(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0022367
(43) 공개일자 2025년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) *A61K 41/00* (2020.01)
C07D 471/04 (2006.01) *C07F 15/00* (2024.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0021 (2023.08)
A61K 41/0057 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0103326
(22) 출원일자 2023년08월08일
심사청구일자 2023년08월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이준석
서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1601호
윤혜영
서울특별시 서초구 효령로77길 20, 603호
이중훈
서울특별시 중랑구 사가정로 363-1, 301호
(74) 대리인
위병갑

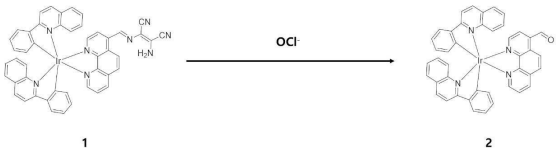
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **활성염소종 반응성 탐침**

(57) 요 약

본 발명은 활성염소종에 반응하여 발광 신호를 보이고 광역학 치료 효과를 가지는 신규한 탐침에 관한 것으로, 본 발명의 이리듐 기반 활성염소종 반응성 탐침은 활성염소종과 반응 후 생성되는 이리듐 착물이 발광 신호 변화를 나타내며, 생성된 이리듐 착물에 광조사하면 활성산소를 과생성하므로, 이를 관련 질환의 진단 및 광역학 치료에 이용할 수 있는 테라노스틱 제제로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C07D 471/04 (2022.08)
C07F 15/0033 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711197947
과제번호 00217701
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 집단연구지원
연구과제명 활성산소 방어기전 직접 표적을 통한 정밀 광역학 치료법개발 연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 이화여자대학교
연구기간 2023.06.01 ~ 2024.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711186209
과제번호 2020R1A2C2004422
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 저분자 프로브를 이용한 RNA epigenetics profiling연구
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

신호 또는 광역학 치료(photodynamic therapy) 모이어티; 및

활성염소종 반응성 모이어티를 포함하는 활성염소종 반응성 탐침(probe).

청구항 2

제 1항에 있어서, 활성염소종은 염소 라디칼($Cl\cdot$), 이염소 라디칼($Cl_2\cdot^-$), 차아염소산(hypochlorous acid, HClO) 또는 차아염소산염(hypochlorite ion, OCl^-)인, 활성염소종 반응성 탐침.

청구항 3

제 1항에 있어서, 활성염소종에 반응하여 형광(photoluminescence, PL) 신호 변화를 나타내는, 활성염소종 반응성 탐침.

청구항 4

제 1항에 있어서, 신호 또는 광역학 치료 모이어티는 광조사(photoirradiation)에 의해 활성 산소를 생산하는, 활성염소종 반응성 탐침.

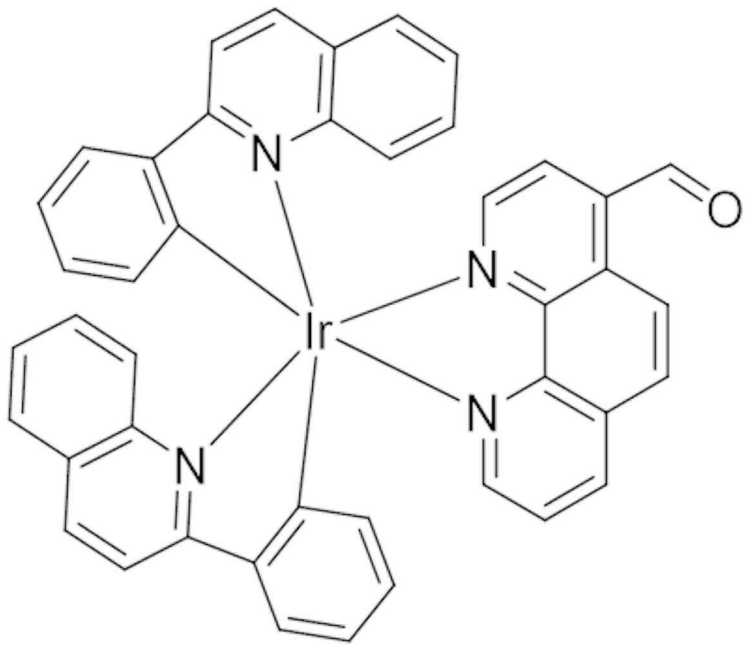
청구항 5

제 1항에 있어서, 신호 또는 광역학 치료 모이어티는 이리듐(iridium) 착물(complex)을 포함하는, 활성염소종 반응성 탐침.

청구항 6

제 5항에 있어서, 이리듐 착물은 하기 화학식 2로 표시되는, 활성염소종 반응성 탐침:

[화학식 2]



.

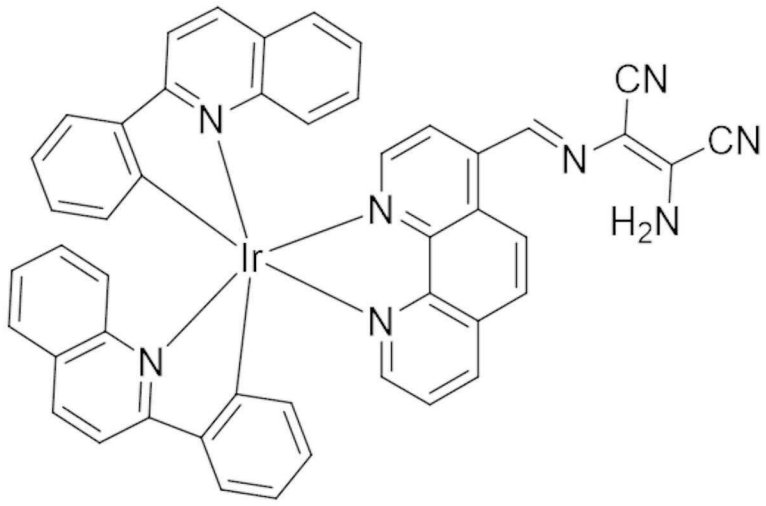
청구항 7

제 1항에 있어서, 활성염소종 반응성 모이어티는 디아미노말레오나이트릴 또는 이의 유도체인, 활성염소종 반응성 탐침.

청구항 8

제 1항에 있어서, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 활성염소종 반응성 탐침:

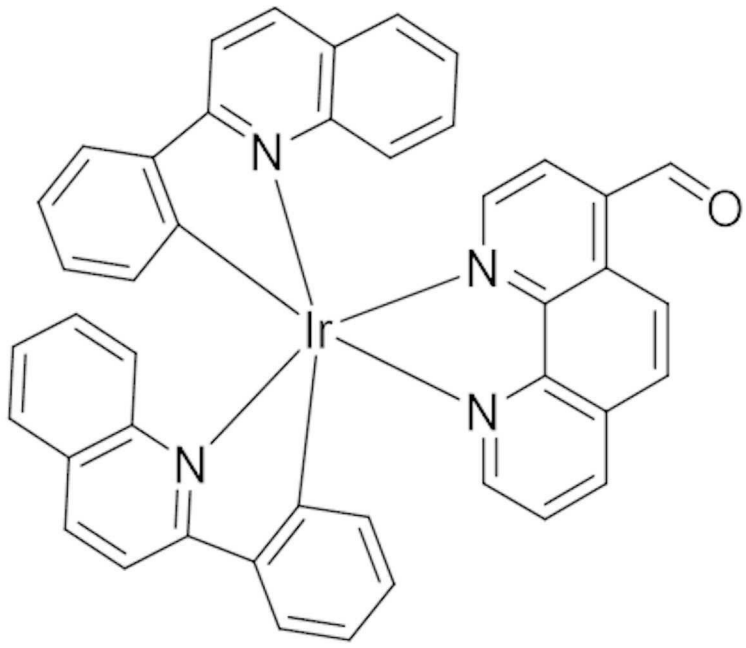
[화학식 1]



청구항 9

하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

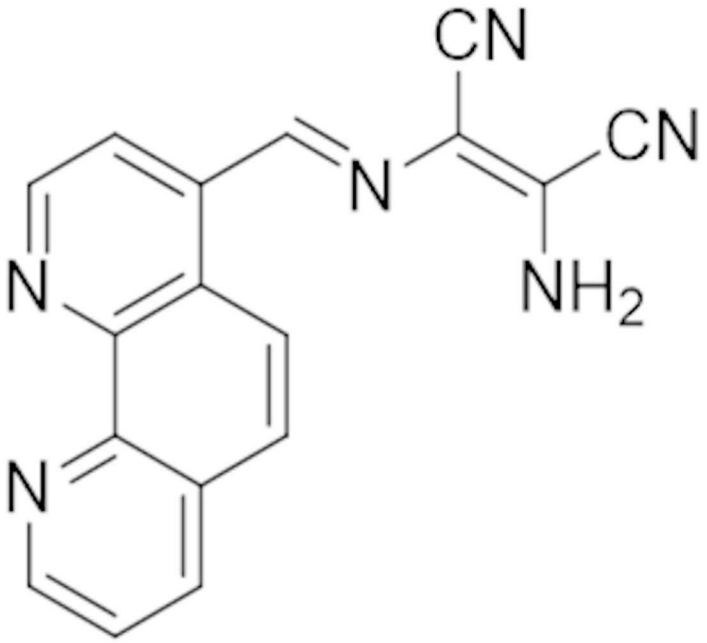
[화학식 2]



청구항 10

하기 화학식 4로 표시되는 화합물:

[화학식 4]



.

