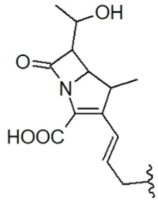
 ,  ,  ,  ,  , 및

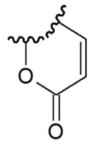
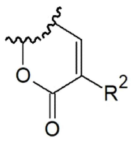
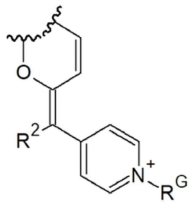
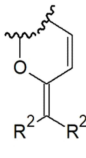

로부터 선택되는 자기 희생 링커이며, 여기서 X는 R^1에 연결되고, 부재하거나 -O-, -NH-, 및 $-N^+(R^G)_2$-로부터 선택되며, 단 R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-NO_2$인 경우, X는 부재하고; X'는 S, O, NH, 및 NR^G로부터 선택되며; L은 펩타이드, 엔도리신 또는 단백질로 선택적으로 작용화 (functionalized)되고;

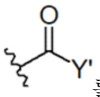
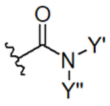
단,

R^1이 효소-불안정성 기일 때, n은 1이고, m은 1이거나, n은 0이고, m은 1이고;

R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$일 때, n 및 m은 둘 모두 0 또는 둘 모두 1이고; 그리고

R^1이 효소-불안정성기  또는  일 때, n은 0이고, m은 1이고;

R^A 및 R^C 중 하나는 R^B와 함께,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 6원 고리를 형성하고, R^A 및 R^C 중 다른 하나는 H 또는 R^2-Q-이고;

R^2는 시아노, 니트로, 설폭사이드, 술폰, 아릴, 알케닐, , 카보닐, 구조  를 갖는 카보닐, 아미드, 구조  를 갖는 아미드로부터 선택되는 기이고,

Y는 H, C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고,

Y' 및 Y"는 H, 및 C1-C12 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 질소 원자와 함께 헤테로사이클릭 구조를 형성하고;

R^3은 H, F, Cl, Br, I, CF_3, 또는 R^2-Q-이고;

Q는 화학식 I의 화합물의 중심 방향족 고리의 파이-시스템과 접합된 파이-시스템을 포함하는 기이고;

단, R^3가 R^2-Q-일 때, R^A 및 R^C 중 하나는 H이고;

R^D는 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 선택되고;

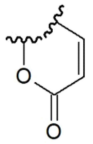
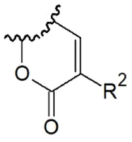
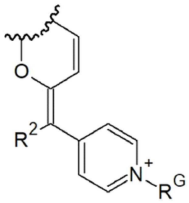
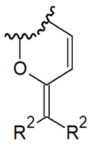
R^E 및 R^F는 분지형 C3-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^E 및 R^F는 부착된 탄소 원자와 함께 융합된, 스피로 또는 폴리사이클릭 고리를 형성하고;

R^G는 각각 독립적으로 C1-C12 알킬로부터 선택되는, 화합물.

청구항 2

제1항에 있어서,

R^A가 H이고;

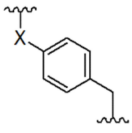
R^C는 R^B와 함께,  ,  ,  , 및  로부터 선택되는 6원 고리를 형성하는, 화합물.

청구항 3

제1항에 있어서,

(i) Z"가 F이거나;

(ii) Kat^+가 알칼리 금속 양이온이거나;

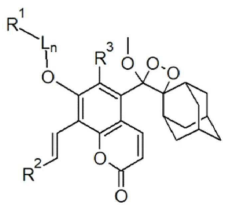
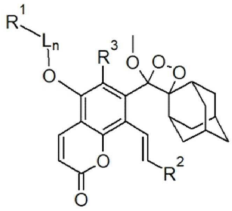
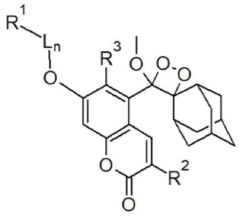
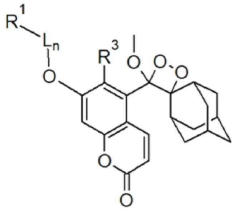
(iii) L이  이거나;

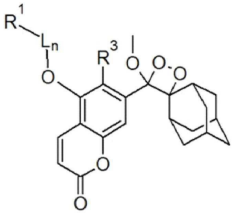
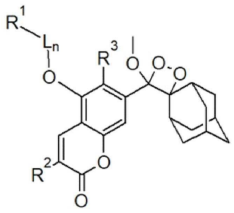
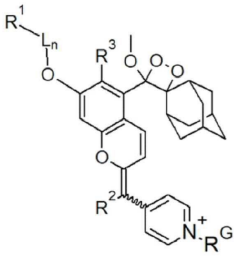
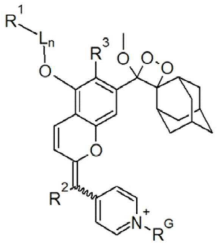
(iv) X가 -O- 또는 $-N^+(CH_3)_2-$이거나; 또는

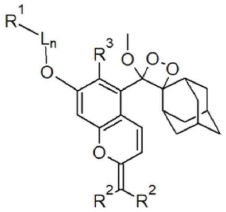
(v) Y' 및 Y"는 질소 원자와 함께 말레이미드기를 형성하는, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

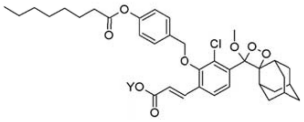
 ,  ,  ,  ,

 ,  ,  ,  , 및

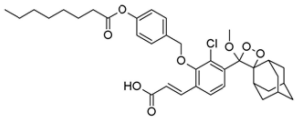
 로부터 선택되는, 화합물.

청구항 5

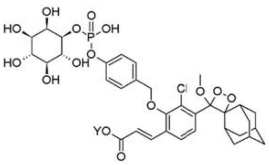
화학식 II, IIa, III, IIIa, IIIb, VII, VIIa, VIIb, VIII, 및 VIIIa의 화합물로부터 선택되는, 화합물:



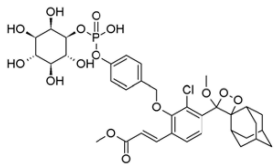
(화학식 II)



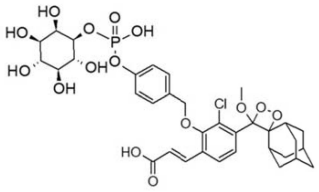
(화학식 IIa)



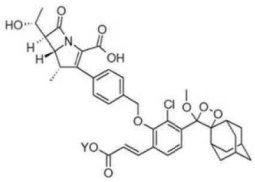
(화학식 III)



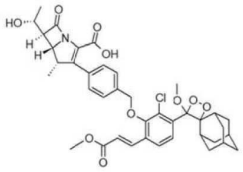
(화학식 IIIa)



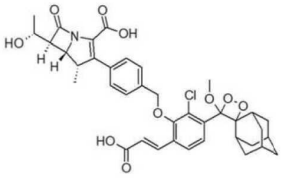
(화학식 IIIb)



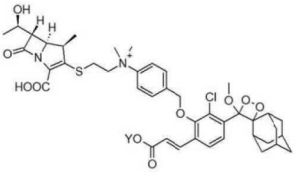
(화학식 VII)



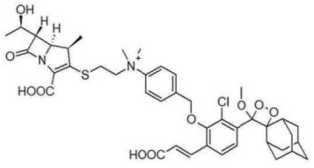
(화학식 VIIa)



(화학식 VIIb)



(화학식 VIII)



(화학식 VIIIa),

여기서, Y는 H, 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온임.

청구항 6

표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물의 검출을 위한 방법으로서,

a) 하나 이상의 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

b) 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물을 첨가하는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 방법은 표적 미생물의 검출을 위한 것인, 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 표적 미생물은 박테리아, 효모, 곰팡이, 및 바이러스로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 박테리아는 살모넬라(*Salmonella*); 리스테리아 (*Listeria*); 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*); E. 콜라이(*E. coli*); 카바페넴 (carbapenem) 내성 박테리아; 캄필로박터(*Campylobacter*); 바실루스(*Bacillus*); 클로스트리듐(*Clostridium*); 마이코박테리움(*Mycobacterium*); 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*); 슈도모나스(*Pseudomonas*); 엔테로코쿠스(*Enterococcus*); 시트로박터(*Citrobacter*); 콜라이형(*Coliform*); 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*); 제오바실루스 스테아로서모필루스(*Geobacillus stearothermophilus)*; 비브리오(*Vibrio*); 레지오넬라 네우모필리아(*Legionella pneumophilia*); 아피라제(apyrase) 포함 미생물: 광범위 베타락타마제(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) 생성 장내 세균; 및 프레보텔라(*Prevotella*)로부터 선택되고; 상기 효모는 칸디다(*Candida*)이며; 상기 바이러스는 칼리시비리다에과(Caliciviridae family) 바이러스인, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 살모넬라는 S. 엔테리카(*S. enterica*)이고; 상기 리스테리아는 L. 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)이고; 상기 스타필로코쿠스는 S. 아우레우스(*S. aureus*) 또는 메티실린-내성 스타필로코쿠스 아우레우스(MRSA)이고; 상기 카바페넴 내성 박테리아는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 클렙시엘라 네우모니아(*Klebsiella pneumonia*)이고; 상기 캄필로박터는 C. 제주니(*C. jejuni*), C. 콜라이(*C. coli*) 또는 C. 라리(*C. lari*)이고; 상기 클로스트리듐은 C. 퍼프리겐스(*C. perfringens*) 또는 C. 디피실레(*C. difficile*)이고; 상기 마이코박테리움은 M. 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*)이고; 상기 스트렙토코쿠스는 S. 아갈락티아에(*S. agalactiae*) 또는 S. 피오게네스(*S. pyogenes*)이고; 상기 슈도모나스는 P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)이고; 상기 엔테로코쿠스는 반코마이신-내성 엔테로코쿠스(VRE)이고; 상기 아피라제 포함 미생물은 쉬겔라(*Shigella*)이고; 상기 칸디다는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)이고; 상기 칼리시비리다에과 바이러스는 라고바이러스(Lagovirus), 노로바이러스(Norovirus), 사포바이러스(Sapovirus), 네보바이러스(Nebovirus), 또는 레코바이러스(Recovirus)인, 방법.

청구항 11

하나 이상의 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물을 첨가하는 단계, 및

방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는, 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물의 검출을 위한 방법에 있어서,

(i) 상기 방법이 성장 기질, 영양소, 및 대사산물의 효소적 산화에 의한 상기 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물의 검출을 위한 것이고, 상기 방법이

a) 효소에 의해 산화될 수 있는 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

b) (b1) 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물을 산화할 수 있는 효소를 첨가하여 과산화수소를 생성하는 단계,

(b2) 과산화수소와 접촉시 화학식 I의 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$인 화합물을 첨가하는 단계로서,

단계 (b1) 및 (b2)는 동시에 또는 후속하여 수행되는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함하는 것이거나;

(ii) 상기 방법이 리물루스 인자 C의 검출을 통한 박테리아 내독소의 검출을 위한 것으로, 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 Boc-Val-Pro-아르기니닐 또는 Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐인 화합물과 리물루스 인자 C가 내독소 포함 배지에 첨가되고, 방출된 광이 검출되는 방법이거나;

(iii) 상기 방법이 낙농 산물의 저온살균 시험을 위한 것이고, 상기 방법이

a) 낙농 산물 배지를 제공하는 단계,

b) 상기 낙농 산물 배지의 저온살균 단계,

c) 화합물이 광을 방출하도록 하기 위해, 선택적으로 완충액과 조합하여, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 포스포릴인 화합물을 첨가하는 단계; 및

d) 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는 것이거나;

(iv) 상기 방법은 미생물에서 베타-락탐 항생제 내성의 시험을 위한 것이고, 상기 방법이

a) 하나 이상의 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

b) 베타-락탐 항생제 내성 미생물이 배지에 존재하는 경우 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 베타-락타마제-불안정성 기인 화합물을 첨가하는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는 것이거나;

(v) 상기 방법이 무기 포스페이트의 검출을 위한 것이고, 상기 방법이

a) 무기 포스페이트를 포함하는 배지를 제공하는 단계,

b) 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 옥살릴에스테르인 화합물을 첨가하는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는 것이거나;

(vi) 상기 방법이 멸균 공정의 모니터링을 위한 것이고, 상기 방법이

a) (a1) 정상 조건 하에, 알파-글루코시다제를 생성하는 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

(a2) 배지를 멸균하는 단계,

b) 배지에 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1은 알파-D-글루코피라노시딜인 화합물을 첨가하는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하는 것이거나;

(vii) 상기 방법이 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출, 및 항생제 감수성 시험을 위한 것이고, 상기 방법이

a) 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계,

b) 항생제를 첨가하는 단계,

c) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 규정된 바와 같은 화합물로서, R^1이 상기 화합물의 발광이 유발되도록 상기 미생물의 효소에 의해 제거가능하거나 변형되는 효소-불안정성 기인 화합물을 첨가하는 단계, 및

d) 존재하는 경우, 방출된 광을 검출하는 단계

를 포함하고, 여기서 단계 c)는 단계 b) 이전, 동시 또는 이후에 수행되는 것인, 방법.

청구항 12

제6항에 있어서, R^1 및 각각의 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물은 다음 표에 제시된 바와 같이 규정되는, 방법:

R^1	표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물
아세틸	캄필로박터 제주니, C. 콜라이, 및 C. 라리를 포함하는 미생물
부티릴	모락셀라 카타르할리스(Moraxella catarrhalis)를 포함하는 미생물
옥타노일	살모넬라
노나노일	살모넬라
미오-이노시톨 포스포릴	리스테리아 모노사이토게네스; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버큘로시스
포스포릴	스타필로코쿠스 아우레우스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에; 칸디다 종; MRSA
L-알라닐	그람-음성 박테리아; 효모 및 곰팡이
L-류시닐	효모 및 곰팡이
β-알라닐	슈도모나스 아에루기노사
L-피로글루타믹 아시딜	엔테로코시; 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터
베타-D-갈락토피라노시딜	콜라이형; E. 콜라이
알파-D-갈락토피라노시딜	살모넬라
알파-D-글루코피라노시딜	크로노박터 사카자키; 스타필로코쿠스 아우레우스; MRSA; VRE; 제오바실루스 스테아로서모필루스
베타-D-글루코피라노시딜	리스테리아 spp ESBL 생성 장내 세균 비브리오 엔테로코시 VRE 칸디다 종 클로스트리듐 디피실레
베타-D-글루쿠로닐	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에
베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에
n-아세틸-베타-D-갈락토사미닐딜	칸디다 알비칸스
N-아세틸뉴라미닐딜	프레보텔라
셀로비오시딜	크로노박터 사카자키
리보푸라노시딜	쉬겔라
콜린 포스포릴	바실루스
$-B(Z)(Z')_2$, $-B(Z'')_3^- Kat^+$	1) 다양한 미생물 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2 2) 미생물 대사산물/기질에서 반응하는 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2
$-NO_2$	활성 미생물
옥살릴에스테르	아피라제
Boc-Val-Pro-아르기니닐	박테리아 내독소
Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	박테리아 내독소
SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	레지오넬라 뉴모필라
베타-락타마제-불안정성 기	항생제 내성 미생물
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	노로바이러스
5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드	캄필로박터 제주니
아크릴산 에스테르	시스테인

청구항 13

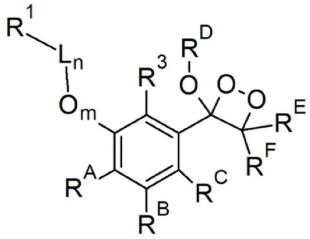
표적 미생물의 검출 방법으로서,

a) 하나 이상의 표적 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계;

b) 화학발광 프로브가 광을 방출하도록, 화학발광 프로브를 첨가하는 단계, 및

c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함하며,

상기 화학발광 프로브가 화학식 I의 화합물인, 방법:



(화학식 I),

상기 식에서

R^1은 분석물-반응성 기로서, 아세틸, 부티릴, 옥타노일, 노나노일, 에틸아세틸, 미오-이노시톨 포스포릴, 포스포릴, 아미노 아시딜 기, L-피로글루타믹 아시딜, 디펩타이드 기, 트리펩타이드 기, 베타-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루쿠로닐, 베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염, n-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜, N-아세틸뉴라미니딜, 셀로비오시딜, 알파-D-리보푸라노시딜, 베타-D-리보푸라노시딜, 콜린 포스포릴, $-NO_2$, 스테아로일, 팔미토일, 올레오일, 리놀레일, Tos-L-알라닐, 알파-만노실, 베타-만노실, 알파-푸코실, 베타-푸코실, 알파-이두로노실, 베타-이두로노실, 알파-(올리고)말토실, 옥살릴에스테르, SucOMe-Arg-Pro-티로시닐, 베타-락타마제-불안정성 기, 5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드, 아크릴산 에스테르, Ac-QLQ-, Ac-FQLQ-, Ac-EFQLQ-, 및 Ac-DEFQLQ-로부터 선택되는 효소-불안정성 (enzyme-labile) 기, 및 화학식 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$를 갖는 붕소-포함 기로부터 선택되는 분석물-반응성 기이고;

Z 및 Z'는 R^4 및 OR^5로부터 독립적으로 선택되고,

R^4는 -OH, $-O^- \ Kat^+$, C1-C4 알킬, C2-C4 헤테로알킬, C2-C4 알케닐, C2-C4 헤테로알케닐, C2-C4 알키닐, C2-C4 헤테로알키닐, C5-C6 아릴, C5-C6 헤테로아릴, C6-C10 아르알킬, 및 C6-C10 헤테로아르알킬로부터 선택되고,

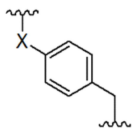
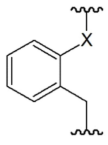
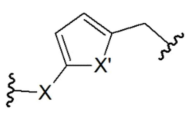
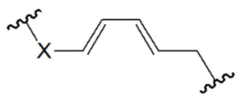
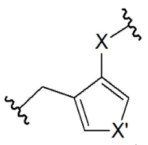
R^5는 -H, C1-C4 알킬, C2-C4 헤테로알킬, C2-C4 알케닐, C2-C4 헤테로알케닐, C2-C4 알키닐, C2-C4 헤테로알키닐, C5-C6 아릴, C5-C6 헤테로아릴, C6-C10 아르알킬, 및 C6-C10 헤테로아르알킬로부터 선택되거나,

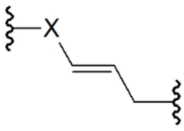
2개의 R^4, 2개의 R^5 또는 1개의 R^4 및 1개의 R^5는 개재하는 원자 (intervening atom)와 함께 5 내지 7원의 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

Z"는 F, Cl, Br, 및 I로부터 선택되고;

Kat^+는 유기 또는 무기 양이온이고;

L은 분석물-반응성 기 R^1 상의 분석물의 작용시, 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되는,

 ,  ,  ,  ,  , 및

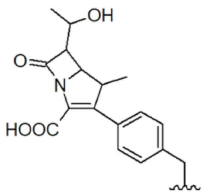
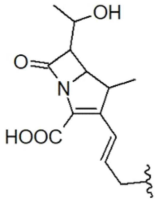


로부터 선택되는 자기 희생 링커이며, 여기서 X는 R^1에 연결되고, 부재하거나 -O-, -NH-, 및 $-N^+(R^G)_2-$로부터 선택되며, 단 R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-NO_2$인 경우, X는 부재하고; X'는 S, O, NH, 및 NR^G로부터 선

택되며; L은 펩타이드, 엔도리신 또는 단백질로 선택적으로 작용화 (functionalized)되고;

단,

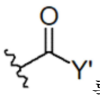
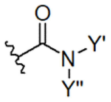
R^1이 효소-불안정성 기일 때, n은 1이고, m은 1이거나, n은 0이고, m은 1이고;

R^1이 효소-불안정성기  또는  일 때, n은 0이고, m은 1이고;

R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$일 때, n 및 m은 둘 모두 0 또는 둘 모두 1이고;

R^A 및 R^C는 H 및 R^2-Q-로부터 독립적으로 선택되고, 단 R^A 및 R^C는 모두 H가 아니며;

R^B는 H이고;

R^2는 시아노, 니트로, 설폭사이드, 술폰, 아릴, 알케닐, , 카보닐, 구조  를 갖는 카보닐, 아미드, 구조  를 갖는 아미드로부터 선택되는 기이고,

Y는 H, C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고,

Y' 및 Y"는 각각 독립적으로 H 및 C1-C12 알킬로부터 선택되거나, 질소 원자와 함께 헤테로사이클릭 구조를 형성하고;

R^3은 H, F, Cl, Br, I, CF_3, 또는 R^2-Q-이고;

Q는 화학식 I의 화합물의 중심 방향족 고리의 파이-시스템과 접합된 파이-시스템을 포함하는 기이고;

R^D는 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬 및 C3-C7 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고;

R^E 및 R^F는 각각 독립적으로 분지형 C3-C18 알킬 및 C3-C7 사이클로알킬로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되거나, R^E 및 R^F는 부착된 탄소 원자와 함께 융합된, 스피로 또는 폴리사이클릭 고리를 형성하고;

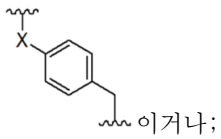
R^G는 각각 독립적으로 C1-C12 알킬로부터 선택된다.

청구항 14

제13항에 있어서,

(i) Z"가 F이거나;

(ii) Kat^+가 알칼리 금속 양이온이거나;

(iii) L이  이거나;

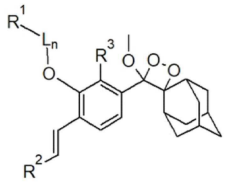
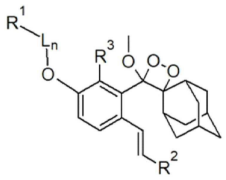
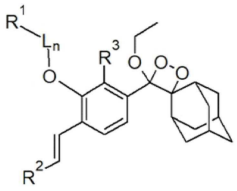
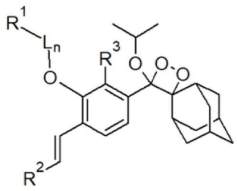
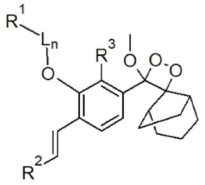
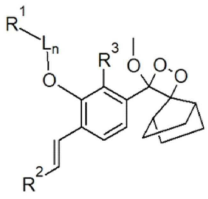
(iv) X가 -O- 또는 $-N^+(CH_3)_2$-이거나; 또는

(v) Y' 및 Y"는 질소 원자와 함께 말레이미드기를 형성하는, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

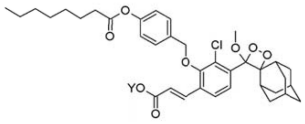
상기 화합물이


,

,

,

,

, 및

로부터 선택되는, 방법.

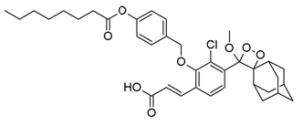
청구항 16

제13항에 있어서,

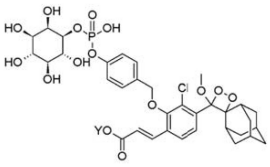
상기 화합물이 화학식 II, IIa, III, IIIa, IIIb, IV, IVa, V, Va, Vb, VI, VIa, VIb, VIc, VII, VIIa, VIIb, VIII, 및 VIIIa의 화합물로부터 선택되는, 방법:



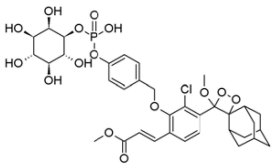
(화학식 II)



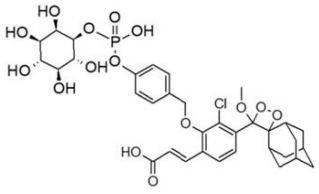
(화학식 IIa)



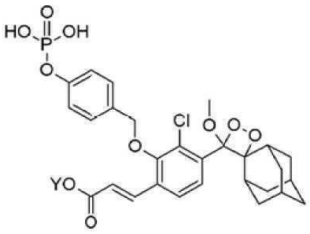
(화학식 III)



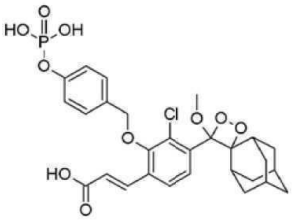
(화학식 IIIa)



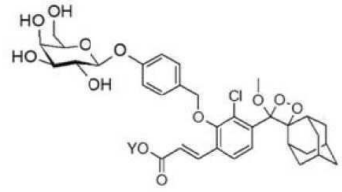
(화학식 IIIb)



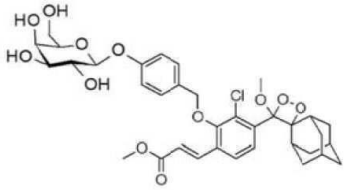
(화학식 IV)



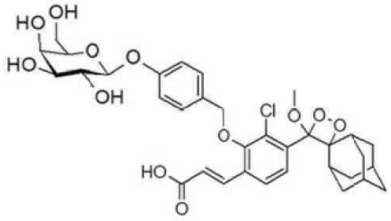
(화학식 IVa)



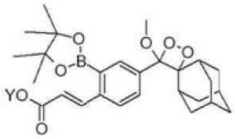
(화학식 V)



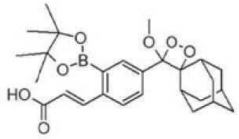
(화학식 Va)



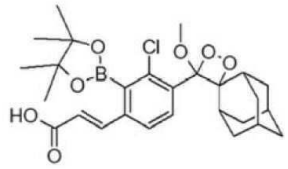
(화학식 Vb)



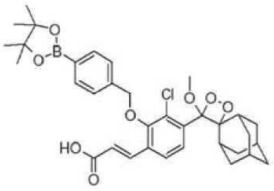
(화학식 VI)



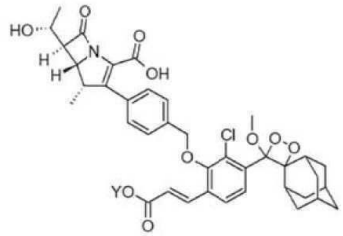
(화학식 VIa)



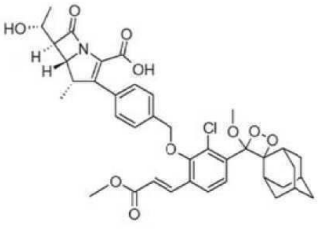
(화학식 VIb)



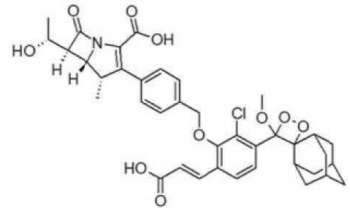
(화학식 VIc)



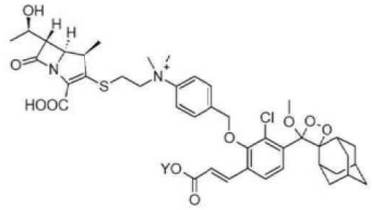
(화학식 VII)



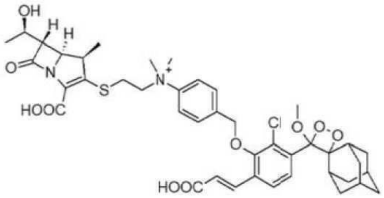
(화학식 VIIa)



(화학식 VIIb)



(화학식 VIII)



(화학식 VIIIa),

여기서, Y는 H, 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온임.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 미생물은 박테리아, 효모, 곰팡이, 및 바이러스로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 18

제17항에 있어서,

상기 박테리아는 살모넬라(*Salmonella*); 리스테리아 (*Listeria*); 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*); E. 콜라이(*E. coli*); 카바페넴 (carbapenem) 내성 박테리아; 캄필로박터(*Campylobacter*); 바실루스(*Bacillus*); 클로스트리듐(*Clostridium*); 마이코박테리움(*Mycobacterium*); 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*); 슈도모나스(*Pseudomonas*); 엔테로코쿠스(*Enterococcus*); 시트로박터(*Citrobacter*); 콜라이형(*Coliform*); 크로노박터 사카자키(*Cronobacter sakazakii*); 제오바실루스 스테아로서모필루스(*Geobacillus stearothermophilus)*; 비브리오(*Vibrio*); 레지오넬라 네우모필리아(*Legionella pneumophilia*); 아피라제(apyrase) 포함 미생물: 광범위 베타락타마제(extended-spectrum beta-lactamase, ESBL) 생성 장내 세균; 및 프레보텔라(*Prevotella*)로부터 선택되고; 상기 효모는 칸디다(*Candida*)이며; 상기 바이러스는 칼리시비리다에과(Caliciviridae family) 바이러스인, 방법.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 살모넬라는 S. 엔테리카(*S. enterica*)이고; 상기 리스테리아는 L. 모노사이토게네스(*L. monocytogenes*)이고; 상기 스타필로코쿠스는 S. 아우레우스(*S. aureus*) 또는 메티실린-내성 스타필로코쿠스 아우레우스(MRSA)이고; 상기 카바페넴 내성 박테리아는 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*) 또는 클렙시엘라 네우모니아(*Klebsiella pneumonia*)이고; 상기 캄필로박터는 C. 제주니(*C. jejuni*), C. 콜라이(*C. coli*) 또는 C. 라리(*C. lari*)이고; 상기 클로스트리듐은 C. 퍼프리겐스(*C. perfringens*) 또는 C. 디피실레(*C. difficile*)이고; 상기 마이코박테리움은 M. 투버쿨로시스(*M. tuberculosis*)이고; 상기 스트렙토코쿠스는 S. 아갈락티아에(*S. agalactiae*) 또는 S. 피오게네스(*S. pyogenes*)이고; 상기 슈도모나스는 P. 아에루기노사(*P. aeruginosa*)이고; 상기 엔테로코쿠스는 반코마이신-내성 엔테로코쿠스(VRE)이고; 상기 아피라제 포함 미생물은 쉬겔라(*Shigella*)이고; 상기 칸디다는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)이고; 상기 칼리시비리다에과 바이러스는 라고바이러스(Lagovirus), 노로바이러스(Norovirus), 사포바이러스(Sapovirus), 네보바이러스(Nebovirus), 또는 레코바이러스(Recovirus)인, 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, R^1 및 각각의 표적 미생물이 다음 표에 제시된 바와 같이 규정되는, 방법:

R^1	표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물
아세틸	대부분의 미생물의 일반적 기질; C. 라리로부터의 C. 콜라이 및 캄필로박터 제주니의 분화
부티릴	모락셀라 카타르할리스(Moraxella catarrhalis); 대부분의 미생물의 일반적 기질
옥타노일	살모넬라
노나노일	살모넬라
미오-이노시톨 포스포릴	리스테리아 모노사이토게네스; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버큘로시스
포스포릴	스타필로코쿠스 아우레우스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에; 칸디다 종; MRSA
L-알라닐	그람-음성 박테리아; 효모 및 곰팡이
L-류시닐	효모 및 곰팡이
β-알라닐	슈도모나스 아에루기노사
L-피로글루타믹 아시딜	엔테로코시; 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터
베타-D-갈락토피라노시딜	콜라이형; E. 콜라이
알파-D-갈락토피라노시딜	살모넬라
알파-D-글루코피라노시딜	크로노박터 사카자키; 스타필로코쿠스 아우레우스; MRSA; VRE; 제오바실루스 스테아로서모필루스 (멸균화 대조군)
베타-D-글루코피라노시딜	리스테리아 spp ESBL 생성 장내 세균 비브리오 엔테로코시 VRE 칸디다 종 클로스트리듐 디피실레
베타-D-글루쿠로닐	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에
베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에
n-아세틸-베타-D-갈락토사미닐	칸디다 알비칸스
N-아세틸뉴라미닐	프레보텔라
셀로비오시딜	크로노박터 사카자키
리보푸라노시딜	쉬겔라
콜린 포스포릴	바실루스
-B(Z)(Z'), $-B(Z'')_3^- Kat^+$	1) 다양한 미생물 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2 2) 미생물 대사산물/기질에서 반응하는 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2
$-NO_2$	미생물
옥살릴에스테르	아피라제
Boc-Val-Pro-아르기니닐	박테리아 내독소
Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	박테리아 내독소
SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	레지오넬라 뉴모필라
베타-락타마제-불안정성 기	항생제 내성 미생물
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	노로바이러스의 검출
5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드	캄필로박터 제주니
아크릴산 에스테르	시스테인, 총 미생물 개수

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디옥세탄 화합물, 적절한 분자 프로브에 대한 대사, 시약 또는 참조 효소의 작용에 대한 화학발광 표시, 시약 효소에 의한 미생물 대사산물 또는 영양소의 효소 산화로부터 생성된 과산화수소 표시 또는 시약 효소에 의한 작용의 영양소, 기질, 대사산물 또는 부산물의 역할을 하는 무기 포스페이트 검출에 의한 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 이들의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 예를 들어, 음식, 물, 혈액 유지량 등의 박테리아 오염은 주요 건강 문제를 제기한다. 세계 보건기구에 따르면 수인성 질병, 즉 물에서 전염되는 병원성 미생물에 의해 유발되는 질병은 전세계적으로 심각한 질병 부담과 관련된다. 예를 들어, 수인성 설사 질병으로 인해 매년 약 2백만 명의 사망자가 발생하며 대부분은 5세 미만의 어린이에게서 발생한다.

[0003] 따라서, 미생물, 특히 박테리아를 검출하기 위한 방법 및 수단이 매우 요구되고 있다. 이와 관련하여, 박테리아에 의해 생성된 특이적 효소에 의해 절단되는 경우 검출 가능한 신호 (예를 들어, 광)를 생성하는 화합물을 사용하여 박테리아의 속 또는 종을 특이적으로 검출할 수 있다는 것이 밝혀졌다. 형광 또는 착색에 기반한 방법과 비교하여 감응성 (sensitivity)이 우수하고 신호대잡음비가 더 높기 때문에 화학발광 기반 검출 방법이 특히 미

생물, 특히 박테리아의 검출에 선호된다. 특히, 화학발광은 신호대잡음비 (S/N)를 현저하게 증가시켜, 형광으로 달성된 것보다 약 100배 내지 1000배 더 증가시키는 것으로 밝혀졌다. 이는 결과적으로 형광과 비교하여 화학발광의 감응성을 현저하게 증가시킨다.

[0004] 미생물 검출을 위해 적절하게 확립된 시스템은 루시페라제 (luciferase)-루시페린 (luciferin) 시스템이다. D-루시페린은 분자 산소, ATP 및 마그네슘의 존재 하에 루시페라제 (산화환원 효소)에 의해 준 안정 중간체로 산화되어, 그 후 붕괴되어 청록색 광을 방출하는 생물발광 화합물이다. D-루시페린은 효소 불안정성 기로 차단될 수 있으며, 루시페라제 존재 하에서 광 방출을 효소 불안정성 기에 작용하는 효소가 또한 존재하는 상황으로 제한할 수 있다. 예를 들어, Masuda-Nishimura 등은 발광성 기질로서 D-루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드를 갖는 콜라이형 박테리아의 검출을 보고하였다 (문헌[Masuda-Nishimura et al. (2000), Letters in Applied Microbiology, 30: 130-135]).

[0005] 최근 몇 년 동안, 현재 사용되는 대부분의 화학 및 생물발광 프로브와는 달리, (화학) 발광을 유발하는 산화 단계가 필요하지 않아 광범위한 화학 및 생물학적 활성을 검출할 수 있는 화학 프로브가 개발되었다. 이러한 화학발광 프로브는 안정한 디옥세탄 모이어티를 포함한다. WO 2017/130191은 이러한 디옥세탄 기반 화학발광 프로브 및 진단 목적 및 생체 내 촬영을 위한 이의 용도를 개시한다. 또한 문헌[Green et al. (Green, O., Eilon, T., Hananya, N., Gutkin, S., Bauer, CR., Shabat, D., ACS Central Sci., **2017**, 4, 349-58)]은 효소 불안정성 기로 차단하고, 효소 활성의 검출에 적합한 수성 조건에서 사용하기에 적합한 화학발광 디옥세탄 프로브를 개시한다.

