(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0131927
(43) 공개일자 2024년09월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 413/12 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
C09K 11/06 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07D 413/12 (2013.01)
A61K 49/0021 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2024-0026529
(22) 출원일자 2024년02월23일
심사청구일자 2024년02월23일
(30) 우선권주장
1020230025062 2023년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
김도경
서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호
김재훈
서울특별시 동대문구 회기로25길 16, 206호
김영웅
서울특별시 동대문구 이문로1길 30, 212호
(74) 대리인
위병갑

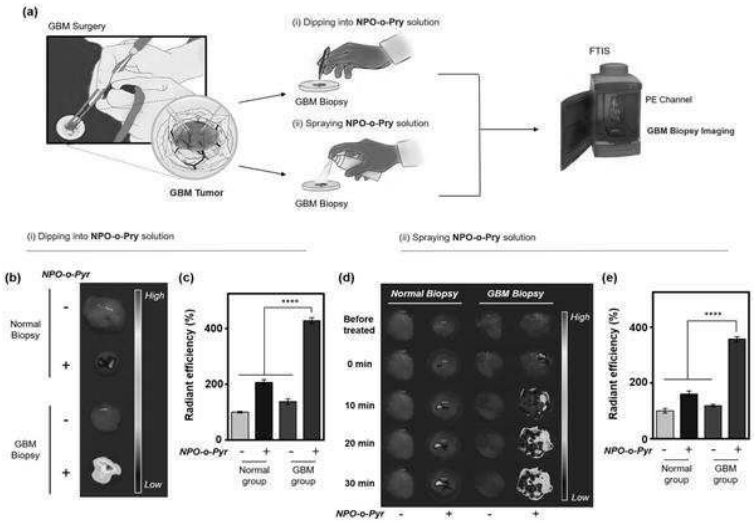
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **신규 형광 프로브를 이용한 교모세포종의 바이오 표지자인 황화아미노산의 검출 방법 및 이의 형광 유도 수술 조영제 응용**

(57) 요 약

본 발명은 시스테인 및 호모시스테인 감지를 위한 형광 프로브 화합물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따라 제조된 형광 프로브 화합물은 종양 및 암에 존재하는 시스테인 및 호모시스테인을 다른 생체 분자의 간섭 없이 빠른 시간 내에 검출하여 표적화하는 능력이 있어 형광 유도 수술에 있어서 활용도가 매우 높으며, 교모세포종을 포함한 종양 및 암을 제거하는 형광 유도 수술에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도13



(52) CPC특허분류
A61K 49/006 (2013.01)
C09K 11/06 (2022.01)
G01N 21/6428 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)
G01N 33/6815 (2013.01)
C09K 2211/1029 (2013.01)
C09K 2211/1048 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465036238
과제번호 HI21C023902
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 질병중심중개연구사업
연구과제명 신경교종 특이적 대사체의 실시간 시각화 형광 탐침자 개발
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345352778
과제번호 NRF-2018-R1A6A1A03025124
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중점연구소 지원사업
연구과제명 활성산소 조절을 통한 만성질병 예방 치료에 관한 연구
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711171698
과제번호 NRF-2022-R1F1A1069954
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구 지원사업
연구과제명 단일-벤젠 기반 형광체 라이브러리 구축 및 이의 광물리적/생물학적 특성 규명
과제수행기관명 경희대학교 산학협력단
연구기간 2022.06.01 ~ 2023.02.28

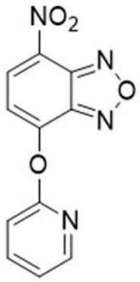
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물은 시스테인(cystein) 또는 호모시스테인(Homocystein)과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 형광 프로브 화합물인 것인, 화합물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물은 pH 6.5 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타내는 것인, 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 및 생체 분자들로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 시료 중에서 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것인, 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 화합물은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것인, 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

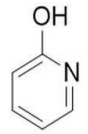
상기 종양 또는 암은 뇌종양, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 폐암, 췌장암, 담낭암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장

암, 방광암, 전립선암, 난소암, 직장암, 중추신경계 종양, 척수 종양, 자궁경부암, 혈액암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 및 부신암으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 화합물.

청구항 7

하기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 형광 프로브:

[화학식 2]

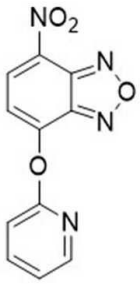


.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물은, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것인, 형광 프로브:

[화학식 1]



.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 형광 프로브는 시스테인 및 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 영상화가 가능한 것인, 형광 프로브.

청구항 10

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 형광 프로브는 종양 또는 암 제거를 위한 형광 유도 수술(fluorescence-guided surgery)에 사용되는 것인, 형광 프로브.

청구항 11

제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물.

청구항 12

제1항의 화합물을 시료, 세포, 조직 또는 기관에 처리하고, 여기광원을 조사하는 단계; 및

방출되는 형광 변화를 측정하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인의 검출방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 세포, 조직 또는 기관은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 세포, 조직 또는 기관인 것인, 시스테인 또는 호모시스테인의 검출방법.

청구항 14

제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물.

청구항 15

제1항의 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 제거하는 형광 유도 수술의 모니터링을 위한 영상화용 조성물.

청구항 16

제1항의 화합물을 환자에게 투여하는 단계;

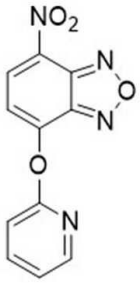
여기광원으로 환자의 수술 부위를 조명하여 화합물 1로부터 방출된 형광을 확인하는 단계; 및

상기 형광을 발하는 영역의 외과적 절제를 수행하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 제거를 위한 형광 유도 수술 방법.

청구항 17

4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine), 2-하이드록시피리딘(2-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 반응시키는 단계;를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[화학식 1]



.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 기반으로 하는 화합물, 이를 포함하는 형광 프로브, 이를 이용한 시스테인과 호모시스테인을 선택적으로 감지하는 방법 및 이를 이용하여 교모세포종을 포함한 종양 및 암의 형광 유도 수술(fluorescence-guided surgery)을 위한 조영제로서의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 교모세포종(glioblastoma)은 가장 흔한 악성 뇌종양으로 신경교종의 약 57%를 차지하고 있으며 악성 중추신경계 종양의 약 48%를 차지할 정도로 사람에게 매우 치명적인 질환이다. 또한, 연령이 증가함에 따라 교모세포종의 발생률이 증가하며 뇌에서 발생한다는 특징을 가지고 있기 때문에 진단을 통한 정확한 교모세포종 종양 제거 수술이 필수적으로 요구된다. 아직까지 교모세포종에 대한 정확한 치료 방법은 알려진 바가 없지만 보통 방사선 요법(radiotherapy), 화학 요법(chemotherapy), 표적 요법(targeted therapy), 그리고 제거 수술을 통해 환자의 생존율을 높여줄 수 있지만 최근 치료 기술의 발전에도 불구하고 교모세포종의 예후는 여전히 불안하며 장기 생존과 완치는 적게 보고되고 있다.

[0003] 현재까지 교모세포종을 치료할 수 있는 명확한 방법은 종양을 직접 제거하는 수술이 전부이다. 종양과 암을 제거하기 위한 형광 유도 수술 조영제로 ICG(Indocyanine green), 5-ALA(5-Aminolevulinic acid), 그리고 플루오레세인(Fluorescein)이 임상에서 가장 많이 사용되고 있다. 하지만, 수술 전 환자에게 투여되기 때문에 조영제가 고유적으로 가지고 있는 독성으로 인한 각종 부작용과 수술 이후의 합병증을 유발할 수 있다. 또한, 형광 유도 수술에서 조영제가 종양 및 암 조직과 정상 조직의 명확한 차이를 보이지 않을 경우 종양 제거가 깨끗하게 이루어지지 않아 잔여 종양으로 인해 재발할 우려가 크다. 따라서, 다음과 같은 조영제의 부작용과 합병증 없이 종양 부위에 대한 감도 높은 표적화 능력은 교모세포종을 포함한 종양과 암의 형광 유도 수술에서 요구되고 있는 필수적인 과제이다.

[0004] 최근 다양한 연구에서 교모세포종을 포함한 종양과 암에 대한 바이오 표지자로 시스테인과 호모시스테인의 가능성이 보고되고 있으며, 뇌종양을 포함한 중추신경계 질환 및 기타 암에 있어서 시스테인과 호모시스테인이 매우 밀접한 연관이 있음이 밝혀지고 있다. 따라서, 시스테인과 호모시스테인을 높은 감도를 기반으로 이들을 선택적으로 검출하는 것은 교모세포종을 포함한 종양과 암을 표적화할 수 있음을 말해주고 있다. 또한, 이러한 선택적 검출이 형광 유도 수술에 사용되는 조영제에 적용되었을 경우 새로운 조영제의 발전 가능성을 말해주고 있다. 따라서, 시스테인과 호모시스테인을 감지하는 것은 교모세포종을 포함한 종양 및 암을 제거하는 데 있어서 필요성이 대두되고 있는 실정이다.

[0005] 한편, 형광 분자 프로브는 다양한 연구에서 활용되고 있는 유기화합물이다. 작은 분자 단위 및 단백질의 특성이나 구조를 분석하는 데 사용되어 왔으며, 특정 생물학적 현상 규명을 밝히고 질병 인자의 검출 능력을 가지고 있다. 특히, 생체 내 존재하는 바이오 표지자를 포함하는 생체분자를 감지하는 능력이 매우 우수하며 검출을 통한 형광 신호를 시각적으로 나타낼 수 있기 때문에 편리함을 주고 있다. 다음과 같은 특징 때문에 형광 분자 프로브 연구 분야의 중요도가 매우 높아지고 있는 추세이다.