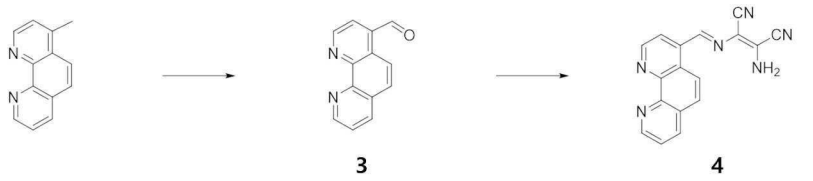
청구항 11

하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

셀레늄 디옥사이드 및 4-메틸-1,10-페난쓰롤린를 유기용매에서 반응시켜 화합물 3을 제조하는 단계 (단계 1); 및

화합물 3 및 2,3-디아미노말레오나이트릴을 유기용매에서 반응시켜 화합물 4를 제조하는 단계 (단계 2)를 포함하는, 화학식 4로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



3 4

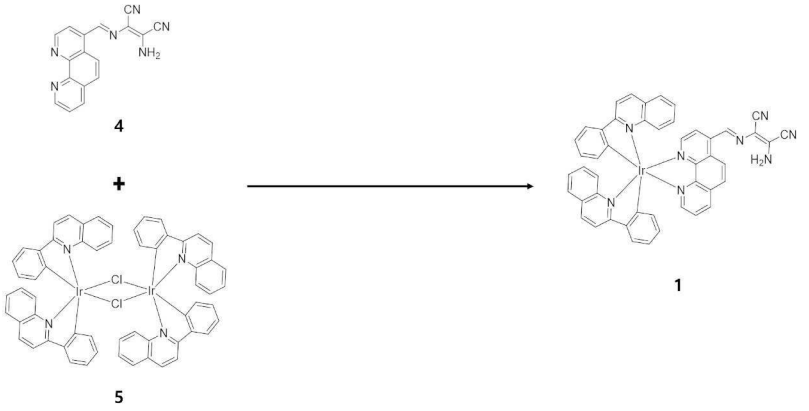
.

청구항 12

하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

화합물 4 및 화합물 5를 유기용매에서 반응하여 화합물 1을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 2]



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 활성염소종에 반응하여 발광 신호를 보이고 광역학 치료 효과를 가지는 신규한 탐침에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 자유라디칼(Free radical)이란 비공유 전자를 갖는 원자, 분자, 이온을 말하며, 이는 화학활성화가 강한 물질로서 생명활동 중 여러가지 생물화학 반응의 중간 산물이다. 생물학적인 구조에서 자유라디칼 손상은 산화적 손상과 밀접한 관련이 있으며, 산소가 전자를 하나 더 받게 되어 활성산소가 되어 세포에 미치는 세포 손상도 자유라디칼에 의한 세포 손상에 속한다. 이와 같은 자유 라디칼의 종류로는 슈퍼옥사이드 음이온(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 일산화질소 라디칼(nitric oxide radical, NO), 퍼옥시니트리트 라디칼(peroxynitrite radical, $ONOO^-$), 일중항산소(oxygen singlet), 활성염소종 및 하이드록실 라디칼(OH^-) 등이 포함된다. 이 중, 차아염소산염(hypochlorite, OCl^- 또는 ClO^-)은 면역세포(immunocytes) 내에서 H_2O_2 및 Cl^-의 MPO(myeloperoxidase)의 촉매화된 반응으로 주로 생성되고, 아미노산, 단백질, 콜레스테롤 및 뉴클레오사이드와 빠르게 반응한다. 차아염소산염은 특히, 골수과산화효소(MPO)의 활성이 증가되면 과생성되며, 이러한 골수과산화효소의 활성이 많이 증가되는 질환으로는 감염증 (류마티스, 신장질환, 염증성 장 질환 등 자가면역 또는 염증성 질환), 심혈관 질환 (동맥경화, 심부전, 심근경색 등) 또는 암 (폐암, 난소암, 정소암, 간암, 결장암, 폐암, 유방암, 혈액암 등)이 보고되고 있으므로, 이와 같은 차아염소산염(차아염소산 이온)의 중요한 기능을 이해하기 위해서, live cell에서 차아염소산염을 이미징하고, 모니터링하는 것이 필수적이다.

[0003] 한편, 광역학 치료(photodynamic therapy, PDT)는 체내에 광민감제(photosensitizer, 또는, PS로 기재함)를 주사한 후 특정 파장의 빛을 조사하여 활성 산소를 발생시킴으로써 표적 조직을 손상 및 괴사시키는 치료법이다. PDT는 수술 없이도 국소적 부위를 효과적으로 치료할 수 있어 가장 촉망받는 치료법 중 하나로 인식되어 광민감제의 개발 및 응용에 관한 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 광민감제는 무시 가능한 정도의 암세포 독성(cytotoxicity)을 보이지만, 분자 분자 산소가 있는 상태에서 광민감제를 광조사하면 type I 또는 type II 프로세스를 통해 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 형성이 촉진되고 세포 독성을 유발한다. type I 반응은 OH·, $O^{-2\cdot}$와 같은 라디칼 양이온 또는 라디칼 음이온을 생성하고, 기질과 삼중항 상태의 광민감제 사이에 광-유도 전자 이동이 이루어진다. type II 반응는, 분자 산소($^3O_2$)를 반응성이 높은 단일항 산소($^1O_2$)로 변환시킨다. 따라서, type I 프로세스는 저분자 산소 농도를 갖는 종양 저산소증 상태에서 보다 효율적인 PDT 효과를 갖는다. 효과적인 광민감제로 작용하기 위해선 특정 파장의 광 조사 후 여기된 전자가 단일항(singlet state)에서 삼중항(triplet state)으로 전이가 일어나야 하는데, 이를 위해선 대부분 중금속이 포함되어야 한다. 즉, 형광 광민감제의 여기는, 수명이 짧고 가장 낮은 단일항 여기 상태(S_1)에서 바닥상태로 빠르게 이완된다. 반면에, 중원자(heavy atom)를 코어 구조에 통합하면, ISC 프로세스(spin-forbidden intersystem crossing process)를

통해 S_1 상태에서 채워지는 낮은 삼중항 여기 상태 T_n을 포함할 수 있다. 이들의 긴 수명으로 인해, 삼중항 여기 상태는 O_2와 같은 다른 분자에 효과적으로 에너지를 전이시킬 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 신규한 활성염소종 반응성 탐침을 제공하는 것이다.

[0005] 아울러, 본 발명의 목적은 활성염소종 반응성 탐침의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 신규한 활성염소종 반응성 탐침을 제공한다.

[0007] 아울러, 본 발명은 상기 활성염소종 반응성 탐침의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 이리듐 기반 활성염소종 반응성 탐침은 활성염소종과 반응 후 생성되는 이리듐 착물이 발광 신호 변화를 나타내 관련 질환의 진단 및 이미징에 이용할 수 있으며, 생성된 이리듐 착물에 광조사하면 활성산소를 과생성하므로, 이를 광역학 치료/요법에 활용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 1H NMR 데이터를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 차아염소산 이온과의 반응식을 나타낸 도이다:

1: 화학식 1의 화합물; 및

2: 화학식 2의 화합물.

도 3은 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 OCl^-과의 반응에 따른 형광 신호 변화를 확인한 도이다:

a): OCl^- 농도에 따른 형광 스펙트럼 변화:

(pq)2Ir-phenMaleCN: 화학식 1의 탐침;

b): OCl^- 검출 선택성:

a: 탐침 단독;

b: H_2O_2;

c: OCl^-;

d: $_1O^2$(singlet oxygen);

e: ·OH(hydroxyl radical);

f: ·OOR(peroxy radical);

g: GSSG(oxidized glutathione);

h: GSH(reduced glutathione);

i: Hcy(homocysteine); 및

j:Cys(cysteine);

c) 일중항 산소의 생산 정도:

CN: 화학식 1의 탐침; 및

Ald: 화학식 2의 탐침.

도 4는 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 OCl^-과의 반응에 따른 형광 검출능을 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 광조사에 따른 세포 사멸 효과를 확인한 도이다.

도 6은 Raw264.7 세포주에서 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 형광 검출능을 나타낸 도이다.