[0006] 그러나, 특정 미생물의 검출을 위한 미생물학 분야에서 화학발광 디옥세탄 프로브의 성공적인 사용은 지금까지 보고되지 않았다. 사실, "실제" 조건에서 미생물을 검출하기 위한 화학발광 프로브의 개발은 프로브, 효소 불안정한 보호기를 제거하는데 필요한 미생물의 효소 및 화학발광 반응의 환경 (즉, 미생물을 포함하는 배지)과의 복잡한 상호작용으로 인해 특히 어려운 문제이다. 미생물 검출에 적합한 화학발광 프로브는 (i) 검출되는 미생물에 무독성이어야 하고, (ii) 수성 배지에서 높은 안정성을 가져야 하며, (iii) 소정의 배지에서 강한 화학발광 신호를 생성할 수 있어야 하고, (iv) 효소 불안정성 보호기를 제거하는 효소 부위 (예를 들어, 주변 세포질 공간, 그람 음성 박테리아의 내부 막의 외부 또는 내부 표면, 세포질 등)에 도달할 수 있다. 더욱이, 명백한 이유로 미생물 검출을 위한 화학발광 프로브는 저렴하고 사용하기 편리해야 한다.

[0007] 상기 요건으로 인해, 화학발광 디옥세탄 프로브가 미생물 (수성 배지에서)의 "실제" 검출에 적합한지 여부는 화학 구조로부터 유도되거나 예측될 수 없다. 프로브가 "실험실" 조건에서 우수한 성능을 나타내더라도 "실제" 적용에는 적합하지 않을 수 있다. 따라서 특이적 프로브가 "실제" 조건에서 미생물 검출에 적합한지를 측정하기 위해서는 광범위한 실험이 필요하다.

[0008] 현재, 루시페라제-루시페린 시스템은 미생물 검출에 이용 가능한 유일한 효율적인 "실제" (생체) 발광 수단이다. 그러나 현재 산업 표준임에도 불구하고 이 시스템에는 여러 가지 단점이 있다. 예를 들어 이는 복합 다성분 시스템 (표준 조성: 1. 프로-루시페린 효소 기질 (예를 들어, 루시페린-베타-D- 갈락토피라노시드), 2. 루시페라제, 3. 소 혈청 알부민, 4. ATP, 5. EDTA, 6. D/L-시스테인, 7. $MgSO_4$, 8. 나트륨 피로포스페이트)이며, 일반적으로 1 성분 시스템보다 더 복합적이다. 또한, 루시퍼라제-루시페린 시스템은 루시퍼라제의 사용이 필요한데, 이는 시중에서 입수 가능한 루시퍼라제의 현저한 불안정성으로 인해 비용이 많이 들고 저장 수명이 제한된다. 더욱이, 루시퍼라제-루시페린 시스템의 감응성은 제한되어 있어 개선의 여지가 있다. 일반적으로 화학발광은 생물발광, 특히 생물발광 루시페라제-루시페린 시스템보다 약 10 내지 100배 더 높은 감응성을 나타내며, 특히 중요한 것은 특히 매우 복잡한 생물발광 루시페라제-루시페린 시스템과 비교하여 매우 간단하고 직접적인 적용을 가능하게 하기 때문에 생물발광보다 선호된다.

발명의 내용

[0009] 발명의 목적

[0010] 상기의 관점에서, 본 발명의 목적은 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 프로브 및 방법을 제공하는 것이며, 이는 일반적으로 적용되는 루시페라제-루시페린 시스템의 단점을 극복하고, 특히 루시페라제-루시페린 기반 시스템보다 감응성이 유의하게 증가하여 사용하기 쉽다.

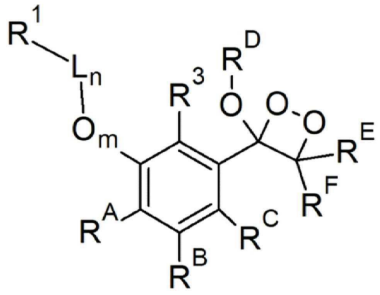
[0011] 화학발광 표시, 예를 들어 적절한 분자 프로브에 대한 대사, 시약 또는 참조 효소의 작용에 대한 화학발광

표시, 시약 효소에 의한 미생물 대사산물 또는 영양소의 효소 산화로부터 생성된 과산화수소 표시 또는 시약 효소에 의한 작용의 영양소, 기질, 대사산물 또는 부산물의 역할을 하는 무기 포스페이트 검출에 의한 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위해 사용될 수 있는 화학발광 프로브 (및 방법)가 제공되어야 한다.

[0012] 발명의 요약

[0013] 상기 목적은 화학발광에 의해 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인에 사용하기에 적합한 특정 디옥세탄 화합물에 의해 달성된다. 하기에 더 상세히 설명된 바와 같이, 놀랍게도 본 발명에 따른 디옥세탄 화합물은 일반적으로 적용되는 루시페라제-루시페린 시스템보다 더 감응성이고 간단한 방식으로 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 가능하게 하는 매우 효율적인 프로브라는 것이 밝혀졌다.

[0014] 제1 양상에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물을 제공하고,

[0015] 

[0016] (화학식 I),

[0017] 상기 식에서,

[0018] R^1은 효소-불안정성 (enzyme-labile) 기 및 화학식 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$를 갖는 붕소-포함 기로부터 선택되는 분석물-반응성 (analyte-responsive) 기이고;

[0019] Z 및 Z'는 R^4 및 OR^5로부터 독립적으로 선택되고,

[0020] R^4는 -OH, $-O^- \ Kat^+$, 선택적으로 치환된 C1-C4 알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 알키닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C5-C6 아릴, 선택적으로 치환된 C5-C6 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C6-C10 아르알킬, 및 선택적으로 치환된 C6-C10 헤테로아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0021] R^5는 -H, 선택적으로 치환된 C1-C4 알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 알키닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C5-C6 아릴, 선택적으로 치환된 C5-C6 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C6-C10 아르알킬, 및 선택적으로 치환된 C6-C10 헤테로아르알킬으로 이루어진 군으로부터 선택되거나,

[0022] 2개의 R^4, 2개의 R^5 또는 1개의 R^4 및 1개의 R^5는 개재하는 원자 (intervening atom)와 함께 5 내지 7원의 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 고리, 바람직하게는 선택적으로 치환된 포화 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

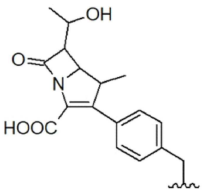
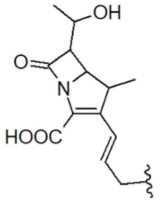
[0023] Z''는 F, Cl, Br, I로부터 선택되고, 바람직하게는 Z''는 F이고;

[0024] Kat^+는 유기 또는 무기 양이온, 바람직하게는 알칼리 금속 양이온이고;

[0025] L은 분석물-반응성 기 R^1 상의 분석물의 작용시, 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되는 자기 희생 링커 기이고, L은 펩타이드, 바람직하게는 세포 투과 펩타이드, 엔도리신 또는 단백질로 선택적으로 작용화되고;

[0026] R^1이 효소-불안정성 기인 경우, n은 1이고, m은 1이거나, n은 0이고, m은 1이고,

[0027] R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-B(Z'')_3^- \ Kat^+$인 경우, n 및 m은 둘 모두 0 또는 둘 모두 1이고;

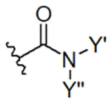
[0028] R^1이  또는  인 경우, n은 0이고, m은 1이고;

[0029] R^A 및 R^C는 H, F, Cl, Br, I, CF_3 및 R^2-Q-, 바람직하게는 H, Cl 및 R^2-Q로부터 독립적으로 선택되거나, R^A 및 R^C 중 하나는 R^B와 함께 중심 방향족 고리의 파이 (pi)-시스템을 연장하는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고, R^A 및 R^C 중 다른 하나는 H 또는 R^2-Q-이고;

[0030] 단 R^A 및 R^C는 둘 모두 H가 아니고;

[0031] R^B는 H이거나, R^A 및 R^C 중 하나와 함께 상기 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고;

[0032] Q는 화학식 I의 화합물의 중심 방향족 고리의 파이-시스템과 접합된 파이-시스템을 포함하는 기이고;

[0033] R^2는 시아노, 니트로, 설폭사이드, 술폰, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 알케닐, , 카보닐, 구조 를 갖는 카보닐, 아미드, 구조  를 갖는 아미드로부터 선택되는 기이고,

[0034] Y는 H, 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고,

[0035] Y' 및 Y''는 H, 및 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 질소 원자와 함께 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 구조, 바람직하게는 선택적으로 치환된 말레이미드기를 형성하고;

[0036] R^3은 H, F, Cl, Br, I, CF_3 또는 R^2-Q-이고;

[0037] 단 R^3은 R^2-Q-인 경우, R^A 및 R^C 중 적어도 하나, 바람직하게는 R^A는 H, F, Cl, Br, I 또는 CF_3, 바람직하게는 Cl이고;

[0038] R^D는 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 선택되고;

[0039] R^E 및 R^F는 분지형 C3-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^E 및 R^F는 부착된 탄소 원자와 함께 선택적으로 치환된 융합, 스피로 또는 폴리사이클릭 고리를 형성한다.

[0040] 제2 양상에서, 본 발명은 표적 분석물 (예를 들어, 과산화수소), 표적 미생물 또는 표적 대사산물, 바람직하게는 미생물, 예를 들어 박테리아의 검출을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0041] 제3 양상에서, 본 발명은 성장 기질, 영양소, 및 대사산물의 효소적 산화에 의한 상기 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물의 검출을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 상기 성장 기질, 영양소, 및 대사산물의 효소적 산화에 의한 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0042] 제4 양상에서, 본 발명은 리물루스 인자 C (limulus factor C)를 사용하여 박테리아 내독소의 검출을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 리물루스 인자 C를 사용하여 박테리아 내독소의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0043] 제5 양상에서, 본 발명은 낙농 산물의 저온살균 시험을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 낙농 산물의 저온살균 시험 방법에 관한 것이다.

[0044] 제6 양상에서, 본 발명은 미생물의 항생제 내성 시험을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 미생물의 항생제 내성 시험 방법에 관한 것이다.

[0045] 제7 양상에서, 본 발명은 무기 포스페이트의 검출을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 무기 포스페이트의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0046] 제8 양상에서, 본 발명은 특히 지표 미생물 제오바실루스 스테아로서모필루스 (*Geobacillus stearothermophilus*)의 알파-D-글루코시다제 활성의 검출을 통한 멸균 공정의 모니터링을 위한 화학식 I의 화합물의 용도 및 특히 지표 미생물 제오바실루스 스테아로서모필루스의 알파-D-글루코시다제 활성의 검출에 의한 멸균 공정의 모니터링을 위한 방법에 관한 것이다.

[0047] 제9 양상에서, 본 발명은 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성(susceptibility) 시험을 위한 화학식 I의 화합물의 용도뿐만 아니라, 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성 시험을 위한 방법에 관한 것이다.

[0048] 본 발명의 바람직한 실시형태는 첨부된 청구범위에 제시되어 있다. 본 발명의 추가 실시형태 및 다른 목적, 이점 및 특징은 본 발명 및 실시예에 대한 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 실시예 1에서 화합물 IIa를 사용한 돼지 간 에스테라제 활성의 효소 분석 결과를 보여준다.

도 2는 발광성 화합물 IIa (비채색 기호) 또는 형광성 기질 MUCAP (채색 기호)를 사용한 살모넬라 엔테리카의 검출 한계를 보여준다.

도 3은 화합물 IVa를 사용한 우유의 알칼리 포스파타제 활성에 대한 저온살균 효과에 대한 화학발광 분석 결과를 보여준다.

도 4는 항생제 옥사실린의 존재 및 부재하에 MRSA 및 MSSA 배양의 발광 발생을 보여준다.

도 5는 글루코스 옥시다제 (GOX)와 조합된 과산화수소-유발 화학발광 기질 화합물 VIa를 사용한 에세리키아 콜라이 배양 상청액에서의 직접적 글루코스 검출 결과를 보여준다.

도 6a는 화합물 A 및 B의 화학발광 동역학 프로파일을 나타낸다.

도 6b는 화합물 A 및 B에서 방출된 총 광을 보여준다.

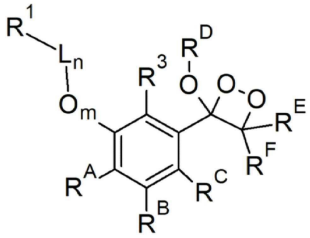
도 7a는 화합물 A 및 C의 화학발광 동역학 프로파일을 나타낸다.

도 7b는 화합물 A 및 C의 방출된 총 광을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 본 발명은 루시페라제-루시페린 기반 시스템이 (상기에 제시된 바와 같이) 많은 결점을 나타내지만, 이러한 시스템은 미생물 검출에 사용할 수 있는 현재 유일한 "실제" 생물 또는 화학발광 시스템이라는 놀라운 발견에 기초한다. 이와 관련하여, 본 발명의 발명자들은 놀랍게도 화학식 I의 디옥세탄 화합물이 미생물 검출을 위한 고효율 프로브임을 발견하였다. 특히, 화학식 I의 디옥세탄 화합물은 수성 배지에서도 화학발광성이고, 미생물 검출에 사용될 때 현저히 높은 감응성을 나타내며, 이는 일반적으로 적용되는 루시페라제-루시페린 시스템보다 유의하게 더 높은 것으로 밝혀졌다. 또한, 본 발명의 화합물의 중요한 특성, 예를 들어 막 투과성 및/또는 용해도는 존재한다면 치환기 R^2를 변화시킴으로써 변형될 수 있다. 또한, 화학식 I의 디옥세탄 화합물은 수성 배지에서 안정하고 특히 미생물 성장 배지에서 안정하다는 것이 밝혀졌다. 특히, 화학식 I의 디옥세탄계 화합물은 쉽고 간단하며 저렴하고 신뢰할 수 있는 미생물 검출을 가능하게 한다는 것이 밝혀졌다. 상기 화합물은 임의의 추가 화합물 없이도 미생물을 포함하는 배지에 그대로 첨가될 수 있다. 특히, 화학식 I의 디옥세탄 화합물이 일반적으로 사용되는 루시페라제-루시페린 기반 시스템보다 더 우수한 것으로 밝혀졌다.

[0051] 제1 양상에서, 본 발명은 화학식 I의 화합물에 관한 것이고,

[0052] 

[0053] (화학식 I),

[0054] 상기 식에서,

[0055] R^1은 효소-불안정성 기 및 화학식 -B(Z)(Z') 또는 $^{-}B(Z'')_3\ Kat^{+}$를 갖는 붕소-포함 기로부터 선택되는 분석물-반응성 기이고;

[0056] Z 및 Z'는 R^4 및 OR^5로부터 독립적으로 선택되고,

[0057] R^4는 -OH, $-O^{-}\ Kat^{+}$, 선택적으로 치환된 C1-C4 알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 알키닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C5-C6 아릴, 선택적으로 치환된 C5-C6 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C6-C10 아르알킬, 및 선택적으로 치환된 C6-C10 헤테로아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되고,

[0058] R^5는 -H, 선택적으로 치환된 C1-C4 알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알킬, 선택적으로 치환된 C2-C4 알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알케닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 알키닐, 선택적으로 치환된 C2-C4 헤테로알키닐, 선택적으로 치환된 C5-C6 아릴, 선택적으로 치환된 C5-C6 헤테로아릴, 선택적으로 치환된 C6-C10 아르알킬, 및 선택적으로 치환된 C6-C10 헤테로아르알킬로 이루어진 군으로부터 선택되거나,

[0059] 2개의 R^4, 2개의 R^5 또는 1개의 R^4 및 1개의 R^5는 개재하는 원자와 함께 5 내지 7원의 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 고리, 바람직하게는 선택적으로 치환된 포화 헤테로사이클릭 고리를 형성하고;

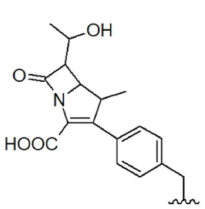
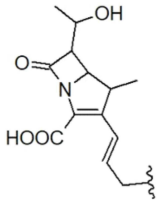
[0060] Z''는 F, Cl, Br, I로부터 선택되고, 바람직하게는 Z''는 F이고;

[0061] Kat^{+}는 유기 또는 무기 양이온, 바람직하게는 알칼리 금속 양이온이고;

[0062] L은 분석물-반응성 기 R^1 상의 분석물의 작용시, 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되는 자기 희생 링커 기이고, L은 펩타이드, 바람직하게는 세포 투과 펩타이드, 엔도리신 또는 단백질로 선택적으로 작용화되고;

[0063] R^1이 효소-불안정성 기인 경우, n은 1이고, m은 1이거나, n은 0이고, m은 1이고,

[0064] R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $^{-}B(Z'')_3\ Kat^{+}$인 경우, n 및 m은 둘 모두 0 또는 둘 모두 1이고;

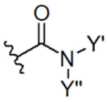
[0065] R^1이  또는  인 경우, n은 0이고, m은 1이고;

[0066] R^A 및 R^C는 H, F, Cl, Br, CF_3 및 R^2-Q-, 바람직하게는 H, Cl 및 R^2-Q-로부터 독립적으로 선택되거나, R^A 및 R^C 중 하나는 R^B와 함께 중심 방향족 고리의 파이 (pi)-시스템을 연장하는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고, R^A 및 R^C 중 다른 하나는 H 또는 R^2-Q-이고;

[0067] 단 R^A 및 R^C는 둘 모두 H가 아니고;

[0068] R^B는 H이거나, R^A 및 R^C 중 하나와 함께 상기 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고;

[0069] Q는 화학식 I의 화합물의 중심 방향족 고리의 파이-시스템과 접합된 파이-시스템을 포함하는 기이고;

[0070] R^2는 시아노, 니트로, 설폭사이드, 술폰, 선택적으로 치환된 아릴, 선택적으로 치환된 알케닐, , 카보닐, 구조 를 갖는 카보닐, 아미드, 구조  를 갖는 아미드로부터 선택되는 기이고,

[0071] Y는 H, 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고,

[0072] Y' 및 Y''는 H, 및 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬로부터 독립적으로 선택되거나, 질소 원자와 함께 선택적으로 치환된 헤테로사이클릭 구조, 바람직하게는 선택적으로 치환된 말레이미드기를 형성하고;

[0073] R^3은 H, F, Cl, Br, I, CF_3 또는 R^2-Q-이고;

[0074] 단 R^3은 R^2-Q-인 경우, R^A 및 R^C 중 적어도 하나, 바람직하게는 R^A는 H, F, Cl, Br, I 또는 CF_3, 바람직하게는 Cl이고;

[0075] R^D는 선형 또는 분지형 C1-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 선택되고;

[0076] R^E 및 R^F는 분지형 C3-C18 알킬 또는 C3-C7 사이클로알킬로부터 독립적으로 선택되거나, R^E 및 R^F는 부착된 탄소 원자와 함께 선택적으로 치환된 융합, 스피로 또는 폴리사이클릭 고리를 형성한다.

[0077] 용어 "알킬"은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 선형 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 지칭하고, 예를 들어, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, sec-부틸, tert-부틸, n-펜틸 등을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 용어 "C_1-C_{12} 알킬" (또는 "C1-C12 알킬")은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 "알킬"을 지칭한다.

[0078] 용어 "알케닐"은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 하나 초과의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 선형 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 지칭한다.

[0079] 용어 "알키닐"은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 하나 초과의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 선형 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 지칭한다.

[0080] 용어 "헤테로알킬," "헤테로알케닐," 및 "헤테로알키닐"은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 백본 잔기 내에 하나 초과의 O, S 또는 N 헤테로원자 또는 이의 조합을 포함하고; 따라서, 해당 알킬, 알케닐, 또는 알키닐 기 중 적어도 하나의 탄소 원자가 소정의 헤테로원자 중 하나에 의해 대체되어, 헤테로알킬, 헤테로알케닐, 또는 헤테로알키닐 기를 형성하는 해당 탄화수소 (알킬, 알케닐, 및 알키닐) 기를 지칭한다.

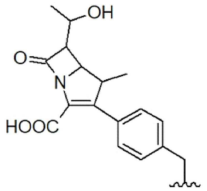
[0081] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "아릴"은 다음에 제한되는 것은 아니나, 페닐, 나프틸, 페난트릴 및 바이페닐과 같은 단일 고리 또는 축합된 다중 고리로 구성된 방향족 카보사이클릭 기를 지칭한다. "아릴"은 치환되거나 치환되지 않을 수 있다.

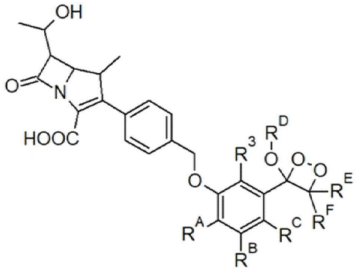
[0082] 용어 "헤테로아릴"은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 고리 구성원으로서 적어도 하나의 헤테로원자 (즉, 탄소 또는 수소와 다른 원자, 예를 들어 N, S, O, P, Se, Te, 바람직하게는 N, S, O, P)를 포함하는 방향족 기를 지칭한다.

[0083] "선택적으로 치환된" 또는 "치환된" 기에 적합한 치환기는 독립적으로 할로겐; $-(CH_2)_{0-4}R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OR^\circ$; $-O(CH_2)_{0-4}R^\circ$, $-O-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}CH(OR^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}SR^\circ$; R° 로 치환될 수 있는 $-(CH_2)_{0-4}Ph$; R° 로 치환될 수 있는 $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-1}Ph$; R° 로 치환될 수 있는 -CH=CHPh; R° 로 치환될 수 있는 $-(CH_2)_{0-4}O(CH_2)_{0-}$

$_1$-피리딜; $-NO_2$; -CN; $-N_3$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)C(S)NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)N(R^\circ)C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)R^\circ$; $-C(S)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)SR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)OSiR^\circ_3$; $-(CH_2)_{0-4}OC(O)R^\circ$; $-OC(O)(CH_2)_{0-4}SR^\circ$ -; $-(CH_2)_{0-4}SC(O)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}C(O)NR^\circ_2$; $-C(S)NR^\circ_2$; $-C(S)SR^\circ$; $-SC(S)SR^\circ$, $-(CH_2)_{0-4}OC(O)NR^\circ_2$; $-C(O)N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(O)C(O)R^\circ$; $-C(O)CH_2C(O)R^\circ$; $-C(NOR^\circ)R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}SSR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2R^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)_2OR^\circ$; $-(CH_2)_{0-4}OS(O)_2R^\circ$; $-S(O)_2NR^\circ_2$; $-(CH_2)_{0-4}S(O)R^\circ$; $-N(R^\circ)S(O)_2NR^\circ_2$; $-N(R^\circ)S(O)_2R^\circ$; $-N(OR^\circ)R^\circ$; $-C(NH)NR^\circ_2$; $-P(O)_2R^\circ$; $-P(O)R^\circ_2$; $-OP(O)R^\circ_2$; $-OP(O)(OR^\circ)_2$; SiR°_3; $-(C_{1-4}$ 직쇄 또는 분지형 알킬렌)O-$N(R^\circ)_2$; 또는 $-(C_{1-4}$ 직쇄 또는 분지형 알킬렌)C(O)O-$N(R^\circ)_2$, (각각의 R° 는 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-CH_2Ph$, $-O(CH_2)_{0-1}Ph$, $-CH_2-$(5 내지 6원 헤테로아릴 고리), 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택되는 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5-6-원 포화, 부분적 불포화 또는 아릴 고리이거나, 상기 규정된 바에도 불구하고, 2개의 독립적인 R° 가 존재하는 경우, 그 개재 원자(들)와 함께 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택되는 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 3-12-원 포화, 부분적 불포화 또는 아릴 모노 또는 바이사이클릭 고리를 형성함); 또는 =O, =S, $=NNR^\circ_2$, $=NNHC(O)R^\circ$, $=NNHC(O)OR^\circ$, $=NNHS(O)_2R^\circ$, $=NR^\circ$, $=NOR^\circ$, $-O(C(R^\circ_2))_{2-3}O-$, 또는 $-S(C(R^\circ_2))_{2-3}S-$ (각각의 R° 가 독립적으로 존재하는 경우, 이는 수소, C_{1-6} 알킬, 또는 질소, 산소 또는 황으로부터 독립적으로 선택되는 0 내지 4개의 헤테로원자를 갖는 5-6-원 포화, 부분적 불포화 또는 아릴 고리임)이다.

[0084] n 또는 m이 0인 경우, 이는 각각의 치환기가 부재함을 의미한다. 따라서, m이 0인 경우 링커 L은 중심 방향족 고리 (즉, 화학식 I에 나타낸 방향족 고리)에 직접 결합된다. 그렇지 않으면 n이 0인 경우, R^1은 산소 원자 (m이 1인 경우) 또는 중심 방향족 고리 (m이 0인 경우)에 결합된다.

[0085] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 화학적 모이어티의 결합을 종결하는 기호 "〰"는 다른 모이어티에 대한 연결을 나타낸다. 예를 들어, n이 0이고, m이 1이고 R^1이  인 화학식 I의 화합물은 다음 구조의 화합물을 나타낸다:



[0086] .

[0087] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "디옥세탄 화합물"은 모이어티 를 포함하는 화합물, 보다 구체적으로 화학식 I의 화합물을 지칭한다.

[0088] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "분석물-반응성 기"는 특정 분석물에 의해 (적어도 부분적으로) 제거 또는 변형될 수 있는 기를 지칭하며, 제거 또는 변형에 의해 발광이 유발된다. 바람직하게는, n이 1인 경우 (즉, 링커 기 L이 존재함), 분석물-반응성 기에 대한 분석물의 작용은 분석물-반응성 기 R^1을 -OH 또는 $-NH_2$ 모이어티로 변환시켜 (L이 기 X를 포함할 때, 모이어티 "X-R^1"은 바람직하게는 OH 또는 $-NH_2$ 모이어티로 변환됨) 링커 기

"L", 예를 들어 1,6-제거가 유발된다. n이 0인 경우 (즉, 링커 기 L이 부재함), 분석물-반응성 기 R^1에 대한 분석물의 작용이 분석물-반응성 기 R^1을 -OH 또는 다른 산성 기로 변환시키는 것이 바람직하다 (m이 1인 경우, 모이어티 "O-R^1"은 -OH 또는 또 다른 산성 기로 변환됨).

[0089] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "효소 불안정성 기"는 특이적 효소에 의해 (적어도 부분적으로) 제거 또는 변형될 수 있는 기를 지칭한다.

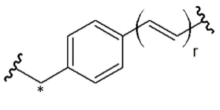
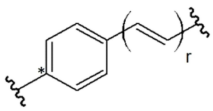
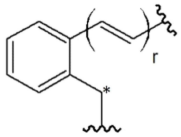
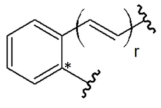
[0090] 용어 표적 분석물, 표적 미생물 또는 표적 대사산물은 본 명세서에 사용되는 바와 같이 화학식 I 화합물에 의해 검출되는 분석물, 미생물 또는 대사산물을 지칭한다.

[0091] 바람직하게는, R^A 및 R^C는 H 및 R^2-Q-로부터 독립적으로 선택되거나, R^A 및 R^C 중 하나는 R^B와 함께 중심 방향족 고리의 파이-시스템을 연장하는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고, 다른 하나는 H 또는 R^2-Q-이고, R^3은 H, F, Cl, Br, I이다.

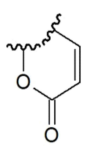
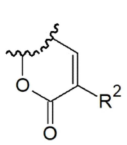
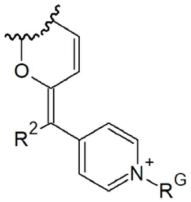
[0092] 바람직한 실시형태에 따르면, R^A 및 R^C 중 하나는 R^B 와 함께 중심 방향족 고리의 파이-시스템을 연장하는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고, 다른 하나는 H 또는 R^2-Q-이다.

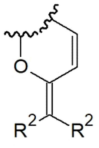
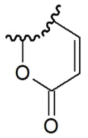
[0093] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, R^A 및 R^C 중 하나는 R^2-Q-이고, 다른 하나는 H이다. 특히 바람직한 실시형태에 따르면, R^A는 R^2-Q-이고, R^C는 H이다. 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면 R^C는 R^2-Q-이고, R^A는 H이다.

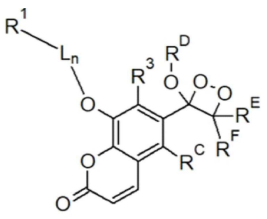
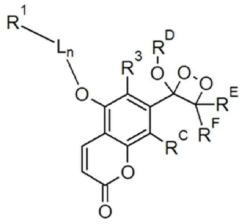
[0094] Q는 화학식 I의 화합물의 중심 방향족 고리의 파이 시스템과 접합된 파이 시스템을 포함하는 기이다. 상기 접합으로 인해 기 Q (잠재적으로 그에 부착된 기 R^2와 함께)가 화학식 I의 화합물의 발광을 조정 설계하는데 사용될 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, 기 Q가 방출 파장, 방출 동역학 (플래시 방출 (flash emission) 대 글로우 방출 (glow emission)) 및 양자 수율에 영향을 미칠 수 있음이 밝혀졌다.

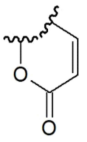
[0095] 바람직한 실시형태에 따르면, Q는 $-(H_2C{=}CH_2)_q-$,  ,  ,  , 및  로 이루어진 군으로부터 선택되고, 별표 (*)는 R^2에 연결된 원자를 나타낸다. q 및 r은 1, 2, 3, 4, 5, 및 6으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는 q 및 r은 1이다. 특히 바람직한 실시형태에 따르면, Q는 $-(H_2C{=}CH_2)_q-$이고, 더욱 바람직하게는 Q는 $-H_2C{=}CH_2-$이다.

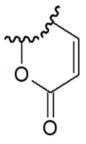
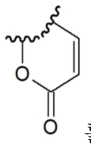
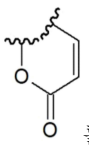
[0096] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, R^A 및 R^C 중 하나는 R^B와 함께 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조를 형성하고, 이는 중심 방향족 고리의 파이-시스템을 연장시킨다. 이 경우, R^A 및 R^C 중 다른 하나는 R2-Q 또는 H, 바람직하게는 H이다. "중심 방향족 고리의 파이-시스템의 연장"은 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조가 중심 방향족 고리의 파이-시스템과 접합된 파이-시스템을 포함함을 의미한다.

[0097] 바람직하게는, R^B와 함께 R^A 및 R^C 중 하나에 의해 형성되는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조는 6원 고리이다. 보다 바람직하게는, 상기 6원 고리는  ,  ,  , 및


로 이루어진 군으로부터 선택되며, R^G는 치환되거나 비치환된 C1-C12 알킬로부터 선택되고, R^2는 상기 및 하기에 규정된 바와 같다. 상기 모이어티는 어떤 방식으로든 R^A 및 R^B 또는 R^C 및 R^B에 연결될 수 있음이 이해된다. 이는 R^B와 함께 R^A가 모이어티 
를 형성하는 화학식 I의 화합물이 다음 선택적 사항을 모두 포함함을 의미한다:

[0098] 
및 
.

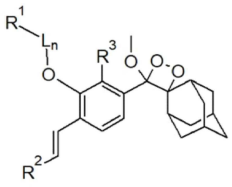
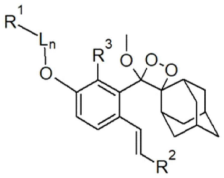
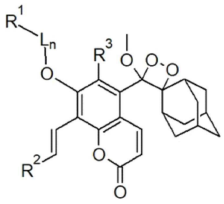
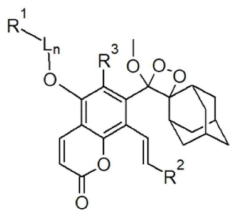
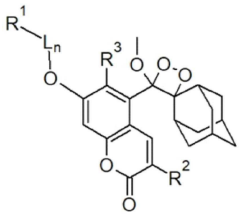
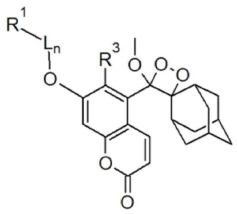
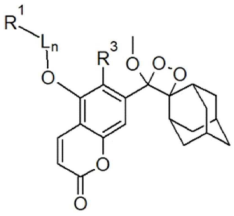
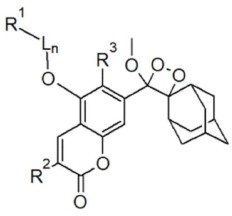
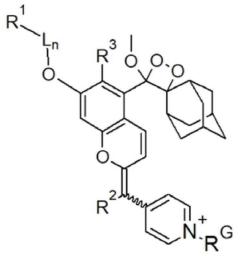
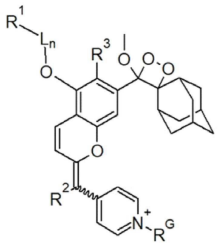
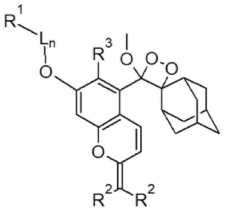
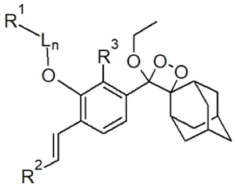
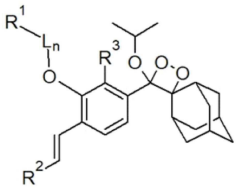
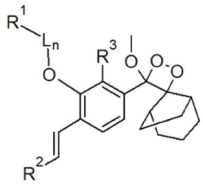
[0099] R^B와 함께 R^A 및 R^C 중 하나에 의해 형성되는 선택적으로 치환된 사이클릭 또는 헤테로사이클릭 구조가 비치환된 
인 것이 특히 바람직하다.

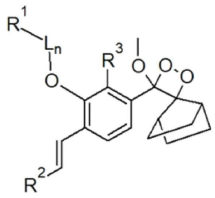
[0100] 놀랍게도, 분석물과의 상호작용을 통해 R^1 기의 (적어도 부분적) 제거 또는 변형시 R^B와 함께 R^A 및 R^C 중 하나, 특히 R^B와 함께 R^C에 의해 형성된 상기 사이클릭 구조 
를 포함하는 화학식 I의 화합물이 매우 장기간 지속되는 발광 (글로우 방출)을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이와 달리, R^A 및 R^C 중 하나가 R^2-Q-, 특히 MeOOC-CH=CH-인 화학식 I의 화합물은 짧지만 강한 방출 (플래시 방출)을 나타낸다 (실시예 13 참조). 또한, 놀랍게도 R^B와 함께 R^A 및 R^C 중 하나, 특히 R^B와 함께 R^C에 의해 형성된 사이클릭 구조 
를 포함하는 화학식 I의 화합물이 50% 초과의 매우 높은 발광 양자 수율을 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 이는 지금까지 달성되지 않았다. 따라서 R^B와 함께 R^A 및 R^C 중 하나, 특히 R^B와 함께 R^C에 의해 형성된 사이클릭 구조 
를 포함하는 화학식 I의 화합물이 R^A 및 R^C 중 하나가 R^2-Q-, 특히 MeOOC-CH=CH-인 화학식 I의 화합물보다 약 20배 더 높은 발광 강도를 나타낸다 (실시예 13 참조).

[0101] 또한, 발광 특성은 치환기 R^3에 의해 추가로 미세 조정될 수 있음이 밝혀졌다 (실시예 13 참조). 바람직한 실시형태에 따르면, R^E 및 R^F는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 선택적으로 치환된 융합, 스피로 또는 가교 사이클릭 또는 폴리사이클릭 고리를 형성한다. 기 R^E 및 R^F의 주요 기능은 화학식 I의 화합물의 디옥세탄 모이어티를 입체적으로 보호하는 것이다.

[0102] 바람직하게는, 상기 선택적으로 치환된 융합, 스피로 또는 가교 사이클릭 또는 폴리사이클릭 고리는 선택적으로 치환된 프로펠란; 화학식 [A.B.1]펜탄, [A.B.1]헥산, [A.B.1]헵탄, [A.B.1]옥탄, [A.B.1]노난, [A.B.1]데칸, [A.B.1]운데칸, [A.B.1]도데칸 (A 및 B는 1, 2, 3, 4, 및 5로부터 독립적으로 선택됨)으로 규정되는 선택적으로 치환된 바이사이클릭; 또는 선택적으로 치환된 아다만틴으로부터 독립적으로 선택된다. 보다 바람직하게는, R^E 및 R^F는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 바람직하게는 선택적으로 치환된 모이어티, 선택적으로 치환된 모이어티, 또는 선택적으로 치환된 모이어티를 형성한다. 훨씬 더 바람직하게는, R^E 및 R^F는 이들이 부착되는 탄소 원자와 함께 선택적으로 치환된 모이어티를 형성한다. 특히 바람직하게는, R^E 및 R^F는 이들이 부착된 탄소 원자와 함께 비치환된 모이어티를 형성한다.