[0006] 현재까지, 시스테인과 호모시스테인을 포함한 황 함유 아미노산을 검출할 수 있는 형광 분자 프로브는 많이 개발되었지만, 형광 분자 프로브 자체적으로 가지는 독성으로 인해 인체에 적용되는 사례는 많지 않다. 인체에 적용되었을 경우 종양이나 암에 대한 높은 표적 능력을 보여준 경우는 드물다. 또한, 낮은 독성을 기반으로 종양과 암을 제거하기 위한 수술에 사용되는 형광 유도 수술의 조영제를 대체할 수 있는 잠재력을 보여준 형광 분자 프로브는 드물게 보고되어 왔다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 간단한 합성법을 기반으로 교모세포종의 바이오 표지자를 선택적으로 감지할 수 있는 형광 분자 프로브를 개발하였으며, 본 화합물을 이용해 교모세포종을 포함한 종양 및 암을 제거하기 위한 형광 유도 수술용 조영제로서의 적용 가능성을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-2216789호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 교모세포종을 포함한 종양과 암의 바이오 표지자인 시스테인(cysteine)과 호모시스테인(homocysteine)을 선택적으로 검출할 수 있는 형광 분자 프로브용 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물을 포함하는 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 형광 프로브, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물 및 이를 이용한 검출 방법 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 화합물을 이용하여 교모세포종을 포함한 종양 및 암의 제거 수술에 사용될 수 있는 형광 유도 수술의 모니터링을 위한 조영제 대체제로서의 영상화용 조성물을 제공하는 것이다.

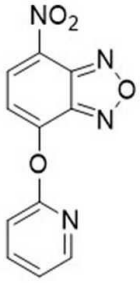
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 낮은 독성을 기반으로 인체에 적합하게 부작용 없는 형광 유도 수술 조영제를 대체할 수 있는 형광 분자 프로브를 제공하여 교모세포종을 포함한 종양 및 암을 제거하는 형광 유도 수술 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[0015] [화학식 1]



[0016] .

[0017] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인(cystein) 또는 호모시스테인(Homocystein)과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있다.

[0018] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인 또는 호모시스테인과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않고, 시스테인 또는 호모시스테인과 접촉하여 형광을 발하는 것일 수 있다.

[0019] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 pH 6.5 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타낼 수 있다.

[0020] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 및 생체 분자들로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 시료 중에서 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것일 수 있고, 즉, 시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 감지하는 것일 수 있다.

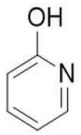
[0021] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것일 수 있다.

[0022] 일 구현예에 있어서, 상기 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암은 시스테인 또는 호모시스테인 과발현에 의해 유발되는 종양 또는 암으로서, 예를 들어, 뇌종양, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 폐암, 췌장암, 담낭암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 난소암, 직장암, 중추신경계 종양, 척수 종양, 자궁경부암, 혈액암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 및 부신암으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는 뇌종양, 간암, 자궁경부암 및 피부암으로

이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것 일 수 있고, 보다 바람직하게는 뇌종양일 수 있으며, 교모세포종인 것이 가장 바람직하다.

[0023] 또한, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 형광 프로브를 제공한다:

[0024] [화학식 2]



[0025] .

[0026] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브는 시스테인 및 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 영상화가 가능한 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브는 종양 또는 암 제거를 위한 형광 유도 수술(fluorescence-guided surgery)에 사용되는 것일 수 있다.

[0029] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물을 제공한다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 시료, 세포, 조직 또는 기관에 처리하고, 여기광원을 조사하는 단계; 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인의 검출방법을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포, 조직 또는 기관은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 세포, 조직 또는 기관인 것일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물을 제공한다.

[0033] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 제거하는 형광 유도 수술의 모니터링을 위한 영상화용 조성물을 제공한다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 환자에게 투여하는 단계; 여기광원으로 환자의 수술 부위를 조명하여 화합물 1로부터 방출된 형광을 확인하는 단계; 및 상기 형광을 발하는 영역의 외과적 절제를 수행하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 제거를 위한 형광 유도 수술 방법을 제공한다.

[0035] 더 나아가, 본 발명은 4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine), 2-하이드록시피리딘(2-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 반응시키는 단계;를 포함하는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0036] 본 발명의 형광 분자 프로브 화합물(NPO-o-Pyr)은 구조가 단순하며 짧은 시간 내에 대량으로 합성할 수 있다는 장점을 가지고 있다.

[0037] 또한, 본 발명의 형광 분자 프로브는 암과 종양의 바이오 표지자로 알려진 시스테인과 호모시스테인을 감지할 수 있는 능력이 매우 우수하고, 낮은 독성 및 생체적합성의 특징을 기반으로 하여 교모세포종 종양 조직에 대한 높은 표적화 능력, 빠른 반응 속도 및 민감도를 가지며, 교모세포종-이종이식 마우스 모델 뿐만 아니라 교모세포종 임상 조직 표본에 적용 되었을 경우 종양 부위에 대한 높은 표적화 능력을 갖는다. 따라서, 기존의 형광 유도 수술 조영제가 가지고 있는 독성 문제를 극복하여 교모세포종을 포함한 종양 및 암을 제거하는데 사용되는 형광 유도 수술 조영제를 대체할 수 있는 형광 분자 프로브로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대해 수용액(phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.4) 조건하에서 시스테인 및 호모시스테인과 반응 시 흡광(Abs) 및 형광(Emi) 변화를 확인한 결과를 동시에 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대해 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy), 글루타티온(GSH) 그리고 황화수소(H_2S)와 각각 반응 후 430 nm 여기 시 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대하여 수용액(pH 7.4) 조건하에서 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy), 티올류(thiols), 다양한 금속 이온(metal ions) 및 생체 내 분자(biomolecules)들과 각각 반응 후 430 nm 여기 시 형광 변화를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대하여 수용액(pH 7.4) 조건하에서 시스테인(Cys), 호모시스테인(Hcy), 티올류(thiols), 다양한 금속 이온(metal ions) 및 생체 내 분자(biomolecules)들과 반응 후 시간 경과에 따른 흡광도 변화 및 형광 스펙트럼을 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대하여 수용액(pH 7.4) 조건하에서 biothiol 종류인 시스테인, 호모시스테인, GSH, H_2S들과 반응 후 시간 경과에 따른 선택성 효능을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 NPO-o-Pyr과 대조군으로 합성된 NPO-m-Pyr 간의 선택성 비교 실험 결과 및 NPO-m-Pyr의 구조를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 대하여 산성도를 달리한 수용액(pH 3-9)에서 시스테인 및 호모시스테인과 각각 반응 후 430 nm 여기시 형광 변화 그래프를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 시스테인 및 호모시스테인과 각각 반응할 경우의 검출 한계(Limit Of Detection; LOD) 값을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 구성하는 이탈기(2-하이드록시피리딘; 2-hydroxypyridine)을 포함한 다양한 이탈기에 대하여 독성을 평가하여, U87MG, Huh7, HeLa 및 B16F10의 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 농도에 따른 U87MG, HeLa, Huh7 및 B16F10의 세포 생존율을 확인한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 11은 NPO-o-Pyr의 구조적 유사체인 NPO-A 및 화합물 1(NPO-o-Pyr) 농도에 따른 용혈반응(hemolysis) 정도를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 교모세포종 이종-이식 마우스 모델에 적용하여 종양 부위에 대한 표적화 능력을 통해 형광-켜짐 특성을 나타낼 수 있는지를 확인한 결과를 나타낸 (a) 형광 조직 영상 촬영 이미지 및 (b) 형광 세기 그래프이다.

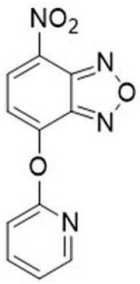
도 13은 화합물 1을 담금(dipping) 형태와 분사(spraying) 형태로 교모세포종 임상 조직에 적용하여 종양 부위에 대한 표적화 능력을 통해 형광-켜짐 특성을 나타낼 수 있는지를 확인하기 위한 (a) 실험 과정을 나타낸 모식도, 및 이를 확인한 결과를 나타낸 (b, d) 형광 조직 영상 촬영 이미지 및 (c, e) 형광 세기 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0041] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

화학식 1



[0042]

[0043] 본 발명의 실시예에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 4-니트로-7-(피리딘-2-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사다이아졸 (4-nitro-7-(pyridine-4-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)을 합성 및 동정하였고, 상기 화합물을 'NPO-o-Pyr'로 명명하였다(실시예 1 참조).

[0044] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인(cystein) 또는 호모시스테인(Homocystein)과 반응하여 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 상기 "형광-켜짐(fluorescence turn-on)" 특성은 검출하고자 하는 대상 물질의 비존재(부재) 하에서는 형광을 발하지 않으며, 육안으로 식별하지 못하지만, 검출 대상 물질이 존재할 경우 검출 대상 물질과 반응하여 형광을 발하는 특성을 의미한다.

[0046] 본 발명의 일 예에 따른 NPO-o-Pyr 화합물과 같은 "형광-켜짐" 기준 시스템의 경우, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질이 존재하지 않을시 형광이 존재하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 형광만이 존재하다가, 검출 대상 물질의 존재에 의해 명확한 형광(최소 10배 이상의 형광 세기 증가)이 발생하게 되므로, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질의 검출 여부를 시각적으로 명확히 판별할 수 있다.

[0047] 본 발명의 상기 화합물이 나타내는 형광 켜짐은 시스테인 및 호모시스테인과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않고, 시스테인 및/또는 호모시스테인과 접촉하여 형광을 발하는 것을 의미할 수 있다. 이에, 상기 화합물을 시스테인 및 호모시스테인 검출용 형광 프로브(probe)로 사용될 수 있으며, 시스테인 및 호모시스테인 검출을 통한 종양 및 암 표적화를 위해 사용될 수 있고, 형광 유도 수술의 조영제용으로 사용될 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 용어 '프로브'는 '센서'라고도 하며 생체 내/외 표적을 검출하거나, 영상화할 수 있는 것으로 정의된다. 일반적으로 영상화제, 조영제, 방사성 의약품 등의 용어로 대체하여 사용되고 있다.

[0049] 본 발명의 상기 화합물은 시스테인 또는 호모시스테인과 반응 이후에 2-하이드록시피리딘(2-hydroxypyridine)을 이탈기로서 발생시킬 수 있다.

[0050] 본 발명의 실시예에에서는 상기 2-하이드록시피리딘이 다양한 세포에서 독성을 나타내지 않으므로, 상기 2-하이드록시피리딘 및 이를 이탈기로 포함하는 본 발명의 화합물(NPO-o-Pyr)은 생체적합성이 높음을 확인하였다(실시예 7 참조). 따라서, 본 발명의 화합물(NPO-o-Pyr)을 비롯한 상기 2-하이드록시피리딘을 이탈기로 포함하는 화합물은 다양한 형광 분자 프로브로서 조영제 대체제로 사용될 수 있다.