도 7은 Raw264.7 세포주에서 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 농도에 따른 광역학 요법 효과를 확인한 도이다.

도 8은 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 OCl^- 의존적 작용을 확인한 도이다:

NT: 전처리 없음; 및

IH: 골수과산화효소 억제제 전처리.

도 9는 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 합성 과정을 나타낸 도이다:

1: 화학식 1의 화합물;

3: 화학식 3의 화합물;

4: 화학식 4의 화합물; 및

5: 화학식 5의 화합물.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0011] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0012] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0014] 일 측면에서, 본 발명은 신호 또는 광역학 치료(photodynamic therapy) 모이어티; 및 활성염소종 반응성 모이어티를 포함하는 활성염소종 반응성 탐침(probe)에 관한 것이다.

[0015] 일 구현예에서, 활성염소종은 염소 라디칼($Cl\cdot$), 이염소 라디칼($Cl_2\cdot^-$), 차아염소산(hypochlorous acid, HClO) 또는 차아염소산염(hypochlorite ion, OCl^-)일 수 있으며, 차아염소산염(OCl^-)인 것이 가장 바람직하다.

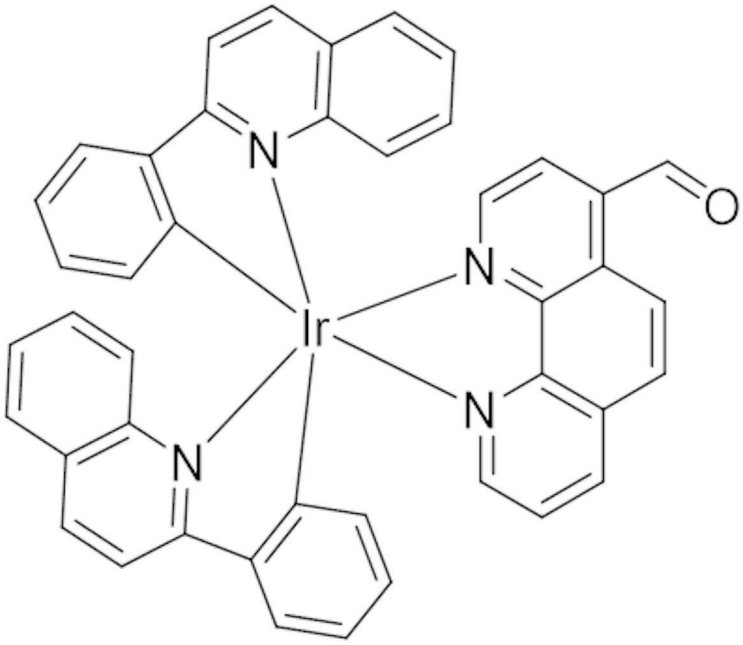
[0016] 일 구현예에서, 본 발명의 탐침은 활성염소종에 반응하여 형광(photoluminescence, PL) 신호 변화를 나타낼 수 있다.

[0017] 일 구현예에서, 본 발명의 탐침은 신호 또는 광역학 치료 모이어티는 광조사(photoirradiation)에 의해 활성 산소를 생산할 수 있다.

[0018] 일 구현예에서, 광조사 파장은 400 내지 700 nm일 수 있다.

[0019] 일 구현예에서, 상기 신호 또는 광역학 치료 모이어티는 이리듐(iridium) 착물(complex)을 포함할 수 있으며, 상기 이리듐 착물은 하기 화학식 2로 표시될 수 있다:

화학식 2

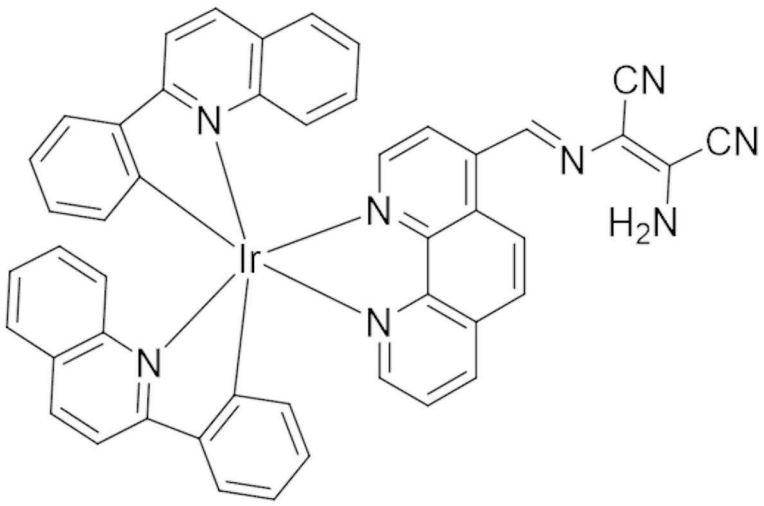
[0020] 

[0021] 일 구현예에서, 상기 활성염소종 반응성 모이어티는 디아미노말레오나이트릴 또는 이의 유도체일 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 본 발명의 탐침은 활성염소종에 반응하여 활성염소종 반응성 모이어티가 제거됨으로써 신호 또는 광역학 치료 모이어티에 의한 형광(photoluminescence, PL) 신호 변화를 나타낼 수 있고, 상기 신호 또는 광역학 치료 모이어티는 광조사에 의해 활성 산소를 생산함으로써 광역학 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명의 탐침은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

화학식 1

[0024] 

[0025] 일 구현예에서, 본 발명의 활성염소종 반응성 탐침은 차아염소산염과 도 2에 나타낸 바와 같이 반응할 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명의 활성염소종 반응성 탐침은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디아이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0027] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0028] 일 구현예에서, 본 발명의 탐침은 표지 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 표지 물질은 발색효소, 방사성동위원소, 크로모포어(chromophore), 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질(fluorescer), 상자성 입자(superparamagnetic particles) 및 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

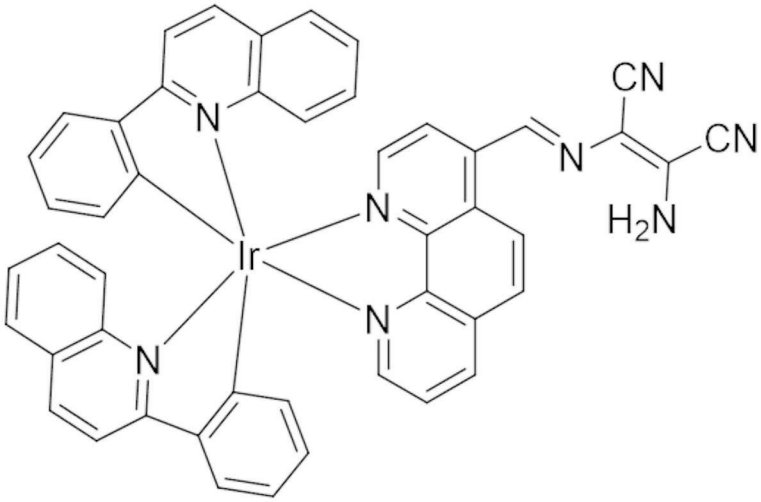
[0029] 일 구현예에서, 발색효소는 스트렙트아비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β-갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스타필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물일 수 있다.

[0030] 일 구현예에서, 형광 물질은 형광 단백질(fluorescent protein), 발광 단백질(photoprotein), 루시퍼라제(luciferase), 형광염료(fluorescent dye) 또는 시분해 형광입자 (Time-resolved Fluorescence, TRF)일 수 있으며, 형광 물질은 알렉사 플루오르 350, 405, 430, 488, 500, 514, 633, 647, 660, 680, 700, cy3, cy5, cy7, 루피(Rubpy)(tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(Ⅱ)), FITC(fluoresein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(5(6)-Carboxytetramethylrhodamine), 텍사스 레드(Texas Red), DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 및 쿠마린으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0031] 본 발명에서는 차아염소산염, hypochlorite, 차아염소산 이온, hypochlorite ion, OCl^- 및 ClO^-가 혼용될 수 있다.

[0032] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

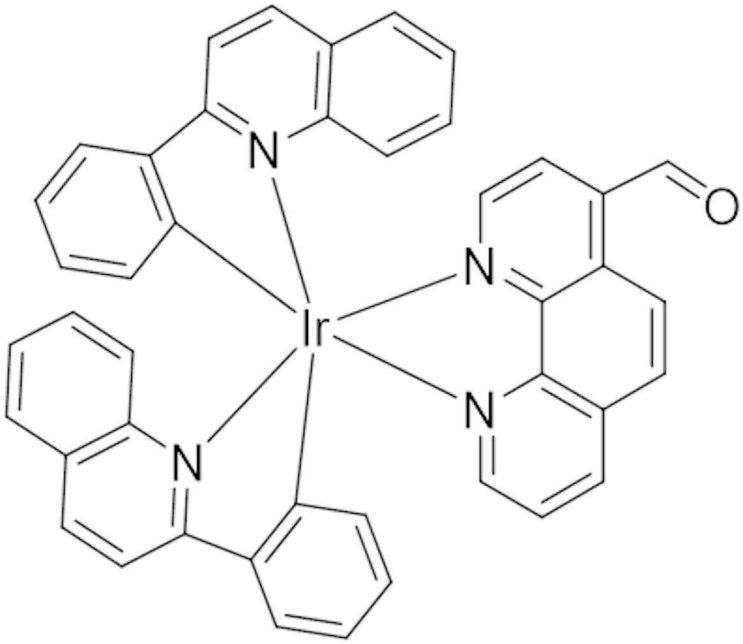
[0033] [화학식 1]



[0034] .