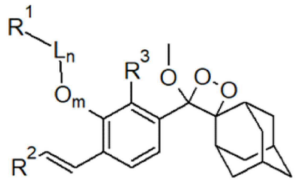
[0103] 바람직한 실시형태에 따르면, R^D는 메틸, 에틸, 또는 이소프로필. 바람직하게는, R^D는 메틸이다.

[0104] 특히 바람직한 화합물은  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  ,  , 및



로 이루어진 군으로부터 선택된다.

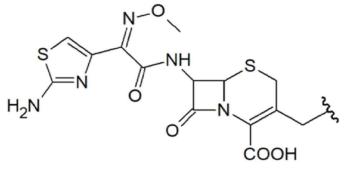
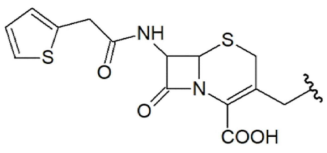
[0105] 바람직한 실시형태에 따르면, 화학식 I의 화합물은 화학식 I'로 표시되고,

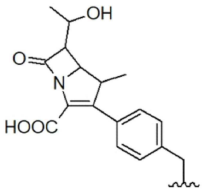
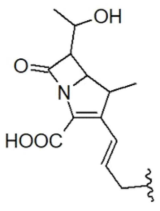
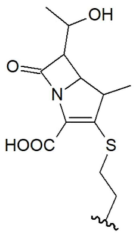
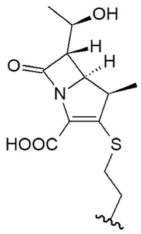


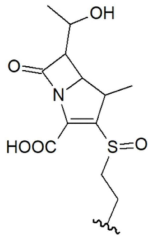
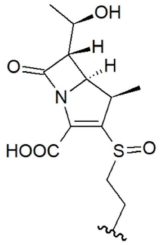
[0106]

[0107] (화학식 I').

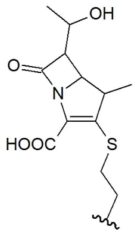
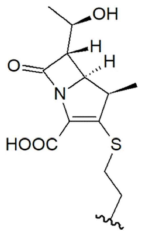
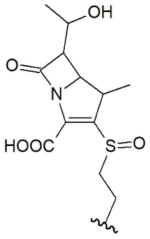
[0108] 바람직한 실시형태에 따르면, R^1은 효소-불안정성 기이다. 바람직하게는, R^1은 아세틸, 부티릴, 옥타노일, 노나노일, 미오-이노시톨 포스포릴, 포스포릴, 아미노 아시딜 기, L-피로글루타믹 아시딜, 디펩타이드 기, 트리펩타이드 기, 베타-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-갈락토피라노시딜, 알파-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루코피라노시딜, 베타-D-글루쿠로닐, 베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염, n-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜, N-아세틸뉴라미니딜, 셀로비오시딜, 알파-D-리보푸라노시딜, 베타-D-리보푸라노시딜, 콜린 포스포릴, $-NO_2$, 스테아로일, 팔미토일, 올레오일, 리놀레일, Tos-L-알라닐, 알파-만노실, 베타-만노실, 알파-푸코실, 베타-푸코실, 알파-이두로노실, 베타-이두로노실, 알파-(올리고)말토실, 화학식 -B(Z)(Z') (Z 및 Z'는 상기에 규정된 바와 같음), $-B(Z'')_3^- Kat^+$을 갖는 기, 옥살릴에스테르, SucOMe-Arg-Pro-티로시닐, 베타-락타마제-불안정성 기, 바람직하게는 베타-락탐 항생제, 더욱 바람직하게는 페니실린 (penicillin), 1 내지 5세대의 세팔로스포린 (cephalosporin), 세파마이신 (cephamycin), 또는 카바페넴 (carbapenem), Ac-QLQ-, Ac-FQLQ-, Ac-EFQLQ-, Ac-DEFQLQ-로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0109] 1 내지 5세대의 바람직한 세팔로스포린은 세팩테릴 (cefacteril), 세프라딘 (cefradin), 세프록사딘 (cefroxadin), 세팔로글리신 (cefaloglycin), 세파클로르 (cefaclor), 세팔렉신 (cefalexin), 세파드록실 (cefadroxil), 세파트리진 (cefatrizin), 세파제돈 (cefazedon), 세파피린 (cefapirin), 세프테졸 (ceftezol), 세파졸린 (cefazolin), 세페자플루 (cefezaflur), 세팔로틴 (cefalotin), 세팔로리딘 (cefaloridin), 세팔로니움 (cefalonium)으로부터 선택되고, 카복실산기가 부착된 탄소 원자 다음의 탄소 원자는 세팔로스포린 화학식 I의 화합물,  , 및  와 결합하는데 사용된다.

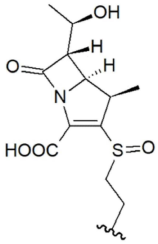
[0110] 바람직한 카바페넴은  ,  ,  , 바람직하게는  , 및

, 바람직하게는 로부터 선택된다.

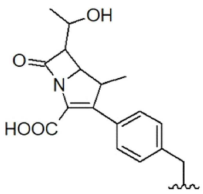
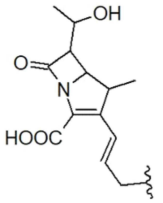
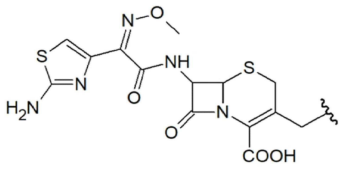




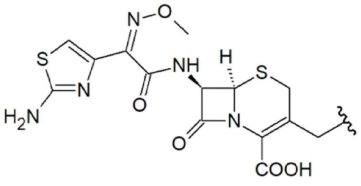
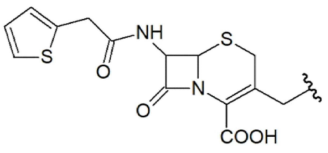
[0111] 특히 바람직한 카바페넴은 모이어티 , 바람직하게는 , 또는 ,

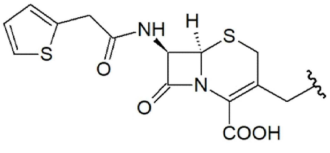
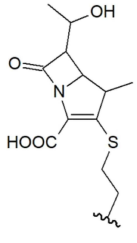
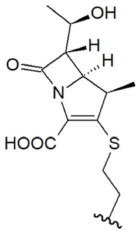


바람직하게는 이다. 놀랍게도 이들 모이어티가 본 명세서에 기재된 다른 카바페넴 모이어티보다 더 안정하고 유의하게 더 낮은 백그라운드를 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 이는 베타 락탐 안정화 술파이드 또는 설폭사이드 기로 인한 것으로 여겨진다.

[0112] 특히 바람직한 베타-락타마제-불안정성 기는

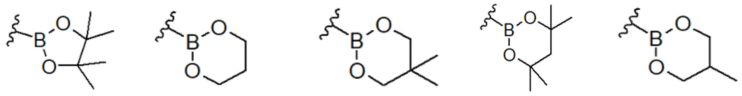
[0113] 
, 
, 
, 바람직하게는

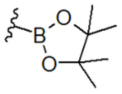

, 
, 바람직하게는


, 
, 
바람직하게는 로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0114] 바람직한 실시형태에 따르면, R^1은 Ac-QLQ-, Ac-FQLQ-, Ac-EFQLQ-, 또는 Ac-DEFQLQ-이다. 이러한 기는 노로바이러스의 검출에 적합하다.

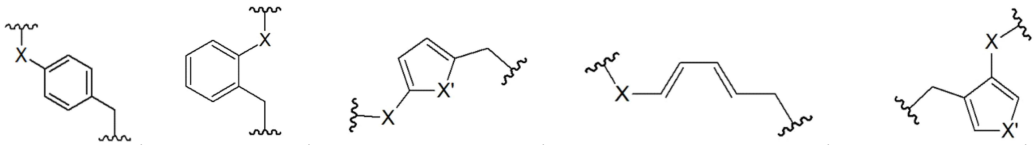
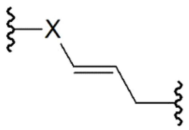
[0115] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, R^1은 화학식 -B(Z)(Z') 또는 $-BF_3^- \ Kat^+$를 갖는 기로서, 바람직하게는 Z

및 Z' 중 적어도 하나는 OR^5이고, 더욱 바람직하게는 Z 및 Z' 둘 모두 OR^5인 기이거나, 화학식 -B(Z)(Z')을 갖는 기는 바람직하게는 $-B(OH)_2$, $-BF_3^- Kat^+$, 

로 이루어진 군으로부터 선택되고, 더욱 바람직하게는  , $-B(OH)_2$, 또는 $-BF_3^- Kat^+$이다.

[0116] 링커 기 "L"은 본 발명이 이루어지기 전에 공지되지 않았던 몇 가지 장점을 갖는다. 한편으로, 이는 화학식 I의 화합물이 바람직하게는 수성 배지에 사용되기 때문에 화학식 I의 화합물의 더 나은 가수분해-안정성을 유도하며, 이는 특히 중요하다. 다른 한편으로, 이는 R^1 기를 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 입체적으로 멀어지게함으로써 R^1 기의 우수한 가용성으로 이어진다. 더 우수한 (가수분해) 안정성은 덜 비특이적인 가수분해로 이어지고, 이에 따라 백그라운드가 더 낮아져, 신호대잡음비가 더 우수하며, 결과적으로 감응성이 더 높아진다. 기 R^1의 가용성을 증가시키면 표적 분석물, 특히 효소에 대한 결합이 향상되고 이에 따라 더 높은 전환이 발생하여 신호대잡음비가 증가하고 결과적으로 감응성이 더 높아진다. 또한 향상된 생체이용률은 막 결합 효소의 검출을 향상시킨다.

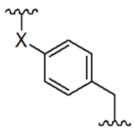
[0117] 바람직하게는 L은 분석물-반응성 기 R^1 상의 분석물의 작용 시 (이로 인해 분석물-반응성 기 R^1의 적어도 부분적 제거 또는 변형을 초래함), 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 방출되는 자기 희생 기 (self-immolative group)이다. L은 펩타이드 (바람직하게는 세포 투과 펩타이드), 엔도리신 또는 단백질을 화학식 I의 화합물에 부착하기 위한 바람직한 모이어티이다. 특히, 이들 기에 의한 L의 작용화가 화학식 I의 화합물의 발광을 소멸시키지 않는 것으로 밝혀졌다. 이론에 결부시키고자 하는 것은 아니나, 이러한 놀라운 현상의 원인은 링커 L이 일반적으로 발광이 유발되기 전의 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 절단된다는 사실인 것으로 고려된다. 따라서, 일 실시형태에서, L은 펩타이드 (바람직하게는 세포 투과 펩타이드), 엔도리신 또는 단백질로 작용화된다. 또 다른 실시형태에서, L은 펩타이드 (바람직하게는 세포 투과 펩타이드), 엔도리신 또는 단백질로 작용화되지 않는다.

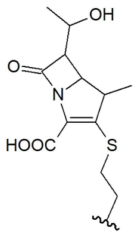
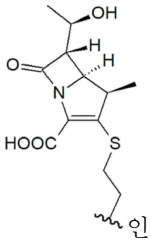
[0118] 바람직하게는, L은  , 

및 로 이루어진 군으로부터 선택되고, 이러한 링커 각각은 펩타이드, 바람직하게는 세포 투과 펩타이드인 엔도리신 또는 단백질로 작용화될 수 있고,

[0119] X는 -O-, $-N^+(R^G)_2-$, 바람직하게는 $-N^+(CH_3)_2-$, 또는 -NH-이고, R^1이 -B(Z)(Z') 또는 $-NO_2$인 경우, X는 부재하고,

X'는 S, O, NH, 및 NR^G로부터 선택되고; X는 R^1에 연결된다.

[0120] 바람직하게는, L은  이다.

[0121] 바람직하게는, R^1이  , 바람직하게는  인 경우, X는 $-N^+(CH_3)_2-$이다.

[0122] 바람직한 실시형태에 따르면, X는 -O-이다. 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, X는 -NH-이다.

[0123] 바람직한 실시형태에 따르면, n은 1이고, m은 1이다. 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, n은 0이고, m은 1이다.

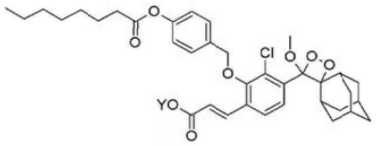
[0124] 바람직한 실시형태에 따르면, R^2는 수용성 기이다.

[0125] 바람직하게는, R^2는 시아노 및 로 이루어진 군으로부터 선택되고, Y는 H 또는 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다.

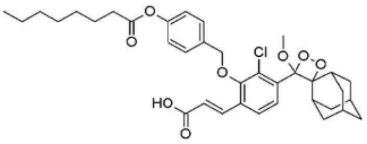
[0126] 바람직하게는, R^2는 이다. R^2가 인 실시형태에서, Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 훨씬 더욱 바람직하게는, R^2는 -COOH 또는 $-COO^-$이다.

[0127] 바람직한 실시형태에 따르면, R^3은 H 및 Cl, 바람직하게는 Cl로 이루어진 군으로부터 선택된다.

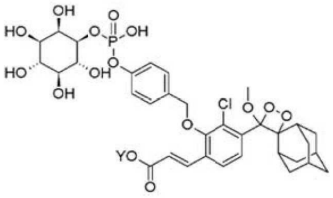
[0128] 화학식 I의 바람직한 화합물은 화학식 II, IIa, III, IIIa, IV, IVa, V, Va, VI, VIa, VIb, VIc, VII 및 VIIa의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되고:



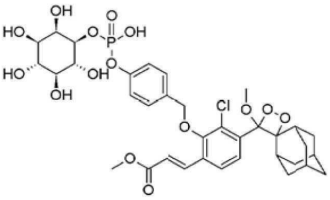
(화학식 II)



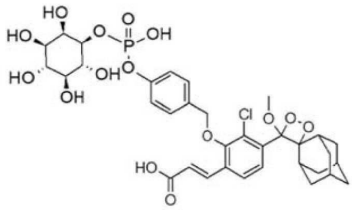
(화학식 IIa)



(화학식 III)

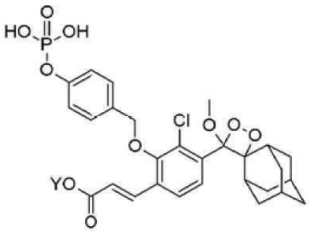


(화학식 IIIa)

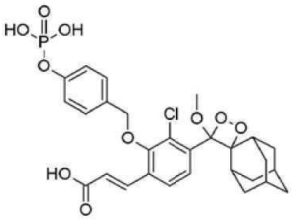


(화학식 IIIb)

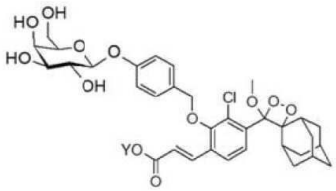
[0129]



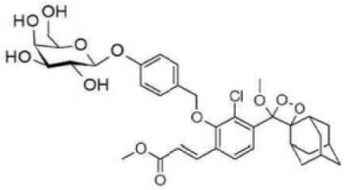
(화학식 IV)



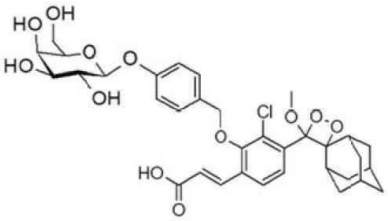
(화학식 IVa)



(화학식 V)

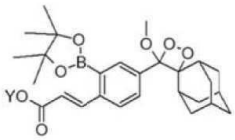


(화학식 Va)

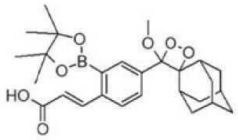


(화학식 Vb)

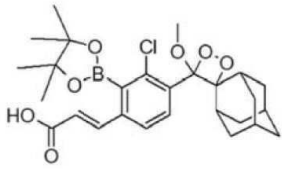
[0130]



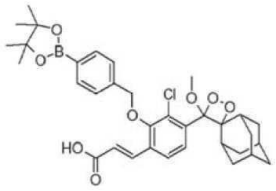
(화학식 VI)



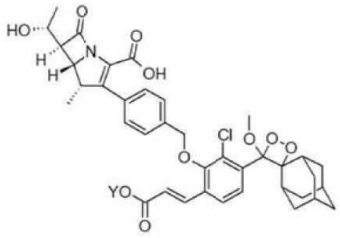
(화학식 VIa)



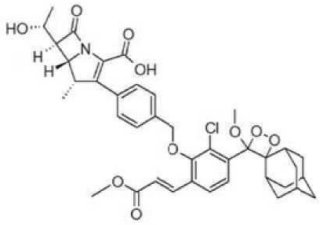
(화학식 VIb)



(화학식 VIc)

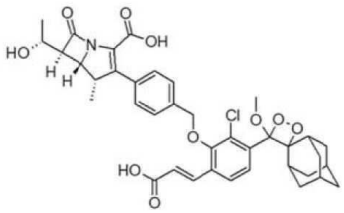


(화학식 VII)

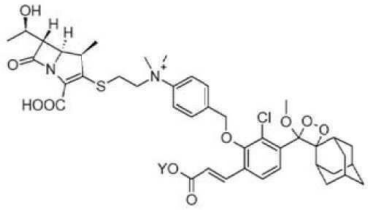


(화학식 VIIa)

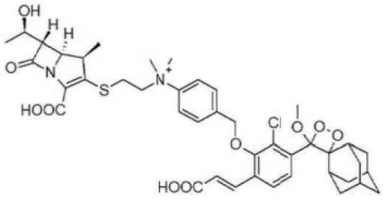
[0131]



(화학식 VIIb)



(화학식 VIII)



(화학식 VIIIa),

[0132]

[0133] Y는 H, 선택적으로 치환된 C1-C12 알킬 또는 알칼리 금속 이온이다. 특히 바람직한 화합물은 Y는 H인 것이다.

[0134] 화학식 II, 특히 IIa의 화합물은 살모넬라 (*Salmonella*), 특히 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*)의 검출에 특히 적합한 것으로 입증되었다.

[0135] 화학식 III, 특히 IIIb의 화합물은 리스테리아 (*Listeria*) 특히 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*)의 검출에 특히 적합한 것으로 입증되었다.

[0136] 화학식 IV, 특히 IVa의 화합물은 스타필로코쿠스 아우레우스의 검출에 특히 적합한 것으로 입증되었다.

[0137] 화학식 V, 특히 Vb의 화합물은 콜라이형 및 E. 콜라이 (*E. coli*)의 검출에 특히 적합한 것으로 입증되었다.

[0138] 화학식 VI, 특히 VIc의 화합물은 그 유래에 상관없이 H_2O_2의 검출에 특히 적합한 것으로 입증되었다.

[0139] 화학식 VII 및 VIII, 바람직하게는 VIIb 및 VIIIa의 화합물은 카바페넴 내성 박테리아와 카바페넴 감응성 박테리아를 구별하는데 특히 적합한 것으로 나타났다.

[0140] 일반적으로, 기 R^1이 존재할 때 화학식 I의 화합물은 수성 배지에서도 안정하고 광자가 방출되지 않는 것으로 밝혀졌다. 분석물과의 상호작용을 통한 R^1 기의 (적어도 부분적) 제거 또는 변형에 의해 불안정한 종이 생성되고,

이는 화학적 여기 과정을 통해 분해되어 여기된 중간체를 생성하고 결과적으로 광자의 방출을 통해 바닥 상태로 붕괴된다. 따라서, 분석물-반응성 기 R^1은 분석물-반응성 기 R^1에 작용하는 분석물이 또한 존재하는 상황으로 광 방출을 제한한다.

[0141] R^1이 효소 불안정성 기인 경우, 화학식 I의 화합물은 효소 검출에 적합하며, 결과적으로 이 효소를 발현하는 미생물 검출에 적합하다. 효소와의 접촉시, 상기 효소-불안정성 기 R^1은 (적어도 부분적으로) 제거 또는 변형되며, 이때 자기-희생 링커는 존재한다면 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 제거되고 불안정한 종이 형성되어, 그 후 화학 여기 과정을 통해 분해되어 여기된 중간체에서 생성되며, 결과적으로 광자의 방출을 통해 바닥 상태로 붕괴된다.

[0142] R^1이 효소-불안정성 기인 경우, R^1이 하나의 특이적 효소에만 반응하여 이 효소를 발현하지 않는 다른 미생물의 존재 하에서 이 효소를 발현하는 미생물을 검출할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 이러한 방식으로, 예를 들어 시트로박터 프레운디 및 에세리키아 콜라이와 같은 다른 박테리아의 존재 하에서 살모넬라 (예를 들어, 살모넬라 티피무리움 및 살모넬라 엔테리티디스)를 특이적으로 검출할 수 있다.

[0143] (특히) 본 발명에서 사용될 수 있는 예시적인 분석물-반응성 기 R^1 및 각각의 표적 분석물, 표적 미생물 및 표적 대사산물은 표 1에 제시되어 있다. 추가 분석물-반응성 기 R^1, 각각의 분석물, 표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물은 예를 들어 문헌[Orenga et al, Journal of Microbiological Methods, 79, 2009, 139-155; 및 Varadi et al., Che. Soc. Rev., 2017, 46, 4818-4832]으로부터 확인할 수 있다.

표 1

[0144]

R^1	분석물	표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물
아세틸	에스테라제	대부분의 미생물의 일반적 기질; C. 라리로부터의 C. 콜라이 및 캄필로박터 제주니의 분화
부티릴	에스테라제	모락셀라 카타르할리스; 대부분의 미생물의 일반적 기질
옥타노일	C8 에스테라제	살모넬라
노나노일	C9 에스테라제	살모넬라
미오-이노시톨 포스포릴	포스파티딜이노시톨-특이적 포스포리파제 C (PI-PLC)	리스테리아 모노사이토게네스; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버쿨로시스
포스포릴	포스파타제	스타필로코쿠스 아우레우스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에; 칸디다 종; MRSA
L-알라닐 (A-)	L-알라닌 아미노펩티다제	그람-음성 박테리아;효모 및 곰팡이
L-류시닐 (L-)	L-류신 아미노펩티다제	효모 및 곰팡이
β-알라닐	β-알라닐 아미노펩티다제	슈도모나스 아에루기노사
L-피로글루타믹 아시딜	PYRase	엔테로코시; 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터
베타-D-갈락토피라노시딜	베타-D-갈락토시다제	콜라이형; E. 콜라이
알파-D-갈락토피라노시딜	알파-D-갈락토시다제	살모넬라
알파-D-글루코피라노시딜	알파-D-글루코시다제	크로노박터 사카자키;스타필로코쿠스 아우레우스; MRSA; VRE ; 제오바실루스 스테아로서모필루스 (멸균화 대조군)
베타-D-글루코피라노시딜	베타-D-글루코시다제	리스테리아 spp ESBL 생성 장내 세균 비브리오 엔테로코시 VRE 칸디다 종 클로스트리듐 디피실레
베타-D-글루쿠로닐	베타-D-글루쿠로니다제	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에
베타-D-글루쿠로닐 나트륨염	베타-D-글루쿠로니다제	E. 콜라이; 스트렙토코쿠스 아갈락티아에

n-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	갈락토사미다제	칸디다 알비칸스
N-아세틸뉴라미니딜	N-아세틸뉴라미니다제	프레보텔라
셀로비오시딜	셀로비오시다제	크로노박터 사카자키
리보푸라노시딜	리보시다제	쉬겔라
콜린 포스포릴	포스포리파아제 C	바실루스
-B(Z)(Z'), $-B(Z'')_3^- Kat^+$	H_2O_2	1) 다양한 미생물 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2 2) 미생물 대사산물/기질에서 반응하는 옥시다제에 의해 방출된 H_2O_2 (예를 들어 글루코스 상의 글루코스 옥시다제 반응; 또는 디아민옥시다제에 의해 산화된 히스타민)
$-NO_2$	니트로리덕타제	일반적 미생물 활성
옥살릴에스테르	무기 포스페이트	아피라제 (예를 들어 쉬겔라)
Boc-Val-Pro-아르기니닐	리물루스 응고 인자 C	박테리아 내독소
Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	리물루스 응고 인자 C	박테리아 내독소
SucOMe-Arg-Pro-티로시닐 (SucOMe-RPY-)	아미노펩티다제	레지오넬라 뉴모필라
베타-락타마제-불안정성기, 바람직하게는 베타-락탐 항생제, 더욱 바람직하게는 페니실린, 1 내지 5 세대의 세팔로스포린, 세파마이신, 또는 카바페넴	베타-락타마제	베타-락탐 감응성 박테리아와 베타-락탐 내성 박테리아의 구별에 적합한 항생제 내성 미생물
Ac-QLQ- Ac-FQLQ- Ac-EFQLQ- Ac-DEFQLQ-	3C 시스테인 프로테아제	노로바이러스의 검출
5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드	히푸리카제	캄필로박터 제주니
아크릴산 에스테르	세린 아세틸트랜스퍼라제, 시스테인 디술피드라제, 시스테인 디옥시다제	시스테인, 총 미생물 개수

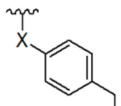
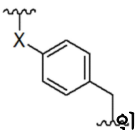
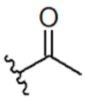
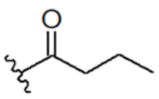
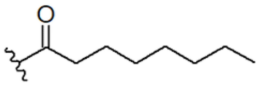
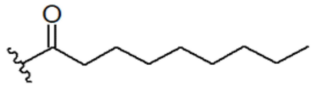
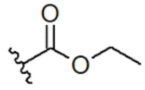
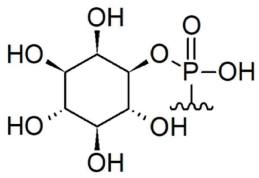
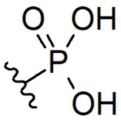
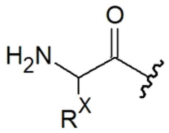
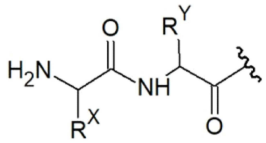
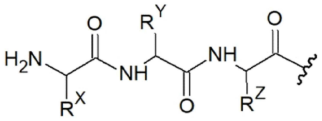
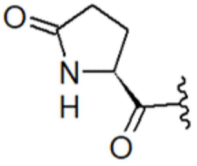
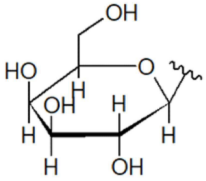
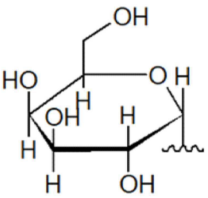
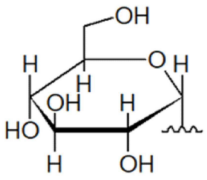
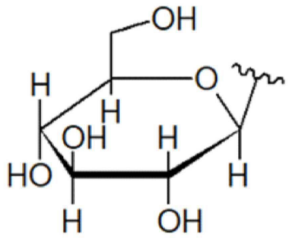
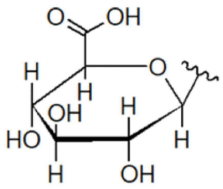
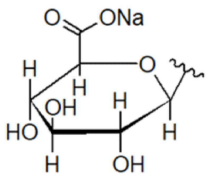
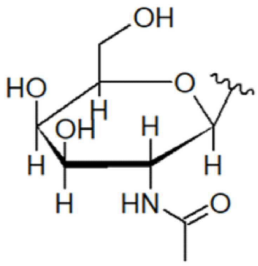
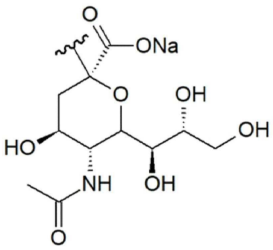
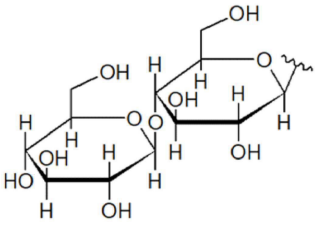
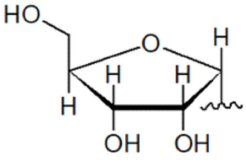
[0145] 예시적인 바람직한 R^1 기 및 그의 구조적 표시 및 L이  인 경우 각각의 바람직한 X 기가 표 2에 제시되어 있다. 그러나 표 2에 제시된 기 R^1은 다른 링커 모이어티와 함께 사용될 수 있거나, 링커 모이어티의 부재하에 사용될 수 있음이 이해된다.

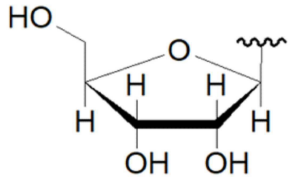
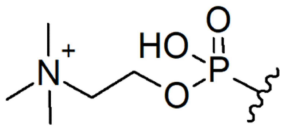
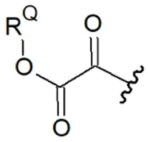
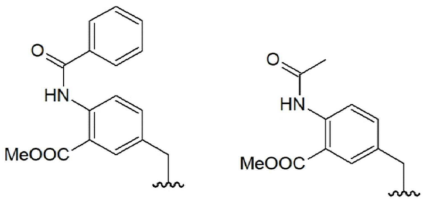
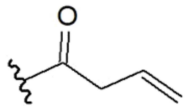
표 2

[0146]

R^1	구조적 표시	 L이 인 경우, 바람직한 기 X,
아세틸		-O-
부티릴		-O-

옥타노일		-O-
노나노일		-O-
에틸아세틸		-NH-
미오-이노시톨 포스포릴		-O-
포스포릴		-O-
아미노 아시딜	 , R^X는 각각의 아미노산에 따른 측쇄이다.	-NH-
디펩타이드 (di-peptidyl)	 R^X 및 R^Y는 디펩타이드 기로 구성된 각각의 아미노산에 따른 측쇄이다.	-NH-
트리-펩타이드 (tri-peptidyl)	 R^X, R^Y 및 R^Z는 트리-펩타이드 기로 구성된 각각의 아미노산에 따른 측쇄이다.	-NH-
L-피로글루타믹 아시딜		-NH-
베타-D-갈락토피라노시딜		-O-
알파-D-갈락토피라노시딜		-O-

알파-D-글루코피라노시딜		-O-
베타-D-글루코피라노시딜		-O-
베타-D-글루쿠로닐		-O-
베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염		-O-
n-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜		-O-
N-아세틸뉴라미니딜		-O-
셀로비오시딜		-O-
알파-D-리보푸라노시딜		-O-

베타-D-리보푸라노시딜		-O-
콜린 포스포릴		-O-
-B(Z)(Z')	-B(Z)(Z')	부재
$-NO_2$	$-NO_2$	부재
옥살릴에스테르	 , R^Q는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 기이다.	-NH-
베타-락타마제-불안정성 기	바람직한 베타-락타마제 불안정성 기는 상기에 개시되어 있다.	특이적 베타-락타마제-불안정성 기에 따라, 링커 L은 존재하거나 부재할 수 있다.
5-치환된-o-안트라닐산 메틸 에스테르의 아미드		부재
아크릴산 에스테르		-O-

[0147] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "아미노 아시딜"은 카복실산 기에 의해 디옥세탄 화합물의 나머지 부분에 결합된 아미노산 모이어티를 지칭한다. 아미노산이 하나 초과의 카복실산기를 포함하는 경우, 상기 카복실산기 각각은 아미노산을 디옥세탄 화합물의 나머지 부분에 결합할 수 있다. 바람직하게는, 아미노산이 하나 초과의 카복실산 기를 포함하는 경우, 이는 알파-카복실산 기에 의해 디옥세탄 화합물의 나머지 부분에 결합된다.결과적으로, R^1은 아미노 아시딜 기 또는 디- 또는 트리-펩타이드 기이고, X는 -NH-인 경우, 디- 또는 트리-펩타이드 기 또는 아미노 아시딜 기의 카복실산 기 (결합 형성에 관여함)는 -NH- 기와 함께 아미드 기 (-CONH-)를 형성한다.

[0148] 바람직한 아미노 아시딜 기는 알라닐 (A-), 바람직하게는 L-알라닐, 피로글루타믹 아시딜, 바람직하게는 L-피로글루타믹 아시딜, 아르기니닐 (R-), 아스파라기닐 (N-), 아스파르트아시딜 (D-), 시스테이닐 (C-), 글루타미닐 (Q-), 글루타믹 아시딜 (E-), 글리시닐 (G-), 히스티디닐 (H-), 이소류시닐 (I-), 류시닐 (L-), 리시닐 (K-), 메티오니닐 (M-), 페닐알라닐 (F-), 프롤리닐 (P-), 세리닐 (S-), 트레오니닐 (T-), 트립토파닐 (W-), 티로시닐 (Y-), 및 발리닐 (V-)이다.

[0149] 특히 바람직한 아미노 아시딜 기는 L-알라닐, L-피로글루타믹 아시딜, L-류시닐, 또는 β-알라닐이다.

[0150] 바람직한 트리-펩타이드 기는 Boc-Val-Pro-아르기니닐, Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐, 및 SucOMe-Arg-Pro-티로시닐 (SucOMe-RPY-)이다.

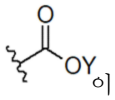
[0151] R^1이 미오-이노시톨 포스포릴인 경우, 화학식 I의 화합물은 특히 포스파티딜이노시톨 특이적 포스포리파제 C (PI-PLC)를 발현하는 미생물, 예를 들어 리스테리아, 특히 리스테리아 모노사이토게네스를 검출하는데 적합하다.

[0152] R^{1}이 옥타노일인 경우, 화학식 I의 화합물은 특히 C8 에스테라제를 발현하는 미생물, 예를 들어 살모넬라, 특히 살모넬라 엔테리카의 검출에 적합하다.

[0153] R^{1}이 포스포릴인 경우, 화학식 I의 화합물은 특히 포스파타제를 발현하는 미생물, 예를 들어 항생제 내성의 주요 운반자인 S. 아우레우스 (*S. aureus*)의 검출에 적합하다. 따라서 이 기질은 S. 아우레우스의 내성 균주를 검출하는데 이상적으로 적합하다 (항생제를 성장 배지에 추가함에 의함: Light = 내성) (실시예 8 참조).

[0154] 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 아미노 아시딜 기, 바람직하게는 L-알라닐 또는 L-피로글루타믹 아시딜, 디펩타이드 기 또는 트리-펩타이드 기 (이 경우 X는 바람직하게는 -NH-)이다.

[0155] 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 아미노 아시딜 기이다.

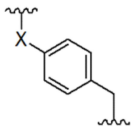
[0156] 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 미오-이노시톨 포스포릴, 포스포릴, 또는 옥타노일이고 및 R^{2}는 

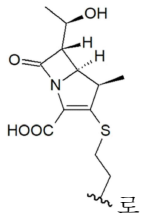
이고, Y는 -H 또는 상기 규정된 바와 같은 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸이다. 특히 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 미오-이노시톨 포스포릴이고 및 R^{2}는

이고, Y는 메틸이다. 또 다른 특히 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 옥타노일이고, R^{2}는

이고, Y는 -H이다. 또 다른 특히 바람직한 실시형태에 따르면, R^{1}은 포스포릴이고, R^{2}는

이고, Y는 -H이다.