[0051] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 pH 6.5 내지 8의 조건에서 형광 켜짐 현상을 나타내는 것일 수 있고, 바람직하게는 pH 7 내지 8의 조건, 더욱 바람직하게는 pH 7 내지 7.8의 조건에서 형광 켜짐을 통한 호모시스테인 검출이 가능한 것일 수 있으며, pH 7.2 내지 7.6의 조건이 가장 바람직한 것일 수 있다.

[0052] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 바이오 티올, 금속 이온 및 생체 분자들로 이루어지는 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 시료 중에서 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것으로서, 즉, 시스테인 또는 호모시스테인을 선택적으로 감지할 수 있는 형광 프로브 화합물일 수 있다.

[0053] 상기 시료는 물, 버퍼(buffer) 용액 또는 생체 시료인 것일 수 있고, 상기 생체 시료는 인간, 동물(설치류, 포유류 등)로부터 분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함

할 수 있고, 바람직하게는 세포 또는 조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0054] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 시스테인 또는 호모시스테인에 선택적 형광을 발하는 것일 수 있다.

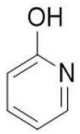
[0055] 일 구현예에 있어서, 상기 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암은 시스테인 또는 호모시스테인 과발현에 의해 유발되는 종양 또는 암으로서, 예를 들어, 뇌종양, 대장암, 위암, 간암, 유방암, 폐암, 췌장암, 담낭암, 갑상선암, 부갑상선암, 신장암, 방광암, 전립선암, 난소암, 직장암, 중추신경계 종양, 척수 종양, 자궁경부암, 혈액암, 흑색종, 결장암, 골암, 피부암, 두부암, 자궁암, 질암, 음문암종, 식도암, 소장암, 및 부신암으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는 뇌종양, 간암, 자궁경부암 및 피부암으로 이루어지는 군에서 선택되는 1종 이상인 것 일 수 있고, 보다 바람직하게는 뇌종양일 수 있으며, 교모세포종인 것이 가장 바람직하다.

[0056] 본 발명의 실시예에서는 시스테인 및 호모시스테인을 빠른 시간 내에 선택적으로 검출할 수 있는 새로운 형광 분자 프로브 화합물로서, 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)에 방향족 고리 화합물인 2-히드록시피리딘(2-hydroxypyridine)을 작용기로 구성되도록 화합물을 설계 및 개발하여, 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 합성 및 명명하였다(실시예 1 참조). 또한, 본 발명의 상기 화합물이 생물학적 조성인 수용액(pH 7.4)에서 안정성을 보이며, 시스테인 및 호모시스테인과 반응되었을 경우, 550 nm 근방에서 형광-켜짐 현상을 나타냄을 확인하였고, 다양한 세포에 처리시 독성이 낮은 이탈기인 2-하이드록시피리딘을 포함하므로, 기존의 형광 분자 프로브 및 조영제가 가질 수 있는 독성 문제를 극복할 수 있음을 확인하였다(실시예 2 내지 7 참조).

[0057] 또한, 본 발명의 실시예에서는, 본 발명의 상기 화합물이 교모세포종 이종-이식 마우스 모델에 적용되었을 경우 종양에 대한 높은 표적화 능력을 보임을 확인하였으며, 형광 발현에 있어서 교모세포종 종양 조직과 정상 뇌 조직간의 확연한 차이를 보여주었다(실시예 8 참조). 또한, 교모세포종 임상 종양 조직에 다양한 형태(담금 형태, 분사 형태 등)로 처리되었을 경우 10 분 이내에 정상 뇌 조직과 차이를 구분할 수 있는 형광 발광 세기를 보여주었다(실시예 9 참조). 이를 통해, 본 발명의 화합물 NPO-o-Pyr을 이용하여 교모세포종의 종양 부위를 구별해 낼 수 있음을 확인함으로써, 이를 교모세포종을 제거하는 형광 유도 수술을 모니터링하기 위한 영상화(조영제) 용도로 적용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0059] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 형광 프로브에 관한 것이다:

화학식 2

[0060] 

[0061] 상기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기는 2-히드록시피리딘(2-hydroxypyridine)으로 명명될 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 화학식 2로 표시되는 구조의 이탈기를 갖는 화합물은, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 형광 프로브에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 형광 프로브에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브는 생체 내에서 시스테인 및 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 표적화하여 영상화가 가능한 것일 수 있다.

[0065] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 형광 프로브는 종양 또는 암 제거를 위한 형광 유도 수술(fluorescence-guided surgery)에 사용되는 것일 수 있다.

[0066] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 형광 프로브는 생체 시료 중에서 시스테인 및/또는 호모시스테인을 선택적으로 검출하는 것일 수 있다.

[0067] 상기 생체 시료는 인간, 동물(설치류, 포유류 등)로부터 분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 세포 또는 조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.

[0069] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0070] 본 발명의 상기 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물은, 생체 시료 중에서 시스테인 및/또는 호모시스테인을 선택적으로 검출하는 것일 수 있다.

[0071] 본 발명의 상기 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물은 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산, 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, N,N-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또는 상기 조성물은 생체 시료와 혼합될 수 있다.

[0072] 본 발명에 따른 시스테인 또는 호모시스테인 검출용 조성물에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 생체 시료에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0074] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 시료, 세포, 조직 또는 기관에 처리하고, 여기광원을 조사하는 단계; 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인의 검출방법에 관한 것이다.

[0075] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 세포, 조직 또는 기관은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 세포, 조직 또는 기관인 것일 수 있다.

[0076] 본 발명에 따른 시스테인 또는 호모시스테인 검출방법에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 시료 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0077] 본 발명에 따른 호모시스테인의 검출방법에 있어서, 상기 여기광원은 380 내지 500 nm의 여기파장을 갖는 광원일 수 있고, 바람직하게는, 390 내지 490nm, 보다 바람직하게는 430 내지 450 nm의 여기파장일 수 있다. 여기서, 상기 광원은 형광 분광광도계 또는 UV 흡수분광법을 사용하여 조사하는 것이 바람직하다.

[0078] 본 발명에 따른 호모시스테인의 검출방법에 있어서, 상기 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계는 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 시스테인 및/또는 호모시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 시스테인 및/또는 호모시스테인 존재시 형광 발광 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있다.

[0080] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0081] 본 발명에 따른 진단용 조성물에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0082] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 인간 또는 동물의 종양 또는 암에 처리하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 처리된 종양 또는 암에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는, 시스테인 및 호모시스테인 관련 질환 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0083] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 여기광원 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0084] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 단계 3은 측정 대상의 종양 또는 암의 형광 발광 세기가 화합물이 처리되기 전의 형광 발광 세기에 비해 증가된 것을 확인할 수 있는 방법을 포함한다.

[0085] 보다 구체적으로 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 시스테인 및/또는 호모시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 시스테인 및/또는 호모시스테인 존재 시 형광-켜짐 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화합물을 처리되기 전의 종양 또는 암의 조직보다 형광 발광 및 형광 세기가 증가가 확인된 경우 종양 또는 암 조직과 정상 조직을 구분할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

[0087] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 시스테인 및 호모시스테인을 바이오 표지자로 하는 종양 또는 암에 첨가하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 처리된 종양 또는 암에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 종양 또는 암 조직을 영상화하는 방법을 제공한다.

[0088] 본 발명에 따른 종양 또는 암 조직을 영상화하는 방법에 있어서, 상기 시스테인 및 호모시스테인을 바이오 표지자로 하는 종양 또는 암은 전술한 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암과 동일한 종양 또는 암을 의미하는 것일 수 있다.

[0089] 본 발명에 따른 종양 및 암을 구별하여 영상화할 수 있는 형광 유도 수술 조영제의 역할에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 여기광원 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0090] 본 발명에 따른 상기 종양 및 암 조직을 영상화하는 방법은, 종양 및 암에 존재하는 시스테인 및 호모시스테인을 검출함으로써 종양 및 암 조직을 표적화하여 영상화하는 것일 수 있다.

[0091] 본 발명에 따른 종양 및 암 조직을 영상화하는 방법에 있어서, 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 시스테인 및 호모시스테인과 선택적으로 반응하여 흡수 및 형광 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 종양 및 암에 존재하는 시스테인 및 호모시스테인과 반응하여 형광 발광 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있다.

[0093] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암을 제거하는 형광 유도 수술의 모니터링을 위한 영상화용 조성물에 관한 것이다.

[0094] 본 발명에 따른 영상화용 조성물에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0095] 본 발명에 따른 상기 영상화용 조성물은 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 및 암, 바람직하게는 교모세포종 종양에 존재하는 시스테인 및 호모시스테인을 검출함으로써, 교모세포종 종양 제거 수술에 사용되는 것일 수 있다.

[0097] 일 측면에서, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 환자에게 투여하는 단계; 여기광원으로 환자의 수술 부위를 조명하여 화합물 1로부터 방출된 형광을 확인하는 단계; 및 상기 형광을 발하는 영역의 외과적 절제를 수행하는 단계;를 포함하는, 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암의 제거를 위한 형광 유도 수술 방법에 관한 것이다.

[0098] 본 발명에 따른 영상화용 조성물에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 여기광원 및 시스테인 또는 호모시스테인 관련 종양 또는 암에 대한 설명은 전술한 바와 같다.

[0100] 더 나아가, 본 발명은 4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine), 2-하이드록시피리딘(2-hydroxypyridine) 및 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)을 반응시키는 단계;를 포함하는, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

[0101] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 반응은 질소로 산소를 제거한 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)을 반응 용매로 이용하여 수행되는 것일 수 있다.

[0102] 바람직하게는, DMF에 용해시킨 4-(디메틸아미노)피리딘 및 DMF에 용해시킨 4-클로로-7-니트로벤조퓨란을 혼합하여 1차 반응시킨 다음, DMF에 용해시킨 2-하이드록시피리딘을 첨가하여 2차 반응 시키는 것일 수 있다.