[0035] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

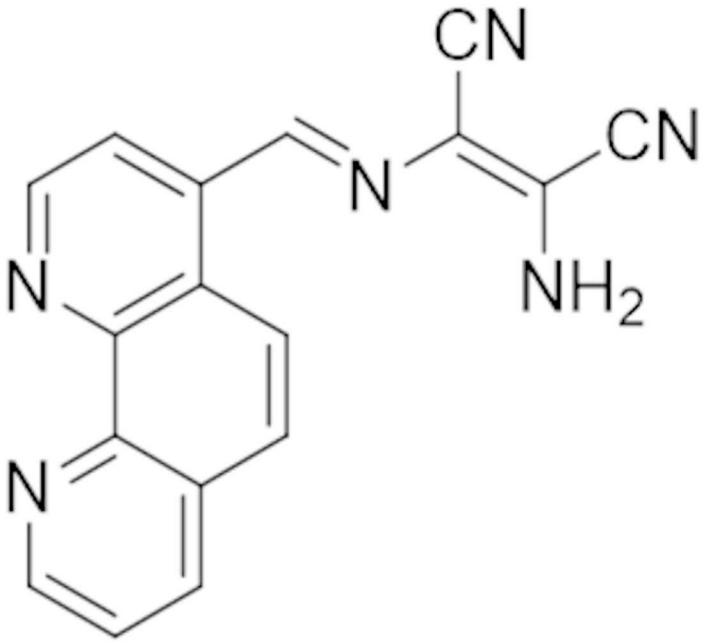
[0036] [화학식 2]



[0037] .

[0038] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 4로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

화학식 4



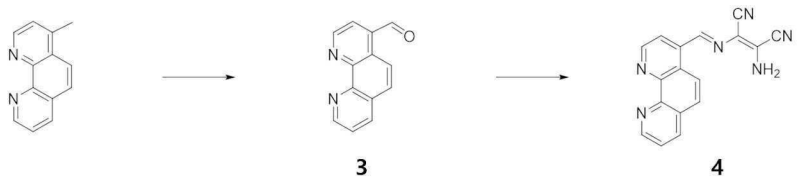
[0039]

[0040] 일 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0041] 셀레늄 디옥사이드 및 4-메틸-1,10-페난쓰롤린를 유기용매에서 반응시켜 화합물 3을 제조하는 단계 (단계 1); 및

[0042] 화합물 3 및 2,3-디아미노말레오나이트릴을 유기용매에서 반응시켜 화합물 4를 제조하는 단계 (단계 2)를 포함하는, 화학식 4로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0043] [반응식 1]



3 4

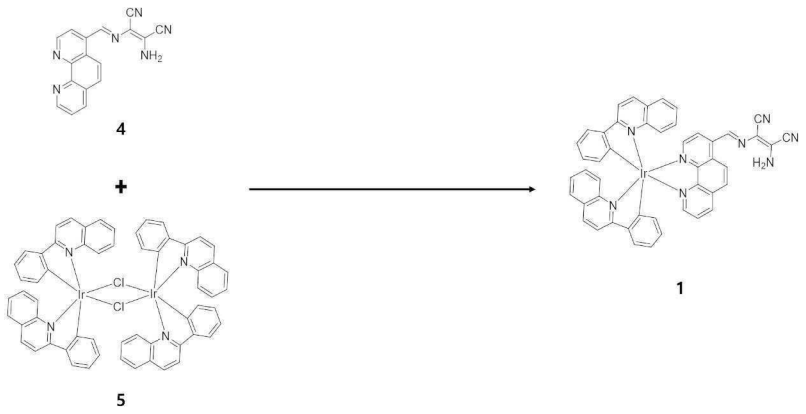
[0044] .

[0045] 일 구현예에서, 상기 유기용매는 에탄올(EtOH), 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH_2Cl_2, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 다이옥세인, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤, 클로로벤젠, 트리에탄올아민(TEA), 1,4-다이옥세인, 메틸렌클로라이드, 2-에톡시에탄올 등을 사용할 수 있다.

[0046] 일 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[0047] 화합물 4 및 화합물 5를 유기용매에서 반응하여 화합물 1을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0048] [반응식 2]



[0049] .

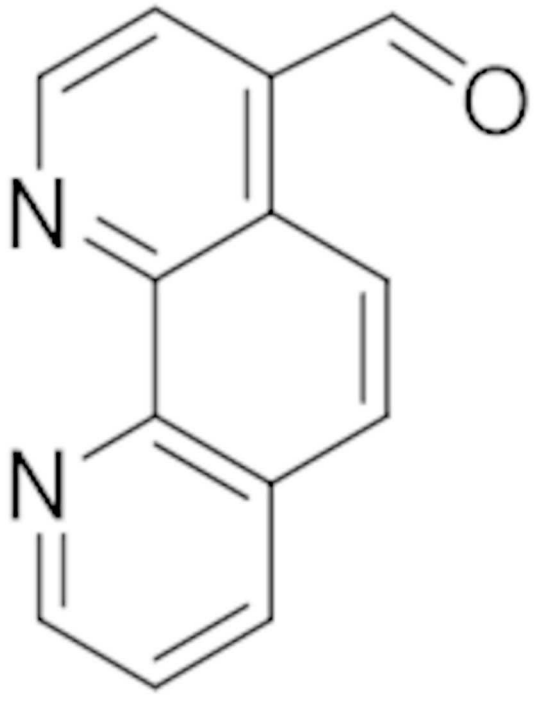
[0050] 일 구현예에서, 상기 유기용매는 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH_2Cl_2, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 다이옥세인, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤, 클로로벤젠, 트리에탄올아민(TEA), 1,4-다이옥세인, 메틸렌클로라이드, 2-에톡시에탄올 등을 사용할 수 있다.

[0051] 일 측면에서, 본 발명은 a) 보조 리간드를 합성하는 단계; b) 주 리간드를 합성하는 단계; 및 c) 주 리간드와 보조 리간드를 반응시키는 단계를 포함하는, 활성염소종 반응성 탐침의 제조방법에 관한 것이다.

[0052] 일 구현예에서, 활성염소종은 염소 라디칼($Cl\cdot$), 이염소 라디칼($Cl_2\cdot^-$), 차아염소산(hypochlorous acid, HClO) 또는 차아염소산염(hypochlorite ion, OCl^-)일 수 있으며, 차아염소산염(OCl^-)인 것이 가장 바람직하다.

[0053] 일 구현예에서, 보조 리간드는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 2,3-디아미노말레오나이트릴(2,3-diaminomaleonitrile)를 유기용매에서 반응시켜 제조할 수 있다:

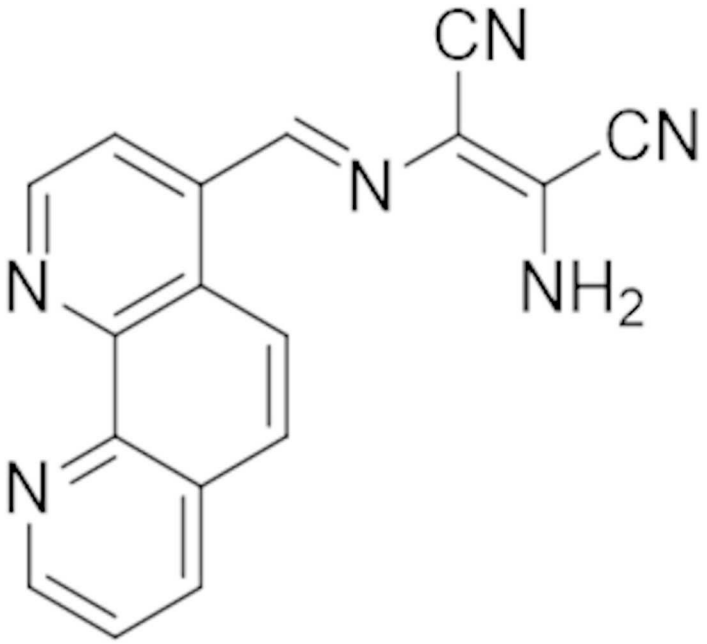
화학식 3



[0054]