[0157] 특히 바람직한 화합물은 치환기 및 변수는 다음과 같이 규정된 화학식 I의 화합물이다 (다른 치환기는 상기에 제시된 바와 같이 규정됨) (표 A 참조; L이 존재하는 경우 L은 

이며; "Carb"는 

로 표시됨):

[표 A]

n	m	L	X	R^1	R^2	R^3
1	1	존재	-O-	옥타노일	-COOH	H
1	1	존재	-O-	옥타노일	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	옥타노일	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	옥타노일	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	옥타노일	-CN	H
1	1	존재	-O-	옥타노일	-CN	Cl
0	1	-	-	옥타노일	-COOH	H
0	1	-	-	옥타노일	-COOH	Cl
0	1	-	-	옥타노일	-COOMe	Cl
0	1	-	-	옥타노일	-COOMe	H
0	1	-	-	옥타노일	-CN	H
0	1	-	-	옥타노일	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	아세틸	-COOH	H
1	1	존재	-O-	아세틸	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	아세틸	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	아세틸	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	아세틸	-CN	H
1	1	존재	-O-	아세틸	-CN	Cl
0	1	-	-	아세틸	-COOH	H
0	1	-	-	아세틸	-COOH	Cl
0	1	-	-	아세틸	-COOMe	Cl
0	1	-	-	아세틸	-COOMe	H
0	1	-	-	아세틸	-CN	H
0	1	-	-	아세틸	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	부티릴	-COOH	H
1	1	존재	-O-	부티릴	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	부티릴	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	부티릴	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	부티릴	-CN	H
1	1	존재	-O-	부티릴	-CN	Cl

[0158]

0	1	-	-	부티릴	-COOH	H
0	1	-	-	부티릴	-COOH	Cl
0	1	-	-	부티릴	-COOMe	Cl
0	1	-	-	부티릴	-COOMe	H
0	1	-	-	부티릴	-CN	H
0	1	-	-	부티릴	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	노나노일	-COOH	H
1	1	존재	-O-	노나노일	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	노나노일	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	노나노일	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	노나노일	-CN	H
1	1	존재	-O-	노나노일	-CN	Cl
0	1	-	-	노나노일	-COOH	H
0	1	-	-	노나노일	-COOH	Cl
0	1	-	-	노나노일	-COOMe	Cl
0	1	-	-	노나노일	-COOMe	H
0	1	-	-	노나노일	-CN	H
0	1	-	-	노나노일	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-CN	H
1	1	존재	-NH-	에틸 아세틸	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOH	H
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-CN	H
1	1	존재	-O-	미오-이노시톨 포스포릴	-CN	Cl
0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOH	H
0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOH	Cl
0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOMe	Cl

[0159]

0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-COOMe	H
0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-CN	H
0	1	-	-	미오-이노시톨 포스포릴	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	포스포릴	-COOH	H
1	1	존재	-O-	포스포릴	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	포스포릴	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	포스포릴	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	포스포릴	-CN	H
1	1	존재	-O-	포스포릴	-CN	Cl
0	1	-	-	포스포릴	-COOH	H
0	1	-	-	포스포릴	-COOH	Cl
0	1	-	-	포스포릴	-COOMe	Cl
0	1	-	-	포스포릴	-COOMe	H
0	1	-	-	포스포릴	-CN	H
0	1	-	-	포스포릴	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	L-알라닐	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	L-류시닐	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	베타-알라닐	-CN	Cl

[0160]

1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-CN	H
1	1	존재	-NH-	L-피로글루타믹 아시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	베타-D-갈락토피라노시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOH	H
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-CN	H
0	1	-	-	베타-D-갈락토피라노시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	알파-D-갈락토피라노시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOH	H
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-CN	H
0	1	-	-	알파-D-갈락토피라노시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOMe	Cl

[0161]

1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	알파-D-글루코피라노시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOH	H
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-CN	H
0	1	-	-	알파-D-글루코피라노시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루코피라노시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOH	H
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-CN	H
0	1	-	-	베타-D-글루코피라노시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-COOH	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-CN	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐	-CN	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-COOH	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-COOH	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-COOMe	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-COOMe	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-CN	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐	-CN	Cl

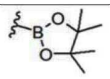
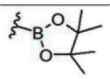
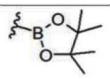
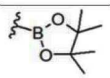
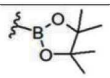
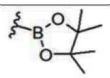
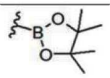
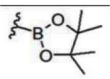
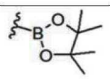
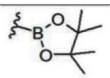
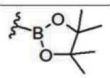
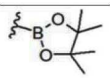
[0162]

1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOH	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-CN	H
1	1	존재	-O-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-CN	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOH	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOH	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOMe	Cl
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-COOMe	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-CN	H
0	1	-	-	베타-D-글루쿠로닐 나트륨 염	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-CN	Cl
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOH	H
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-COOMe	H
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-CN	H
0	1	-	-	N-아세틸-베타-D-갈락토사미니딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	N-아세틸뉴라미니딜	-CN	Cl
0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOH	H
0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOMe	Cl

[0163]

0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-COOMe	H
0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-CN	H
0	1	-	-	N-아세틸뉴라미니딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	셀로비오시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	셀로비오시딜	-COOH	H
0	1	-	-	셀로비오시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	셀로비오시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	셀로비오시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	셀로비오시딜	-CN	H
0	1	-	-	셀로비오시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-COOH	H
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-CN	H
1	1	존재	-O-	리보푸라노시딜	-CN	Cl
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-COOH	H
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-COOH	Cl
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-COOMe	Cl
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-COOMe	H
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-CN	H
0	1	-	-	리보푸라노시딜	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-COOH	H
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-CN	H
1	1	존재	-O-	콜린 포스포릴	-CN	Cl

[0164]

0	1	-	-	콜린 포스포릴	-COOH	H
0	1	-	-	콜린 포스포릴	-COOH	Cl
0	1	-	-	콜린 포스포릴	-COOMe	Cl
0	1	-	-	콜린 포스포릴	-COOMe	H
0	1	-	-	콜린 포스포릴	-CN	H
0	1	-	-	콜린 포스포릴	-CN	Cl
1	1	존재	-		-COOH	H
1	1	존재	-		-COOH	Cl
1	1	존재	-		-COOMe	Cl
1	1	존재	-		-COOMe	H
1	1	존재	-		-CN	H
1	1	존재	-		-CN	Cl
0	0	-	-		-COOH	H
0	0	-	-		-COOH	Cl
0	0	-	-		-COOMe	Cl
0	0	-	-		-COOMe	H
0	0	-	-		-CN	H
0	0	-	-		-CN	Cl
1	1	존재	-	$-NO-_2$	-COOH	H
1	1	존재	-	$-NO-_2$	-COOH	Cl
1	1	존재	-	$-NO-_2$	-COOMe	Cl
1	1	존재	-	$-NO-_2$	-COOMe	H

[0165]

1	1	존재	-	-NO-2	-CN	H
1	1	존재	-	-NO-2	-CN	Cl
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-COOH	H
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-COOH	Cl
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-COOMe	Cl
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-COOMe	H
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-CN	H
1	1	존재	-O-	옥살릴에스테르	-CN	Cl
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-COOH	H
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-COOH	Cl
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-COOMe	Cl
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-COOMe	H
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-CN	H
0	1	-	-	옥살릴에스테르	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Val-Pro-아르기니닐	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐	-CN	Cl
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-COOH	H
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-COOH	Cl
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-COOMe	Cl
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-COOMe	H
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-CN	H
1	1	존재	-NH-	SucOMe-Arg-Pro-티로시닐	-CN	Cl
1	1	존재	-	Carb	-COOH	H

[0166]

1	1	존재	-	Carb	-COOH	Cl
1	1	존재	-	Carb	-COOMe	Cl
1	1	존재	-	Carb	-COOMe	H
1	1	존재	-	Carb	-CN	H
1	1	존재	-	Carb	-CN	Cl

[0167]

[0168] 일반적으로, 이하에서 논의되는 모든 용도 및 방법은 시험관내 용도 및 방법으로 이해되어야 한다.

[0169] 제2 양상에서, 본 발명은 (그 유래에 상관없이) 표적 분석물 (예를 들어 과산화수소)/표적 미생물/표적 대사산물의 검출을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다. 더욱 바람직하게는, 본 발명은 표적 미생물, 더욱 바람직하게는 병원성 미생물, 훨씬 더욱 바람직하게는, 박테리아, 바이러스 또는 진균의 검출을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0170] 특히, 본 발명은 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 다른 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의

화합물의 용도에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 적절한 분자 프로브에 대한 대사, 시약 또는 참조 효소의 작용에 대한 화학발광 표시, 시약 효소에 의한 미생물 대사산물 또는 영양소의 효소 산화로부터 생성된 과산화수소 표시 또는 시약 효소에 의한 작용의 영양소, 기질, 대사산물 또는 부산물의 역할을 하는 무기 포스페이트 검출에 의한 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0171] 바람직하게는, 미생물은 살모넬라 (*Salmonella*); 살모넬라 엔테리카 (*Salmonella enterica*); 리스테리아 (*Listeria*), 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스 (*Listeria monocytogenes*); S. 아우레우스 (*S. aureus*); E. 콜라이 (*E. coli*); 카바페넴 (carbapenem) 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 및 클렙시엘라 네우모니아 (*Klebsiella pneumonia*); 캄필로박터 제주니 (*Campylobacter jejuni*); C. 콜라이 (*C. coli*); C. 라리 (*C. lari*); 바실루스 (*Bacillus*); 스타필로코쿠스 (*Staphylococcus*); 클로스트리듐 (*Clostridium*); 마이코박테리움 투버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*); 클로스트리듐 퍼프리겐스 (*Clostridium perfringens*); S. 아갈락티아에 (*S. agalactiae*); 칸디다 종 (*Candida spp.*); 그람 음성 박테리아, 효모, 곰팡이, 슈도모나스 아에루기노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 엔테로코시 (*Enterococci*), 스트렙토코쿠스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*); 시트로박터 (*Citrobacter*), 콜라이형; 크로노박터 사카자키 (*Cronobacter sakazakii*); MRSA, VRE, 제오바실루스 스테아로서모필루스; 리스테리아 종 (*Listeria spp.*), ESBL 생성 장내 세균; 비브리오 (*Vibrio*); 클로스트리듐 디피실레 (*Clostridium difficile*); 칸디다 알비칸스 (*Candida albicans*); 프레보텔라 (*Prevotella*); 쉬겔라 (*Shigella*), 아피라제 (apyrase) 포함 미생물, 바람직하게는 쉬겔라; 레지오넬라 네우모필리아 (*Legionella pneumophilia*); 및 칼리시비리다에과 바이러스 (Caliciviridae family), 바람직하게는 라고바이러스 (Lagovirus), 노로바이러스 (Norovirus), 사포바이러스 (Sapovirus), 네보바이러스 (Nebovirus), 레코바이러스 (Recovirus), 더욱 바람직하게는 노로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0172] 바람직하게는, 미생물은 살모넬라, 살모넬라 엔테리카, 리스테리아, 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스, S. 아우레우스, E. 콜라이, 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0173] 화학식 I의 화합물의 어떤 치환기 R^1이 어떤 표적 분석물 (예를 들어, 과산화수소)/표적 미생물/표적 대사산물의 검출에 적합한지는 제1 양상, 특히 표 1로부터 명백하며, 다른 치환기는 제1 양상에서 규정된 바와 같이 선택된다 (이는 본 발명의 모든 양상 및 실시형태에 적용됨).

[0174] 전술한 바와 같이, 놀랍게도 화학식 I의 화합물이 미생물 검출에 사용될 때 많은 이점을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 특히, 화학식 I의 화합물은 미생물의 매우 쉽고 간단하며 신뢰할 수 있는 검출을 가능하게 하는데, 이는 화학식 I의 화합물이 임의의 추가 화합물 및 추가적 배지 제조의 필요 없이 미생물 포함 배지에 그대로 간단하게 첨가될 수 있기 때문이다. 이는 그 중 하나, 즉 루시퍼라제는 상당히 비싸고 현저한 불안정성으로 인해 저장 수명을 제한하는 다수의 화합물의 사용이 필요한 일반적으로 적용되는 루시페라제-루시페린 시스템에 비해 큰 이점이다. 더욱이, 화학식 I의 화합물은 수성 배지에서 안정하고 루시페라제-루시페린 시스템보다 훨씬 더 높은 감응성을 갖는 것으로 나타났다. (실시예 9 및 10 참조).

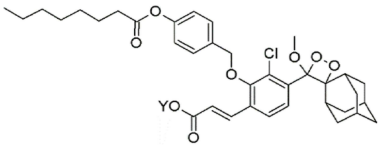
[0175] 미생물의 검출에 사용될 때, 화학식 I의 화합물은 미생물 (하나 이상), 특히 미생물 포함 배지 (바람직하게는 수성), 고체 형태 또는 용액에 첨가될 수 있다. 그러나, 다음 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다: 높은 감응성 (루시페라제-루시페린 시스템보다 유의하게 높음)으로 인해, 단지 매우 소량의 화학식 I의 화합물이 필요하다. 통상적으로, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다. 따라서, 용액, 특히 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하면 소정의 농도의 스톡 용액으로부터의 분취에 의해 미생물 포함 배지에 첨가된 정확한 양을 쉽게 결정할 수 있다. 또한, 화학식 I의 화합물은 DMSO 용액에서 매우 안정하다는 것이 밝혀졌다 (실온에서 수개월, 4℃에서 수년).

[0176] 바람직한 실시형태에 따르면, 화학식 I의 화합물은 표적 분석물 (예를 들어, 과산화수소)/표적 미생물/표적 대사산물, 바람직하게는 미생물의 검출에 사용되며, 기 R^1은 분석물 특히 상기 미생물에 의해 발현되는 효소에 대

해 반응성이다. 기 R^1이 특정 분석물, 예를 들어, 효소에 반응성인지는 상기 기 R^1을 포함하는 화학식 I의 화합물을 각각의 분석물에 첨가하고 (또는 그 반대로 첨가함), 방출된 광자 (즉, 광)가 존재한다면 이를 검출함으로써 간단히 측정될 수 있다.

[0177] 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 살모넬라, 바람직하게는 살모넬라 엔테리카, 리스테리아, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스, S. 아우레우스 또는 E. 콜라이이다.

[0178] 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 살모넬라, 바람직하게는 살모넬라 엔테리카이고, 상기 화합물은 화학식 II의 화합물이고:

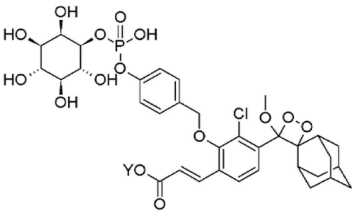
[0179] 

[0180] (화학식 II),

[0181] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 바람직하게는, 화학식 IIa의 화합물이 사용된다.

[0182] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 살모넬라, 바람직하게는 살모넬라 엔테리카이고, 상기 화합물은 화학식 IIa의 화합물이다.

[0183] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 리스테리아, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스이고, 상기 화합물은 화학식 III의 화합물이고:

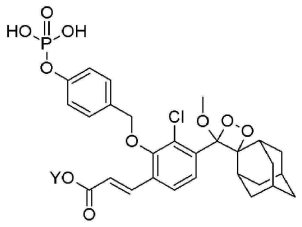
[0184] 

[0185] (화학식 III),

[0186] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 바람직하게는, 화학식 IIIa 또는 IIIb, 더욱 바람직하게는 IIIb의 화합물이 사용된다.

[0187] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 리스테리아, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스이고, 상기 화합물은 화학식 IIIb의 화합물이다.

[0188] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 S. 아우레우스이고, 상기 화합물은 화학식 IV의 화합물이고:



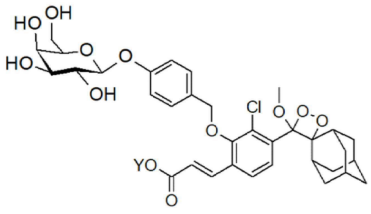
[0189]

[0190] (화학식 IV)

[0191] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 바람직하게는, 화학식 IVa의 화합물이 사용된다.

[0192] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 S. 아우레우스이고, 상기 화합물은 화학식 IVa의 화합물이다.

[0193] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 E. 콜라이이고, 상기 화합물은 화학식 V의 화합물이고:



[0194]

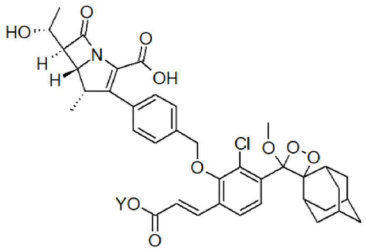
[0195] (화학식 V)

[0196] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 바람직하게는, 화학식 Va 또는 Vb, 더욱 바람직하게는 Vb의 화합물이 사용된다.

[0197] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 E. 콜라이이고, 상기 화합물은 화학식 Vb의 화합물이다.

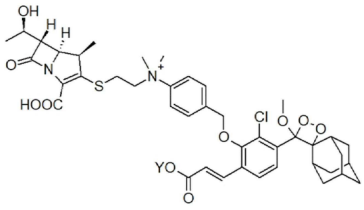
[0198] 바람직한 실시형태에 따르면, 표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물은 과산화수소 및 화학식 I의 화합물은 화학식 VI, VIa, VIb, 또는 VIc의 화합물이다. 특히, 글루코스와 같은 성장 기질 및 대사산물은 적합한 과산화수소-방출 효소 (예를 들어, 옥시다제)와 조합하여, R^1은 제1 양상에 규정된 바와 같이 -B(Z)(Z')이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같은 화학식 I의 화합물 (바람직하게는 화학식 VI, VIa, VIb 또는 VIc의 화합물)이 사용되는 경우, 화학발광에 의해 미생물 배양의 상청액에서 직접 검출될 수 있다. 바람직하게는, 화학식 VI의 화합물, 특히 화학식 VIa, VIb, 또는 VIc, 가장 바람직하게는 VIc의 화합물, 또는 관련 화합물이 사용된다.

[0199] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 카바페넴 내성 박테리아, 예를 들어, 슈도모나스 아에루기노사 또는 클렙시엘라 네우모니아이고, 상기 화합물은 화학식 VII 또는 VIII의 화합물이고,



[0200]

[0201] (화학식 VII),



[0202]

[0203] (화학식 VIII)

[0204] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다. 바람직하게는, 화학식 VIIa, VIIb, 또는 VIIIa, 더욱 바람직하게는 VIIb 또는 VIIIa, 훨씬 더욱 바람직하게는 VIIIa의 화합물이 사용된다.

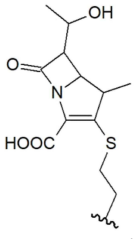
[0205] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 카바페넴 내성 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아이고, 상기 화합물은 화학식 VIIb 또는 VIIIa의 화합물이다.

[0206] 추가의 표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물뿐만 아니라 이들의 검출에 적합한 화학식 I의 특정 화합물, 특히 기 R^1은 본 발명의 제1 양상으로부터 확인될 수 있다.

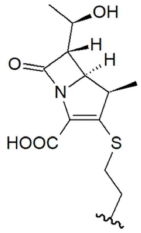
[0207] 또한, 본 발명은 표적 분석물 (예를 들어, 과산화수소)/표적 미생물/표적 대사산물의 검출 방법에 관한 것이다.

[0208] 바람직하게는, 본 발명은 표적 미생물의 검출 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 방법에 관한 것이다. 더욱 특히, 본 발명은 적절한 분자 프로브에 대한 대사, 시약 또는 참조 효소의 작용에 대한 화학발광 표시, 시약 효소에 의한 미생물 대사산물 또는 영양소의 효소 산화로부터 생성된 과산화수소 표시 또는 시약 효소에 의한 작용의 영양소, 기질, 대사산물 또는 부산물의 역할을 하는 무기 포스페이트 검출에 의한 박테리아, 박테리아 단편 (예를 들어, LPS, 내독소), 바이러스, 진균뿐만 아니라, 기타 병원체를 포함하는 미생물의 존재 또는 부재의 검출, 정량화 및 확인을 위한 방법에 관한 것이다.

[0209] 본 방법은 a) 하나 초과의 표적 분석물 (예를 들어 과산화수소)/표적 미생물/표적 대사산물을 포함하는 배지를 제공하는 단계, b) 화학식 I의 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 제1 실시형태에 규정된 바와 같은 화학식 I의 화합물을 첨가하는 단계, 및 c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.



[0210] 화학식 I의 화합물이 바람직하게는 $-N^+(CH_3)_2-$ 모이어티 (상기 참조)에 의해 링커에 연결된 ,

바람직하게는  인 기 R^1을 포함하는 경우, 그 후 또한 산화제 (바람직하게는 과산화수소)는 바람직하게는 단계 b)에서 첨가된다. 이는 카바페네마제에 의한 베타-락탐 고리의 개방이 방출 종의 생성으로 직접 연결되지 않기 때문이다. 오히려, 황화물 모이어티의 산화는 호프만 (Hofmann) 제거 반응을 개시시키는데 필요하며, 이는 최종적으로 링커의 자기-희생으로 이어지고 따라서 방출 종이 생성된다.

[0211] 바람직한 실시형태에 따르면, 본 방법은 단계 a) 및 b) 사이에 또는 단계 b)에서 화학식 I의 화합물을 배지에 첨가하는 단계와 함께 또는 그 후에 수행될 수 있는 추가적인 용해 단계를 포함한다. 일 예에서, 에탄올 또는 다른 적합한 용매 혼합물과 같은 비특이적 용해 시약 (바람직하게는 15%의 양)이 배지에 첨가될 수 있다. 이러한 방식으로, 세포내 효소가 배지로 방출되고 화학식 I의 화합물에 의해 검출될 수 있다. 다른 예에서, 파지, 펩타이드, 단백질과 같은 선택적 용해 시약 (특히 엔도리신 및 그의 유도체)이 배지에 첨가될 수 있다. 상기 선택적 용해 시약은 오직 특이적 세포 (즉, 각각의 선택적 용해 시약에 반응성인 세포)의 세포내 효소의 방출을 유도한다. 따라서, 상기 선택적 용해 시약은 검출된 효소에 더하여 추가 선택 기준을 나타내며, 이는 위양성 결과를 방지하고 특이성을 증가시킨다. 이는 원칙적으로 본 명세서에 개시된 모든 추가 양상에도 적용된다.

[0212] 특이성을 증가시키는 추가 예는 항체 기반 포획 방법의 사용이다. 예를 들어, 항체 작용화된 자기 비드는 단계 a) 및 b) 후에 첨가될 수 있다. 따라서 특이적 세포를 다른 세포로부터 수집/분리하여 특이성을 높일 수 있다. 이러한 방식으로, 항체의 높은 특이성은 높은 감응성으로 대사 활성 박테리아를 검출하기 위한 화학식 I의 화합물의 능력과 조합될 수 있다. 이는 원칙적으로 본 명세서에 개시된 모든 추가 양상에도 적용된다.

[0213] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0214] 바람직하게는, 표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물은 미생물이다.

[0215] 바람직하게는, 미생물은 표 1에 개시된 미생물이다.

[0216] 바람직하게는, 미생물은 살모넬라; 살모넬라 엔테리카; 리스테리아, 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스; S. 아우레우스; E. 콜라이; 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사, 및 클렙시엘라 네우모니아; 캄필로박터 제주니; C. 콜라이; C. 라리; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버쿨로시스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에, 칸디다 종; 그람 음성 박테리아, 효모, 곰팡이, 슈도모나스 아에루기노사, 엔테로코시, 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터, 콜라이형; 크로노박터 사카자키; MRSA, VRE, 제오바실루스 스테아로서모필루스; 리스테리아 종, ESBL 생성 장내 세균; 비브리오; 클로스트리듐 디피실레; 칸디다 알비칸스; 프레보텔라; 쉬겔라, 아피라제 포함 미생물, 바람직하게는 쉬겔라; 레지오넬라 네우모필리아; 및 칼리시비리다에과 바이러스, 바람직하게는 라고바이러스, 노로바이러스, 사포바이러스, 네보바이러스, 레코바이러스, 더욱 바람직하게는 노로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0217] 바람직하게는, 미생물은 살모넬라, 살모넬라 엔테리카, 리스테리아, 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스, S. 아우레우스, E. 콜라이, 및 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아로 이루어진 군으로부터 선택된다.

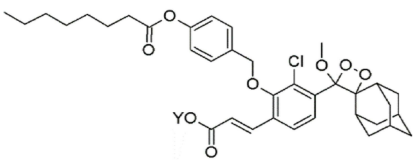
[0218] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이 단계 b)에 첨가된다.

[0219] 바람직하게는, 단계 b)에 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다. 이 경우, 단계 b)에 첨가되는 화학식 I의 화합물의 총 양은 소정의 농도의 스톡 용액으로부터의 분취에 의해 간단하게 측정될 수 있다.

[0220] 바람직하게는, 단계 b) 이후 배지 중 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이다.

[0221] 바람직하게는, 미생물은 병원성 미생물, 더욱 바람직하게는 박테리아, 훨씬 더욱 바람직하게는 살모넬라, 리스테리아 또는 S. 아우레우스이다.

[0222] 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 살모넬라, 바람직하게는 살모넬라 엔테리카이고, 상기 화합물은 화학식 II의 화합물이고:

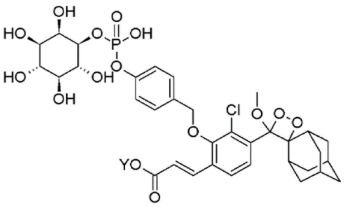
[0223] 

[0224] (화학식 II),

[0225] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다.

[0226] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 살모넬라, 바람직하게는 살모넬라 엔테리카이고, 상기 화합물은 화학식 IIa의 화합물이다.

[0227] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 리스테리아, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스이고, 상기 화합물은 화학식 III의 화합물이고:

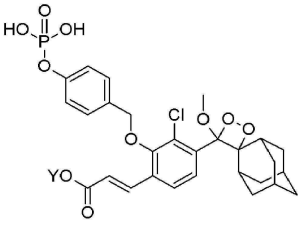
[0228] 

[0229] (화학식 III),

[0230] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다.

[0231] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 리스테리아, 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스이고, 상기 화합물은 화학식 IIIa 또는 IIIb, 바람직하게는 IIIb의 화합물이다.

[0232] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 S. 아우레우스이고, 상기 화합물은 화학식 IV의 화합물이고:

[0233] 

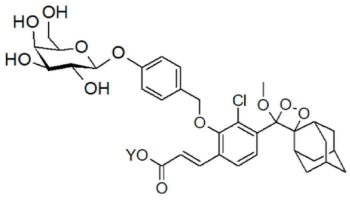
[0234] (화학식 IV)

[0235] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨

또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다.

[0236] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 S. 아우레우스이고, 상기 화합물은 화학식 IVa의 화합물이다.

[0237] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 E. 콜라이이고, 상기 화합물은 화학식 V의 화합물이고:

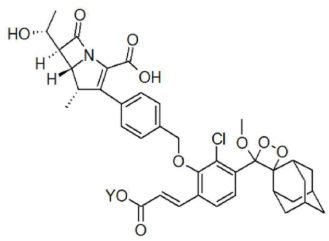
[0238] 

[0239] (화학식 V)

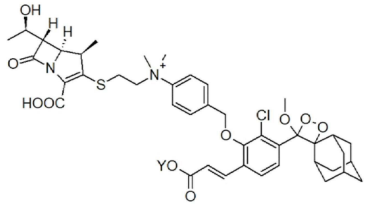
[0240] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다.

[0241] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 E. 콜라이이고, 상기 화합물은 화학식 Va 또는 Vb, 바람직하게는 Vb의 화합물이다.

[0242] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아이고, 상기 화합물은 화학식 VII 또는 VIII의 화합물이고,

[0243] 

[0244] (화합물 VII)

[0245] 

[0246] (화합물 VIII)

[0247] Y는 -H, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬 또는 알칼리 금속 이온이고, 알칼리 금속 이온은 바람직하게는 나트륨 또는 칼륨이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 바람직하게는, Y는 -H, 또는 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬이고, 선택적으로 치환된 C_1-C_{12} 알킬은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 또는 tert-부틸이다. 더욱 바람직하게는, Y는 -H 또는 메틸이다.

[0248] 특히 바람직한 실시형태에 따르면, 미생물은 카바페넴 내성 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아

이고, 상기 화합물은 화학식 VIIa, VIIb 또는 VIIIa, 바람직하게는 VIIIa의 화합물이다.

[0249] 추가의 표적 분석물/표적 미생물/표적 대사산물뿐만 아니라 이들의 검출에 적합한 화학식 I의 특정 화합물, 특히 기 R^1은 본 발명의 제1 양상으로부터 확인될 수 있다.

[0250] 더욱이, 배지가 하나 초과의 미생물을 포함하고 상기 미생물 중 하나가 배지에 존재하는 상기 미생물 중 하나 이상의 다른 미생물보다 적어도 10배, 바람직하게는 적어도 20배 더 높은 광 방출을 유도하는 것이 바람직하다.

[0251] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제3 양상에서, 본 발명은 성장 기질, 영양소, 및 대사산물의 효소적 산화에 의한 상기 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물의 검출을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0252] 성장 기질, 영양소 및 대사산물의 검출을 통해 병원체를 간접적으로 검출할 수 있다.

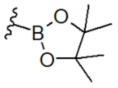
[0253] 이러한 양상에서, 성장 기질, 영양소 및/또는 대사산물은 성장 기질, 영양소 및/또는 대사산물을 산화시켜 과산화수소를 생성하는 효소와 접촉시킴으로써 검출된다. 따라서, 성장 기질, 영양소 또는 대사산물에 작용하는 효소에 의해 생성된 과산화수소를 검출하여 성장 기질, 영양소 또는 대사산물을 간접적으로 검출한다.

[0254] 일 실시형태에서, 영양소는 탄수화물 또는 아미노산이고, 효소는 해당 옥시다제이다. 예를 들어, 영양소는 글루코스이고이고, 효소는 글루코스 옥시다제이거나; 영양소는 D-아미노산이고이고, 효소는 D-아미노산 산화물(DAO)이거나; 영양소는 D-아스파르트산이고이고, 효소는 D-아스파테이트 옥시다제이다.

[0255] 바람직한 실시형태에서, 대사산물은 히스타민이고, 효소는 디아미노옥시다제이다.

[0256] 이러한 양상에서, R^1은 바람직하게는 제1 양상에 규정된 바와 같은 -B(Z)(Z') 또는 $-BF_3^- \ Kat^+$이고, 다른 치환기는 또한 제1 양상에서 규정된 바와 같다.

[0257] 일 실시형태에서, n은 0이다. 또 다른 실시형태에서, n은 1이다.

[0258] 특히 바람직한 화합물은 표 A에 개시된 것이고, R^1은  이다.

[0259] 화학식 I의 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 상기에 제시된 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다. 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0260] 바람직한 실시형태에 따르면, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0261] 또 다른 바람직한 실시형태에 따르면 화합물은 10 내지 500 μM, 바람직하게는 10 내지 250 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 50 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0262] 바람직하게는, 배지는 원핵 세포 포함 배지, 원핵 배양 상청액, 진핵 세포 포함 배지, 진핵 배양 상청액, 혈청 또는 전혈이다.

[0263] 추가로, 본 발명은 성장 기질, 영양소, 및 대사산물의 효소적 산화에 의한 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0264] 본 방법은 a) 효소에 의해 산화될 수 있는 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물을 포함하는 배지를 제공하는 단계, b) (b1) 성장 기질, 영양소, 및/또는 대사산물을 산화할 수 있는 효소를 첨가하여 과산화수소를 생성하는 단계, (b2) 과산화수소와 접촉시 화학식 I의 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 화학식 I의 화합물로서, R^1은 -B(Z)(Z')이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같은 화합물을 첨가하는 단계로서, 단계 (b1) 및 (b2)는 동시에 또는 후속하여 수행될 수 있는 단계, 및 c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0265] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0266] 더욱 바람직하게는, 배지는 원핵 세포 포함 배지, 원핵 배양 상청액, 진핵 세포 포함 배지, 진핵 배양 상청, 혈청 또는 전혈이다.

[0267] 일 실시형태에서, 영양소는 탄수화물 또는 아미노산이고, 효소는 해당 옥시다제이다. 예를 들어, 영양소는 글루코스이고이고, 효소는 글루코스 옥시다제이거나; 영양소는 D-아미노산이고, 효소는 D-아미노산 산화물 (DAO)이거나; 영양소는 D-아스파르트산이고, 효소는 D-아스파테이트 옥시다제이다.

[0268] 바람직한 실시형태에서, 대사산물은 히스타민이고, 효소는 디아미노옥시다제이다.

[0269] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 단계 a) 및 b) (하위단계 b1 및 b2 포함) 중 임의의 단계 동안 또는 단계 a) 및 b) 사이 또는 이후에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0270] 화학식 I의 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 상기 제시된 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0271] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 첨가된다.

[0272] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 배지 중 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이 되도록 첨가된다.

[0273] 대안적으로, 및 또한 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 배지 중 화합물의 최종 농도는 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM이 되도록 첨가된다.

[0274] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제4 양상에서, 본 발명은 리물루스 인자 C의 검출을 통한 박테리아 내독소의 검출을 위한 제1 양상에 규정된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0275] 이러한 양상에서, 기 R^1은 리물루스 인자 C에 대해 반응성/불안정성이다. 바람직하게는, R^1은 Boc-Val-Pro-아르기니닐 또는 Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다.

[0276] 화학식의 화합물은 고체 형태 또는 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중에 사용될 수 있다. 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중에 사용된다.

[0277] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0278] 추가로, 본 발명은 리물루스 인자 C의 검출을 통한 박테리아 내독소의 검출을 위한 방법으로서, 화학식 I의 화합물 및 리물루스 인자 C가 내독소-포함 배지에 첨가되는 방법에 관한 것이다.

[0279] 바람직하게는, R^1은 Boc-Val-Pro-아르기니닐 또는 Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다. 특히 바람직하게는, 상기 화합물은 표 A에 개시된 바와 같은 화학식 I의 화합물이고, R^1은 Boc-Val-Pro-아르기니닐 또는 Boc-Asp(OBzl)-Pro-아르기니닐이다.

[0280] 각각의 내독소의 존재 하에, 리물루스 인자 C의 펩티다제 활성이 활성화되고이 펩티다제 활성은 화학식 I의 화합물의 나머지 부분으로부터 R^1을 절단하여 화학발광을 생성한다. 각각의 내독소가 부재하면 펩티다제 활성이 없다.

[0281] 바람직하게는, 본 방법에 사용되는 배지는 수성 배지이다.

[0282] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 배지에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0283] 화학식 I의 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 상기 제시된 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0284] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0285] 바람직하게는, 배지 중 화학식 I의 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이다.

[0286] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제5 양상에서, 본 발명은 낙농 산물, 예를 들어 우유의 저온살균 시험을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0287] 바람직하게는, 사용되는 화합물은 화학식 I의 화합물로서, R^1은 포스포릴이고, 다른 치환기는 제1 양상에 기재된 바와 같은 화합물이다.

[0288] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0289] 바람직하게는, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0290] 또 다른 실시형태에서, 화학식 I의 화합물은 1 내지 50 μM, 바람직하게는 5 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 15 내지 25 μM, 더욱 바람직하게는 18 내지 22 μM, 더욱 바람직하게는 19 내지 21 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0291] 추가로, 본 발명은 낙농 산물, 바람직하게는 우유의 저온살균 시험 방법에 관한 것이다.

[0292] 본 방법은 a) 낙농 산물 배지, 바람직하게는 우유를 제공하는 단계, b) 저온살균 단계, c) 화학식 I의 화합물이 광을 방출하도록 하기 위해, 제1 실시형태에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물로서, R^1은 포스포릴인 화합물을 선택적으로 완충액과 조합된 배지에 첨가하는 단계, 및 d) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0293] 낙농 산물에 천연으로 존재하는 포스파타제는 멸균 동안 분해된다. 따라서, 멸균이 성공적으로 이루어지는 경우, 낙농 산물에 활성 포스파타제가 존재 하지 않으므로, 광 방출이 검출되지 않는다.

[0294] 바람직하게는, 단계 b)에 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다.

[0295] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM의 최종 농도로 존재 하도록 첨가된다.

[0296] 또 다른 실시형태에서, 화학식 I의 화합물은 1 내지 50 μM, 바람직하게는 5 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 15 내지 25 μM, 더욱 바람직하게는 18 내지 22 μM, 더욱 바람직하게는 19 내지 21 μM의 최종 농도로 존재 하도록 첨가된다.

[0297] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이 배지에 첨가된다.

[0298] 바람직하게는, 단계 b)에 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다. 이 경우, 단계 b)에 첨가되는 화학식 I의 화합물의 총 양은 소정의 농도의 스톡 용액으로부터의 분취에 의해 간단하게 측정될 수 있다.

[0299] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제6 양상에서, 본 발명은 미생물에서 항생제 내성 시험을 위한 화학

식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0300] 바람직하게는, R^1은 제1 양상에 규정된 바와 같은 베타-락타마제-불안정성 기, 바람직하게는 베타-락탐 항생제, 더욱 바람직하게는 페니실린, 1 내지 5세대의 세팔로스포린, 세파마이신, 또는 카바페넴이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다.