[0103] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 단계 이후, 반응시킨 용액에 에틸아세테이트(EtOAc)와 물을 혼합하여 섞어준 후, 유기층(EtOAc층)만을 따로 회수하여 건조 및 농축하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 컬럼 크로마토그래피 등을 이용하여 정제하는 과정을 추가로 더 포함할 수 있다.

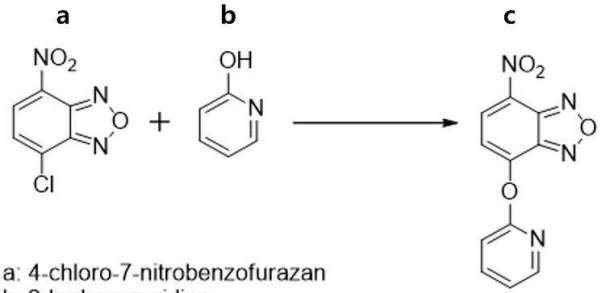
[0104] 본 발명에 따른 제조방법에 있어서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조 과정은 하기 실시예 1의 반응식 1과 같이 나타낼 수 있다.

[0106] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0108] **실시예 1. 종양 및 암 표적화를 위한 시스테인 및 호모시스테인 검출용 형광 분자 프로브 화합물의 합성 및 구조 분석**

[0109] 본 발명자들은 종양 및 암을 제거하기 위한 형광 유도 수술에 사용될 수 있는 조영제를 대체할 수 있는 낮은 독성을 기반으로 하는 생체적합성이 높은 형광 분자 프로브를 디자인하였다. 보다 상세하게는, 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)에 방향족 고리 화합물인 2-히드록시피리딘(2-hydroxypyridine)을 작용기로 구성되도록 화합물 1을 설계하였으며, 하기 반응식에 따라 상기 화합물 1을 합성하였다.

[0110] [반응식 1]



a: 4-chloro-7-nitrobenzofurazan
b: 2-hydroxypyridine
c: 4-nitro-7-(pyridine-2-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole

[0111]

[0112] 구체적으로, 4-(디메틸아미노)피리딘(4-(dimethylamino)pyridine)(70.98 mg, 0.5810 mmol, SIGMA ALDRICH, 107700)을 질소로 산소를 제거한 9 mL의 엔,엔-다이메틸 포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)에 녹였으며, 회전막대(stirring bar)를 이용해 화합물이 잘 섞일 수 있게 해준 후, 10분간 25℃에서 교반해주었다(분당 회전수: 250 rpm). 이후, 상기 용액에 합성 출발 물질인 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)(100 mg, 0.3873 mmol, SIGMA ALDRICH, 163260)과 질소로 산소를 제거한 2 mL의 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)을 추가해주고, 혼합물을 10분간 60℃에서 교반해주었다. 마지막으로, 3 mL의 엔,엔-다이메틸포름아마이드(N,N-dimethylformamide; DMF)에 2-히드록시피리딘(2-hydroxypyridine)(147.32 mg, 1.5492 mmol, SIGMA ALDRICH, 56800)을 녹인 용액을 상기 혼합물에 첨가한 뒤 실리콘 오일 용기 상에서 온도를 80℃까지 올려주었다. 온도가 80℃까지 도달하면 60분간 교반해준 뒤 물(10 mL)로 반응을 멈추어주었다. 유기층을 추출하기 위해서 분별 깔때기를 이용하여 에틸아세테이트(Ethylacetate; EtOAc)와 물을 1:1로 혼합하여 섞어주었고, 이 과정을 통해 유기층만을 따로 획득할 수 있었다. 이후, 유기층을

무수황산나트륨(Na_2SO_4, 5 g)으로 건조하고 회전농축기(Evaporator)를 이용하여, 37℃ 및 20~500 mmHg의 조건으로 농축하였다. 이렇게 얻은 진한 갈색 고체화합물은 실리카겔(silica gel, Merck-silica gel 60, 230-400 mesh)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(직경 6 cm, 높이 15 cm) 방법을 이용하여 분리(전개 액: EA/n-Hexane=30/70)하여 노란색 고체 화합물 (화합물 1, 19.23 mg, 23.4%)을 얻었다.

[0113] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance)을 수행하였다. 분석을 통해 화합물 1이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과는 다음과 같다:

[0114] ^{1}H-NMR (500 MHz, DMSO-D6) δ 8.72, 8.70, 8.26, 8.26, 8.26, 8.25, 8.06, 8.06, 8.04, 8.03, 8.03, 7.45, 7.43, 7.42, 7.41, 7.38, 7.37, 7.36, 7.35, 3.30, 2.47, 2.47, 2.46, 2.46, 2.46, -0.03, -0.04, -0.05.

[0115] 이때, 상기 화합물 1을 '4-니트로-7-(피리딘-2-일옥시)벤조[c][1,2,5]옥사다이아졸(4-nitro-7-(pyridine-4-yloxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)'로 동정하였으며, 'NPO-o-Pyr'로 명명하였다.

[0117] **실시예 2. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 형광 방출 특성 확인**

[0118] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 형광 방출 특성을 확인하기 위하여, 중성 조건의 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 시스테인 및 호모시스테인과 반응 후 흡광 및 형광 방출 그래프를 측정하였다.

[0119] 구체적으로, 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 화합물 1(NPOO-o-Pyr, 10 μM)과 시스테인(L-cysteine, 10 μM) 및 호모시스테인(DL-homocysteine, 10 μM)을 각각 10 분간 교반 후, 형광 방출 및 흡광 값을 측정하였다(여기파장: 430 nm). 흡광 스펙트럼(UV/Vis absorption spectra) 분석을 위해서는 UV/Vis 분광광도계(Agilent Technologies Cary 8454, USA)을 사용하였고, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra) 분석을 위해서는 형광 광도계(SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)을 사용하였다. 이때 각 기기에 본 화합물을 넣어주는 셀(cell)은 1 cm 두께의 표준 석영 셀(standard quartz cell, internal volume=0.1 cm)을 이용하였다. 측정된 결과를 도 1에 나타내었다.

[0120] 도 1은 중성의 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1(NPO-o-Pyr)과 시스테인 및 호모시스테인이 반응함에 따른 흡광(Abs) 및 형광 방출(Emi) 그래프 변화의 결과이며, 흡광 스펙트럼은 488 nm에서 증가하고, 형광 방출 스펙트럼은 550 nm에서 증가하는 것이 확인되었다. 또한, 화합물 1(NPO-o-Pyr)과 시스테인 및 호모시스테인이 반응함에 따라 550 nm 근방에서 형광-켜짐 현상을 나타냄을 확인하였다.

[0122] **실시예 3. 화합물1(NPO-o-Pyr)의 시스테인 및 호모시스테인 반응 시간 및 선택성 확인**

[0123] 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 중성(pH 7.4) 조건에서 시스테인 및 호모시스테인을 포함한 다양한 종류의 아미노 티올(aminothiol)과의 반응을 나타내는 가에 대한 확인을 위해, 중성(pH 7.4)의 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에 화합물 1(NPO-o-Pyr)과 아미노 티올을 첨가 후 형광 방출 그래프를 측정하였다.

[0124] 구체적으로, 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에서 화합물 1(NPO-o-Pyr, 10 μM)과 시스테인(L-Cysteine, 10 μM), 호모시스테인(DL-homocysteine, 10 μM), 글루타티온(L-glutathione, 10 μM), 및 황화수소(hydrogen sulfide, 10 μM)를 각각 반응시켜 형광 값을 측정하였다(여기파장: 430 nm). 호모시스테인을 포함한 아미노티올은 Sigma, TCI 사의 제품을 사용하였으며, 형광 스펙트럼(fluorescence spectra) 분석을 위해서는 형광 광도계(SHIMADZU CORP, RF-6000, Japan)을 사용하였다. 이때, 각 기기의 본 화합물을 넣어주는 셀(cell)은 1 cm 두께의 표전 석영 셀(standard quartz cell, internal volume=0.1 cm)을 이용하였다. 측정된 결과를 도 2에 나타내었다.

[0125] 도 2는 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1(NPO-o-Pyr)과 아미노 티올에 대한 반응을 시간 경과(0-10분)에 따라서 그래프로 나타낸 것이다. 시스테인 및 호모시스테인을 추가한 후 3분 내에 화합물 1의 형광 증가가 관찰되었으며, 형광 세기가 10분까지 유지된 반면에, 시스테인과 호모시스테인을 제외한 다른 아미노 티올에 대해서는 형광 방출을 보이지 않아 낮은 반응성을 가짐을 확인하였다. 이를 통해, 수용액(pH 7.4, PBS buffer) 조건하에서 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 다양한 아미노 티올 중 시스테인과 호모시스테인에 가장 높은 선택성과 빠른 반응 시간이 있음을 확인하였다.

[0127] **실시예 4. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 생체 분자에 대한 선택성 확인**

[0128] 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 다양한 종류의 생체 분자 중에서도 시스테인과 호모시스테인에 대해서만 선택성을 발휘할지 형광 변화를 통해 확인하고자 했다.

[0129] 구체적으로, 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 시스테인과 호모시스테인에 대한 선택성 여부를 확인하기 위하여 형광-켜짐 여부를 확인하였다. 수용액(pH 7.4, PBS buffer)을 사용하였으며, 금속 이온은 Aldrich, Oriental Chemicals, Samchun chemicals 및 Duksan chemicals 사의 제품을 사용하였다. 화합물 1은 10 mM로 디메틸설폭사이드(DMSO)에 녹여 사용하였으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 디메틸설폭사이드의 양이 각 용매에 동일하도록 통제되었다(1% 미만). 화합물 1의 농도는 10 μM, 생체 분자는 10 μM로 동일하게 처리하였고, 여기 파장은 430 nm를 사용하여, 형광분광광도계로 형광 파장 550 nm에서의 형광 값을 측정하여 도 3에 나타내었다.