[0055] 일 구현예에서, 보조 리간드는 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

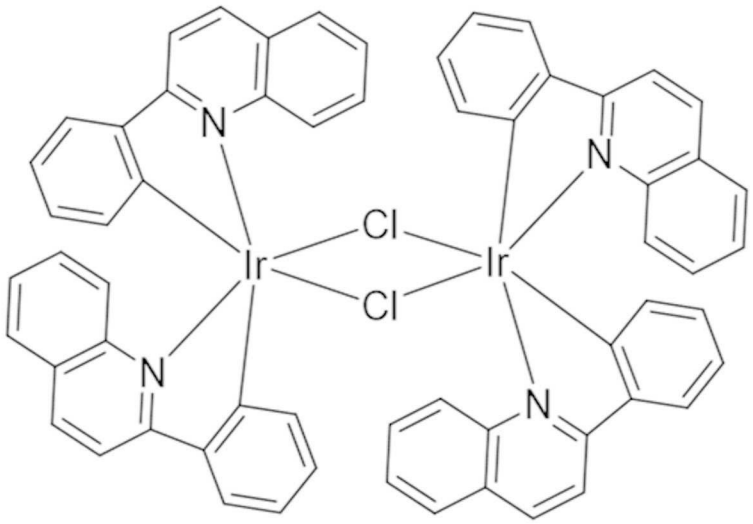
[0056] [화학식 4]



[0057] .

[0058] 일 구현예에서, 주 리간드는 하기 화학식 5로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

화학식 5



[0059]

[0060] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 활성염소종 반응성 탐침을 포함하는, 활성염소종 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0061] 일 구현예에서, 활성염소종은 염소 라디칼($Cl\cdot$), 이염소 라디칼($Cl_2\cdot^-$), 차아염소산(hypochlorous acid, HClO) 또는 차아염소산염(hypochlorite ion, OCl^-)일 수 있으며, 차아염소산염(OCl^-)인 것이 가장 바람직하다.

[0062] 일 구현예에서, 상기 조성물은 생체 내 또는 외에 활성염소종을 선택적으로 감지 및 형광 이미징할 수 있다.

[0063] 일 구현예에서, 활성염소종에 반응하여 형광 신호 변화를 나타낼 수 있다.

[0064] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 활성염소종 검출 센서에 관한 것이다.

[0065] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 활성염소종 관련 질환, 특히, 차아염소산염 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0066] 일 구현예에서, 상기 차아염소산염 관련 질환은 골수과산화효소의 활성이 증가되는 질환일 수 있으며, 자가면역 질환, 염증성 질환 등을 포함하는 감염증; 동맥경화, 심부전, 심근경색 등을 포함하는 심혈관 질환; 또는 고형암 및 혈액암을 포함하는 암일 수 있다.

[0067] 일 구현예에서, 감염증은 류머티스성 관절염, 경피증, 강직성 척추염, 뒤시엔느형 근디스트로피(Duchene muscular dystrophy; DMD), 베커형 근디스트로피(Becker muscular dystrophy; BMD), 특발성 염증성 근육병증(IIM), 다발성 근염, 산발성 봉입체 근염, 피부근염, 면역매개성 괴사성 근육병증(IMNM), 건선, 다발성 경화증, 염증성 장질환, 베체트병, 궤양성 대장염, 크론병(Crohn's disease), 쇼그렌 증후군(Sjogren's Syndrome), 기관지염, 결막염, 췌장염, 담낭염, 기관지확장증, 대동맥 판막 협착증, 재협착, 섬유증, 간염, 신장질환, 간경변, 지방성 간염, 만성 간염, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease; AD), 근위축성 측삭경화증(ALS), 헌팅턴병(Huntington's disease), 봉입체 근염, 근원섬유 근육병증(myofibrillar myopathy), GVHD 또는 다발성 골수종일 수 있다.

[0068] 일 구현예에서, 심혈관 질환은 심부전, 심근경색, 아테롬성 동맥경화증, 죽상혈전증, 관상동맥질환, 안정 및 불안정 협심증, 뇌졸중, 혈관 협착증, 혈관 재협착증 또는 급성 허혈성 심혈관질환(acute ischemic arteriovascular event)일 수 있다.

[0069] 일 구현예에서, 암은 위암, 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 또는 뇌하수체 선종일 수 있다.

[0070] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 진단 또는 검출용 조성물을 포함하는 활성염소종 관련 질환 진단 키트에 관한 것이다.

[0071] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 생체 내 또는 생체 외 이미징용 조성물에 관한 것이다.

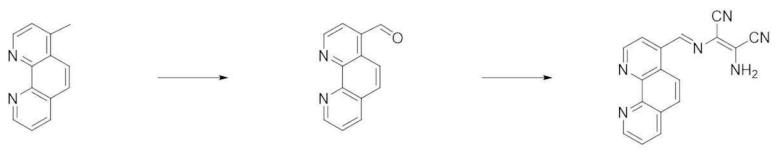
[0072] 일 구현예에서, 상기 조성물은 표지 물질을 추가로 포함할 수 있다.

[0073] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용하여 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 활성염소종을 검출하는 단계를 포함하는, 활성염소종 관련 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0074] 일 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈소판 또는 혈청일 수 있다.

[0076] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0078] **실시예 1. 보조리간드 (4) 합성**



3 4

[0079]

[0080] 1-1. 화학식 3의 화합물 합성

[0081] 셀레늄 다이옥사이드(selenium dioxide) (214 mg, 1.93 mmol, 2.5 equiv.)를 1,4-다이옥세인/물(1,4-dioxane/water) (20:1, 12 ml) 용액에 첨가하여 현탁액(suspension)을 만들고 이를 75 ℃에서 가열하였다. 가열되고 있는 현탁액에, 4-메틸-1,10-페난쓰롤린(4-methyl-1,10-phenanthroline) (150 mg, 0.77 mmol, 1equiv.)을 1,4-다이옥세인 3 mL에 녹인 용액을 천천히 방울방울 떨어뜨려 넣고, 이를 3시간 동안 가열 교반하였다. 이 후, SeO_2를 필터로 제거하고 얻은 용액의 용매를 증발기(evaporator)로 70% 정도 제거하면서 생성되는 고체를 필터하여 화학식 3의 화합물을 얻었다 (120 mg, 0.576 mmol, 수득률: 74.6%).

[0083] 1-2. 차아염소산염 반응기로서 디아미노말레오나이트릴을 포함하는 보조 리간드 합성 (4)

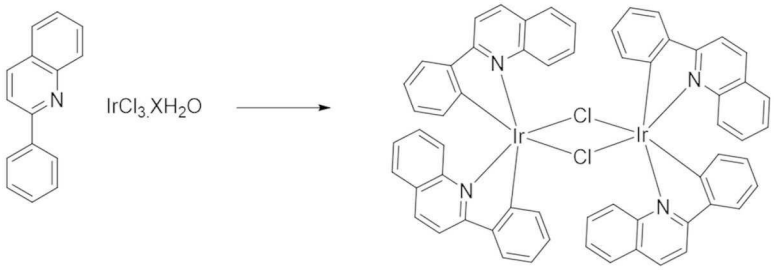
[0084] 화학식 3의 화합물 (200 mg, 0.96 mmol, 1 equiv.)을 EtOH 15 mL에 넣고 아세트산을 2~3 방울 떨어뜨린 후, 2,3-디아미노말레오나이트릴(2,3-diaminomaleonitrile) (156 mg, 1.44 mmol, 1.5 equiv.)를 넣고 67 ℃에서 밤새 가열 교반하였다. 증발기로 용매를 30 % 정도 제거하고 남은 고체를 필터하여 화학식 4의 화합물을 얻어 차가운 EtOH 및 에테르(ether)로 씻어냈다 (200 mg, 0.67 mmol, 수득률: 69.8%).

[0085] 1H NMR (400 MHz, DMSO) δ (ppm) = 9.20 (d, J=9.2 Hz, 1H), 9.14-9.13 (m, 1H), 9.05 (t, J=9.2 Hz, 1H), 8.62 (d, J=9.2 Hz, 1H), 8.56-8.54 (m, 2H), 8.45 (br, 2H, NH2), 8.13 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.82 (q, J=9.2 Hz, 1H);

[0086] 13C NMR (101 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) = 150.9, 150.7, 150.0, 147.1, 146.1, 138.5, 136.7, 129.5, 128.6, 128.5, 126.3, 124.3, 122.1, 121.6, 114.7, 103.1;

[0087] HRMS (FAB) calcd. for $C_{17}H_{10}N_6$ [M]+ 298.0967, found 298.0961.