[0301] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 표 A에 규정된 바와 같고, R^1은 도시된 바람직한 카바페넴 모이어티이다.

[0302] 바람직하게는, 미생물은 살모넬라; 살모넬라 엔테리카; 리스테리아, 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스; S. 아우레우스; E. 콜라이; 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사, 및 클렙시엘라 네우모니아; 캄필로박터 제주니; C. 콜라이; C. 라리; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버쿨로시스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에, 칸디다 종; 그람 음성 박테리아, 효모, 곰팡이, 슈도모나스 아에루기노사, 엔테로코시, 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터, 콜라이형; 크로노박터 사카자키; MRSA, VRE, 제오바실루스 스테아로서모필루스; 리스테리아 종, ESBL 생성 장내 세균; 비브리오; 클로스트리듐 디피실레; 칸디다 알비칸스; 프레보텔라; 쉬겔라, 레지오넬라 네우모필리아; 및 칼리시비리다에과 바이러스, 바람직하게는 라고바이러스, 노로바이러스, 사포바이러스, 네보바이러스, 레코바이러스, 더욱 바람직하게는 노로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0303] 더욱 바람직하게는, 미생물은 살모넬라; 살모넬라 엔테리카; 리스테리아, 바람직하게는, 리스테리아 모노사이토게네스; S. 아우레우스; E. 콜라이; 카바페넴 내성 박테리아, 바람직하게는 슈도모나스 아에루기노사, 및 클렙시엘라 네우모니아; 캄필로박터 제주니; C. 콜라이; C. 라리; 바실루스; 스타필로코쿠스; 클로스트리듐; 마이코박테리움 투버쿨로시스; 클로스트리듐 퍼프리겐스; S. 아갈락티아에, 칸디다 종; 그람 음성 박테리아, 효모, 곰팡이, 슈도모나스 아에루기노사, 엔테로코시, 스트렙토코쿠스 피오게네스; 시트로박터, 콜라이형; 크로노박터 사카자키; MRSA, VRE, 제오바실루스 스테아로서모필루스; 리스테리아 종, ESBL 생성 장내 세균; 비브리오; 클로스트리듐 디피실레; 칸디다 알비칸스; 프레보텔라; 쉬겔라, 및 레지오넬라 네우모필리아로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0304] 훨씬 더욱 바람직하게는, 미생물은 슈도모나스 아에루기노사 및 클렙시엘라 네우모니아에로부터 선택된다.

[0305] 상기 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0306] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0307] 바람직하게는, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0308] 또 다른 실시형태에서, 상기 화합물은 약 1 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 3 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 4 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 15 μM, 더욱 바람직하게는 7 내지 13 μM, 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0309] 추가로, 본 발명은 미생물에서 항생제, 특히 베타-락탐 항생제 예컨대 페니실린, 세팔로스포린, 세파마이신, 또는 카바페넴 내성의 시험을 위한 방법에 관한 것이다.

[0310] 본 방법은 a) 하나 초과의 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계 b) 항생제, 바람직하게는 베타-락탐 항생제 예컨대 페니실린, 세팔로스포린, 세파마이신 또는 카바페넴 내성 미생물이 배지에 존재하는 경우 화학식 I의 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 화학식 I의 화합물로서, R^1은 베타-락타마제-불안정성 기, 바람직하게는 베타-락탐 항생제 예컨대 페니실린, 1 내지 5세대의 세팔로스포린, 세파마이신, 또는 카바페넴이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같은 화합물을 첨가하는 단계, 및 c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0311] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 표 A에 규정된 바와 같고, R^1은 카바페네밀이다.

[0312] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0313] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 단계 a) 및 b) 중 임의의 단계 또는 단계 a) 및 b) 사이 또는 이후에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0314] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM의 최종 농도로 존재 하도록 첨가된다.

[0315] 또 다른 실시형태에서, 화학식 I의 화합물은 1 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 3 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 4 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 15 μM, 더욱 바람직하게는 7 내지 13 μM, 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM의 최종 농도로 존재 하도록 첨가된다.

[0316] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이 배지에 첨가된다.

[0317] 바람직하게는, 단계 b)에 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다. 이 경우, 단계 b)에 첨가되는 화학식 I의 화합물의 총 양은 소정의 농도의 스톡 용액으로부터의 분취에 의해 간단하게 측정될 수 있다.

[0318] 특히, 본 방법은 항생제 내성 미생물의 경우에만 광 방출이 이루어지기 때문에, 항생제 감수성 미생물과 항생제 내성 미생물의 구별에 적합하다.

[0319] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제7 양상에서, 본 발명은 무기 포스페이트, 바람직하게는 효소 반응에 의해 생성된 무기 포스페이트의 검출을 위한 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0320] 바람직하게는, R^1은 옥살릴에스테르이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다.

[0321] 바람직하게는, 무기 포스페이트은 아피라제, 바람직하게는 쉬겔라 아피라제에 의해 생성된다. 이 경우, 상기 화합물은 전 세계적으로 설사의 주요 원인 중 하나인 쉬겔라를 검출하는데 적합하다.

[0322] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0323] 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 다음 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0324] 바람직하게는, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0325] 추가로, 본 발명은 무기 포스페이트, 바람직하게는 효소 반응에 의해 생성된 무기 포스페이트의 검출을 위한 방법에 관한 것이다.

[0326] 본 방법은 a) 무기 포스페이트을 포함하는 배지를 제공하는 단계 b) 화학식 I의 화합물이 광을 방출할 수 있도록 하기 위해, 배지에 화학식 I의 화합물로서, R^1은 옥살릴에스테르이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같은 화합물을 첨가하는 단계, 및 c) 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0327] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 표 A에 규정된 바와 같고, R^1은 옥살릴에스테르이다.

[0328] 바람직하게는, 배지에 포함되는 무기 포스페이트은 아피라제, 바람직하게는 쉬겔라 아피라제에 의해 생성된다. 따라서, 단계 a)의 배지는 아피라제, 바람직하게는 쉬겔라 아피라제를 포함하는 것이 바람직하다. 단계 a)의 배지가 쉬겔라를 포함하는 것이 특히 바람직하다.

[0329] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0330] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 단계 a) 및 b) 중 임의의 단계 또는 단계 a) 및 b) 사이 또는 이후에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0331] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이다.

[0332] 바람직하게는, 단계 b)에 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다.

[0333] 바람직하게는, 배지 중 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이다.

[0334] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제8 양상에서, 본 발명은 멸균 공정, 바람직하게는 지표 미생물 제오바실루스 스테아로서모필루스의 알파-D-글루코시다제 활성의 검출을 통한 모니터링을 위한 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다. 제오바실루스 스테아로서모필루스는 알파-글루코시다제를 생성하나, 이는 멸균시 불활성화된다.

[0335] 바람직하게는, R^1은 알파-D-글루코피라노시딜이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다. 따라서, 제오바실루스 스테아로서모필루스 및 알파-글루코시다제가 멸균에 의해 불활성화되는 경우, 이는 알파-D-글루코피라노시딜 모이어티를 절단할 수 없고, 결과적으로 광이 방출되지 않는다.

[0336] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0337] 또한 이러한 양상에서, 화학식 I의 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 다음 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0338] 바람직하게는, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0339] 추가로, 본 발명은 멸균 공정, 바람직하게는 지표 미생물 제오바실루스 스테아로서모필루스의 알파-D-글루코시다제 활성의 검출을 통한 모니터링을 위한 방법에 관한 것이다.

[0340] 본 방법은 a1) 정상 조건 하에, 알파-글루코시다제, 바람직하게는 제오바실루스 스테아로서모필루스를 생성하는 미생물을 포함하는 배지를 제공하는 단계, a2) 배지를 멸균하는 단계, b) 화학식 I의 화합물로서, R^1은 알파-D-글루코피라노시딜이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같은 화합물을 배지에 첨가하는 단계, 및 c) 존재하는 경우, 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0341] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 표 A에 규정된 바와 같고, R^1은 알파-D-글루코피라노시딜이고, 다른 치환기는 제1 양상에 규정된 바와 같다.

[0342] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0343] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 단계 b) 동안 또는 이후에 첨가될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0344] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이다.

[0345] 바람직하게는, 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다.

[0346] 바람직하게는, 배지 중 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이다.

[0347] 제2 양상의 하위 양상으로 고려될 수 있는 제9 양상에서, 본 발명은 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성 시험을 위한 제1 양상에 기재된 바와 같은 화학식 I의 화합물의 용도에 관한 것이다.

[0348] 이러한 양상에서, 상기 화합물은 배양 초기 또는 측정시에 박테리아 및 항생제 포함 배지에 첨가될 수 있다. 항생제 내성 박테리아는 항생제의 존재 하에서도 증식할 것이며, 이는 기 R^1과 각각의 박테리아 (특히 이들의 효소 등)의 상호작용에 의해 화학식 I의 화합물의 광 방출을 유발할 것이다 (참조: 실시예 8).

[0349] 박테리아의 항생제 내성의 상기 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성 시험에 사용될 수 있는 기 R^1은 표 1에서 확인할 수 있다. 예를 들어, R^1이 포스포릴인 화학식 I의 화합물은 스타필로코쿠스 아우레우스, 특히 MRSA, 클로스트리듐 퍼프리겐스, S. 아갈락티아에, 또는 칸디다의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 이의 항생제 감수성 시험에 사용될 수 있다. 또 다른 예에서, R^1이 L-피로글루타믹 아시딜인 화학식 I의 화합물은 엔테로코시, 스트렙토코쿠스 피오게네스, 또는 시트로박터의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 이의 항생제 감수성 시험에 사용될 수 있다. 추가로 실시예에서, R^1이 베타-D-갈락토피라노시딜인 화학식 I의 화합물은 콜라이형, 또는 E. 콜라이의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 이의 항생제 감수성 시험에 사용될 수 있다.

[0350] 바람직하게는, 화학식 I의 화합물은 0.1 μg 미만, 바람직하게는 0.09 μg 미만, 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 양으로 사용된다.

[0351] 또한 이러한 양상에서, 화학식 I의 화합물은 고체 형태 또는 용액 중에 사용될 수 있다. 그러나, 다음 이유로 용액, 바람직하게는 DMSO 용액 중 화학식 I의 화합물을 사용하는 것이 바람직하다.

[0352] 바람직하게는, 상기 화합물은 1 내지 100 μM, 바람직하게는 5 내지 80 μM, 더욱 바람직하게는 10 내지 70 μM, 더욱 바람직하게는 20 내지 60 μM, 더욱 바람직하게는 30 내지 50 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 35 내지 45 μM의 최종 농도로 사용된다.

[0353] 추가로, 본 발명은 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성 시험을 위한 방법에 관한 것이다.

[0354] 본 방법은 a) 미생물, 바람직하게는 박테리아를 포함하는 배지를 제공하는 단계, b) 항생제를 첨가하는 단계, c) 화학식 I의 화합물로서, R^1은 상기 미생물, 특히 이에 따라 생성된 효소에 대해 반응성인 화합물을 첨가하는 단계로서, 단계 c)는 단계 b) 이전, 동시 또는 이후에 수행될 수 있는 단계, d) 존재하는 경우, 방출된 광을 검출하는 단계를 포함한다.

[0355] 박테리아의 항생제 내성의 한계 및 온라인 검출 및 항생제 감수성 시험에 사용될 수 있는 기 R^1은 표 1에서 확인할 수 있다.

[0356] 바람직하게는, 0.1 μg 미만, 더욱 바람직하게는, 0.09 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.08 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.07 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.065 μg 미만, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.04 내지 0.06 μg, 훨씬 더욱 바람직하게는 0.045 내지 0.055 μg, 가장 바람직하게는 약 0.05 μg의 화학식 I의 화합물이다.

[0357] 바람직하게는, 배지에 첨가되는 화합물은 DMSO 용액 중에 존재한다.

[0358] 바람직하게는, 배지 중 화합물의 최종 농도는 2 내지 50 μM, 바람직하게는 2 내지 40 μM, 더욱 바람직하게는 2 내지 30 μM, 더욱 바람직하게는 5 내지 20 μM, 더욱 바람직하게는 8 내지 15 μM, 훨씬 더욱 바람직하게는 9 내지 11 μM, 가장 바람직하게는 약 10 μM이다.

[0359] 바람직하게는, 배지는 수성 배지이다.

[0360] 바람직하게는 15%의 양의 에탄올 또는 또 다른 적합한 용매 또는 용매 혼합물이 단계 b) 동안 또는 이후에 첨가

될 수 있다. 상기 기재된 바와 같이, 다른 용해 시약이 대안적으로 사용될 수 있다.

[0361] 본 발명은 이제 다음의 비 제한적인 실시예에 의해 추가로 설명될 것이다.

[0362] 실시예

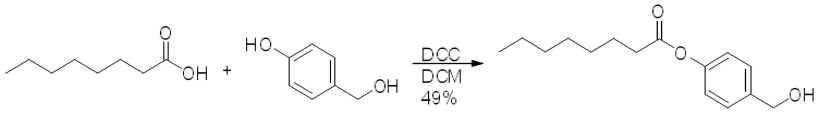
[0363] 일반적 방법:

[0364] 달리 언급하지 않는 한 모든 반응은 실온에서 수행하였다. 화학물질 및 용매는 A.R. 등급이거나 표준 기술에 의해 정제된 것이다. 박층 크로마토그래피 (TLC): 실리카겔 플레이트 Merck 60 F254 : 화합물을 자외선 조사에 의해 시각화하였다. 컬럼 크로마토그래피 (FC): 실리카겔 Merck 60 (입자 크기 0.040 내지 0.063mm), 괄호 안에 용리액. 역상 고압 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC): C18 5u, 250x4.6mm, 괄호 안의 용리액. 분취 RP-HPLC : C18 5u, 250x21mm, 괄호 안의 용리액. 형광 및 화학발광은 Molecular Devices Spectramax i3x에 기록하였다.

[0365] 달리 명시되지 않은 경우 모든 화학물질은 Merck 및 Biosynth AG에서 구입하여 제공된대로 사용하였다.

[0366] 약자. AcOH-아세트산, MeCN-아세토니트릴, DCM-디클로로메탄, DMF-N,N'-디메틸포름아미드, EtOAc-에틸아세테이트, Hex-헥산, MeOH-메탄올, TFA-트리플루오로아세트산, THF-테트라하이드로푸란. TIPSCl-트리이소프로필실릴 클로라이드.

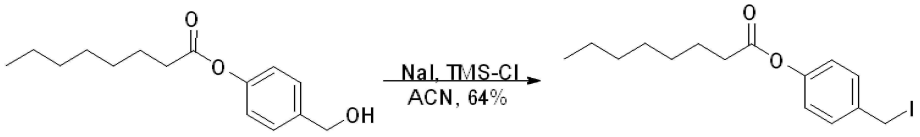
[0367] **합성 실시예 1: 화합물 IIa의 합성**



1a

[0368]

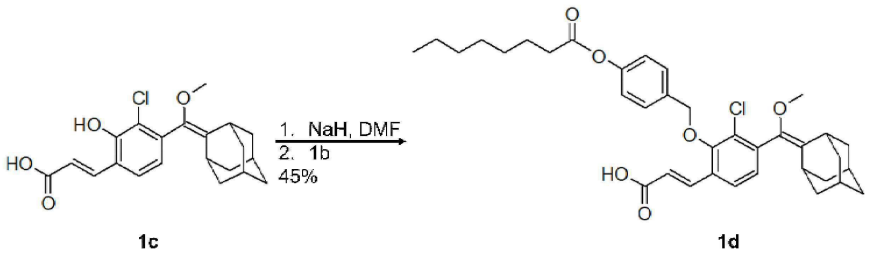
[0369] DCC (457 mg, 2.21 mmol, 1.1 eq)를 DCM (2 ml) 중 옥탄산 (350 μl, 2.21 mmol, 1.1 eq) 및 4-하이드록시벤질 알콜 (250 mg, 2.01 mmol, 1 eq)의 혼합물에 첨가하였다. 반응 혼합물을 실온에서 교반하고, TLC (40:60 EtOAc:Hex)를 통해 모니터링하였다. 완료시, DCC을를 여과하고, 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (30:70 EtOAc:Hex) 상에서 정제하여, 화합물 1a (246 mg, 49% 수율)를 황색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.35 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 4.63 (s, 2H), 2.55 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.76 (dt, J = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 1.50 - 1.18 (m, 8H), 0.97 - 0.82 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 173.75, 150.68, 133.71, 129.49, 121.78, 65.50, 34.48, 31.72, 29.16, 29.14, 29.11, 28.98, 25.01, 22.67, 14.13.



1a 1b

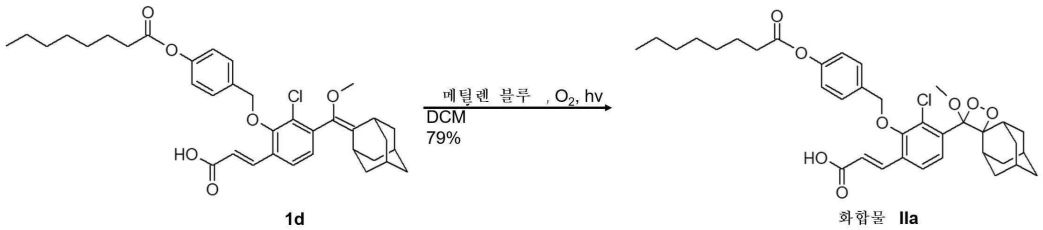
[0370]

[0371] 화합물 1a (200 mg, 0.8 mmol, 1 eq)를 4 ml의 ACN에 용해시키고, 및 0℃로 냉각시켰다. 요오드화나트륨 (360 mg, 2.4 mmol, 3 eq)을 첨가한 후, TMS-Cl (306 μl, 2.4 mmol, 3eq)을 빠르게 첨가하였다. 반응을 실온으로 가온시키고, TLC (30:70 EtOAc:Hex)에 의해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 및 포화 $Na_2S_2O_3$ 이 후 염수로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시키고, 화합물 1b (185 mg, 64% 수율)를 회백색 고체로서 제공하였다. 화합물을 추가 정제 단계 없이 반응시켰다. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.38 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.00 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.45 (s, 2H), 2.54 (t, J = 5.6 Hz, 2H), 1.74 (dt, J = 15.1, 7.5 Hz, 2H), 1.44 - 1.24 (m, 8H), 0.90 (t, J = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 172.35, 150.33, 133.73, 129.82, 129.40, 121.93, 121.68, 43.20, 34.36, 34.28, 31.62, 30.71, 29.03, 28.88, 24.90, 22.57, 14.04.



[0372]

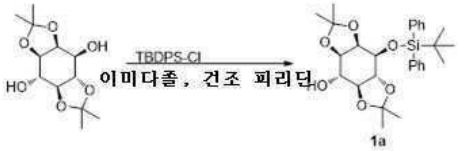
[0373] 화합물 1c (문헌[Green, O., Eilon, T., Hananya, N., Gutkin, S., Bauer, CR., Shabat, D., ACS Central Sci., 2017, 4, 349-58]에 따라 제조됨) (30 mg, 0.08 mmol, 1.1 eq)를 건조 DMF에 아르곤 대기 하에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. 수소화나트륨 (6.4 mg, 0.16 mmol, 2.2 eq)을 첨가하고, 반응을 실온으로 가온시켰다. 15분 교반 후, 화합물 1b (26 mg, 0.07 mmol, 1 eq)를 첨가하고, 반응을 RP-HPLC (90 내지 100% ACN, 물 중, 20분)에 의해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 감압 하에 증발에 의해 농축시키고, 미정제 산물을 분취 RP-HPLC (95-100% ACN, 물 중, 20분)에 의해 정제하여, 화합물 1d (18 mg, 45% 수율)를 백색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.78 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.75 (d, J = 10.5 Hz, 1H), 7.48 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 7.17 - 7.05 (m, 3H), 6.58 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.96 (d, J = 12.9 Hz, 2H), 3.21 (s, 3H), 3.17 (s, 2H), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.92 (dd, J = 34.0, 9.0 Hz, 4H), 1.82 - 1.55 (m, 10H), 1.37 - 1.14 (m, 8H), 0.89 - 0.80 (m, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO) δ 172.09, 159.35, 153.04, 150.78, 139.79, 137.52, 133.86, 130.71, 130.06, 129.93, 129.00, 128.20, 126.30, 122.28, 75.34, 56.92, 36.88, 33.89, 32.83, 31.53, 29.46, 28.78, 28.12, 27.98, 24.75, 22.51, 14.31.



[0374]

[0375] 화합물 1d (18 mg, 0.03 mmol) 및 수 밀리그램의 메틸렌 블루를 5 ml의 DCM 및 몇 방울의 DMF (용해도를 향상시키기 위함)에 용해시켰다. 황색 광을 조사하면서 용액을 통해 산소를 발포시켰다. 반응을 RP-HPLC (90-100% ACN, 물 중, 20분)에 의해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 감압 하에 증발에 의해 농축시켰다. 미정제 산물을 분취 RP-HPLC (90-100% ACN, 물 중, 20분)에 의해 정제하여, 화합물 IIa (15 mg, 79% 수율)를 회백색 고체로서 제공하였다. ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.94 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.73 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.13 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.63 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.92 (q, J = 10.9 Hz, 2H), 3.11 (s, 3H), 2.88 (s, 1H), 2.56 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.22 (d, J = 11.5 Hz, 1H), 1.89 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 1.77 - 1.50 (m, 19H), 1.46 (d, J = 11.8 Hz, 1H), 1.40 - 1.16 (m, 8H), 0.90 - 0.80 (m, 3H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 172.35, 167.74, 154.08, 151.18, 136.97, 134.67, 133.84, 132.01, 130.34, 129.10, 127.38, 126.70, 123.90, 122.50, 111.79, 96.02, 75.65, 50.03, 36.48, 34.07, 33.89, 33.68, 32.44, 32.26, 31.71, 31.48, 30.43, 29.60, 26.10, 25.77, 22.64, 14.54.

[0376] **<u>합성 실시예 2: 화합물 IIIa의 합성</u>**



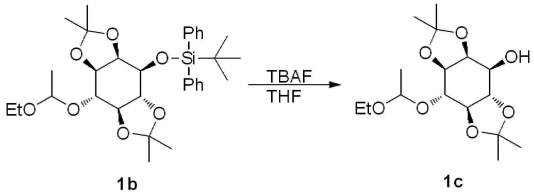
[0377]

[0378] 1,2:4,5-디-O-이소프로필리덴-미오-이노시톨 (250 mg, 0.96 mmol, 1eq) 및 이미다졸 (98 mg, 1.44 mmol, 1.5 eq)을 건조 피리딘 (3 ml)에 용해시키고, 및 -10℃로 냉각하였다. t-부틸디페닐실릴 클로라이드 (275 μl, 1.06 mmol, 1.1 eq)를 주사기를 통해 서서히 첨가하였다. 반응을 실온으로 가온시키고, TLC (50:50 EtOAc:Hex)를 통

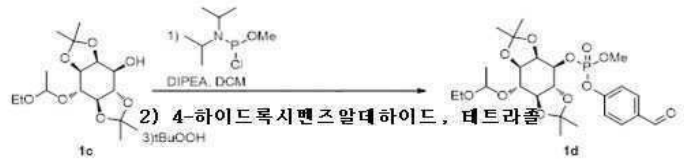
해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 EtOAc로 희석하고, 및 포화 NH_4Cl로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (50:50 EtOAc:Hex) 상에서 정제하여, 화합물 1a (350 mg, 73% 수율)를 백색 거품으로서 제공하였다. MS (ES+): m/z $C_{28}H_{38}O_6Si$ 계산치: 498.24; 실측치: 499.4 $[M+H]^+$.

[0379]

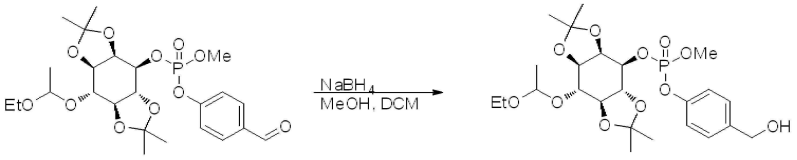
[0380] 화합물 1a (170 mg, 0.341 mmol, 1 eq)를 DCM에 용해시키고, 및 에틸 비닐 에테르 (652 μl, 6.8 mmol, 20 eq)이 후 피리디늄 p-톨루엔 술폰산 (39 mg, 0.153 mmol, 0.45 eq)을 첨가하였다. 반응을 TLC (20:80 EtOAc:Hex)를 통해 모니터링하고, 완료시, 반응을 Et_2O로 희석한다. 유기 층을 5% $NaHCO_3$ 이 후 염수로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (15:85 EtOAc:Hex) 상에서 정제하여, 화합물 1b (150 mg, 77% 수율)를 투명한 오일로서 제공하였다.

[0381] 

[0382] 화합물 1b (90 mg, 0.16 mmol, 1eq)를 THF (1 ml)에 용해시키고, 및 테트라부틸 암모늄 플루오라이드를 첨가하였다 (1M, THF 중, 240 μl, 0.24 mmol, 1.5 eq). 반응을 실온에서 밤새 교반하였다. 완료시, 용매를 감압 하에 제거하였다. 미정제 산물을 Et_2O에 용해시키고, 및 물로 세척하였다. 수성 상을 Et_2O로 2회 이상 세척하였다. 유기 층을 조합하고, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (EtOAc) 상에서 정제하여, 화합물 1c (42 mg, 80% 수율)를 백색 분말로서 제공하였다.

[0383] 

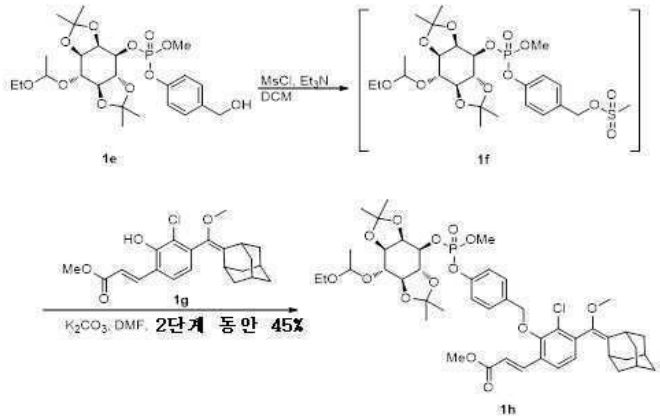
[0384] 화합물 1c (39 mg, 0.117 mmol, 1 eq)를 건조 DCM에 용해시켰다. 디이소프로필에틸 아민 (63 μl, 0.351 mmol, 3 eq)을 첨가한 후, N,N-디이소프로필메틸포스폰아미드 클로라이드 (45 μl, 0.234 mmol, 2 eq)를 적가하였다. 반응을 실온에서 밤새 방치하였다. 이 후, 용매를 감압 하에 제거하였다. 미정제 산물을 DCM 중에 용해시킨 후, 4-하이드록시벤즈알데하이드 (20 mg, 0.164 mmol, 1.4 eq) 및 테트라졸 (0.45M, ACN 중, 780 μl, 0.351 mmol, 3eq)을 첨가하였다. 반응을 TLC (20:80 EtOAc:Hex)에 의해 모니터링하였다. 2시간 후, tert-부틸 하이드로퍼옥사이드 (5.5M, 데칸 중, 43 μl, 0.234 mmol, 2 eq)를 0℃에서 서서히 적가하였다. 반응을 TLC (30:70 EtOAc:Hex)를 통해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 DCM로 희석하고, 및 5% $NaHCO_3$ 이 후 염수로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (70:30 EtOAc:Hex) 상에서 정제하여, 화합물 1d (37 mg, 60% 수율)를 백색 고체로서 제공하였다. MS (ES+): m/z $C_{24}H_{35}ClO_{11}P$ 계산치: 530.19; 실측치: 553.5 $[M+Na]^+$.



1d 1e

[0385]

[0386] 화합물 1e (95 mg, 0.18 mmol, 1eq)를 수 방울의 DCM과 MeOH에 용해시켰다. $NaBH_4$ (14 mg, 0.36 mmol, 2 eq)를 서서히 첨가하였다. 반응을 TLC (60:40 EtOAc:Hex)를 통해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 및 염수로 세척하였다. 수성 상을 DCM로 2회 이상 세척하였다. 유기 층을 조합하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시키고 화합물 1e (75 mg, 80% 수율)를 회백색 분말로서 제공하였다. MS (ES+): m/z $C_{24}H_{37}ClO_{11}P$ 계산치: 532.21; 실측치: 555.3 $[M+Na]^+$.



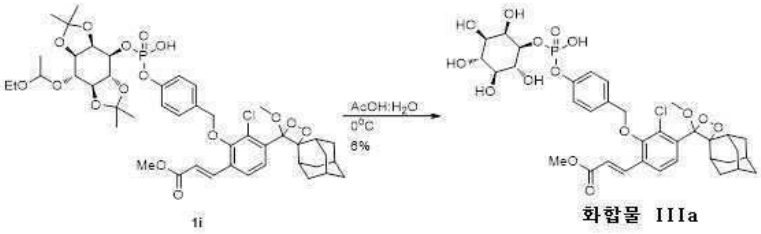
[0387]

[0388] 화합물 1e (305 mg, 0.57 mmol, 1 eq)를 DCM에 용해시켰다. 메탄술포닐 클로라이드 (54 μl, 0.68 mmol, 1.2 eq) 및 트리메틸아민 (97 μl, 0.68 mmol, 1.2 eq)을 적가하였다. 반응을 TLC (30:70 EtOAc:Hex)를 통해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 DCM으로 희석하고, 및 포화 $NaHCO_3$로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하여, 용매를 감압 하에 증발시키고, 화합물 1f를 생성하여, 이를 추가 정제 단계 없이 사용하였다. MS (ES+): m/z $C_{25}H_{39}ClO_{13}PS$ 계산치: 610.18; 실측치: 633.26 $[M+Na]^+$. 화합물 1f 및 화합물 1g (문헌[Green, O., Eilon, T., Hananya, N., Gutkin, S., Bauer, CR., Shabat, D., ACS Central Sci., 2017, 4, 349-58]에 따라 제조됨) (288 mg, 0.74 mmol, 1.3 eq)를 건조 DMF에 용해시키고, K_2CO_3을 첨가하였다 (197 mg, 1.43 mmol, 2.5 eq). 반응을 TLC (30:70 EtOAc:Hex) 및 RP-HPLC (70-100% ACN, 물 중, 20분)에 의해 모니터링하였다. 완료시, 용매를 감압 하에 제거하였다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 (75:25 EtOAc:Hex) 상에서 정제하여, 화합물 1h (231 mg, 2단계 동안의 수율 45%)를 백색 거품으로서 제공하였다. MS (ES+): m/z $C_{46}H_{60}ClO_{14}P$ 계산치: 902.34; 실측치: 925.60 $[M+Na]^+$.

[0389]

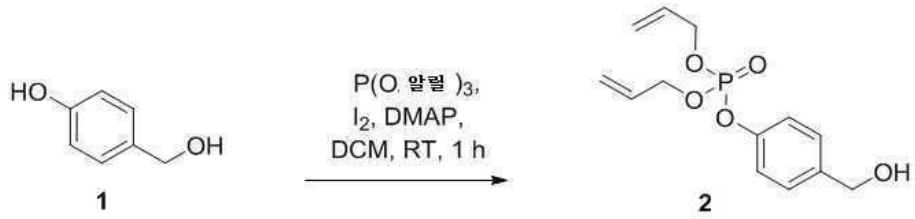
[0390] 화합물 1h (20 mg, 0.022 mmol, 1 eq)를 아세톤에 용해시키고, 요오드화리튬을 첨가하였다 (6 mg, 0.044 mmol, 2 eq). 반응을 환류 가열하고, RP-HPLC RP-HPLC (10-60% ACN, 암모늄 카보네이트 15 mM 완충액, 20분)에 의해 모니터링하였다. 용매를 제거하고, 미정제 산물을 DCM에 용해시켰다. 수 밀리그램의 메틸렌 블루를 첨가하고, 황색 광을 조사하면서 용액을 통해 산소를 발포시켰다. 반응을 RP-HPLC (15-70% ACN, 암모늄 카보네이트 15 mM 완충액, 20분)에 의해 모니터링하였다. 완료시, 반응 혼합물을 감압 하에 증발에 의해 농축시켰다. 미정제 산물

을 분취 RP-HPLC (15-70% ACN, 암모늄 카보네이트 15 mM 완충액, 20분)에 의해 정제하여, 화합물 1i (13 mg, 2단계 동안의 수율 63%)를 회백색 고체로서 제공하였다. MS (ES-): m/z $C_{45}H_{58}ClO_{16}P$ 계산치: 920.32; 실측치: 919.67 $[M-H]^-$.

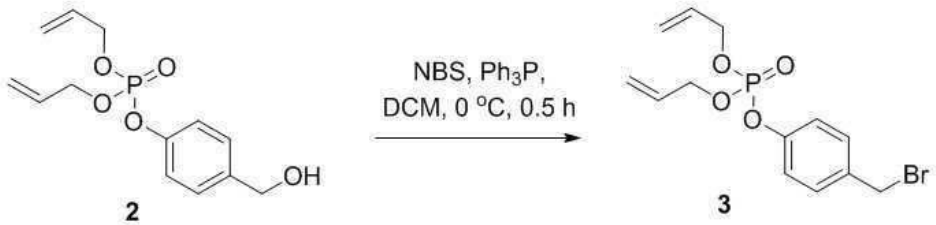
[0391] 

[0392] 화합물 1i (13 mg, 0.041 mmol)를 첨가하고 냉각하고 (0℃) AcOH:H_2O 1:4 및 생성된 현탁액을 0℃에서 교반하였다. 24시간 후, 용매를 에탄올로 증발시켜 제거하였다. 미정제 산물을 분취 RP-HPLC (15-70% ACN, 암모늄 카보네이트 15 mM 완충액, 20분)에 의해 정제하여, 화합물 IIIa (0.7 mg, 6% 수율)를 회백색 고체로서 제공하였다. MS (ES-): m/z $C_{35}H_{42}ClO_{15}P$ 계산치: 768.19; 실측치: 767.5 $[M-H]^-$

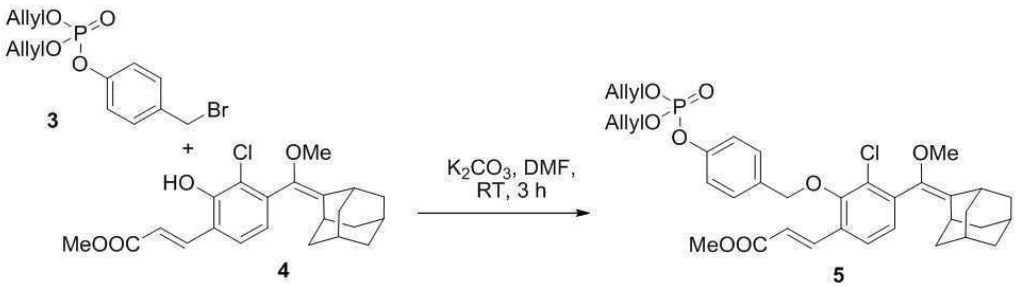
[0393] **합성 실시예 3: 화합물 IVa의 합성**

[0394] 

[0395] 4-하이드록시벤질알콜 (1) (0.0400 mol, 4.97 mol)을 DCM (80 mL)에 용해시키고, DMAP (2 eq., 0.0800 mol, 9.77 g)를 첨가하였다. 분리 플라스크에서 트리알릴포스파이트 (2.2 eq. 0.0880 mol, 17.8 g, 17.8 mL)를 DCM (80 mL)에 용해시키고, 혼합물을 0℃로 냉각시키고, 요오드 (2 eq., 0.080 mol, 20.3 g)를 분량씩 첨가하고, 모든 요오드가 제거될 때까지 혼합물을 0℃에서 교반시켜 (약 20분) 무색 용액을 형성시켰다. 이 용액 (포스포늄 염 포함)을 에스테르 1 및 DMAP의 용액에 분량씩 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 1시간 후 반응 혼합물 (황색 용액)에 염수 (80 mL)를 첨가하고, 분리 유기층을 건조하고 ($MgSO_4$) 진공 하에 농축시켜, 연황색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔, 용리액 헥산 : EtOAc 2:1 내지 1:1 내지 2:1)에 의해 정제하여, 알콜 2를 무색 오일, 2.0 g, 18%로서 생성하였다.