[0130] 도 3의 그래프는 화합물 1이 포함된 수용액(pH 7.4, PBS buffer)에 다양한 생체 내 분자(molecule) 및 이온(anion)을 처리한 후 형광 세기를 측정하여 나타낸 그래프이다. 도 3의 그래프에서 화합물 1만 처리한 결과는 밝은 회색 바그래프(bar-graph)로 표시하였으며, 시스테인(Cys) 및 호모시스테인(Hcy)을 화합물 1과 반응시킨 그래프는 어두운 회색 바 그래프로 표시하였고, 기타 생체 분자와 화합물 1을 반응시킨 결과는 밝은 회색 바그래프로 표시되었다. 도 3의 그래프에 보여진 가로축 표시한 이온들의 종류는 다음과 같다:

[0131] (A) 화합물 1 및 DL-호모시스테인 (Probe 1 with DL-Homocysteine);

[0132] (B) 화합물 1 및 L-시스테인 (Probe 1 with L-Cysteine);

[0133] (C) 화합물 1 및 L-글루타티온 (Probe 1 with L-Glutathion);

[0134] (D) 화합물 1 및 황화수소 (Probe 1 with Hydrogen sulfide);

[0135] (E) 화합물 1 및 소혈청알부민 (Probe 1 with Bovine Serum Albumin);

[0136] (F) 화합물 1 및 염화홀뮴(III) (Probe 1 with Holmium(Ⅲ) chloride);

[0137] (G) 화합물 1 및 염화철(Ⅱ) (Probe 1 with Iron(Ⅱ) chloride);

[0138] (H) 화합물 1 및 염화철(Ⅲ) (Probe 1 with Iron(Ⅲ) chloride);

[0139] (I) 화합물 1 및 염화마그네슘 (Probe 1 with Magnesium chloride);

[0140] (J) 화합물 1 및 염화니켈(Ⅰ) (Probe 1 with Nikel(Ⅰ) chloride);

[0141] (K) 화합물 1 및 염화니켈(Ⅱ) (Probe 1 with Nikel(Ⅱ) chloride);

[0142] (L) 화합물 1 및 염화금(III) (Probe 1 with Gold trichloride);

[0143] (M) 화합물 1 및 염화팔라듐(Ⅱ) (Probe 1 with Palladium (Ⅱ) chloride);

[0144] (N) 화합물 1 및 염화칼륨 (Probe 1 with potassium chloride);

[0145] (O) 화합물 1 및 질산은 (Probe 1 with Silver nitrate);

[0146] (P) 화합물 1 및 염화나트륨 (Probe 1 with Sodium chloride); 및

[0147] (Q) 화합물 1 및 염화코발트 (Probe 1 with Cobalt chloride);

[0148] 또한, 도 4에 상기 화합물들의 흡광도 및 형광 스펙트럼을 나타내었다.

[0149] 그 결과, 도 3 및 도 4의 그래프에 나타난 바와 같이, 화합물 1 자체(Only NPO-o-Pyr)에서는 형광 세기 값이 거의 나타나지 않았으나, 시스테인과 호모시스테인이 각각 존재하는 A와 B에서는 강한 형광 세기 값을 보였다. 반면, 화합물 1(NPO-o-Pyr)은 시스테인 및 호모시스테인을 제외한 다른 아미노 티올, 금속 이온 및 생체분자 조건 내에서는 형광 켜짐 현상을 거의 나타내지 않았다.

[0151] 또한, biothiol 종류인 시스테인, 호모시스테인, GSH, H_2S에 대해서 시간에 따른 선택성 효능을 상기 분석방법에 따라 확인하였다. 도 5에 시간에 따른 선택성 효능을 상기 분석 결과를 나타내었다.

[0152] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, GSH 및 H_2S에서는 시간이 경과하여도 형광세기가 유의적으로 나타나지 않았

으나, 시스테인, 호모시스테인의 경우 시간이 경과함에 따라 형광세기가 유의적으로 강해지는 것으로 나타났다.

[0154] 또한, NPO-o-Pyr의 대조군으로 합성된 NPO-m-Pyr (ortho 위치에 pyridine이 아닌 meta 위치에 pyridine이 달린 물질)과의 선택성을 상기 분석방법에 따라 분석하였다. 도 6에 분석결과를 나타내었다.

[0155] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 대조군인 NPO-m-Pyr에서는 형광세기가 낮게 나타난 반면, 화합물 1의 경우 시스테인, 호모시스테인에서 형광세기가 300을 초과하여 유의적으로 높은 형광세기를 나타내었다.

[0157] 상기 결과들을 통해 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 시스테인과 호모시스테인에 대하여 높은 선택성을 가지고 있음을 확인하였다.

[0160] **실시예 5. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 pH에 따른 시스테인 및 호모시스테인 감지 능력 확인**

[0161] 본 발명자들은 산성도(pH)에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 시스테인 및 호모시스테인 감지 능력을 확인하였다.

[0162] 구체적으로, 화합물 1의 형광-켜짐을 바탕으로 호모시스테인에 대한 산성도(pH)의 민감도를 관찰하기 위해, 화합물 1(NPO-o-Pyr, 10 μM)과 시스테인(10 μM) 및 호모시스테인(10 μM)의 농도를 고정한 상태에서 다양한 산성도 조건(pH 3-9)에 따른 민감도를 확인하였다. 즉, pH 3, 5, 7.4, 9의 조건에서 각각 시스테인 및 호모시스테인을 10 μM씩 처리하고, 화합물 1(NPO-o-Pyr, 10 μM)과 10 분간 교반 해준 뒤 형광 세기를 측정하였다. 이때, 430 nm의 여기파장을 사용하였으며, 550 nm의 형광 방출 파장을 측정하여 형광 세기를 바그래프로 도 7에 나타내었다.

[0163] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, pH 7.4에서 가장 민감하게 시스테인 및 호모시스테의 반응이 관찰되었으며, 다른 pH에서는 상대적으로 약하게 나타남을 확인하여, 이를 통해, 화합물 1(NPO-o-Pyr)가 생체와 유사한 조건의 수용액 상태에서 시스테인 및 호모시스테인 검출에 적용 가능함을 확인하였다.

[0165] **실시예 6. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 시스테인 및 호모시스테인 검출 한계 확인**

[0166] 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 생체내 pH와 유사한 조건(pH 7.4)에서 시스테인 및 호모시스테인 감지 능력을 확인하고자 검출 한계 값을 분석하였다.

[0167] 수용액(pH 7.4, PBS buffer)을 사용하여 화합물 1(NPO-o-Pyr, 10 μM)이 존재하는 상태에서 시스테인 및 호모시스테인을 각각 농도별(1-100 ng/μL)로 처리한 뒤 10분간 37℃에서 교반한 뒤 형광 스펙트럼을 측정하였다(여기파장: 430 nm). 화합물 1은 10 μM로 DMSO 용액에 녹여 사용되었으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 DMSO의 양이 각 용기별로 동일하도록 하였다(1% 미만).

[0168] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 저농도에서도 시스테인 및 호모시스테인을 감지할 수 있는 능력이 높은 것으로 확인되었다. LOD 값은 시스테인의 경우 0.071 ppm(= 0.004 μM), 호모시스테인의 경우 0.189 ppm(= 0.011 μM)로 계산되었다. 이러한 결과를 통해, 교모세포종의 바이오표지자인 시스테인 및 호모시스테인을 감지할 수 있는 능력이 매우 우수함을 확인함과 동시에 형광 유도 수술의 조영제로의 가능성을 확인하였다.

[0170] **실시예 7. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 이탈기를 포함한 다양한 이탈기의 독성 분석**

[0171] 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 체내에서 시스테인 및 호모시스테인과 반응 이후에 발생되는 이탈기는 2-히드록시피리딘(2-hydroxypyridine)으로, 본 발명의 화합물 1을 생체 내 조영제 대체제로서 사용하기 위해서는 생체적합성을 확인할 필요가 있다. 이에, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 시스테인 및 호모시스테인과 반응 이후에 발생될 수 있는 이탈기(2-hydroxypyridine)의 다양한 세포에서의 독성을 평가하였다.

[0172] 구체적으로, 세포의 준비를 위해, 교모세포종세포(U87MG), 간암세포(Huh7), 자궁경부암세포(HeLa) 및 피부암세

포(B16F10) 각각의 약 5×10^3의 세포를 96-웰 투명 플레이트(SPL Life Science, Ref. of Korea)에 처리한 다음, 24 시간 동안 37℃에서 배양 후 화합물 1(NPO-o-Pyr, 10 μM)을 처리하여 CCK-8 분석 키트(Dofindo, Japan)에 의해 제조사의 설명에 따라 분석하였다. 흡광도 수준은 마이크로 플레이트 판독기 (SpctraMax Gemini EM, Molecular Devices, US)에 의해 490 nm 파장에서 분석하였다. 2-히드록시피리딘 및 이와 유사한 구조의 다양한 이탈기를 U87MG, Huh7, HeLa 및 B16F10 각 세포에 처리하여 세포 생존률을 측정하였으며, 이를 도 9에 나타내었다. 화합물 1의 농도에 따른 U87MG, Huh7, HeLa 및 B16F10 세포의 세포 생존률을 도 10에 나타내었다.

[0173] 그 결과, 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 포함하고 있는 이탈기(2-하이드록시피리딘)의 독성은 유사 구조의 이탈기의 독성에 비해 매우 낮은 것으로 확인되었으며, 이는 NPO-o-Pyr의 형광 프로브 자체가 낮은 독성을 기반으로 생체에 적합하다는 것을 나타낸다.

[0175] **실시예 8. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 용혈반응(hemolysis) 분석**

[0176] 화합물 1의 생체 내 독성 반응을 평가하기 위해, 화합물 1을 처리하였을 때 적혈구의 용혈반응을 확인하였다.

[0177] 마우스의 심장에서 채혈한 혈액을 항응고제에 처리 후 원심분리기를 이용하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 진행하여 혈구만을 분리하였다. 분리한 혈구에 PBS를 추가하여 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 다시 진행하여 혈구를 추출하였다. 상기 추출한 혈구를 전체 부피 대비 8%만을 처리하고 NPO-o-Pyr과 NPO-A를 각각 100, 200, 400 mM 처리하여 1시간동안 37℃에서 배양 후 다시 2000 rpm에서 5분간 원심분리를 진행하여 상층액을 분리하였다. 450 nm에서 분리한 상층액의 흡광을 확인하였다. 적혈구에 PBS만을 처리하여 음성대조군을 설정하였고, 적혈구에 0.5 % Triton X-100를 처리하여 양성대조군을 설정하였다.