[0089] **실시예 2. 주 리간드 (5) 합성**



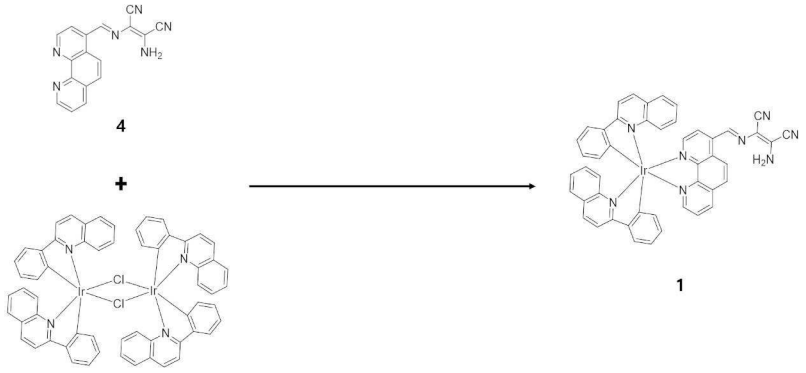
5

[0090]

[0091] IrCl3·nH2O (Aldrich, 200 mg, 0.67 mmol)와 3 equiv의 2-페닐퀴놀린(2-phenylquinoline, pq)을 2-$EtOCH_2CH_2OH$:H_2O = 3:1 (v/v)에 녹이고, 130 ℃에서 밤새 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 낮춰 생성된 침전물을 필터하여 얻은 뒤, 이를 에테르로 세척하여 침전물로써 주 리간드인 $(pq)_2IrCl$ 이합체 (화학식 5)를 수득하였다 (178 mg, 0.14 mmol, 수득률: 41.77%).

[0092] 1H NMR (400 MHz, CD3CN) δ(ppm) = 9.19 (m, 2H), 8.23 (m, 2H), 8.03 (m, 2H), 7.83 (m, 2H), 7.68 (m, 2H), 7.53 (m, 4H), 6.84 (m, 2H), 6.52 (m, 2H), 6.15 (m, 2H).

[0094] **실시예 3. 차아염소산염 반응성 이리듐 기반 탐침 합성 (1)**



[0095]

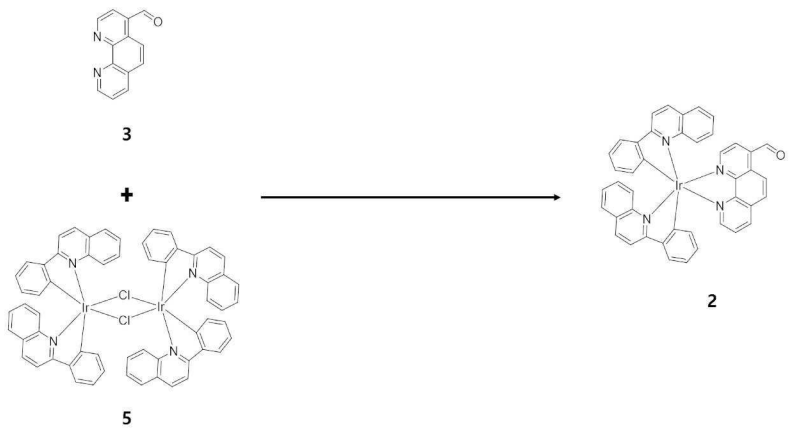
[0096] 주 리간드로서 상기 실시예 2에서 합성한 화학식 5의 $(pq)_2IrCl$ 이합체 (100 mg, 0.04 mmol)를 메틸렌 클로라이드(methylene chloride, MC) 16 mL에 녹이고, 보조 리간드로서 상기 실시예 1에서 합성한 화학식 4의 화합물 2.5 equiv을 첨가하여 밤새 환류하였다. 반응 후, 실온으로 온도를 낮춘 뒤, 용매를 제거하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 ~ CH_2Cl_2:CH_3OH = 20:1)를 이용하여 분리한 후, 이를 10 equiv. KPF6가 녹여진 MC/MeOH(5:1) 넣고 밤새 다시 교반하였다. 교반 후 필터하여 남은 KPF6를 제거하고, 용액을 증발시켜 얻은 고체 물질을 최소한의 MC에 녹이고, 에테르로 침전물을 생성하고, 이를 필터하여 최종 생산물로서 화학식 1의 화합물을 활성염소종, 특히, 차아염소산염(hypochlorite, OCl^-) 반응성 이리듐 탐침으로서 얻었다 (42 mg, 0.06 mmol, 수득률: 26%). 이렇게 제작된 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 기반 탐침은 신호 유닛 또는 광역학 치료 유닛으로서 이리듐 착물을, 차아염소산염 반응기로서 디아미노말레오나이트릴을 포함한다. 본 발명의 이리듐 기반 탐침은 차아염소산염과 반응하여 도 2와 같이 신호 물질 및 활성 산소 생성 물질로서 이리듐 착물 (화학식 2)을 방출한다.

[0097] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) = 8.81-8.74 (m, 3H), 8.63-8.55 (m, 4H), 8.49-8.47 (m, 3H), 8.36-8.32 (m, 3H), 8.13 (d, J=9.2 Hz, 1H), 8.04-8.02 (m, 1H), 7.77 (d, J=8.4 Hz, 2H), 7.24-7.18 (m, 4H), 7.07 (d, J=8.0 Hz, 1H), 6.85-6.83 (m, 4H), 6.51-6.48 (m, 2H) (도 1);

[0098] 13C NMR (101 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) = 170.3, 151.4, 151.2, 149.1, 147.5, 147.4, 146.5, 146.2, 141.0, 139.4, 134.7, 131.4, 131.1, 130.9, 130.6, 129.8, 129.1, 128.3, 128.2, 127.8, 127.8, 127.2, 125.0, 124.6, 124.0, 123.5, 118.9, 118.7, 114.3, 113.7, 104.5, 102.6;

[0099] HRMS (FAB) calcd. for $C_{47}H_{30}IrN_8$ [M]+ 899.2223, found 899.2225.

[0101] **실시예 4. 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 반응 후 생성물 (2) 합성**



[0102]

[0103] 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)이 차아염소산염과 반응한 (도 2) 후의 생성 물질인 이

리듐 착물의 신호 방출 및 활성 산소 생성 효과를 확인하기 위해, 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침(화학식 1)의 차아염소산염과의 반응 후 생성 물질인 이리듐 착물을 합성하였다. 구체적으로, 주 리간드로서 화학식 5의 $(pq)_2IrCl$ 이합체 (100 mg, 0.04 mmol)를 메틸렌 클로라이드(methylene chloride, MC) 16 mL에 녹이고, 보조 리간드로서 2.5 equiv의 화학식 3의 화합물을 첨가하여 밤새 환류하였다. 반응 후, 실온으로 온도를 낮춘 뒤, 용매를 제거하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (CH_2Cl_2 ~ CH_2Cl_2:CH_3OH = 20:1)를 이용하여 분리한 후, 이를 10 equiv. KPF6가 녹여진 MC/MeOH(5:1) 넣고 밤새 다시 교반하였다. 교반 후 필터하여 남은 KPF6를 제거하고, 용액을 증발시켜 얻은 고체 물질을 최소한의 MC에 녹이고, 에테르로 침전물을 생성하고, 이를 필터하여 최종 생산물로서 화학식 2의 화합물을 얻었다 (43.7 mg, 0.05 mmol, 수득률: 28%).

[0104] 1H NMR (400 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) = 10.53 (s, 1H), 8.86 (d, J=9.2 Hz, 1H), 8.77 (d, J=8.4 Hz, 1H), 8.73 (d, J=5.2 Hz, 1H), 8.60-8.56 (m, 2H), 8.52-8.45 (m, 3H), 8.38-8.32 (m, 3H), 8.24 (d, J=9.6 Hz, 1H), 8.09-8.05 (m, 1H), 7.78 (d, J=9.2 Hz, 1H), 7.24-7.16 (m, 4H) 7.03-6.99 (m, 2H), 6.84-6.79/(m, 4H) 6.47 (q, J=8.0 Hz, 2H);

[0105] 13C NMR (101 MHz, DMSO-D6) δ (ppm) = 192.1, 170.4, 151.0, 150.7, 149.7, 149.3, 147.4, 146.5, 146.0, 141.0, 139.5, 138.5, 134.6, 134.5, 131.5, 131.2, 130.5, 130.4, 129.8, 128.8, 128.5, 127.8, 124.5, 123.9, 123.9, 123.6, 119.0, 118.9;

[0106] HRMS (FAB) calcd. for $C_{43}H_{28}IrN_{40}$ [M]+ 809.1892, found 809.1899.