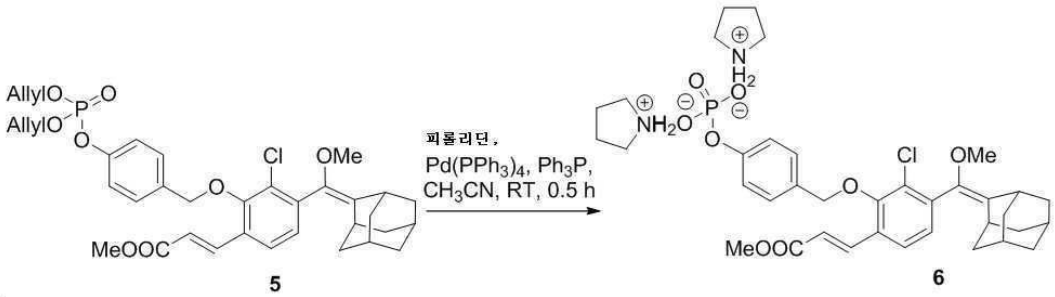
[0396] 

[0397] DCM (100 mL) 중 알콜 2 (2.00 g, 0.00700 mol)의 용액을 0℃로 냉각시켰다. NBS (2 eq., 0.014 mol, 2.5 g) 및 Ph_3P (2 eq., 0.014 mol, 3.67 g)를 첨가하였다 (연황색 용액). 0.5시간 후 혼합물 (연황색 용액)을 진공 하에 농축시켜, 연황색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔, 용리액 헥산 : Et_2O 1:1 내지 1:2)에 의해 정제하여, 브로마이드 3을 연황색 오일, 1.2 g, 49%로서 제공하였다.



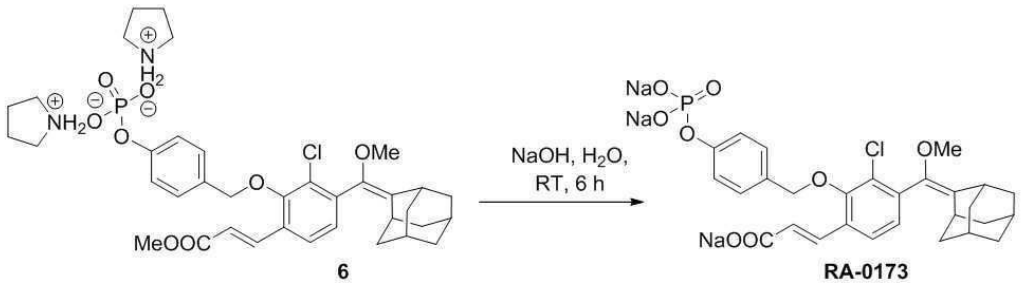
[0398]

[0399] DMF (9 mL) 중 에스테르 4 (1.34 g, 0.00345 mol)의 용액 (무색 용액)을 0℃로 냉각시키고 (황색 현탁액), K_2CO_3 (1.2 eq., 0.00413 mol, 0.57 g)를 첨가하고, 혼합물을 0℃에서 교반하였다. 10분 후 DMF (8 mL) 중 브로마이드 3 (1 eq., 0.00345 mol, 1.20 g)의 용액을 첨가하고, 생성된 혼합물 (황색-오렌지색 현탁액)을 실온에서 교반하였다. 3시간 후 혼합물에 NH_4Cl (50 mL)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 EtOAc (3배 20 mL)로 추출하고, 조합 유기층을 건조하고 ($MgSO_4$) 진공 하에 농축시켜 연황색 오일, 3.8 g을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔, 용리액 Et_2O : 헥산 1:1 대 Et_2O)에 의해 정제하여, 에스테르 5를 연황색 오일, 1.9 g, 84%로서 제공하였다; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1.60 - 2.03 (m, 12 H) 2.12 (br s, 1 H) 3.33 (br s, 1 H) 3.37 (s, 3 H) 3.86 (s, 3 H) 4.70 (ddq, J = 8.5, 5.7, 1.3, Hz, 4 H) 5.02 (m, 2 H) 5.28 - 5.47 (m, 4 H) 5.93 - 6.06 (m, 2 H) 6.51 (d, J = 16.2 Hz, 1 H) 7.13 (dd, J = 8.1, 0.5 Hz, 1 H) 7.27 - 7.31 (m, 2 H) 7.49 (d, J = 8.1 Hz, 1 H) 7.53 (d, J = 8.3 Hz, 2 H) 7.98 (d, J = 16.2 Hz, 1 H).



[0400]

[0401] CH_3CN (29 mL) 중 에스테르 5 (1.9 g, 0.0029 mol)의 용액에 피롤리딘 (6.2 eq., 0.0018 mol, 1.28 g, 1.5 mL), Ph_3P (0.20 eq., 0.00059 mol, 0.15 g) 및 $Pd(PPh_3)_4$ (0.05 eq., 0.000145 mol, 0.168 g)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 0.5시간 후 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜, 연황색 오일을 생성하였다. 에스테르 6을 포함하는 미정제 혼합물을 추가 정제 단계 없이 다음 단계 (Me-에스테르 가수분해)를 위해 사용하였다.

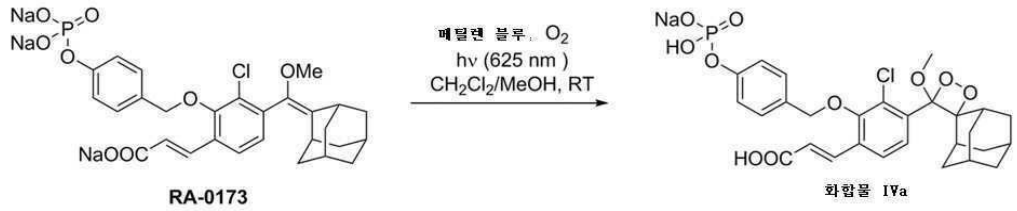


[0402]

[0403] 물 (28 mL) 및 NaOH (3 eq., 0.0087, 0.35 g)를 에스테르 6 (0.0029 mol, 전단계로부터 이론적 몰수)에 첨가하고, 혼합물을 Et_2O (2배 30 mL)로 추출하고, 조합 유기층을 따라내었다 및 수성 층 (뿌연 황색 용액)을 실온에서 교반하였다. 6시간 후 반응 혼합물 (황색 용액)을 Et_2O (5 mL)로 추출하고, 분리 수성 층을 진공 하에 농축시켜 황색-녹색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카겔, 용리액 EtOAc : MeOH 50 : 50

내지 40 : 60)에 의해 정제하여, RA-0173 회백색 고체, 0.81 g, 46%를 생성하였다.

[0404] ^{1}H NMR (300 MHz, D_2O) δ ppm 1.53 - 1.95 (m, 13 H) 3.05 (br s, 1 H) 3.25 (br s, 3 H) 4.98 (br s, 2 H) 6.44 (br d, J = 16.0 Hz, 1 H) 7.10 (br d, J = 7.8 Hz, 3 H) 7.37 (br d, J = 8.0 Hz, 2 H) 7.45 - 7.63 (m, 2 H).

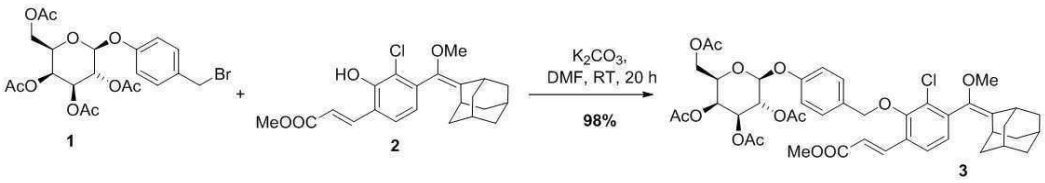
[0405] 

[0406] DCM (30 mL) 중 RA-0173 (0.1 g, 0.00016 mol) 및 MeOH (30 mL)의 용액에 메틸렌 블루 삼수화물 (0.04 eq., 0.0065 mmol, 2.4 mg)을 첨가하고, 생성된 혼합물을 주사기 필터 (25 mm, 0.45 μm)를 통해 여과하였다. 용액을 LED 램프 (Peschl Ultraviolet, 100 W, 625 nm)로 균일한 유속 (0.9 내지 1.1 mL min^{-1})으로 조사하고, 산소압을 1.0 bar로 설정하였다. 반응 혼합물을 250 mL 플라스크에 수집하고, 용액을 통해 질소를 발포하여 지속적으로 탈기시켰다. 60분 후 유동을 중단시키고, 반응 혼합물 EtOAc (20 mL)로 희석하고, 실리카의 플러그를 통해 여과하고, MeOH/EtOAc 9:1 (120 mL)로 세척하였다. 제1 여과물을 따라내고, MeOH/EtOAc 여과물을 가열 없이 감압 하에 농축시켰다. 화합물 IVa를 회백색 고체, 91 mg, 93%로서 획득하였다.

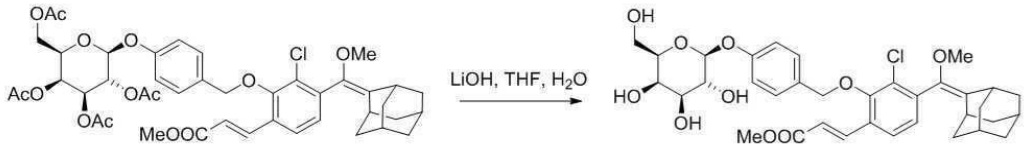
[0407] 당업자에 공지된 수단, 예를 들어 이온 교환에 의해, 나트륨 원자(들)를 수소와 교환시켜, "OH" 기를 생성할 수 있다.

[0408] ^{1}H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 1.40 (br. s., 2 H) 1.52 (d, J = 10.8 Hz, 1 H) 1.62 - 1.89 (m, 7 H) 2.00 (br. s., 2H) 2.40 (d, J = 12.5 Hz, 1 H) 2.96 (br. s., 1 H) 3.18 (s, 3 H) 6.58 (d, J = 16.1 Hz, 1 H) 7.24 (d, J = 7.8 Hz, 2 H) 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2 H) 7.72 (d, J = 8.3 Hz, 1 H) 7.78 (d, J = 15.9 Hz, 1 H) 7.84 (d, J = 8.4 Hz, 1 H). [코멘트: 벤질 2H 피크는 CD_3OD 중 H_2O 피크 하에 가려짐]

[0409] **합성 실시예 4: 화합물 Va의 합성**

[0410] 

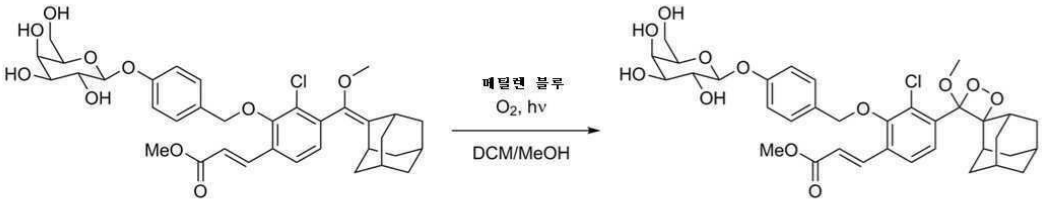
[0411] 에스테르 2 (0.00644 mol, 2.51 g)를 DMF (50 mL)에 용해시키고, 생성된 혼합물을 0℃로 냉각시켰다. 0℃에서 K_2CO_3 (1.2 eq., 0.00773 mol, 1.07 g)을 첨가하고, 0℃에서 혼합물을 교반하였다. 10분 후, DMF (14 mL) 중 브로마이드 1 (1.2 eq., 0.00773 mol, 4.00 g)의 용액을 첨가하고, 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 20시간 후 혼합물에 NH_4Cl (200 mL)의 포화 용액을 첨가하고, 생성된 혼합물을 Et_2O (3배 60 mL)로 추출하고, 조합 유기층을 염수 (60 mL)로 세척하고, 건조하고 ($MgSO_4$) 진공 하에 농축시켜 연황색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 에스테르 3 (5.2 g, 98%)을 백색 고체로서 생성하였다.



3 4

[0412]

[0413] 에스테르 3 (0.00300 mol, 2.48 g)을 THF (60 mL) 및 H_2O (15 mL)의 혼합물에 용해시키고, LiOH (3.9 eq., 0.0117 mol, 0.280 g)를 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 교반하였다. 24시간 후 혼합물에 포화 NH_4Cl (80 mL)을 첨가하고, 혼합물을 EtOAc (3배 60 mL)로 추출하고, 조합 유기층을 염수 (60 mL)로 세척하고, 건조하고 ($MgSO_4$) 진공 하에 농축시켜 연황색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피 (용리액 EtOAc 대 EtOAc-MeOH 8:1)에 의해 정제하여, 에스테르 4 (1.33 g, 70%)를 회백색 고체로서 제공하였다.



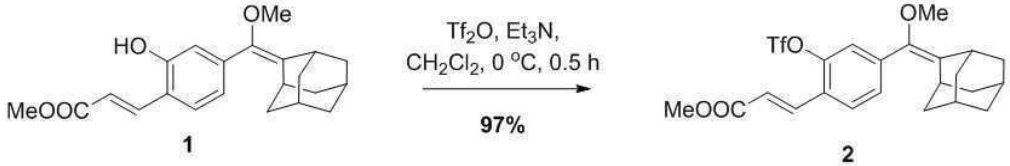
4 화합물 Va

[0414]

[0415] 4 (50 mg, 0.076 mmol) 및 메틸렌 블루 (1.2 mg, 3.2 mmol)를 DCM/MeOH 혼합물 (30 mL, 5:1)에 용해시키고, 용액을 주사기 필터 (0.45 mm)를 통해 통과시켰다. 맑은 용액을 MPLC 펌프 (Labomatic MD 80/100)를 통해 기체-액체 혼합 세포 (Peschl Ultraviolet)로 펌핑하고, 산소 (1.0 bar)와 혼합하였다. 산소 포화 용액을 그 후 지속적 유속으로 실온에서 LED 램프 (625 nm, novaLIGHT FLED 100 내지 625, Peschl Ultraviolet)로 조사하였다. 혼합물을 250 mL 둥근 바닥 플라스크에 수집하고, 용액을 질소로 지속적으로 퍼징하였다. 획득된 반응 혼합물을 20 mL EtOAc로 희석하고, 짧은 실리카 패드를 통해 여과하고, EtOAc/MeOH (120 mL, 9:1)로 세척하였다. 여과물을 광이 차단된 곳에서 실온에서 농축시키고, 획득된 고체 잔여물을 Et_2O로 적정하였다. 산물 화합물 Va를 회백색 고체 (32 mg, 0.046 mmol, 61%)로서 단리하였다.

[0416] ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ ppm 1.29 - 1.39 (m, 3 H), 1.46 (d, J = 13.1 Hz, 1 H), 1.57 - 2.1 (m, 12 H), 2.32 (d, J = 13.1 Hz, 1 H), 3.02 (br. s, 1 H), 3.21 (s, 3 H), 3.68 (br. s, 1 H), 3.72 - 3.80 (m, 4 H), 3.83 - 4.07 (m, 3 H), 4.13 (br. s, 1 H), 4.80 - 4.91 (m, 2 H), 4.93 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 6.36 (dd, J = 16.2, 5.2 Hz, 1 H), 7.02 (d, J = 8.7, 2 H), 7.32 (d, J = 6.4 Hz, 2 H), 7.52 (dd, J = 7.9, 3.4 Hz, 1 H), 7.74 (dd, J = 16.1, 5.4 Hz, 1 H), 7.89 (d, J = 8.5 Hz, 1 H).

[0417] **합성 실시예 5: 화합물 VIa의 합성**

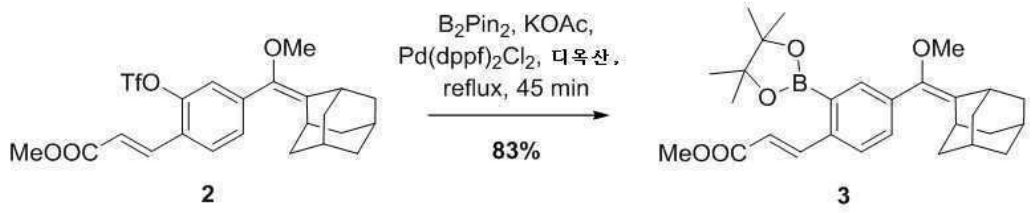


1 2

[0418]

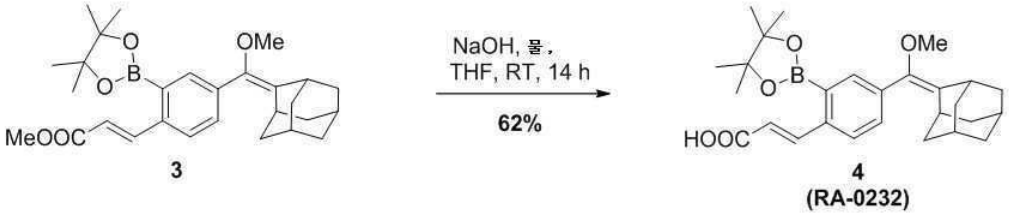
[0419] DCM (40 mL) 중 페놀 **1** (0.00100 mol, 3.54 g)의 용액을 0℃로 냉각시키고, Tf_2O (1.2 eq., 0.0012 mol, 3.4 g, 2.0 mL)를 아르곤 하에 첨가한 후, Et_3N (2.5 eq., 0.0025 mol, 2.5 g, 3.5 mL)을 적가에 의해 첨가하였다. 0℃에서 생성된 혼합물을 0℃에서 교반하였다. 30분 후 반응 혼합물에 염수 (50 mL)를 첨가하고, 분리 수성 층을 DCM (60 mL)로 추출하고, 조합 유기층을 건조하고 ($MgSO_4$), 진공 하에 농축시켜 갈색 오일을 생성하였다. 혼합물을 컬럼 크로마토그래피 (헥산 대 헥산:EtOAc 9:1)에 의해 정제하여, 트리플레이트 **2** (5.05 g, 97%)를 무색

오일로서 제공하였다.



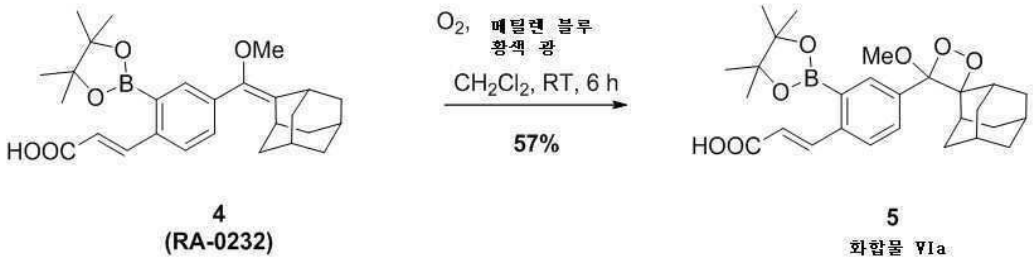
[0420]

[0421] 트리플레이트 **2** (0.00925 mol, 4.50 g), B_2Pin_2 (2 eq., 0.0185 mol, 4.96 g), KOAc (3 eq., 0.0278 mol, 2.72 g) 및 $Pd(dppf)_2Cl_2$ (0.2 eq., 0.00185 mol, 1.35 g)를 둥근 바닥 플라스크에 배치하고, 내용물을 아르곤 하에 배치하고 (2회의 진공-아르곤 주기), 건조 디옥산 (40 mL)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 탈기시키고 (2회의 진공-아르곤 주기), 아른곤 하에 환류 교반하였다. 45분 후 반응 혼합물 (진갈색 혼합물)을 진공 하에 농축시켰다. 이 혼합물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 보로네이트 **3** (3.83 g, 83%)을 회백색 고체로서 제공하였다.



[0422]

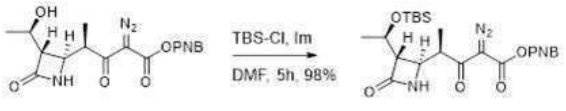
[0423] 보로네이트 **3** (0.00500 mol, 2.30 g) 및 THF (20 mL)의 혼합물에 물 (5 mL) 및 NaOH (3 eq., 0.0150 mol, 0.600 g)를 첨가하고, 생성된 혼합물을 40℃에서 교반하였다. 14 h 후 혼합물에 0.5 M HCl (200 ml)을 첨가하고, 혼합물을 EtOAc (3배 50 ml)로 추출하였다. 조합 유기층을 염수 (50 mL)로 세척하고, 건조하고 ($MgSO_4$) 및 진공 하에 농축시켜, 연황색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 산 **4** (**RA-0232**)를 백색 고체, 1.4 g, 62%로서 제공하였다.



[0424]

[0425] DCM (18 mL) 중 산 **4** (0.00019 mol, 0.085 g)의 용액에 메틸렌 블루 (9 mg)를 첨가하고, 반응 플라스크를 고무 격막으로 밀봉하고, 산소가 충전된 풍선을 부착시켰다 (진청색 용액). 생성된 혼합물에 황색 광을 조사하였다 (589 nm). 6시간 후 반응 혼합물을 진공 하에 농축시켜 청색 오일을 생성하였다. 이 잔여물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 화합물 VIa 연황색 고체, 0.052 g, 57%로서 생성하였다.

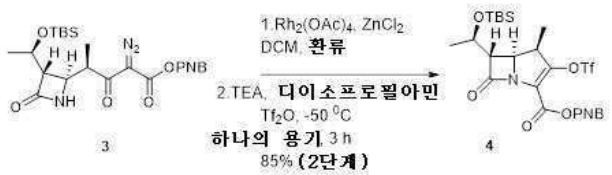
[0426] **합성 실시예 6: 화합물 VIIa의 합성**



[0427]

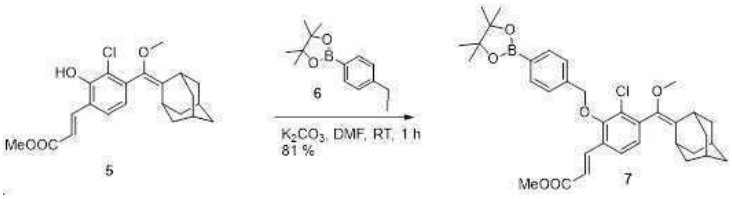
[0428] **(R)-4-니트로벤질4-((2R,3S)-3-((R)-1-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)에틸)-4-옥소아제티딘-2-일)-2-디아조-3-옥소펜타노에이트 (3).**

[0429] 시중에서 입수 가능한 무수 DMF (15 mL) 중 Meropenem 중간체 2 (2.6 g, 6.8 mmol)의 용액에 아르곤 대기 하에 TBDMSCl (4.0 g, 27.1mmol) 및 이미다졸 (2.8 g, 40.8 mmol)을 첨가하였다. 생성된 혼합물을 실온에서 5시간 동안 교반하였다. 에틸아세테이트 (50 mL)에 의한 희석 후, 용액을 물 (20 mL x 3) 및 염수 (20 mL x1)로 순차적으로 세척하였다. 유기 층을 Na2SO4 상에서 건조하고, 농축시켰다. 잔여물을 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 컬럼 상에서 정제하여, 표제 화합물 3을 백색 고체 (3.3 g, 98%)로서 제공하였다. MS (ES^+) m/z $C_{23}H_{32}N_4NaO_7Si$ $[M+Na]^+$ 계산치 527.2, 실측치 527.4.

[0430] 

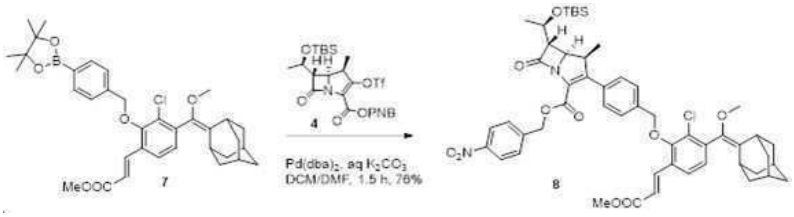
[0431] **(4R, 5R, 6S)-4-니트로벤질-6-((R)-1-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)에틸)-4-메틸-7-옥소-3-(((트리플루오로메틸)술폰일)옥시)-1-아자비사이클로[3.2.0]헵트-2-엔-2-카복실레이트 (4).**

[0432] 둥근 바닥 플라스크에 아르곤 하에 $ZnCl_2$ (무수물, 20 mg, 0.15mmol), 화합물 **3** (2.4 g, 4.8mmol), $Rh_2(OAc)_4$ (21.5 mg, 0.05 mmol) 및 CH_2Cl_2 (무수물, 15 mL)를 첨가한 후, 화합물 **3**의 소멸시까지 90분 동안 환류 가열하였다(TLC에 의해 모니터링하였음). 생성된 혼합물을 -50℃로 냉각하고, 트리에틸아민 (235 μL, 1.7mmol) 및 디이소프로필아민 (680 μL, 4.8 mmol)의 혼합물을 적가한 후, Tf_2O (850 μL, 5.0 mmol)를 서서히 첨가하였다. 현탁액을 -50℃에서 60분 동안 교반하고, 크로마토그래피에 의해 짧은 실리카 겔 컬럼 상에서 용리액으로서 디클로로메탄을 사용하여 정제하여, 목적 화합물 **4**를 백색 고체 (2.5 g, 85%)로서 제공하였다. MS (ES+) m/z $C_{24}H_{32}F_3N_2O_9SSi$ $[M+Na]^+$ 계산치 609.1, 실측치 609.4.

[0433] 

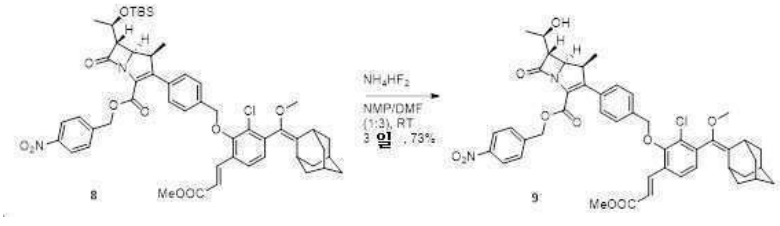
[0434] **메틸 (E)-3-(4-(((1r,3r,5R,7S)-아다만탄-2-일리덴)(메톡시)메틸)-3-클로로-2-((4-(4,4,5,5-테트라메틸-1,3,2-디옥사보롤란-2-일)벤질)옥시)페닐)아크릴레이트 (7).**

[0435] 에놀 에테르 **5** (문헌[Green, O., Eilon, T., Hananya, N., Gutkin, S., Bauer, CR., Shabat, D., ACS Central Sci., **2017**, 4, 349-58]에 따라 제조됨) (500 mg, 1.3 mmol)를 3 mL 건조 DMF에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. K_2CO_3 (195 mg, 1.4 mmol)을 첨가하고, 용액 0℃에서 10분 동안 교반한 후, 화합물 **6** (참조: 문헌[Karton-Lifshin N.,Albertazzi L.,Bendikov M.,Baran PS.,Shabat D.,J Am Chem Soc., **2012**, 134(50), 20412-20]) (536.6 mg, 1.6 mmol)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 실온에서 교반하고, TLC에 의해 모니터링하였다. 완료 후, 반응 혼합물 EtOAc (30 ml)로 희석하고, 포화 NH_4Cl (10 ml)로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 상에서 정제하여, 표제 화합물 **7**을 백색 고체 (661 mg, 81%)로서 제공하였다. MS (ES+) m/z $C_{35}H_{42}BClNaO_6$ $[M+Na]^+$ 계산치 627.2, 실측치 627.5.

[0436] 

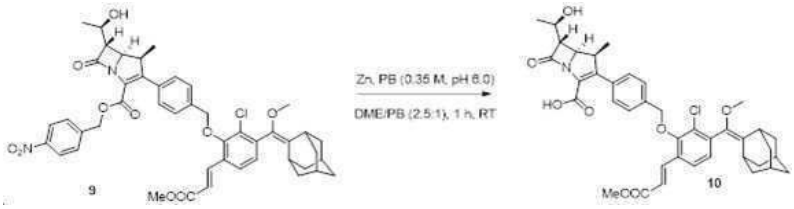
[0437] **4-니트로벤질 (4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-아다만탄-2-일리덴)(메톡시)메틸)-2-클로로-6-((E)-3-메톡시-3-옥소프로프-1-엔-1-일)페녹시)메틸)페닐)-6-((R)-1-((tert-부틸디메틸실릴)옥시)에틸)-4-메틸-7-옥소-1-아자비사이클로[3.2.0]헵트-2-엔-2-카복실레이트 (8).**

[0438] CH_2Cl_2 (2 mL) 및 DMF (1.1 mL)의 혼합물 중 피나콜보로네이트 **7** (304 mg, 0.50 mmol) 및 비닐 트리플레이트 **4** (304 mg, 0.50 mmol)의 용액에 $Pd(dba)_2$ (14 mg, 0.02 mmol) 및 3 M 수성 K_2CO_3 (0.5 mL, 1.5 mmol)을 첨가하였다. 혼합물을 37℃에서 2.5 h 동안 교반하고, TLC에 의해 모니터링하였다. 완료 후, 반응 혼합물 EtOAc (20 ml)로 희석하고, 포화 NH_4Cl (10 ml)로 세척하였다. 유기 층을 분리시키고, 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 상에서 정제하여, 표제 화합물 **8** (358 mg, 76%)을 제공하였다. MS (ES+) m/z $C_{52}H_{62}ClN_2O_{10}Si$ $[M+Na]^+$ 계산치 937.4, 실측치 937.8.

[0439] 

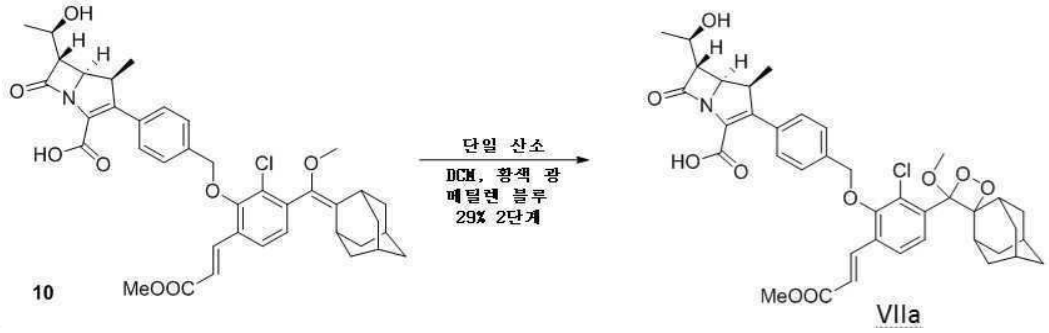
[0440] **4-니트로벤질 (4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-아다만탄-2일리덴) (메톡시) 메틸)-2-클로로-6-((E)-3-메톡시-3-옥소프로프-1-엔-1-일)페녹시)메틸)페닐)-6-((R)-1-하이드록시에틸)-4-메틸-7-옥소-1-아자비사이클로[3.2.0]헵트-2-엔-2-카복실레이트 (9).**

[0441] N-메틸피롤리디논/DMF (1:3, 0.7 mL) 중 **8** (350 mg, 0.4 mmol)의 용액에 실온에서 이플루오르화수소암모늄 (150 mg, 2.8 mmol)를 첨가하고, 생성된 반응 혼합물을 실온에서 72 h 동안 교반하였다 (TLC에 의해 모니터링하였음). 반응을 그 후 에틸 아세테이트 (40 mL)로 희석하고 및 물 및 염수로 세척하였다. Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 농축시킨 후, 잔여물을 크로마토그래피에 의해 실리카 겔 컬럼 상에서 정제하여, 표제 화합물 **9** (290.6 mg, 73%)를 제공하였다. MS (ES+) m/z $C_{46}H_{48}ClN_2O_{10}$ $[M+Na]^+$ 계산치 823.4, 실측치 823.6.

[0442] 

[0443] **(4S,5R,6S)-3-(4-((3-(((1r,3r,5R,7S)-아다만탄-2-일리덴)(메톡시)메틸)-2-클로로-6-((E)-3-메톡시-3-옥소프로프-1-엔-1-일)페녹시)메틸)페닐)-6-((R)-1-하이드록시에틸)-4-메틸-7-옥소-1-아자비사이클로[3.2.0]헵트-2-엔-2-카복실산 (10).**

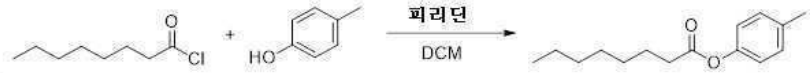
[0444] 0.5 mL DME 중 화합물 **7** (20 mg, 0.02 mmol)의 용액에 20℃에서 0.2 mL 포스페이트 완충액 (0.35 M, pH 6.0) 및 활성화된 아연 분말을 첨가하였다. 반응 혼합물을 그 후 동일한 온도에서 1 h 동안 교반하였다. 침전물을 0.22 μM PTFE 주사기 필터로 제거하고, 여과물을 CH_3CN-H_2O의 분취 RP-HPLC (30 mmol NH_4HCO_3 완충수, CH_3CN은 30% 완충수를 포함함)를 사용하여 이동 상으로서 정제하였다. MS (ES+) m/z $C_{39}H_{42}ClNNaO_8$ $[M+Na]^+$ 계산치 710.2, 실측치 710.5.

[0445] 

[0446] **(4S,5R,6S)-3-(4-((2-클로로-6-((E)-3-메톡시-3-옥소프로프-1-엔-1-일)-3-((1r,3r,5S,7S)-4'-메톡시스피로[아다만탄-2,3'-[1,2]디옥세탄]-4'-일)페녹시)메틸)페닐)-6-((R)-1-하이드록시에틸)-4-메틸-7-옥소-1-아자비사이클로[3.2.0]헵트-2-엔-2-카복실산 (1).**

[0447] 에놀 에테르 **10** 및 수 밀리그램의 메틸렌 블루를 15 ml의 DCM에 용해시켰다. 황색 광을 조사하면서 20분 동안 용액을 통해 산소를 발포시켰다. 반응을 RP-HPLC에 의해 모니터링하였다. 완료 후, 반응 혼합물을 감압 하에 증발에 의해 농축시켰다. 미정제 산물을 CH_3CN-H_2O의 분취 RP-HPLC (30 mmol NH_4HCO_3 완충수, CH_3CN은 30% 완충수를 포함함)에 의해 정제하여, 이동 상으로서 화합물 **VIIa**를 백색 고체 (3 mg, 30%)로서 제공하였다. MS (ES+) m/z $C_{39}H_{42}ClNNaO_{10}$ $[M+Na]^+$ 계산치 742.2, 실측치 742.5.

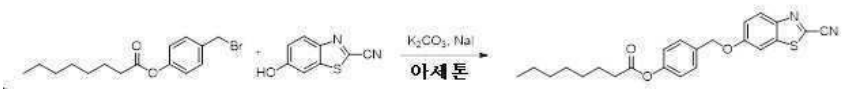
[0448] **합성 실시예 7: D-루시페린-스페이서-카프릴레이트의 합성**

[0449] 

[0450] 500ml 3구 플라스크에 10g의 p-크레졸 (92,5 mmol/1 eq.)을 충전한 후, 건조 DCM (200 mL)을 충전하였다. 혼합물을 냉각 빙수조에서 냉각하였다. 이 용액에 피리딘 (10,24 g/12,9 mmol/1,4 eq.)을 첨가하였다. 반응 혼합물의 온도를 12℃ 미만에서 유지하면서 적하 깔때기로부터 카프릴로일 클로라이드 (18 g/110,7 mmol/1,2 eq.) (50ml의 건조 DCM 중 용해됨)를 적가하였다. 15분 후 냉각조를 제거하고, 혼합물을 주변 온도에서 교반하였다. 50분 후 반응을 완료시켰다 (TLC (페트롤에테르/AcOEt = 2/1)에 의해 제어함). 반응 혼합물을 200 mL의 물로 세척한 후, 2x200 mL의 0.2M NaOH 용액으로 세척하였다. 유기 상을 Na2SO4 상에서 건조하고, 여과하여, 회전식 증발기에서 농축시켰다. 잔여물 (대략 23 g)을 짧은 실리카 겔 (h = 45mm, d = 100mm) 플러그에서 정제하여, DCM으로 용리시켰다. 무색의 과일향 오일 (20.9 g/96% 수율) 형태의 산물을 추가 정제 단계 없이 다음 합성 단계에 사용하였다.