[0178] 그 결과, 도 11에 나타낸 바와 같이, NPO-A를 적혈구에 처리한 경우 NPO-A의 농도가 높아질수록 용혈반응의 정도가 높아지는 것으로 나타났다. 그러나, 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 경우 음성대조군과 유사할 정도로 용혈반응이 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다. 상기 결과를 통해, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 생체에 적합하며, 기존의 화합물 대비 세포독성이 낮을 것을 확인하였다.

[0180] **실시예 9. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 교모세포종 이종-이식 마우스 모델의 적용**

[0181] 화합물 1을 교모세포종 이종-이식 마우스 모델에 적용하였을 경우 마우스 뇌 영상화가 가능한지 확인하기 위하여, 정상군 마우스(Normal mouse), 교모세포종을 유발시킨 대조군 마우스(GBM mouse) 및 각각의 마우스에 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 투여한 실험군을 준비하여, 뇌 영상화를 확인하였다.

[0182] 먼저, 실험군 준비를 위해, LUC-U87MG 세포(교모세포종세포)를 사용하여, 소태아혈정(FBS; Fetal Bovine Serum)을 제거한 세포 배양 배지(Cell Culture Media) 5 μL에 5.0×10^5 세포가 있는 상태의 용액을 해밀턴 마이크로시린지를 사용하여 정위(stereotaxically) 투여를 통해 이소플루란으로 마취된 마우스 뇌의 시상(- 3.0mm 전후방(AP), - 1.8mm 내외측(ML) 및 - 3.0mm 등배쪽(DV))으로 투여 (1 μL/min, 5분)하여 교모세포종(GBM) 마우스 모델을 만들었다.

[0183] 이후, 마우스 뇌 영상화를 통한 교모세포종의 진행 정도를 파악하기 위해, 루시페린(D-Luciferin, 150 mg/kg, n=10)을 정상 마우스 또는 교모세포종 유발 마우스의 복강 내에 투여하여 형광 조직 영상촬영 시스템(FTIS; Fluorescence tissue imaging system; VISQUE InVivo Elite. Vieworks)을 이용하여 교모세포종 형광 발광 신호(세기)를 확인하였다(PE Channel: 390-490 nm excitation, 575-640 nm detection).

[0184] 정상군(Normal)과 대조군(GBM) 및 각각의 처리군에 화합물 1을 투여한 실험군에 대한 마우스 뇌 영상화 결과는 도 12에 나타낸 바와 같다.

[0185] 그 결과, 도 12에서 나타낸 바와 같이 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 교모세포종 이종-이식 마우스에 꼬리 정맥 투여하였을 경우 교모세포종 이종-이식 마우스 모델의 종양에서 형광 발광 세기가 증가한 것을 확인하였다. 즉, 교모세포종 이종-이식 마우스 모델에 적용되었을 경우 화합물 1이 교모세포종의 종양을 표적화하여 영상화할 수 있음을 확인하였다.

[0186] 이러한 결과를 통해, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 교모세포종 종양을 표적화하는 능력이 매우 우수하다는 것을 확인하였으며, 교모세포종에 국한되는 것이 아닌, 교모세포종을 포함한 종양과 암을 제거하기 위해 사용되는 형광

유도 수술 조영제를 대체할 수 있는 잠재력이 있음을 확인하였다.

[0188] **실시예 10. 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 교모세포종 임상 조직 적용**

[0189] 본 발명에 따른 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 다양한 형태(담금 형태, 분사 형태)로 실제 교모세포종 임상 조직 표본과 정상 뇌 조직 표본에 적용 되었을 경우를 비교하여, 교모세포종 조직에서 뇌 정상 조직과 형광 발광 세기의 차이를 보여주는가를 확인하고자 했다.

[0190] 먼저, 실제 임상에서 획득된 교모세포종 종양(GBM tumor) 조직 표본과 뇌 정상 조직 표본의 불순물을 제거하기 위해 수용액(phosphate-buffered saline; PBS, pH 7.4)을 10 mL에 각 표본을 담근 후 37℃ 교반기에서 10분 교반하여 3 회 세척하였다. 이후, 화합물 1(NPO-o-Pyr)의 농도를 100 μM로 고정한 상태에서 담금 형태(dipping)와 분사(spraying) 형태 2가지 형태로 나누어 각 표본에 처리되었다. 담금 형태의 경우 각각의 표본을 농도가 고정된 화합물 1(NPO-o-Pyr)에 담구어 상온에서 1시간 교반되었으며, 분사 형태의 경우 농도가 고정된 화합물 1(NPO-o-Pyr)을 표본에 적당량 분사하여 25℃에서 방치되었다.

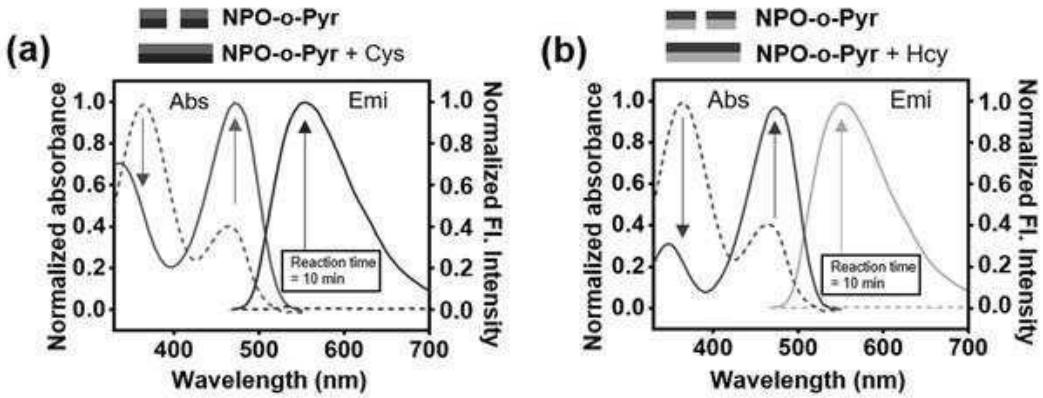
[0191] 이후, 교모세포종 종양 조직 표본과 뇌 정상 조직 표본의 형광 발광 세기 차이를 파악하기 위해, 형광 조직 영상촬영 시스템(FTIS; Fluorescence tissue imaging system; VISQUE InVivo Elite. Vieworks)을 이용하여 각 표본의 형광 발광 신호(세기)를 확인하였다(PE Channel: 390-490 nm excitation, 575-640 nm detection).

[0192] 그 결과, 도 13에 나타낸 바와 같이 담금 형태의 경우 교모세포종 종양 조직 표본과 뇌 정상 조직 표본에서 확연한 형광 발광 세기 차이를 보여주었다. 또한, 분사 형태에서도 시간이 지남에 따라 형광 발광 세기 차이를 보였다. 이러한 결과는, 화합물 1(NPO-o-Pyr)이 교모세포종 종양을 표적화하는 능력이 매우 우수하다는 것을 보여주고 있으며, 교모세포종 종양에 국한되는 것이 아닌 교모세포종을 포함한 종양과 암에 대한 높은 표적화 능력을 가지고 있는 것을 보여주고 있다.

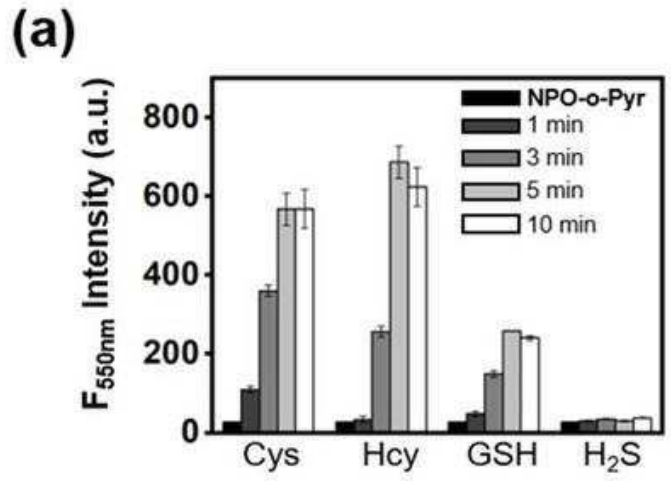
[0194] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

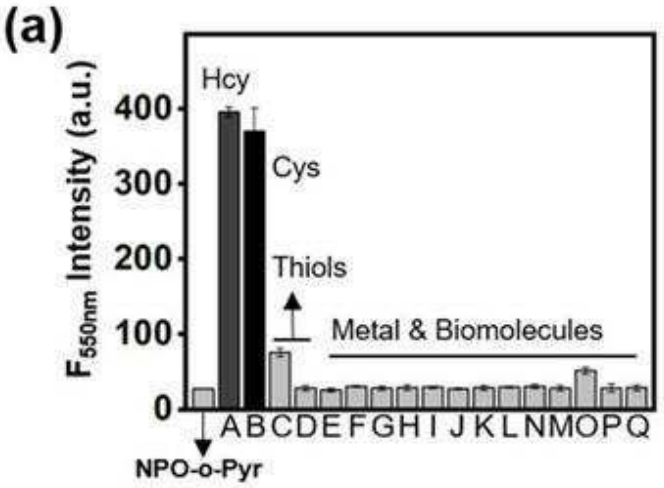
도면1



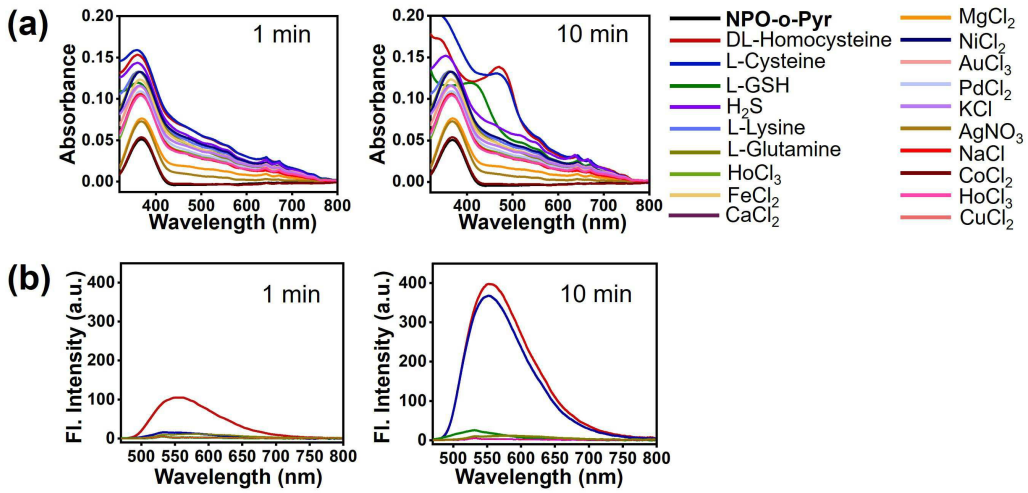
도면2


(a)
F_{550nm} Intensity (a.u.)
800
600
400
200
0
NPO-o-Pyr
1 min
3 min
5 min
10 min
Cys
Hcy
GSH
H_2S