[0108] **실시예 5. 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 형광 신호 변화 확인**

[0109] 상기 실시예 3에서 합성한 탐침 (화학식 1) 5 uM을 PBS:DMF=7:3 환경에서 다양한 농도의 차아염소산염(OCl^-) (1~500 uM)과 40분 동안 인큐베이션하고, 310 nm에서 여기(excitation)하여 얻어지는 형광 스펙트럼을 확인하였다. 또한, 5uM의 탐침과 500uM의 다양한 활성화학종 (H_2O_2, OCl^-, $_1O^2$(singlet oxygen), ·OH(hydroxyl radical), ·OOR(peroxy radical), GSSG(oxidized glutathione), GSH(reduced glutathione), Hcy(homocysteine) 및 Cys(cysteine))을 40분 동안 인큐베이션하고 350nm에서 여기하여 얻어지는 형광 스펙트럼 변화를 확인하였다. 아울러, 상기 실시예 3에서 합성한 탐침 (화학식 1) 및 실시예 4에서 합성한 반응 후 탐침 (화학식 2) 5~20 uM과 ABDA(9,10-Anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid) 100 uM을 PBS:DMF=7:3 조건에 녹이고, white lamp (~45 mW/cm^2)를 0~5분간 조사하여 ABDA 흡광도 변화를 분석하였다.

[0110] 그 결과, 본 발명의 탐침인 화학식 1의 화합물은 560 nm에서 차아염소산염(OCl^-)의 농도가 증가함에 따라 형광 강도가 현저하게 증가되는 것으로 나타났다 (도 3a). 이를 통해, 본 발명의 차아염소산염 반응성 탐침인 화학식 1의 화합물이 형광 발광을 통해 차아염소산염을 검출할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 탐침인 화학식 1의 화합물은 다른 활성종에 비해 차아염소산염에 대해 현저히 높은 형광 강도를 나타내 (도 3b), 본 발명의 탐침이 차아염소산염을 특이적으로 검출할 수 있음을 확인하였다. 아울러, 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 차아염소산염과의 반응 후의 화합물인 화학식 2의 탐침이 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)에 비하여 일중항 산소(singlet oxygen)의 생성이 활발한 것으로 나타나 (도 3c), 본 발명의 탐침이 OCl^-과 반응 후 활성산소를 과생성시키는 것을 확인하였다.

[0112] **실시예 6. 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 OCl^- 생성 관련 질환 진단 효과 확인**

[0113] OCl^-는 골수과산화효소(MPO)의 활성이 증가되면 과생성되며, 이러한 골수과산화효소의 활성이 많이 증가되는 질환의 진단 도구로서의 본 발명의 탐침의 유효성을 확인하기 위해, 자궁암 세포주 (Hela), 유방암 세포주 (MCF-7) 및 폐암 세포주 (SNU-2292)를 사용하여 본 발명의 탐침의 형광 이미징 효과를 확인하였다. 구체적으로, 자궁암 세포주 (Hela), 유방암 세포주 (MCF-7) 및 폐암 세포주 (SNU-2292)를 각각 96웰 플레이트에 분주하고 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)을 10uM씩 30분 동안 처리하였다. 세포들을 세척한 뒤, LSM-700 (Confocal) 현미경으로 적색 형광 필터에서 63x 배율로 이미징하였다.

[0114] 그 결과, 본 발명의 탐침이 3가지 암세포주 모두에서 형광 이미징되는 것으로 나타났다 (도 4). 따라서, 본 발

명의 탐침의 OCl^- 생성 관련 질환의 진단 효과를 확인하였다.

[0116] **실시예 7. 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 광역학 치료 효과 확인**

[0117] 7-1. 세포 사멸 효과 확인

[0118] 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 광역학 치료/요법(photodynamic therapy) 효과를 확인하기 위해, 자궁암 세포주 (Hela), 유방암 세포주 (MCF-7) 및 폐암 세포주 (SNU-2292)를 각각 96웰 플레이트에 분주하고 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)을 10uM씩 30분 동안 처리하여 염색하였다. 30분 후 세포를 세척한 뒤, white lamp (~45 mW/cm^2)를 10분간 조사하여 광역학 반응을 유도하고, 24시간 후에 세포 생존력 분석 키트로 세포 생존력을 확인하였다.

[0119] 그 결과, 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침이 약 20 내지 50%의 암세포 사멸 효과를 나타내 (도 5), 본 발명의 탐침이 광조사(photoirradiation)에 의해 활성화되어 세포 사멸을 유발하므로, OCl^- 의존적 환경에서 효과적으로 광역학 요법/치료에 활용할 수 있음을 확인하였다.

[0121] 7-2. 농도에 따른 세포 사멸 효과 확인

[0122] 대식 세포주인 Raw264.7에서 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 형광 이미징 효과를 확인하고 (도 6), 탐침의 농도에 따른 광역학 요법 효과를 확인하기 위해, Raw264.7 세포에 탐침을 0.5 uM ~ 50 uM로 30분 동안 처리한 뒤, 세포를 세척하고, white lamp (~45 mW/cm^2)를 10분간 조사하여 광역학 반응을 유도한 후, 세포 생존율을 확인하였다.

[0123] 그 결과, 2 uM 내지 20 uM 농도의 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)이 현저한 세포 사멸 효과를 가지는 것을 확인하였다 (도 7).

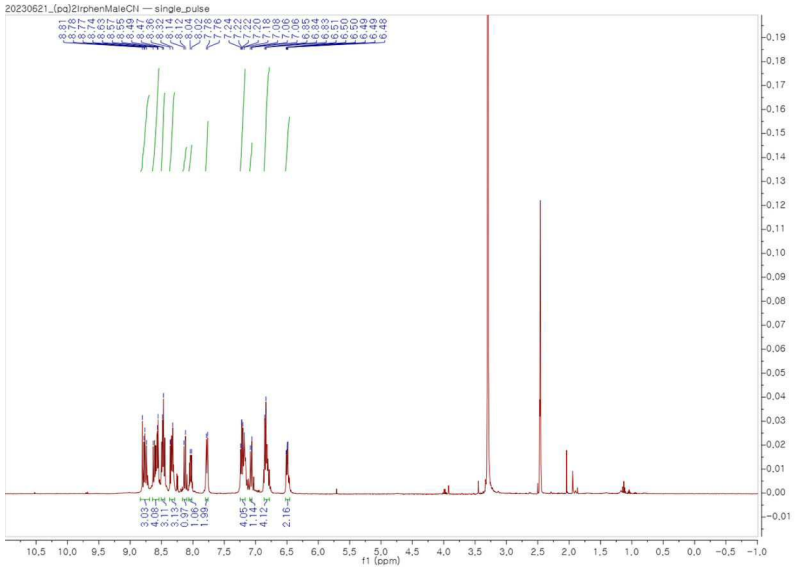
[0125] **실시예 8. 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침의 OCl^- 의존적 작용 검증**

[0126] 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 작용이 OCl^- 의존적임을 확인하기 위해, 골수과산화효소의 억제제를 다양한 세포주에 처리하고 탐침의 형광 강도를 확인하였다.

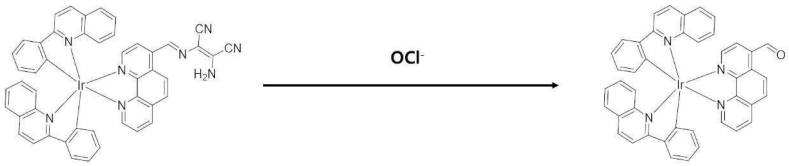
[0127] 그 결과, 골수과산화효소의 억제제를 전처리했을 때, 폐암 세포주인 A549 및 대식 세포주인 Raw264.7에서 탐침의 형광 강도가 다른 세포주에 비해 현저히 감소하는 것으로 나타나 (도 8), 본 발명의 차아염소산염 반응성 이리듐 탐침 (화학식 1)의 작용이 OCl^- 의존적임을 확인하였다.