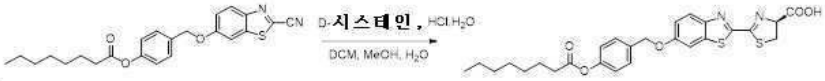
[0451]

[0452] CCl4 (140 mL)가 충전된 250 mL 반응 플라스크에 p-크레졸-카프릴레이트 (20,9 g/92.5 mmol/1 eq.)를 첨가한 후, NBS (19,84 g/111,5 mmol/1,25 eq.)를 첨가하였다. 현탁액을 오일 조 (100℃)에서 15분 동안 교반하였다. 오일 조를 제거하고, AIBN (915 mg/5,6 mmol/5 mol%)을 일 분량씩 첨가하였다. 약 2분 후 집중 환류로 반응을 개시시켰으며, 환류가 훨씬 더 미온으로 이루어지면, 혼합물을 다시 고온의 가열 조에 배치하였다. 20분 후 TLC (페트롤에테르/AcOEt = 10/1)에 의해 완전히 전환된 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 냉각수에서 15℃로 냉각하였다. 이 온도에서 혼합물을 S3 fritt를 통해 여과하고, 10mL의 DCM으로 세척하고, 여과물을 진공 하에 농축시켰다. 원 산물 (27,7 g/99% 수율)을 정제 단계 없이 다음 합성 단계에 사용하였다.

[0453] 

[0454] 4-브로모메틸-페닐-카프릴레이트 (27,7 g/88 mmol/1.2 eq.) 및 2-시아노-6-하이드록시-벤조티아졸 (13,07 g/7 mmol/1 eq)을 건조 아세톤 (120 mL)에 용해시키고, 가열 오일 조 (80℃)에서 교반하였다. K2CO3 (25,6 g/185,2 mmol/2,5 eq) 및 요오드화나트륨 (220 mg/1,5 mmol/2 mol%)을 일 분량씩 첨가하였다. 반응 혼합물은 즉시 황색

-오렌지색으로 변하였다. 환류 온도에서 100분 교반 후 TLC 제어 (페트롤에테르/AcOEt = 2/1)에 의해 완전히 전환된 것으로 나타났다. 반응 혼합물을 서서히 냉각시키고, S3 fritt를 통해 여과하고, 30ml의 아세톤으로 세척하고, 진공 하에 농축시켰다. 잔여물을 200 mL에 용해시키고, 100 mL H2O 및 염수로 세척하였다. 유기 층을 Na2SO4 상에서 건조하고, S3 fritt를 통해 여과하고 진공 하에 농축시켰다. 잔여물을 MTBE로부터 결정화한 후 EtOH로부터 결정화하였다. 산물을 백색 분말 (13.3 g/37% 수율)로서 단리하였다.

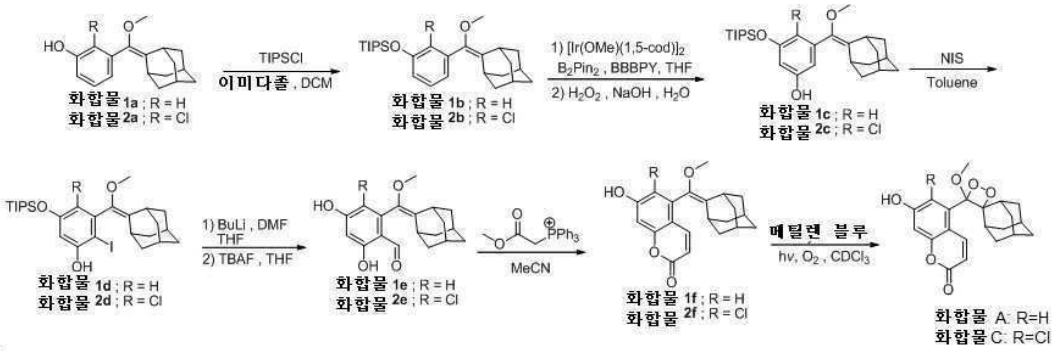
[0455] 

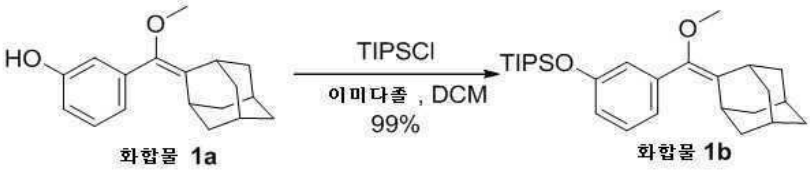
[0456] 1,3 g의 출발 물질 (1,3 g/3,18 mmol/1eq)을 DCM (30 mL) 및 MeOH (30 mL)의 혼합물에 용해시켰다. 고체를 용해시킨 후, 10 mL의 물을 첨가하였다. 획득된 용액에 15분 동안 아르곤을 발포하였다. 시스테인 하이드로클로라이드 일수화물 (592 mg/3.37 mmol/1,06 eq)을 첨가하고, 대략 3분 동안 용해시켰다. K2CO3 (474 mg/3,43 mmol/1.06 eq)을 5 mL의 demi 물에 용해시키고, 15분 동안 아르곤을 발포시켰다. K2CO3의 용액을 벤조티아졸 유도체의 용액에 일 분량씩 첨가하였다. 생성된 황색 용액은 탁해졌다. 혼합물을 실온에서 아르곤 하에 교반하였다. 90분 후 TLC (페트롤에테르/AcOEt = 2/1) 제어에 의해 출발 물질이 완전히 전환된 것으로 나타났. 일부 황색 고체가 형성될 때까지, 반응 혼합물을 회전식 증발기에서 부분적으로 증발시켰다. 1M HCl을 사용하여, 생성된 혼합물의 pH를 1 내지 2로 설정하였다. 잔여물에 물 (200 mL)을 첨가하고, 생성된 용액을 DCM (3x150mL)으로 추출하였다. 유기 층을 Na2SO4 상에서 건조하고, S3 fritt를 통해 여과하고, 진공 하에 농축시켰다. 생성된 황색 비정질 고체를 EtOH로부터 결정화하였다. 결정 산물을 황색 분말의 형태 (1,16 g/71% 수율)로 단리하였다.

[0457] 본 명세서에 개시된 다른 화합물은 출발 물질의 각각의 선택에 의해 상기 기재된 바와 같은 절차에 따라 합성되었다.

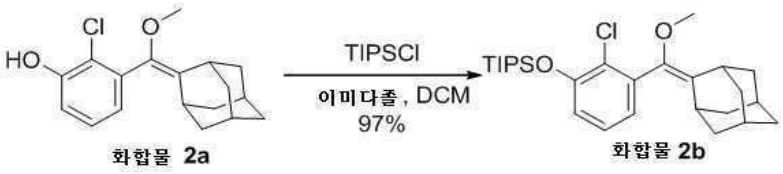
[0458] **합성 실시예 8: 실시예 13에서 사용되는 화합물 A 및 C의 합성**

[0459] 일반 합성 도식

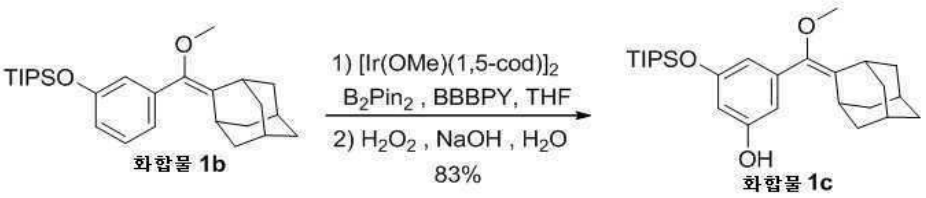
[0460] 

[0461] 

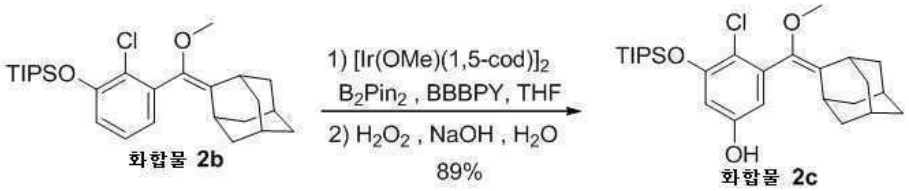
[0462] 화합물 1a (문헌[Green, O.; Eilon, T.; Hananya, N.; Gutkin, S.; Bauer, C. R.; Shabat, D. ACS Cent. Sci. 2017, 3, 349]에 따라 합성됨) (2.0 g, 7.4 mmol) 및 이미다졸 (756 mg, 11.1 mmol)을 20 ml의 DCM에 용해시켰다. 트리이소프로필실릴 클로라이드 (1.7 mL 8.1 mmol)를 첨가하고, 용액을 실온에서 교반하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 완료시, 백색 침전물을 여과하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc 95:5)에 의해 정제하여 3.1 g (99% 수율)의 무색 오일을 제공하였다.

[0463] 

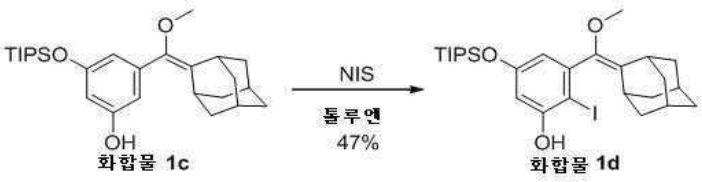
[0464] 화합물 **2a** (문헌[Green, O.; Eilon, T.; Hananya, N.; Gutkin, S.; Bauer, C. R.; Shabat, D. ACS Cent. Sci. **2017**, 3, 349]에 따라 합성됨) (2.0 g, 6.6 mmol) 및 이미다졸 (671 mg, 9.7 mmol)을 20 ml의 DCM에 용해시켰다. 트리이소프로필실릴 클로라이드 (1.5 mL, 7.2 mmol)를 첨가하고, 용액을 실온에서 교반하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 완료시, 백색 침전물을 여과하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc 95:5)에 의해 정제하여 2.9 g (97% 수율)의 무색 오일을 제공하였다.

[0465] 

[0466] 밀봉된 튜브에서 화합물 **1b** (2.00 g, 4.7 mmol), 비스(피나콜라토)디보론 (2.14 g, 8.44 mmol), (1,5-사이클로옥타디엔)(메톡시)이리듐(I) 이량체 (63 mg, 0.93 mmol) 및 4,4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜 (51 mg, 0.189 mmol)을 20 ml의 무수 THF에 용해시켰다. 반응 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하고, 완료시 모니터링하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 실리카 겔 컬럼 (Hex:EtOAc 65:35)을 통해 통과시켜, 1.73 g (83% 수율)의 백색 고체를 제공하여, 추가 정제 단계 없이 다음 단계에 적용하였다.

[0467] 

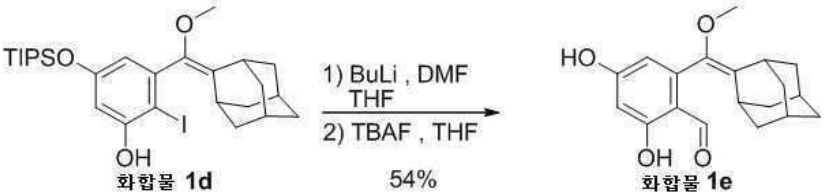
[0468] 밀봉 튜브에서 화합물 **2b** (2.00 g, 4.3 mmol), 비스(피나콜라토)디보론 (1.97 g, 7.76 mmol), (1,5-사이클로옥타디엔)(메톡시)이리듐(I) 이량체 (58 mg, 0.856 mmol) 및 4,4'-디-tert-부틸-2,2'-디피리딜 (47 mg, 0.173 mmol)을 20 ml의 무수 THF에 용해시켰다. 반응 혼합물을 80℃에서 2시간 동안 교반하고 완료시 모니터링하고, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 미정제 산물을 실리카 겔 컬럼 (Hex:EtOAc 70:30)을 통해 통과시켜, 1.84 g (89% 수율)의 백색 고체를 제공하여, 추가 정제 단계 없이 다음 단계에 적용하였다.

[0469] 

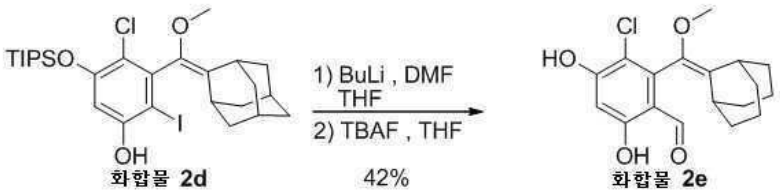
[0470] 화합물 **1c** (1.5 g, 3.40 mmol)를 150 ml의 톨루엔에 용해시키고, 0℃로 냉각하였다. N-요오도숙신이미드 (635 mg, 2.81 mmol)를 분량씩 첨가하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 완료시, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc 90:10)에 의해 정제하여 900 mg (47% 수율)의 백색 고체를 제공하였다.

[0471]

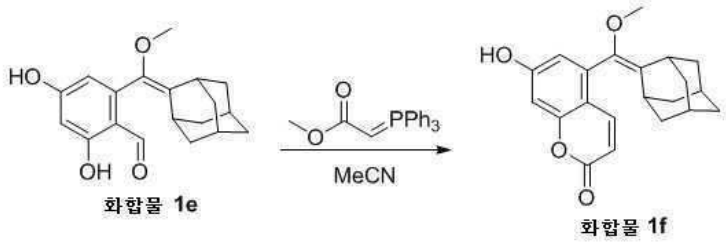
[0472] 화합물 **2c** (1.5 g, 3.16 mmol)를 150 ml의 톨루엔에 용해시키고, 0℃로 냉각시켰다. N-요오도숙신이미드 (592 mg, 2.63 mmol)를 분량씩 첨가하였다. 반응을 TLC에 의해 모니터링하였다. 완료시, 용매를 감압 하에 증발시켰다. 컬럼 크로마토그래피 (Hex:EtOAc 90:10)에 의해 정제하여 967 mg (51% 수율)의 백색 고체를 제공하였다.

[0473] 

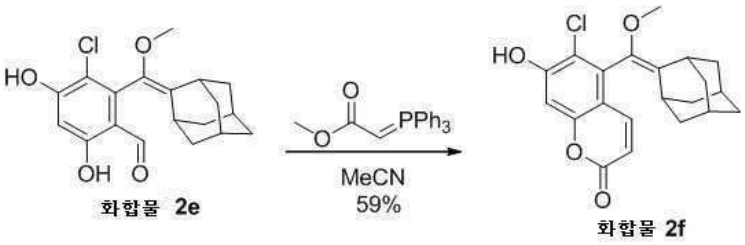
[0474] 화합물 **1d** (900 mg, 1.58 mmol)를 THF (5 mL)에 N_2 대기 하에 용해시켰다. 용액을 -78℃로 냉각하고, n-BuLi (2.54 mL, 2.5 M, Hex 중)를 첨가하였다. 15분 교반 후, DMF (440 μL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 교반하면서 실온으로 가열하고, TLC에 의해 모니터링하였다. 완료 후, 염화암모늄 (5 mL)의 포화 용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3x30 mL)로 추출하였다. 조합 유기 층을 염수 (50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 그 후, 미정제 잔여물을 THF (10 mL)에 용해시키고, TBAF (3.2 mL, 2.5M, THF 중)를 첨가하였다. 완전한 전환시, 염화암모늄 (5 mL)의 포화 용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3x30 mL)로 추출하였다. 조합 유기 층을 염수 (25 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 269 mg (54% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.

[0475] 

[0476] 화합물 **2d** (900 mg, 1.50 mmol)를 THF (5 mL)에 N_2 대기 하에 용해시켰다. 용액을 -78℃로 냉각하고, n-BuLi (2.41 mL, 2.5 M, Hex 중)를 첨가하였다. 15분 교반 후, DMF (418 μL)를 첨가하였다. 반응 혼합물을 30분 동안 교반하면서 실온으로 가열하고, TLC에 의해 모니터링하였다. 완료 후, 염화암모늄 (5 mL)의 포화 용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3x30 mL)로 추출하였다. 조합 유기 층을 염수 (50 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 그 후, 미정제 잔여물을 THF (10 mL)에 용해시키고, TBAF (3.0 mL, 2.5M, THF 중)를 첨가하였다. 완전한 전환시, 염화암모늄 (5 mL)의 포화 용액을 첨가하였다. 혼합물을 EtOAc (3x30 mL)로 추출하였다. 조합 유기 층을 염수 (25 mL)로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 218 mg (42% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.

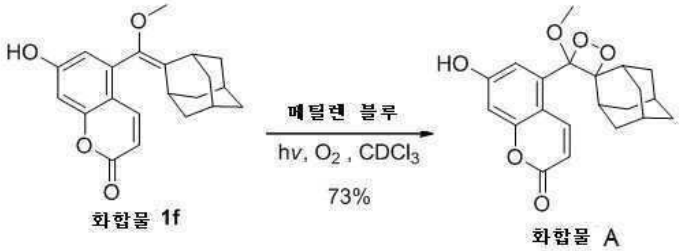
[0477] 

[0478] 화합물 **1e** (150 mg, 0.48 mmol) 및 메틸 (트리페닐포스포라닐리덴)아세테이트 (191 mg, 0.57 mmol)를 MeCN (3 mL)에 용해시키고, 혼합물을 환류 가열하면서 RP-HPLC (물 중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 모니터링하였다. 출발 물질의 완전한 소모시 반응 혼합물을 냉각하고, EtOAc (100 mL)로 희석하고, 염수 (50 ml)로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 111 mg (69% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.



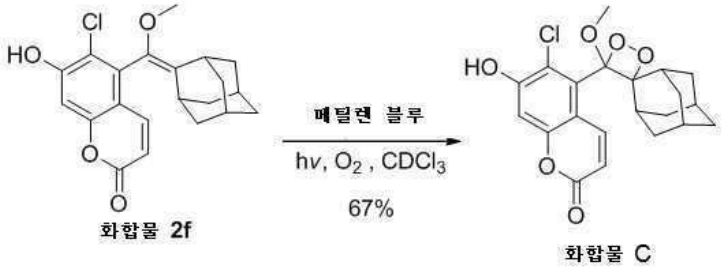
[0479]

[0480] 화합물 **2e** (150 mg, 0.43 mmol) 및 메틸 (트리페닐포스포라닐리덴)아세테이트 (172 mg, 0.51 mmol)를 MeCN (3 mL)에 용해시키고, 혼합물을 환류 가열하면서 RP-HPLC (물 중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 모니터링하였다. 출발 물질의 완전한 소모시 반응 혼합물을 냉각하고, EtOAc (100 mL)로 희석하고, 염수 (50 ml)로 세척하였다. 유기 층을 Na_2SO_4 상에서 건조하고, 감압 하에 증발시켰다. 산물을 컬럼 크로마토그래피에 의해 정제하여, 94 mg (59% 수율)을 황색 고체로서 제공하였다.



[0481]

[0482] 화합물 **1f** (50 mg, 0.15 mmol) 및 촉매량의 메틸렌 블루를 20 mL의 DCM에 용해시켰다. 그 후, 황색 광을 조사하면서 용액을 통해 산소를 발포시켰다. 반응을 RP-HPLC에 의해 모니터링하였다. 완료시 (10분), 용매를 감압 하에 농축시키고, 산물을 분취 RP-HPLC (물 중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 정제하였다. 산물을 백색 고체 (40 mg, 73%)로서 획득하였다.



[0483]

[0484] 화합물 **2f** (50 mg, 0.13 mmol) 및 촉매량의 메틸렌 블루를 20 mL의 DCM에 용해시켰다. 그 후, 황색 광을 조사하면서 용액을 통해 산소를 발포시켰다. 반응을 RP-HPLC에 의해 모니터링하였다. 완료시 (10분), 용매를 감압 하에 농축시키고, 산물을 분취 RP-HPLC (물 중 ACN의 구배, 0.1% TFA)에 의해 정제하였다. 산물을 백색 고체 (36 mg, 67%)로서 획득하였다.

[0485] **실시예 1:**

[0486] **화합물 IIa를 사용한 돼지 간 에스테라제 활성의 효소 분석**

[0487] 화합물 IIa를 10% v/v 디메틸 설폭사이드를 포함하는 포스페이트 완충 식염수 (pH 7.4)에 62.5 μM의 최종 농도로 첨가하였다. 분석 혼합물을 실온에서 20분 동안 사전 인큐베이션한 다음, 다양한 효소 농도를 포함하는 1:5

v/v의 돼지 간 에스테라제 용액을 첨가하고 발광 모드에서 SpectraMax M5 판독기를 사용하여 실온에서 20분 동안 발광을 기록하였다. 총 액체 부피가 0.25 mL인 흑색 미세역가 플레이트에서 분석을 수행하였다. 20분 측정 기간 내 돼지 간 에스테라제 농도 및 최대 RLU (상대 광 단위) 값은 2배의 양의 선형 상관관계를 나타냈다. 도 1은 이 실시예의 결과를 보여준다.

[0488] **실시예 2:**

[0489] **화합물 IIa에 의한 살모넬라 엔테리카 검출**

[0490] 시트로박터 프레운디 ATCC 8090 (C.f., C8E 음성), 에세리키아 콜라이 ATCC 25922 (E.c., C8E 음성), 살모넬라 티피무리움 (D) ATCC 14028 (S.T., 살모넬라 엔테리카 종 I ser. 티피무리움, C8E 양성), 살모넬라 엔테리티디스 (D) ATCC 13076 (S.E. 1, 살모넬라 엔테리카 종 엔테리카 ser. 엔테리티디스, C8E 양성) 및 살모넬라 엔테리티디스 RKI 05/07992 (S.E. 2, 살모넬라 엔테리카 종 엔테리카 ser. 엔테리티디스, C8E 양성)를 영양 액체 배지 (5 g/l 펩톤, 5 g/l NaCl, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/l 쇠고기 추출물, pH 7.4)에서 17시간 동안 배양한 다음 멸균 식염수 (0.9% NaCl)에 일련 희석한다. 모든 균주의 유사한 세포 농도를 영양 액체 배지와 함께 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 또한 멸균 식염수 중 S.E. 2 세포의 추가 희석을 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 멸균 식염수를 음성 대조군 튜브에 첨가하였다. 37℃ 및 150rpm에서 6시간 동안 배양한 후, 샘플을 배양로부터 취하고 (0.205 mL), 백색 미세역가 플레이트에서 디메틸 설폭사이드 중 화합물 IIa 용액 45 μL와 혼합하였다. 최종 농도 화합물 IIa는 10 μM이고, 디메틸 설폭사이드의 최종 농도는 15% v/v였다. 발광 검출 시스템이 장착된 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 화학발광 기질을 첨가한 후 27 내지 30분의 기간의 평균 RLU (상대 광 단위) 값을 비교하였다 (표 3). 10^5 CFU/mL의 유사한 접종 밀도에서, 시험된 살모넬라 균주는 시트로박터 프레운디보다 35 내지 60배 더 높은 광 방출을 나타내고 에세리키아 콜라이보다 65 내지 111배 더 높은 광 방출을 나타내는 것으로 나타났다. 멸균 대조군에 비해 신호대잡음비 2로 표시된 바와 같이 6시간 인큐베이션 후 10 CFU/mL의 살모넬라 엔테리티디스를 검출할 수 있었다.

표 3

[0491] 다른 박테리아 종과 비교한 화합물 IIa의 첨가 후 살모넬라 엔테리카 배양 샘플의 발광

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	평균 RLU (n = 3)	표준 오차 (%, n = 3)	신호대잡음비(멸균 대비)
10^5	C.f.	6480	7	12
10^5	E.c.	3504	11	6
10^5	S.T.	228202	13	283
10^5	S.E. 1	158262	6	408
10^5	S.E. 2	387911	19	693
10^4	S.E. 2	154011	8	275
10^3	S.E. 2	40236	9	72
10^2	S.E. 2	5100	5	9
10^1	S.E. 2	1041	3	2
0	멸균	560	13	1

[0492] **실시예 3:화합물 IIIa를 사용한 PI-PLC 활성의 효소 분석**

[0493] 화합물 IIIa를 1% v/v 디메틸 설폭사이드를 포함하는 포스페이트 완충 식염수 (pH 7.4)에 10 μM의 최종 농도로 첨가하였다. 다양한 농도의 포스파티딜이노시톨 특이적 포스포리파제 C (PI-PLC)를 첨가하고 발광을 실온에서 기록하였다 (표 4). 총 액체 부피가 0.25 mL인 백색 미세역가 플레이트에서 분석을 수행하였다. 20분 측정 기간 내 PI-PLC 및 최대 RLU (상대 광 단위) 값의 농도는 2배의 양의 상관관계를 나타냈다.

표 4

[0494] 화합물 IIIa를 사용한 PI-PLC 활성 측정

첨가된 PI-PLC (U/mL)	RLU	신호대잡음비
$5 \cdot 10^{-1}$	60265	862
$5 \cdot 10^{-2}$	35822	512
$5 \cdot 10^{-3}$	10369	148
$5 \cdot 10^{-4}$	1191	17
w/o 효소	70	1

[0495] **실시예 4:화합물 IIIa를 사용한 리스테리아 모노사이토게네스의 검출**

[0496] 리스테리아 모노사이토게네스 ATCC 7644 (L.m. 1, PI-PLC 양성), 리스테리아 모노사이토게네스 (4b) ATCC 19115 (L.m. 2, PI-PLC 양성), 리스테리아 이노쿠아 (6a) ATCC 33090 (L.i., PI-PLC 음성) 및 에세리키아 콜라이 ATCC 25922 (E.c., PI-PLC 음성)를 M52 액체 배지 (1.35 g/L 인산이수소칼륨, 9.6 g/L 인산수소이나트륨, 1.11 g/L 피루브산나트륨, 6 g/L 효모 추출물, 17 g/L 트립톤, 3 g/L 피톤, 5 g/L 염화나트륨, 2.5 g/L 글루코스, pH 7.3)을 19시간 동안 배양한 다음 멸균 식염수 (0.9% NaCl)에 일련 희석하였다. 모든 균주의 유사한 세포 농도를 M52 액체 배지와 함께 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 또한 멸균 식염수 중 L.m. 2 세포의 추가 희석을 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 멸균 식염수를 음성 대조군 튜브에 첨가하였다. 37℃ 및 150rpm에서 6시간 동안 배양한 후, 샘플을 배양로부터 취하고 (0.99 mL), 백색 미세역가 플레이트에서 디메틸 설폭사이드 중 1 μL 화합물 IIIa 용액과 혼합하였다. 화합물 IIIa의 최종 농도는 10 μM이고, 디메틸 설폭사이드의 최종 농도는 1% v/v였다. 발광 검출 시스템이 장착된 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 화학발광 기질을 첨가한 후 16 내지 20분의 기간의 평균 RLU (상대 광 단위) 값을 비교하였다 (표 5). 10^5 CFU/mL의 유사한 접종 밀도에서, 시험된 리스테리아 모노사이토게네스 균주는 리스테리아 이노쿠아보다 311 내지 361배 더 높은 광 방출을 나타내고 에세리키아 콜라이보다 1465 내지 1702배 더 높은 광 방출을 나타내는 것으로 나타났다. 멸균 대조군에 비해 신호대잡음비 2로 표시된 바와 같이 6시간 인큐베이션 후 10^3 CFU/mL의 리스테리아 모노사이토게네스를 검출할 수 있었다.

표 5

[0497] 화합물 IIIa를 사용한 리스테리아 모노사이토게네스의 검출

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	평균 RLU (n = 3)	표준 오차 (%, n = 3)	신호대잡음비 (멸균 대비)
10^5	L.i.	33	8.3	2.3
10^5	E.c.	7	5.7	0.5
10^5	L.m.1	11913	1.7	832
10^5	L.m. 2	10258	9.0	716
10^4	L.m. 2	242	9.0	17
10^3	L.m. 2	31	2.7	2.2
10^2	L.m. 2	12	2.9	0.9
0	멸균	14	6.9	1

[0498] **실시예 5: 살모넬라 엔테리카와 화합물 IIa 및 4-메틸움벨리페릴 카프릴레이트의 검출 비교 (도 2)**

[0499] 살모넬라 엔테리티디스 RKI 05/07992를 영양 액체 배지 (5 g/l 펩톤, 5 g/l NaCl, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/l 쇠고기 추출물, pH 7.4)에서 20시간 동안 배양한 후 (37℃, 150rpm), 포스페이트 완충 식염수로 일련 희석하였다. 세포 현탁액을 디메틸 설폭사이드 (분석의 최종 농도 15%) 및 화합물 IIa (최종 농도 10 μM) 또는 4 메틸움벨리페릴 카프릴레이트 (MUCAP, 최종 농도 0.1 mM)를 포함하는 포스페이트 완충 식염수와 1:1 v/v로 혼합하였

다. 마이크로플레이트에서 분석을 수행하였고, 총 액체 부피는 0.2 mL였다. SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 플레이트 판독기로 광 방출 및 형광 (여기 360 nm, 방출 455 nm)을 기록하였다. 희석되지 않은 배양의 세포 농도를 광학 밀도 (600 nm)에서 추정하였다. 결론: 살모넬라 엔테리카의 검출 한계는 MUCAP 대신 화합물 IIa를 사용할 때 625배 더 낮았다.

[0500] 도 2는 발광성 화합물 IIa (비채색 기호) 또는 형광성 기질 MUCAP (채색 기호)를 사용한 살모넬라 엔테리카의 검출 한계를 보여준다.

[0501] **실시예 6:**

[0502] **화합물 IVa에 의한 스타필로코쿠스 아우레우스 검출**

[0503] 스타필로코쿠스 아우레우스 ATCC 29213 (S.a., 포스파타제 양성) 및 스타필로코쿠스 하에몰리티쿠스 RKI 06-01354 (S.h., 약한 포스파타제 활성)를 영양 액체 배지 (5 g/l 펩톤, 5 g/l NaCl, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/l 쇠고기 추출물, pH 7.4)를 17시간 동안 배양한 다음 멸균 식염수 (0.9% NaCl)에 일련 희석하였다. 유사한 세포 농도의 S.a. 및 S.h.를 영양 액체 배지와 함께 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 또한 멸균 식염수 중 S.a. 세포의 추가 일련 희석을 3중 반복 실험 시험 튜브에 접종하였다. 멸균 식염수를 음성 대조군 튜브에 첨가하였다. 37℃ 및 150rpm에서 6시간 동안 배양한 후, 샘플을 배양로부터 취하고 (0.196 mL) 백색 미세역가 플레이트에서 디메틸 설폭사이드 중 4 μL 화합물 IVa 용액과 혼합하였다. 화합물 IVa의 최종 농도는 10 μM이고, 디메틸 설폭사이드의 최종 농도는 2% v/v였다. 발광 검출 시스템이 장착된 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 화학발광 기질을 첨가한 후 15 내지 20분의 기간의 평균 RLU (상대 광 단위) 값을 비교하였다 (표 6). 결론: 스타필로코쿠스 아우레우스는 화합물 IVa를 사용하여 고 감응성으로 검출할 수 있다.

표 6

[0504] 화합물 IVa 첨가 후 스타필로코쿠스 배양 샘플의 발광

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	평균 RLU, 6 h (n = 3)	표준 오차 (%, n = 3)	신호대잡음비 (멸균 대비)
10^5	S.h.	9550	10	20
10^5	S.a.	53190	18	112
10^4	S.a.	407697	4	859
10^3	S.a.	95498	4	201
10^2	S.a.	7563	2	16
10^1	S.a.	1439	15	3
0	멸균	474	4	1

[0505] **실시예 7: 화합물 IVa에 의한 우유의 저온살균 모니터링**

[0506] UHT 전유 (우유 1) 및 저온살균 전유 (우유 2)를 스위스 슈퍼마켓에서 구입하였다. 송아지 장의 알칼리 포스파타제 (AP)를 최종 농도 0.5 U/mL로 우유 샘플에 첨가하였다. 3중 반복 실험의 폴리프로필렌 시험 튜브 (알칼리 포스파타제로 스파이킹(spike)됨) 중 우유 샘플을 수조에서 70℃에서 20분 동안 가열하고, 유사한 참조 샘플을 실온에 보관하였다. 가열 및 비가열 우유 샘플의 알칼리 포스파타제 활성을 2:1 v/v 검출 혼합물 (화합물 IVa 20 μM, 100mM Tris(하이드록시메틸)-아미노메탄 하이드로클로라이드 pH 9.7, 1mM 염화마그네슘, 실온에서 20분 동안 사전 인큐베이션)을 첨가하여 백색 미세 역가 플레이트에서 분석하였다. SpectraMax M5 플레이트 판독기로 발광을 기록했으며, 총 분석 부피는 0.3 mL였다. 저온살균 우유 샘플의 평균 RLU (상대 광 단위) 값은 실온에서 보관된 샘플과 비교하여 8 내지 10배 더 낮았다 (도 3: 화합물 IVa를 사용한 우유의 알칼리 포스파타제 활성에 대한 저온살균 효과에 대한 화학발광 분석. n = 3중 반복 실험의 평균값 및 표준 편차). 또한 비 스파이킹 우유에서 잔류 알칼리 포스파타제 활성을 검출할 수 있었고 측정된 RLU 값은 UHT 우유 (우유 1)에서 알칼리 포스파타제 활성이 저온살균 우유 (우유 2)보다 더 낮다는 것을 나타내었다.

[0507] 결론: 화합물 IVa 및 관련 화합물은 우유 저온살균 및 유사한 공정의 모니터링에 적합하다.

[0508] **실시예 8:**

[0509] **화합물 IVa를 사용한 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스 (MRSA) 검출**

[0510] 메티실린 및 옥사실린과 같은 페니실린 유도체에 내성이 있는 균주인 메티실린 내성 스타필로코쿠스 아우레우스 ATCC 33592 (MRSA) 및 메티실린 감응성 스타필로코쿠스 아우레우스 ATCC 29213 (MSSA)을 영양 액체 배지 (5 g/L 펩톤, 5 g/L 염화나트륨, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/L 육류 추출물, pH 7.4)에서 37℃에서 밤새 배양하고, 멸균 식염수에 희석하였다. MRSA 및 MSSA 균주를 10 μM의 최종 농도에서 화합물 IVa를 포함하는 영양 액체 배지에 약 10^6 CFU/mL로 접종하였다. 각 균주에 대해, 하나의 배양에 옥사실린 (20 mg/L 최종 농도)을 보충하고 하나의 배양을 항생제 부재 하에 방치하였다. 튜브 배양을 37℃ 및 150rpm에서 인큐베이션하였다. 멸균 대조군 (10 μM의 화합물 IVa가 포함된 영양 액체 배지)을 병렬로 인큐베이션하였다. 배양 샘플 (백색 미세역가 플레이트 중 0.2 mL)의 발광을 SpectraMax M5 플레이트 판독기를 사용하여 6시간 동안 일정한 간격으로 기록하였다 (도 4: 항생제 옥사실린의 존재 및 부재하에 MRSA 및 MSSA 배양의 발광 발생). 시간 경과에 따FMS 발광 강도는 MRSA 균주는 옥사실린의 존재와 부재 하 둘 모두에서 증식하지만, MSSA 균주는 항생제 부재 하의 배양에서만 발광 증가를 나타낸 것으로 나타났다. 성장 및 비 성장 배양을 인큐베이션 1시간 후에 구별할 수 있다.

[0511] 결론: 화합물 IVa 및 관련 화합물은 짧은 시간 (1 내지 2시간) 내에 메티실린 내성 S. 아우레우스 (MRSA)의 검출에 적합하다.

[0512] **실시예 9:**

[0513] **화합물 Va를 사용한 에세리키아 콜라이 검출 및 D-루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드와의 비교**

[0514] 에세리키아 콜라이 ATCC 25922 (E.c., 베타-갈락토시다제 양성) 및 살모넬라 엔테리티디스 RKI 05/07992 (S.E., 베타-갈락토시다제 음성)를 영양 액체 배지에서 17시간 동안 배양한 다음 멸균 식염수 (0.9% NaCl)에 일련 희석하였다. 희석된 세포 현탁액을 전강도 LB 배지 (10 g/L 트립톤, 5 g/L 효모 추출물, 5 g/L NaCl) 또는 초순수 물로 1:20 v/v로 희석된 LB 배지 (LB1:20)와 함께 시험 튜브에 1:100 v/v로 접종하였다. 모든 배지는 베타-갈락토시다제의 유도를 위해 1 mM IPTG를 포함하였다. 멸균 식염수를 음성 대조군 튜브에 첨가하였다. 37℃ 및 150 rpm에서 6시간 배양한 후, 샘플 (0.255 mL)을 배양로부터 취하고 백색 미세역가 플레이트에서 에탄올 중 화합물 Va의 45 μL 스톡 용액과 혼합하였다. 화합물 Va의 최종 농도는 20 μM이고, 에탄올의 최종 농도는 15% v/v였다. SpectraMax M5 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 화학발광 기질을 첨가한 후 9 내지 10분의 기간의 평균 RLU (상대 광 단위) 값을 비교하였다 (표 VIa).