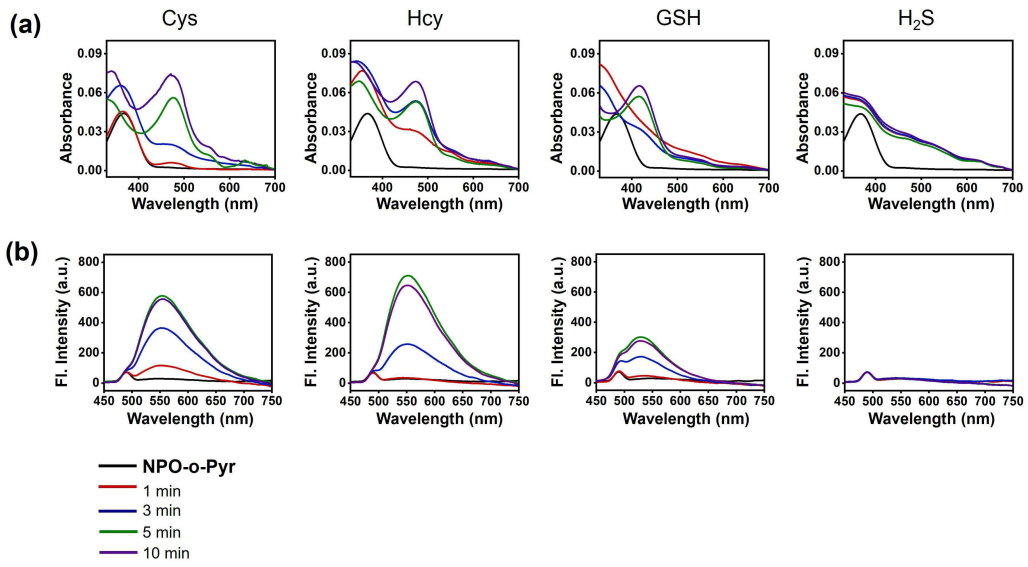
도면3


(a)
F_{550nm} Intensity (a.u.)
400
300
200
100
0
Hcy
Cys
Thiols
Metal & Biomolecules
A B C D E F G H I J K L N M O P Q
NPO-o-Pyr

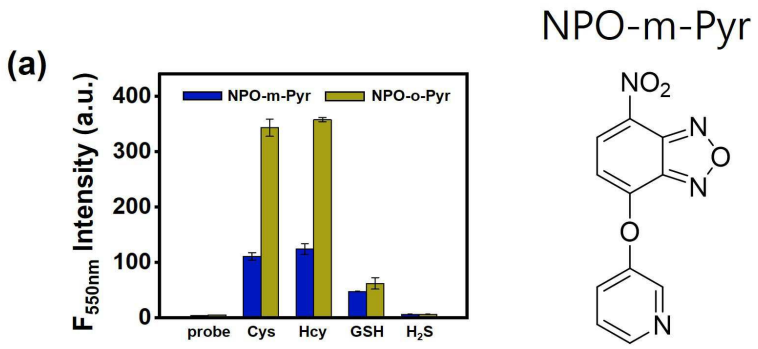
도면4


(a)
Absorbance
1 min
10 min
Wavelength (nm)
NPO-o-Pyr
DL-Homocysteine
L-Cysteine
L-GSH
H_2S
L-Lysine
L-Glutamine
$HoCl_3$
$FeCl_2$
$CaCl_2$
$MgCl_2$
$NiCl_2$
$AuCl_3$
$PdCl_2$
KCl
$AgNO_3$
NaCl
$CoCl_2$
$HoCl_3$
$CuCl_2$
(b)
Fl. Intensity (a.u.)
1 min
10 min
Wavelength (nm)

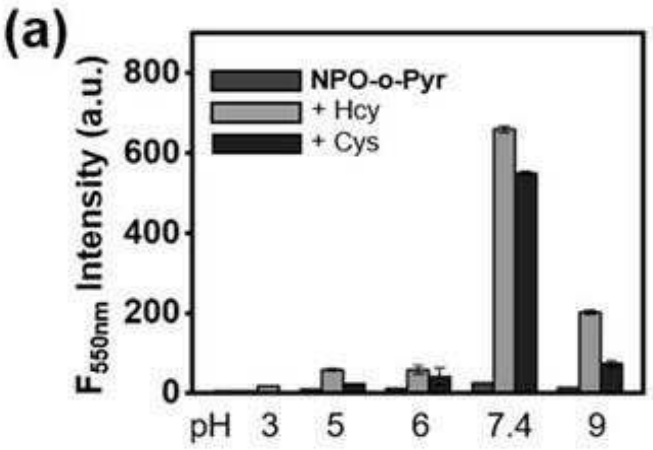
도면5


(a)
Cys
Hcy
GSH
H_2S
Absorbance
Wavelength (nm)
(b)
Fl. Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
NPO-o-Pyr
1 min
3 min
5 min
10 min

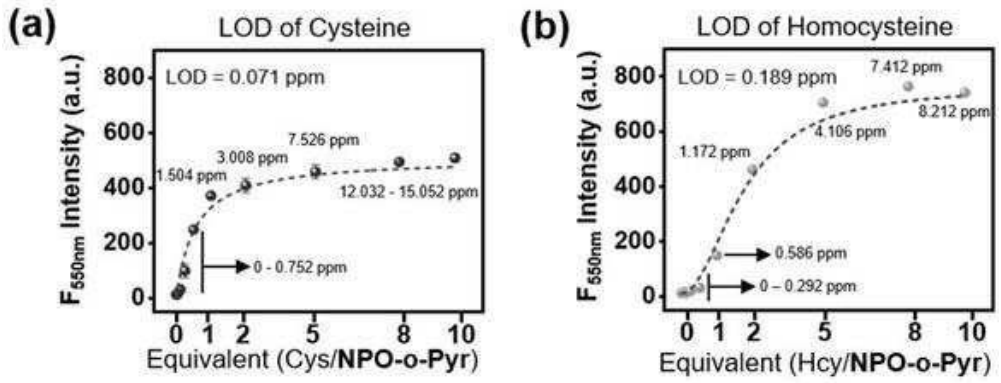
도면6


(a)
F_{550nm} Intensity (a.u.)
NPO-m-Pyr
NPO-o-Pyr
probe
Cys
Hcy
GSH
H_2S
NPO-m-Pyr
NO_2
N
O
N
O
N