도면

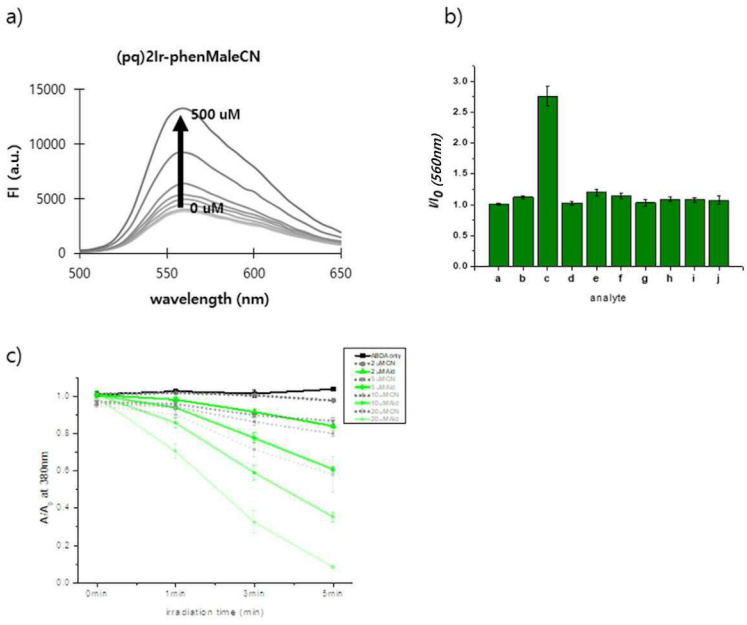
도면1



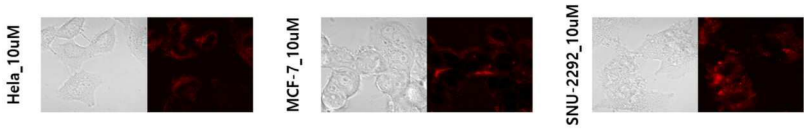
도면2



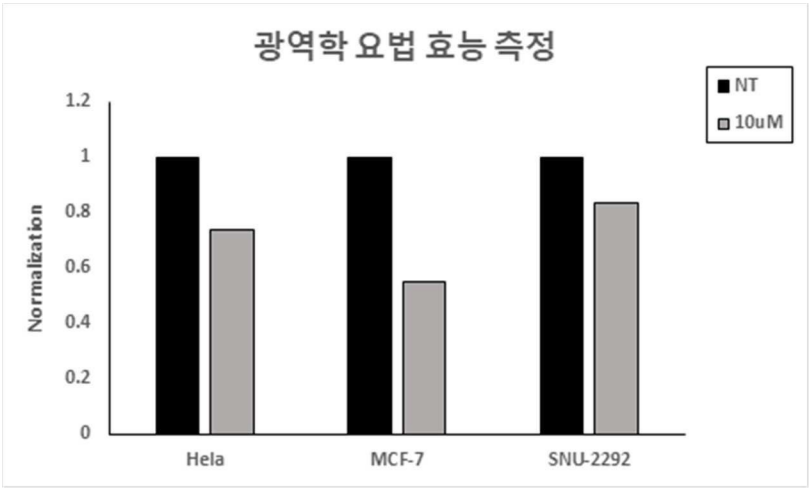
도면3



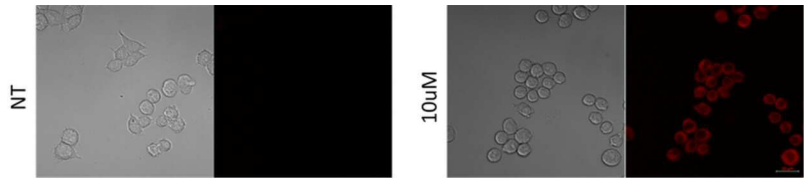
도면4


Hela_10uM
MCF-7_10uM
SNU-2292_10uM

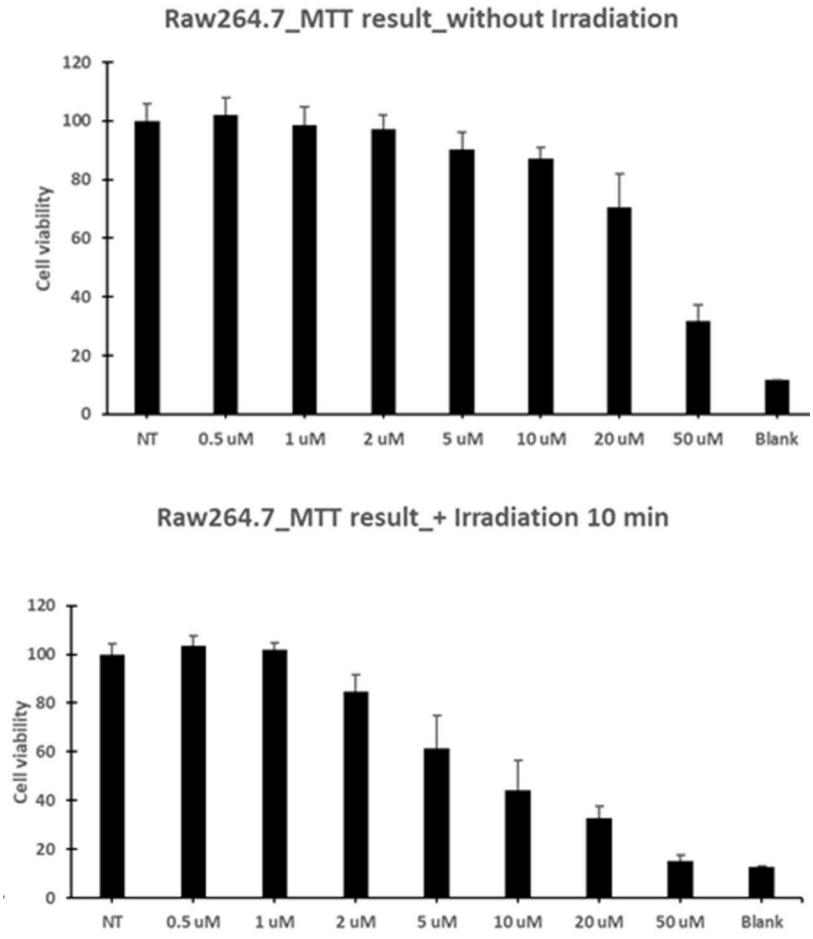
도면5


광역학 요법 효능 측정
NT
10uM
Normalization
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Hela
MCF-7
SNU-2292

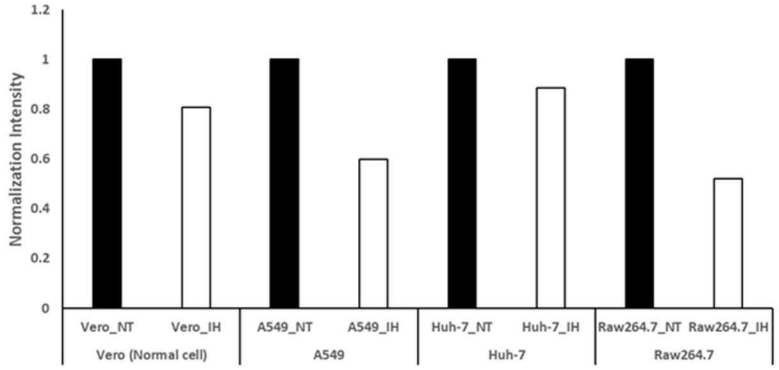
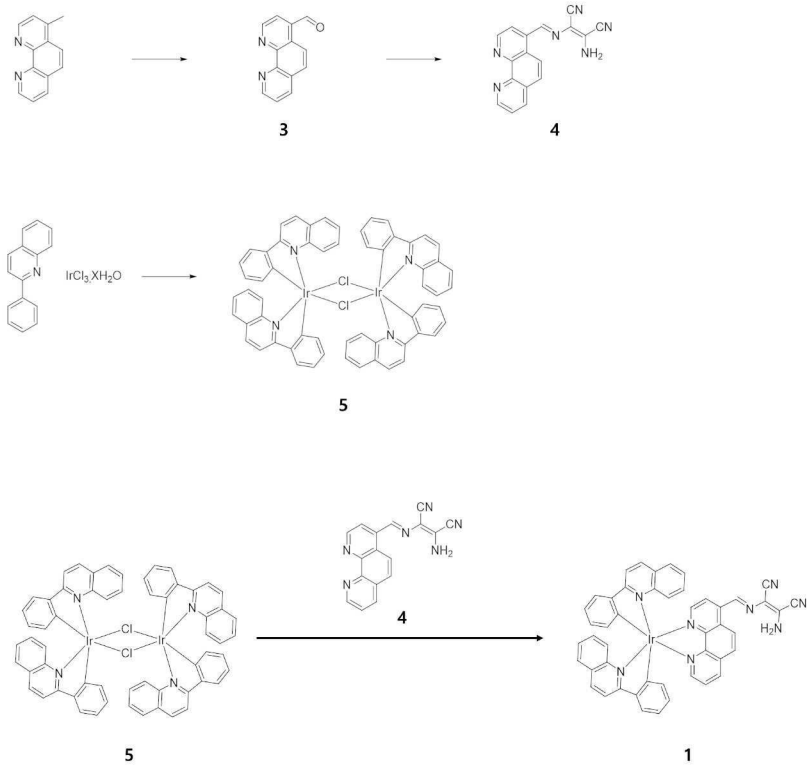
도면6


NT
10uM

도면7


Raw264.7_MTT result_without Irradiation
Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
NT
0.5 uM
1 uM
2 uM
5 uM
10 uM
20 uM
50 uM
Blank
Raw264.7_MTT result_+ Irradiation 10 min
Cell viability
120
100
80
60
40
20
0
NT
0.5 uM
1 uM
2 uM
5 uM
10 uM
20 uM
50 uM
Blank

도면8


Normalization Intensity
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Vero_NT
Vero_IH
Vero (Normal cell)
A549_NT
A549_IH
A549
Huh-7_NT
Huh-7_IH
Huh-7
Raw264.7_NT
Raw264.7_IH
Raw264.7

도면9