[0515] 비교를 위해 동일한 E. 콜라이 균주를 사전 배양하고 유사한 방식으로 희석한 다음 희석된 Mueller-Hinton 액체 배지 (MH1:20, 20 mM 포스페이트 완충액 pH 7.2로 1:20 v/v로 희석된 전강도 배지)에 접종하였다. 배지를 1 mM IPTG로 보충하였다. 37℃ 및 150 rpm에서 6시간 동안 배양한 후 배양 샘플 (45 μL)을 미세역가 플레이트로 옮기고 2% w/v 도데실-트리메틸암모늄 브로마이드, 1 mM D-루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드 (시판됨, Biosynth Cat. No. L-8600) 및 10 mM 염화마그네슘를 포함하는 5 μL의 10x 용해 시약과 혼합하였다. 용해 및 D-루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드와의 반응을 37℃에서 1시간 동안 수행하였다. 그 다음 0.2 mL의 루시퍼라제 분석 혼합물을 첨가하였다 (5:1 v/v). 분석 혼합물에는 62.5 mM Tris 아세테이트 (pH 7.8), 12.5 mM 황산마그네슘, 2.5 g/L 소 혈청 알부민, 7.5 mM D/L-시스테인, 1.25 mM 에틸렌 디아민 테트라아세테이트, 25 μM 피로인산나트륨, 10 g/L 사이클로덱스트린, 1.25 mM 아데노신 5-트리포스페이트 및 13.1 μg/mL의 시중에서 입수 가능한 포티누스 피랄리스 (Photinus pyralis) 루시퍼라제 (재조합)이 포함되었다. SpectraMax M5 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 처음 2분 측정의 평균 상대 광 단위 (RLU)는 표 VIb에 제시되어 있다.

[0516] 결론: 베타-갈락토시다제의 검출에 D 루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드 대신 화합물 Va를 사용한 경우, 작업 농도가 5배 더 낮음에도 불구하고, 시험된 가장 낮은 접종 밀도의 E. 콜라이에 대해 달성된 신호대잡음비는 9배 더 높았다.

[표 VIa]

15% v/v 에탄올과 조합하여 화합물 Va를 첨가한 후의 에세리키아 콜라이 배양 샘플의 발광

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	RLU, 6 h LB	RLU, 6 h LB1:20	신호대잡음비, LB1:20 (멸균 대비)
10^6	S.E.	66	125	1
10^6	E.c.	18830	84511	871
10^5	E.c.	43412	164721	1698
10^4	E.c.	49434	105252	1085
10^3	E.c.	3317	7690	79
10^2	E.c.	551	1369	14
0	멸균	62	97	1

[0517]

[표 VIb]

루시페린-6-O-베타-D-갈락토피라노시드의 존재 하에 용해 및 루시퍼라제 분석 혼합물 첨가 후

에세리키아 콜라이 배양 샘플의 발광

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	RLU, 6 h MH1:20	신호대잡음비 (멸균 대비)
10^6	E.c.	4777613	544
10^4	E.c.	3306967	377
10^2	E.c.	13367	1.5
0	멸균	8780	1

[0518]

[0519] **실시예 10:**

[0520] **D-루시페린-6-O-페닐-카프릴레이트를 이용한 살모넬라 엔테리카 검출**

[0521] D-루시페린-6-O-페닐-카프릴레이트를 당업자에게 공지된 절차에 따라 합성하였다. 살모넬라 엔테리티디스 RKI 05/07992 (SE, 살모넬라 엔테리카 종 엔테리카 ser. 엔테리티디스, C8 에스테라제 양성)를 영양 액체 배지 (5 g/L 펩톤, 5 g/L NaCl, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/L 효모 추출물, pH 7.4)에서 16시간 동안 배양한 다음 멸균 식염수 (0.9% NaCl)에 일련 희석하였다. 희석된 세포 현탁액을 0.1 mM D-루시페린-6-O-페닐-카프릴레이트를 포함하는 영양 액체 배지로 시험 튜브에 1:100 v/v로 접종하였다. 37℃ 및 150 rpm에서 6.5시간 배양한 후, 샘플 (50 μL)을 배양로부터 취하고 미세 역가 플레이트에서 0.2 mL 루시퍼라제 분석 혼합물 (실시예 9에 기재된 조성물)과 혼합하였다. 도데실 트리메틸 암모늄 브로마이드와 같은 세포 용해 시약의 사용은 필요하지 않았다 (데이터는 표시되지 않음). 발광 검출 시스템이 장착된 플레이트 판독기로 광 방출을 기록하였다. 루시퍼라제 분석 혼합물을 첨가한 후 처음 3분의 평균 RLU (상대 광 단위) 값을 비교하였다 (표 VII).

[0522] 결론: 유사한 농도의 살모넬라 엔테리카에서 화합물 IIa로 달성된 신호대잡음비는 D-루시페린-6-O-카프릴레이트와 비교하여 9 내지 170배 더 높았으며, 더 낮은 한계의 검출을 용이하게 하였다 (실시예 2 참조).

[표 VII]

루시페라제 분석 혼합물과 혼합한 후 D-루시페린-6-O-페닐-카프릴레이트를 포함하는 살모넬라

엔테리카 배양 샘플의 발광

접종 밀도 (CFU/mL)	유기체	RLU, 6 h	신호대잡음비 (멸균 대비)
10^6	S.E.	417195	24
10^4	S.E.	27783	1.6
10^2	S.E.	18354	1.1
0	멸균	17154	1

[0523]

[0524] **실시예 11:**

[0525] **글루코스 옥시다제와 조합된 화합물 VIa를 사용한 에세리키아 콜라이 배양 상청액 중 글루코스 검출**

[0526] 에세리키아 콜라이 ATCC 25922를 16시간 동안 영양 액체 배지 (5 g/L 펩톤, 5 g/L NaCl, 2 g/L 효모 추출물, 1 g/L 효모 추출물, pH h 7.4)에서 배양하였다. 원심분리 (13'000 x g, 2분)에 의해 배양 상청액으로부터 세포를 분리하였다. 물에 100배 농축된 스톡 용액으로부터 다양한 농도의 글루코스를 배양 상청액에 첨가하고, 유사한 양의 물을 음성 대조군에 첨가하였다. 두 번째 음성 대조군은 또한 5 mM 글루코스을 포함했지만 글루코스 옥시다제는 부재하였다. 글루코스 (0.1 mL)의 존재 및 부재 하의 배양 상청액을 40 μM의 화합물 VIa를 포함하는 0.1 mL의 HEPES 완충액 (100 mM, pH 7.0)과 아스퍼길루스 니거로부터의 1 mg/mL의 시중에서 입수 가능한 글루코스옥시다제와 함께 백색 미세역가 플레이트에서 혼합하였다. 발광 시간 경과를 SpectraMAx M5 플레이트 판독기로 20분 동안 기록했으며, 그 결과는 도 5에 나와 있다 (글루코스 옥시다제 (GOX)와 조합된 과산화수소-유발 화학발광 기질 화합물 VIa를 사용한 에세리키아 콜라이 배양 상청액에서의 직접적 글루코스 검출). 화합물 VIa 및 글루코스 옥시다제가 또한 존재하는 경우, 글루코스의 존재는 지속적 발광 증가를 유도하였다. 증가율은 글루코스 농도와 양의 상관관계를 나타내었다.

[0527] 결론: 글루코스와 같은 성장 기질 및 대사산물은 적합한 과산화수소-방출 효소 (예를 들어, 옥시다제)와 조합된 화합물 VIa 또는 관련 화합물을 사용하는 경우, 화학발광에 의해 미생물 배양의 상청액에서 직접 검출될 수 있다.

[0528] **실시예 12:**

[0529] **화합물 VIIa를 사용한 카바페넴 내성 박테리아 검출**

[0530] 카바페넴 내성 박테리아 균주 슈도모나스 아에루기노사 RKI 48/09 (IMP-2) (P.a.-Imp^R) 및 클렙시엘라 네우모니아에 RKI 92/08 (KPC-2) (K.p.-Imp^R)을 각각 8 mg/L 및 4 mg/mL 이미페넴이 보충된 트립티카제 대두 한천에서 배양하였다. 카바페넴 감응성 균주 에세리키아 콜라이 ATCC 25922 (E.c.)를 트립티카제 대두 한천에서 배양하였다. 이미페넴의 존재 및 부재 하의 영양 액체 배지 (조성 및 pH에 대해서는 이전 실시예 참조, 15 mL 튜브 중 3mL)에 한천 플레이트로부터 이미페넴 내성 및 감응성 박테리아를 접종하였다. 튜브 배양을 37℃ 및 150 rpm에서 6시간 동안 인큐베이션하였다. 배양 샘플 (0.255 mL)을 백색 미세역가 플레이트의 웰로 옮기고 에탄올 중 화합물 VIIa의 스톡 용액 45 μL와 혼합하였다. 화합물 VIIa, 에탄올 및 디메틸 설폭사이드의 최종 농도는 각각 10 μM, 14% v/v 및 1% v/v였다. 화합물 VIIa를 첨가한 후 플레이트 판독기로 30분 동안 발광을 기록하였다. 측정 기간의 최대 발광 신호 (상대 광 단위)는 표 VII에 제시되어 있다.

[0531] 결론: 화합물 VIIa를 배양 샘플에 첨가하고 발광을 기록함으로써 카바페넴 내성 박테리아를 카바페넴 감응성 박테리아와 구별할 수 있다.

[표 VII]

화합물 VIIa의 첨가 후 카바페넴 내성 및 감응성 박테리아의 배양 샘플의 발광

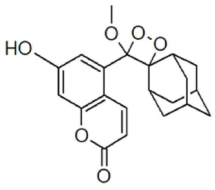
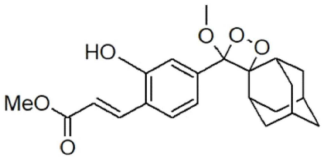
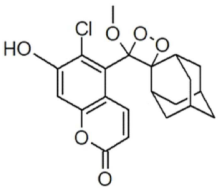
균주	이미페넴 (mg/L)	OD_{600} 6 h	RLU max. (w 10 μM VI)	신호대잡음비 (E.c. 대비)
P.a.-Imp^{R}	8	0.48	21028	2.6
P.a.-Imp^{R}	0	0.67	19940	2.4
K.p.-Imp^{R}	4	0.50	72272	8.8
K.p.-Imp^{R}	0	0.66	72951	8.9
E.c.	4	0.01	7992	n.a.
E.c.	0	0.73	8181	n.a.
멸균	0	0	8812	n.a.

[0532]

[0533] **실시예 13:**

[0534] **다른 치환기 R^{A}, R^{B} 및 R^{C}를 포함하는 화합물의 발광 특성**

[0535] 화합물 A, 화합물 B 및 화합물 C의 화학발광 동역학 프로파일 및 방출된 총 광을 pH 7.4에서 PBS 완충 용액 (10% DMSO), [1μM]에서 측정하였다.

[0536] 화합물 A:  ; 화합물 B:  ; 화합물 C: 

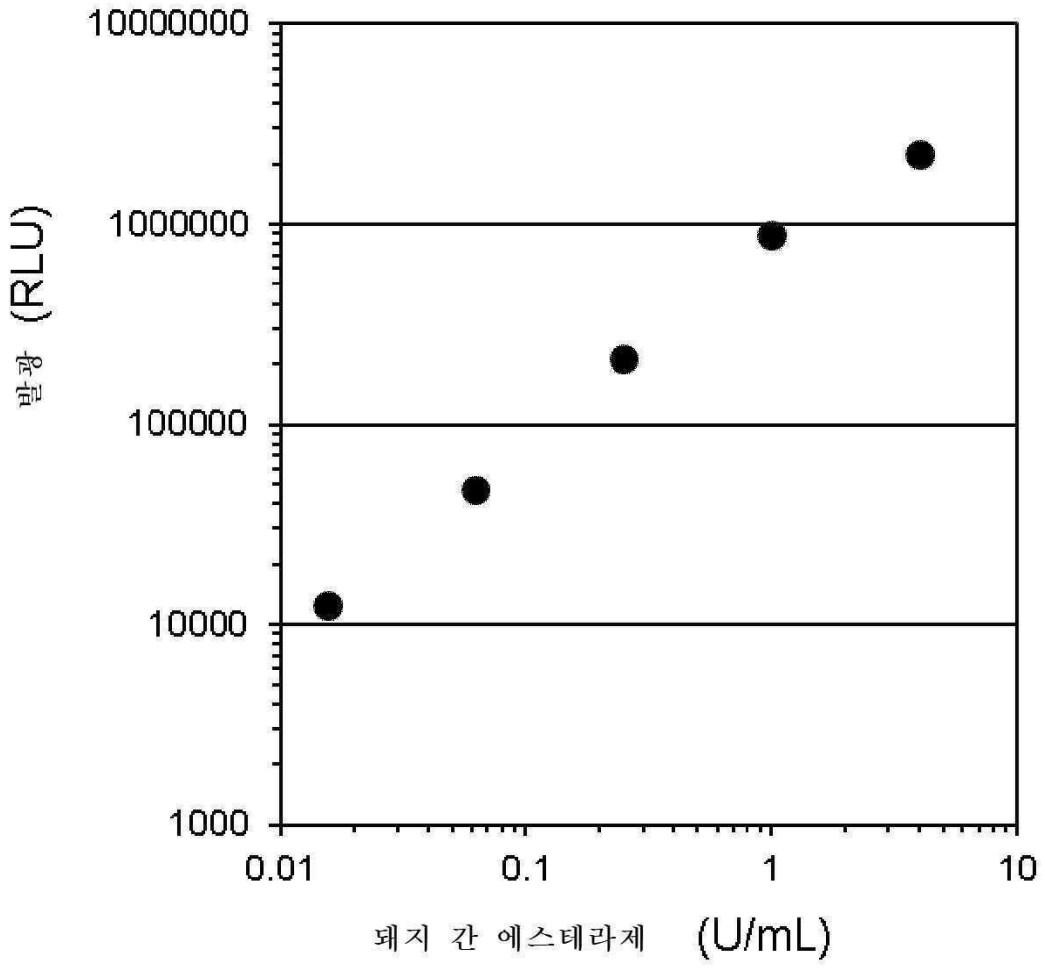
[0537] 화합물 A, B 및 C는 R^{1}과 분석물의 상호작용시 화학식 I의 각 화합물로부터 형성되는 (발광) 종을 나타낸다.

[0538] 화합물 A 및 B의 화학발광 동역학 프로파일은 도 6a에 비교되어 있으며 (삽입: 처음 2시간 확대); 화합물 A 및 B에서 방출된 총 광은 도 6b에 비교되어 있다.

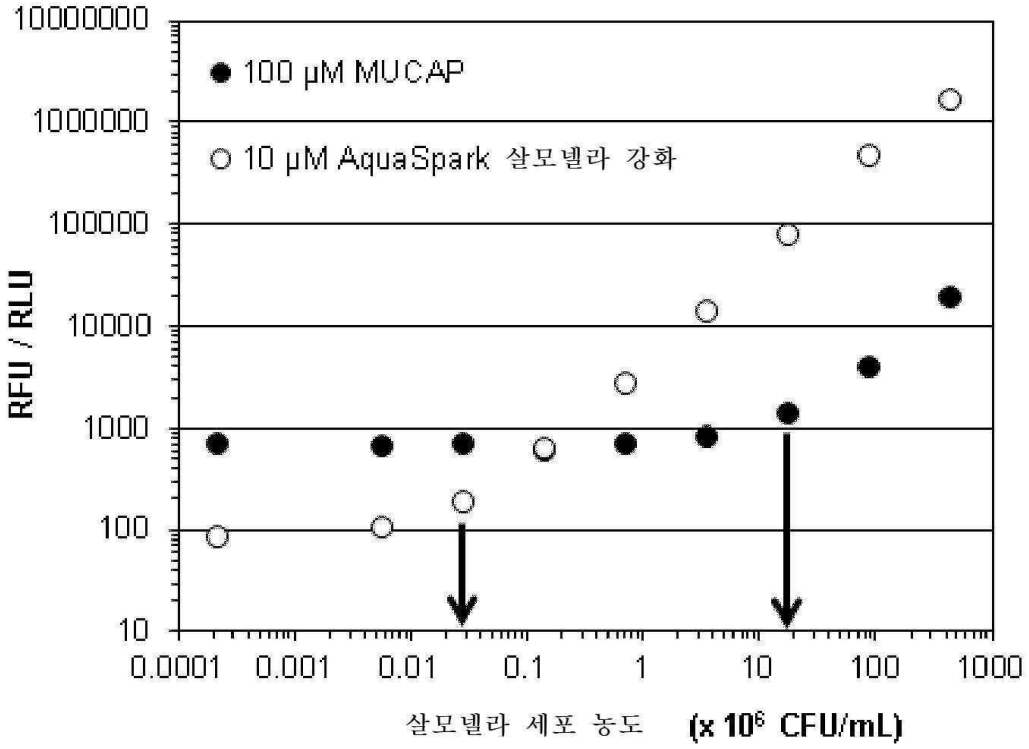
[0539] 화합물 A 및 C의 화학발광 동역학 프로파일은 도 7a에서 비교되어 있으며; 화합물 A 및 C의 방출된 총 광은 도 7b에 비교되어 있다.

도면

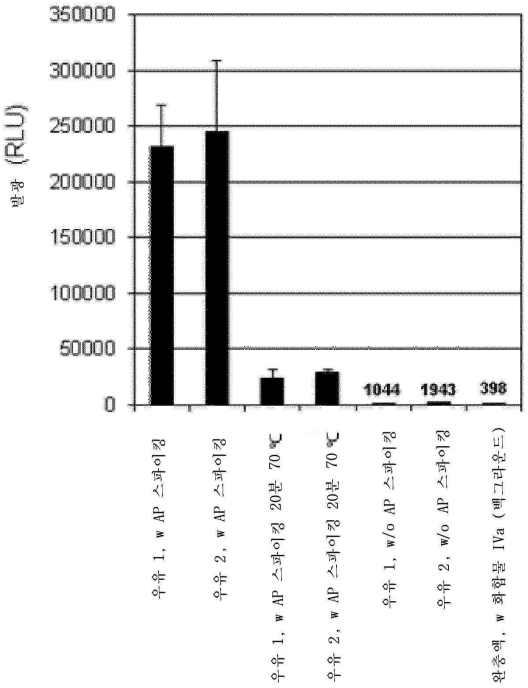
도면1


10000000
1000000
100000
10000
1000
발광 (RLU)
0.01
0.1
1
10
돼지 간 에스테라제 (U/mL)

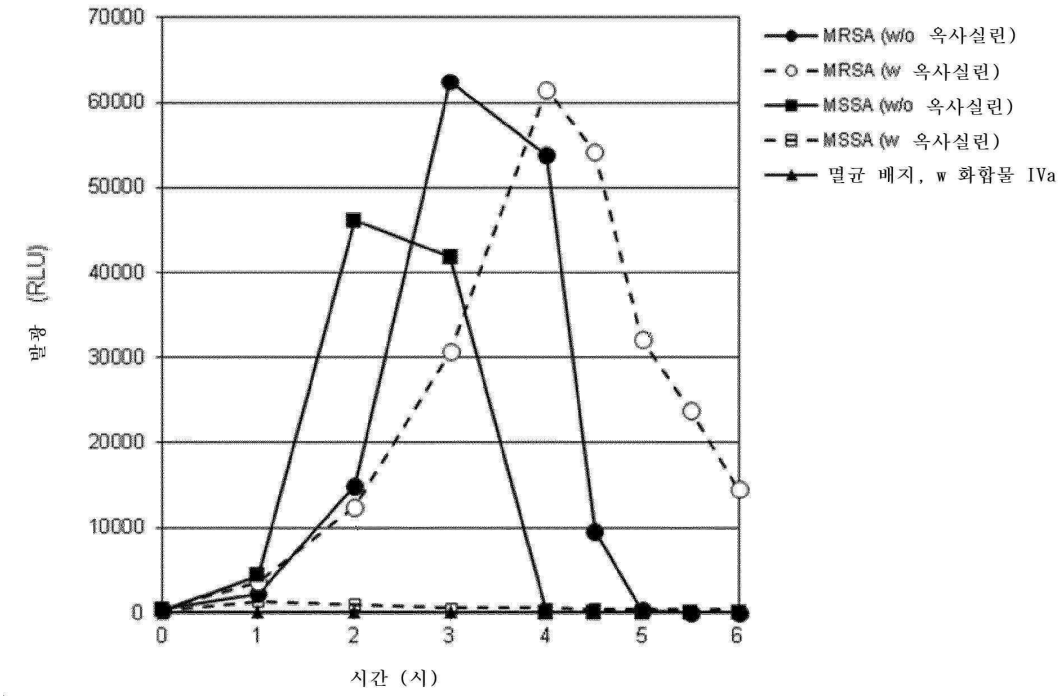
도면2


10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
RFU / RLU
100 μM MUCAP
10 μM AquaSpark 살모넬라 강화
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
살모넬라 세포 농도 (x 10⁶ CFU/mL)

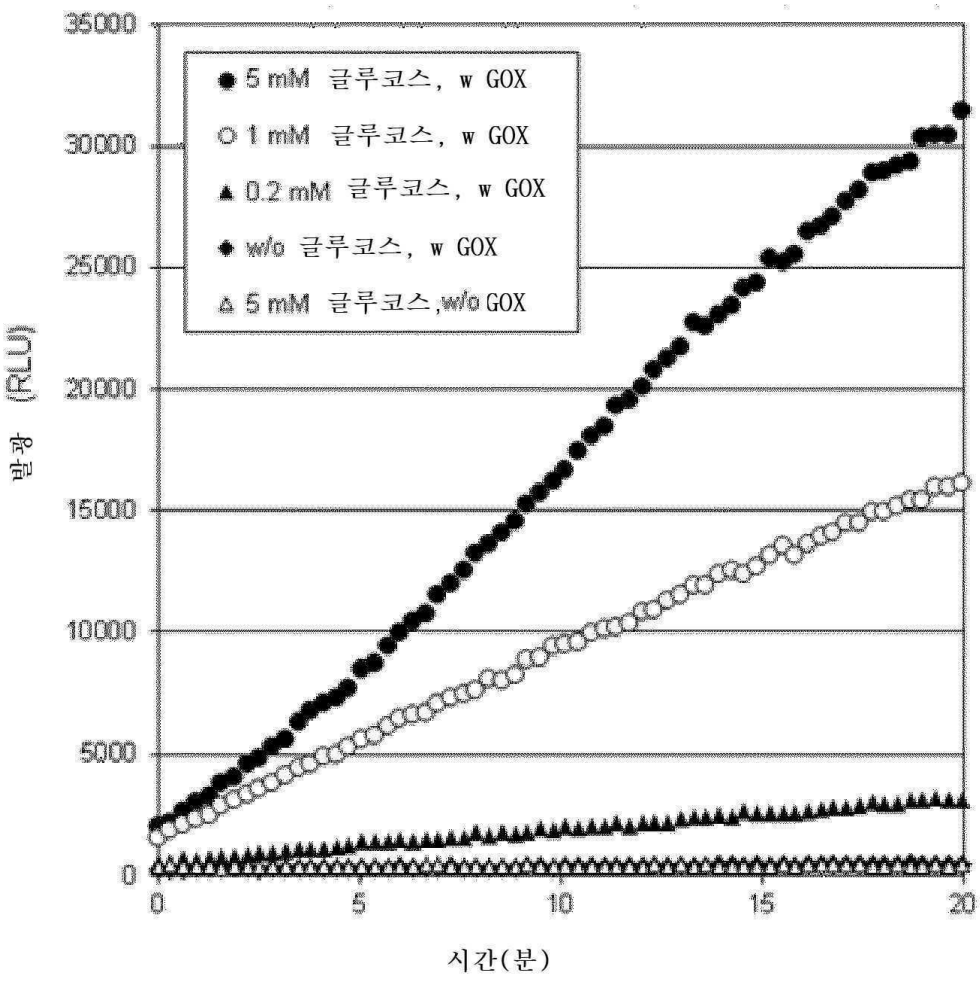
도면3


350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
발광 (RLU)
1044
1943
398
우유 1, w AP 스파이킹
우유 2, w AP 스파이킹
우유 1, w AP 스파이킹 20분 70℃
우유 2, w AP 스파이킹 20분 70℃
우유 1, w/o AP 스파이킹
우유 2, w/o AP 스파이킹
완충액, w 화합물 IVa (백그라운드)

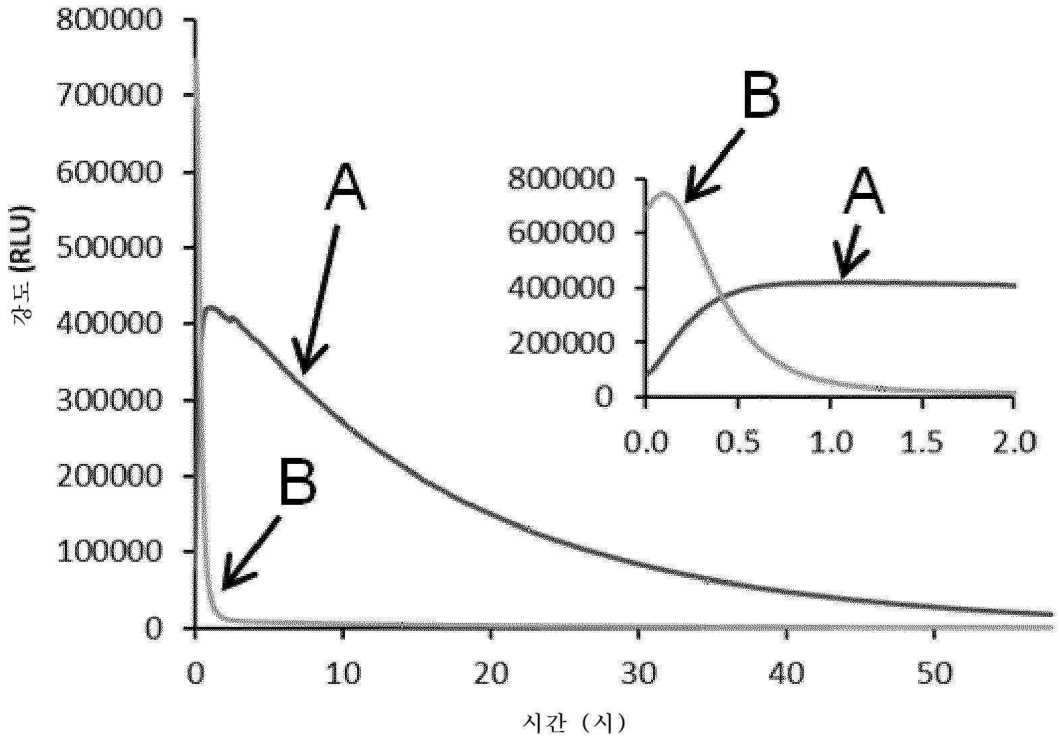
도면4


70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
발광 (RLU)
0
1
2
3
4
5
6
시간 (시)
MRSA (w/o 옥사실린)
MRSA (w 옥사실린)
MSSA (w/o 옥사실린)
MSSA (w 옥사실린)
멸균 배지, w 화합물 IVa

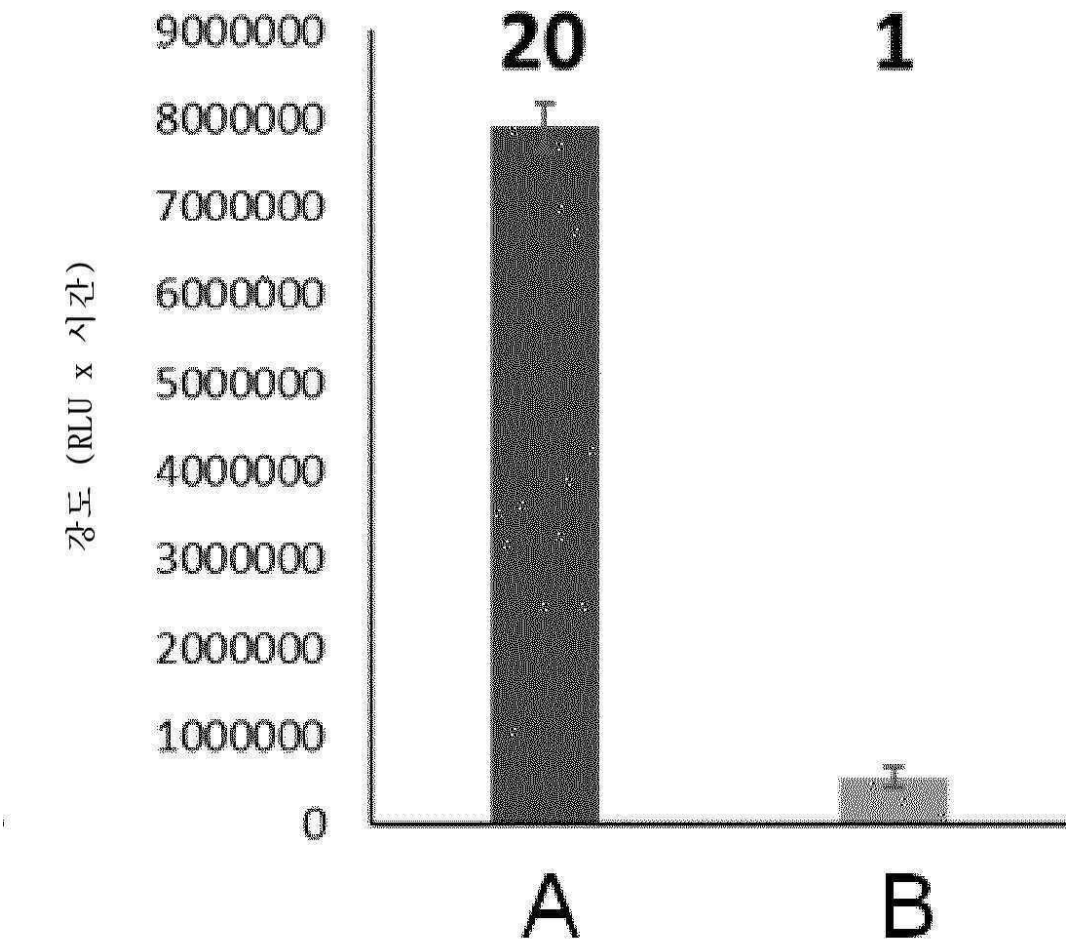
도면5


35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
0
5
10
15
20
발광 (RLU)
시간(분)
5 mM 글루코스, w GOX
1 mM 글루코스, w GOX
0.2 mM 글루코스, w GOX
w/o 글루코스, w GOX
5 mM 글루코스,w/o GOX

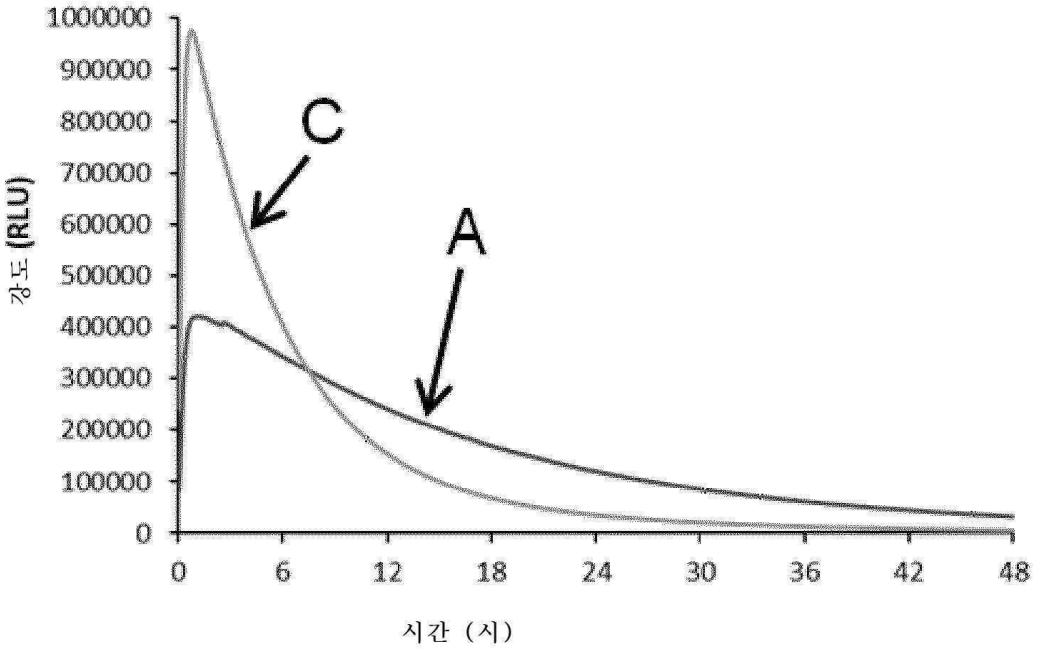
도면6a


800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
강도 (RLU)
A
B
0
10
20
30
40
50
시간 (시)
800000
600000
400000
200000
0
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0

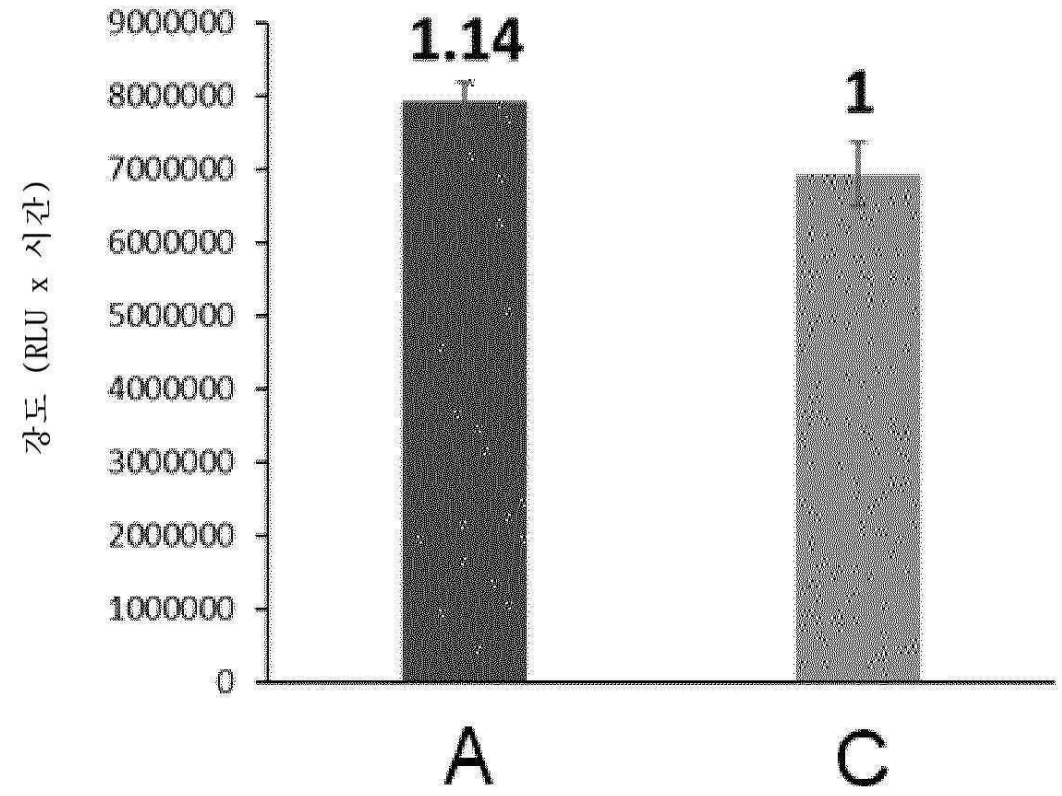
도면6b


9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
강도 (RLU x 시간)
20
1
A
B

도면7a


1000000
900000
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
강도 (RLU)
C
A
0
6
12
18
24
30
36
42
48
시간 (시)

도면7b


9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
강도 (RLU x 시간)
1.14
1
A
C