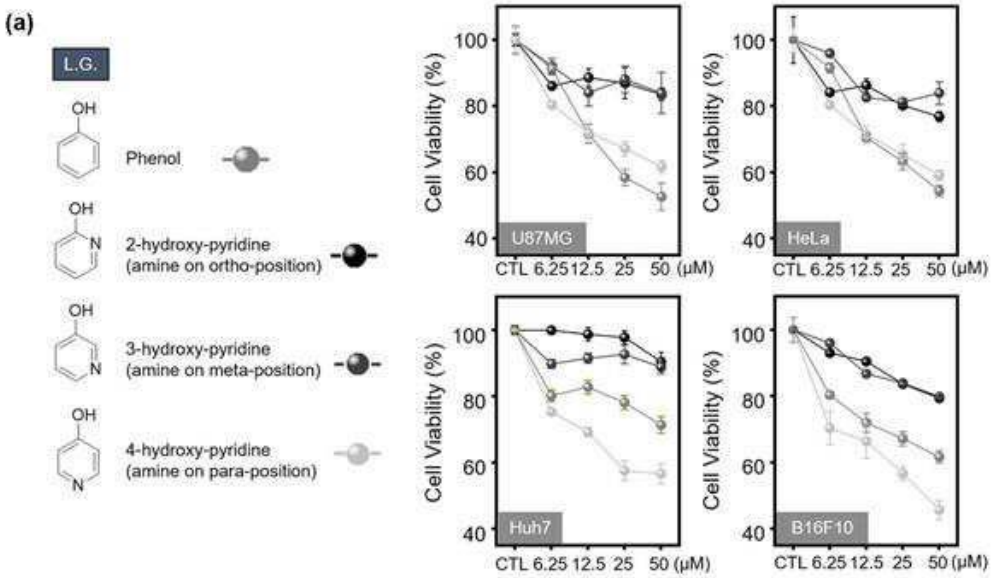
도면7


(a)
F_{550nm} Intensity (a.u.)
NPO-o-Pyr
+ Hcy
+ Cys
pH 3 5 6 7.4 9

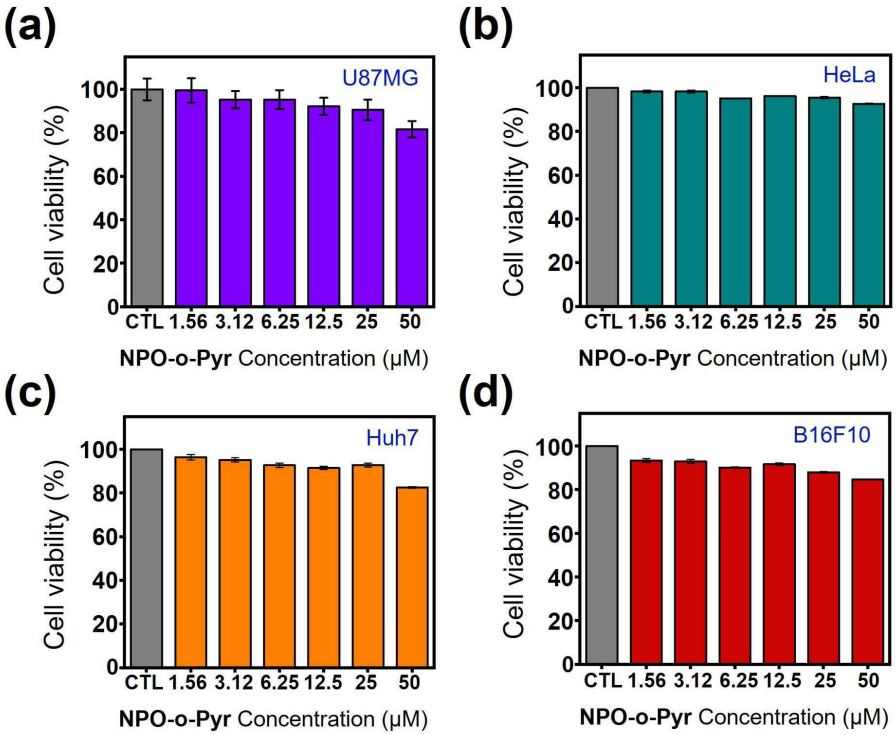
도면8


(a)
LOD of Cysteine
LOD = 0.071 ppm
1.504 ppm
3.008 ppm
7.526 ppm
12.032 - 15.052 ppm
0 - 0.752 ppm
F550nm Intensity (a.u.)
Equivalent (Cys/NPO-o-Pyr)
(b)
LOD of Homocysteine
LOD = 0.189 ppm
1.172 ppm
4.106 ppm
7.412 ppm
8.212 ppm
0.586 ppm
0 – 0.292 ppm
F550nm Intensity (a.u.)
Equivalent (Hcy/NPO-o-Pyr)

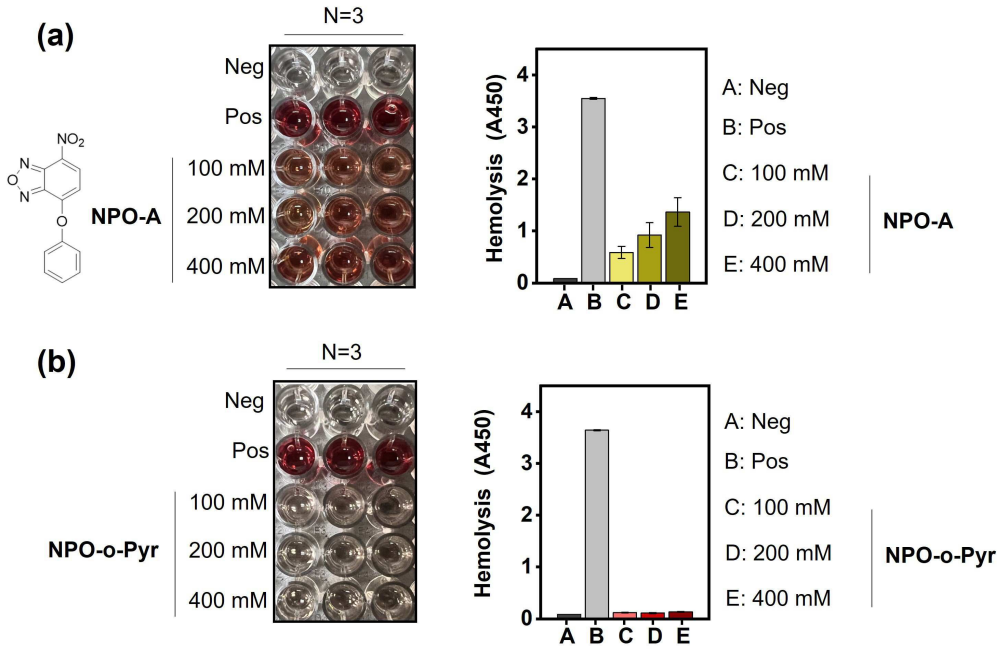
도면9


(a)
L.G.
Phenol
2-hydroxy-pyridine
(amine on ortho-position)
3-hydroxy-pyridine
(amine on meta-position)
4-hydroxy-pyridine
(amine on para-position)
Cell Viability (%)
U87MG
HeLa
Huh7
B16F10
CTL 6.25 12.5 25 50 (μM)

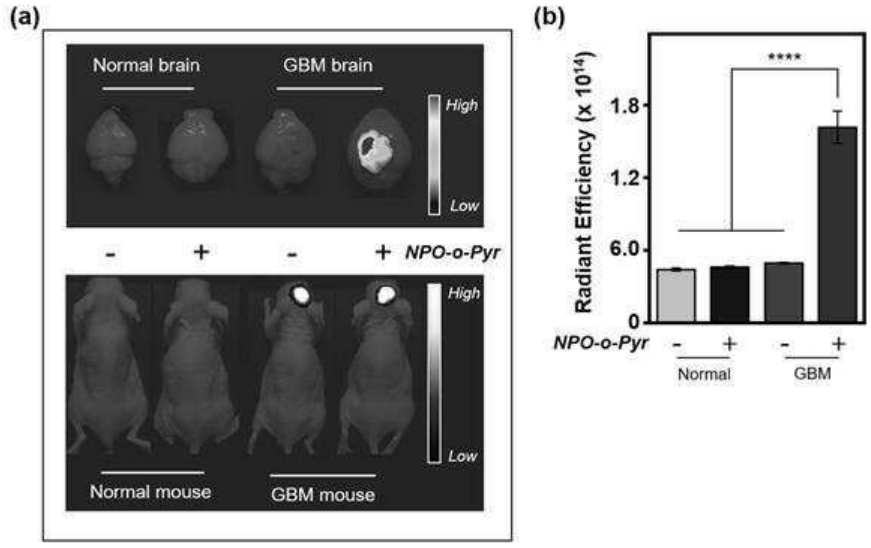
도면10


(a)
U87MG
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
CTL 1.56 3.12 6.25 12.5 25 50
NPO-o-Pyr Concentration (μM)
(b)
HeLa
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
CTL 1.56 3.12 6.25 12.5 25 50
NPO-o-Pyr Concentration (μM)
(c)
Huh7
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
CTL 1.56 3.12 6.25 12.5 25 50
NPO-o-Pyr Concentration (μM)
(d)
B16F10
Cell viability (%)
100
80
60
40
20
0
CTL 1.56 3.12 6.25 12.5 25 50
NPO-o-Pyr Concentration (μM)

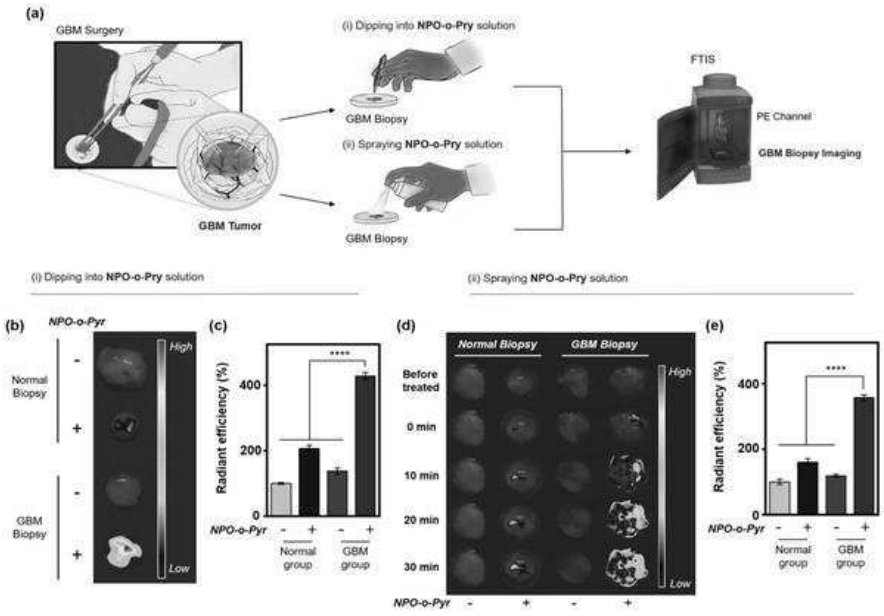
도면11


(a)
N=3
Neg
Pos
100 mM
200 mM
400 mM
NPO-A
Hemolysis (A450)
4
3
2
1
0
A B C D E
A: Neg
B: Pos
C: 100 mM
D: 200 mM
E: 400 mM
NPO-A
(b)
N=3
Neg
Pos
100 mM
200 mM
400 mM
NPO-o-Pyr
Hemolysis (A450)
4
3
2
1
0
A B C D E
A: Neg
B: Pos
C: 100 mM
D: 200 mM
E: 400 mM
NPO-o-Pyr

도면12


(a)
Normal brain
GBM brain
High
Low
- + - + NPO-o-Pyr
High
Low
Normal mouse
GBM mouse
(b)
Radiant Efficiency (x 10^14)
1.8
1.2
6.0
0
****
NPO-o-Pyr - + - +
Normal
GBM

도면13


(a)
GBM Surgery
GBM Tumor
(i) Dipping into NPO-o-Pry solution
GBM Biopsy
(ii) Spraying NPO-o-Pry solution
GBM Biopsy
FTIS
PE Channel
GBM Biopsy Imaging
(i) Dipping into NPO-o-Pry solution
(ii) Spraying NPO-o-Pry solution
(b)
NPO-o-Pyr
Normal Biopsy
GBM Biopsy
High
Low
(c)
Radiant efficiency (%)
400
200
0
****
NPO-o-Pyr
Normal group
GBM group
(d)
Normal Biopsy
GBM Biopsy
Before treated
0 min
10 min
20 min
30 min
High
Low
NPO-o-Pyr
(e)
Radiant efficiency (%)
400
200
0
****
NPO-o-Pyr
Normal group
GBM group