(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0012504
(43) 공개일자 2020년02월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07C 251/86 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07C 251/86 (2013.01)
G01N 21/6486 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0087874
(22) 출원일자 2018년07월27일
심사청구일자 2018년07월27일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
유자형
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
최후연
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
김채규
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

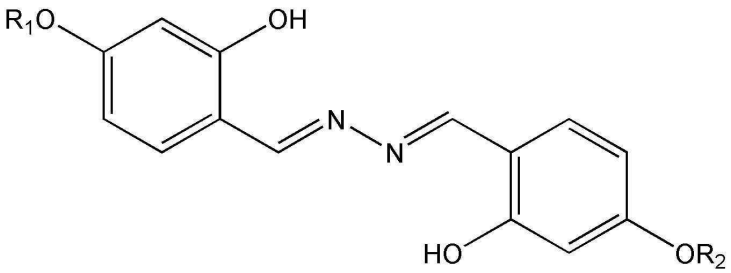
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **단백질 검출용 응집-유도된 발광 분자 및 이를 이용한 단백질 검출 방법**

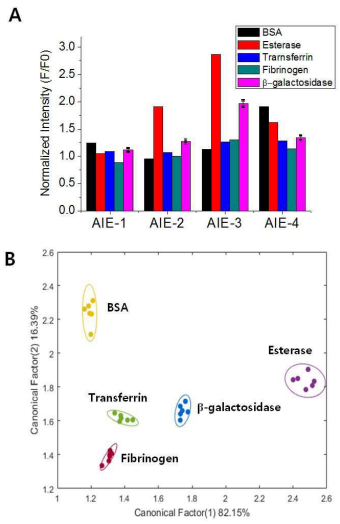
(57) 요 약

단백질을 검출하는데 사용하기 위한 하기의 화학식 I로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염에 관한 것이다.

[화학식 I]



대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
G01N 33/68 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711063956
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 미토콘드리아 안에서의 펩타이드 자기조립에 의한 선택적 노화세포 제거를 통한 생체조직의 재생능력 회복
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711050025
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(미래부)
연구과제명 세포 소기관 표적 자기조립을 통한 새로운 항암치료 연구
기 여 율 1/2
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

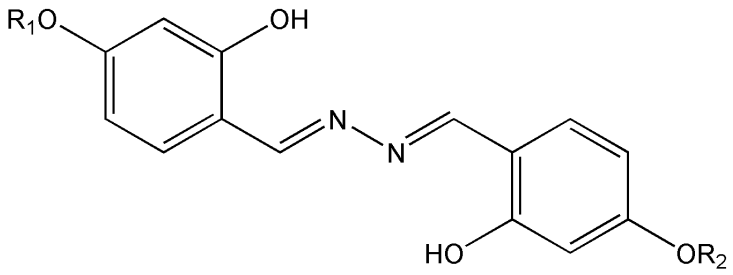
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기의 화학식 I로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염:

[화학식 I]



상기 화학식 I 중,

R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(Q_1)$, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)-N(Q_1)(Q_2)$ 및 $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)\ N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$ 중 선택되는 것이고,

Q_1, Q_2, Q_3 및 Q_4는 서로 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록실기, 아민, C_1-C_6 알킬기, C_2-C_6 알케닐기, 및 C_2-C_6 알카이닐기 중 선택되는 것이고,

a는 0 내지 6의 정수이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$ 및 $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$ 중 선택되는 것이고,

Q_1, Q_2 및 Q_3 는 서로 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬기, C_2-C_6 알케닐기, 및 C_2-C_6 알카이닐기 중 선택되는 것이고,

Q_4는 히드록실기인 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염:

나머지는 상기한 바와 같다.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

R_1 및 R_2 는 수성 용액에서 전하를 갖는 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염:

나머지는 상기한 바와 같다.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 하기의 AIE-1 내지 AIE-4의 화합물로 이루어진 군에서 선택되는 것인 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염:

1) 2,2'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 다이아세트산;

2) 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메탄일일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시) (N,N,N-트라이메틸프로판-1-아미니움);

3) 6,6'-((1E,1'E)-하이드라진-1,2-디일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-(3-(다이메틸아미노)프로폭시)페놀); 및

4) 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 비스 (프로판-1-설폰산).

청구항 5

청구항 1의 화합물 또는 이의 염을 포함하는 단백질 검출용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 수용성인 것인 단백질 검출용 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 화합물 또는 이의 염은 단백질과 응집하여 형광을 여기하는 것인 단백질 검출용 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 표적 단백질의 농도를 측정하기 위한 것인 단백질 검출용 조성물.

청구항 9

청구항 5의 단백질 검출용 조성물을 시료와 접촉시키는 단계; 및

접촉된 시료에서 여기되는 형광을 측정하는 단계를 포함하는 단백질 검출 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 시료는 복수의 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 시료는 상이한 농도의 복수의 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 방법은 측정된 형광 값에 선형 판별 분석법(LDA)을 적용하여 특징데이터를 구축함으로써 단백질을 분류하는 단계를 더 포함하는 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 방법은 단백질 부재시 측정된 형광 세기에 대한 단백질 존재시 측정된 형광 세기의 비율 값, 또는 단백질 존재시 측정된 형광 세기에 대한 단백질 부재시 측정된 형광 세기의 차이 값을 산출하는 단계를 더 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 응집-유도된 여기 현상을 기반으로 단백질을 검출할 수 있는 민감하고 빠른 "턴 온" 센서 물질 및 이를 이용한 하나 이상의 단백질을 포함하는 시료에서 각 단백질을 검출 및 동정하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 특정 단백질 농도의 증가/감소는 많은 질병의 발생과 관련되기 때문에 빠르고, 정확하고, 정밀한 단백질의 검출은 진단 분야에서 매우 중요하다[1]. 그러나, 단백질의 신속한 동정을 위한 감지 도구의 개발은 이들의 복잡성 및 구조적 다양성 때문에 여전히 어려운 과제로 남아있다. 전통적으로, 단백질의 감지 도구로서 단일 또는 다중 진단 플랫폼에서 단백질의 검출을 위한 항원-항체 또는 앱타머-항체 상호작용에 초점을 맞춘 "자물쇠 및 열쇠(lock and key)" 이론이 사용된다[2-6]. 이러한 전략은 실용적이지만, 질병 진행에 종종 돌연변이가 일어나는 단백질의 경우 그에 대한 완전한 특성화를 요구한다[7]. 대안적으로, 선택성에 기초한 양식을 가진 다중 특이적 단백질의 결합된 인식을 이용하는 분석-기반된 감지 시스템이 개발되어 분석물과 수용체 사이의 고도의 특이성을 요구하지 않는 편리하고 신속한 방법을 보여주었다.

[0003] 성공적인 분석-기반 감지 시스템을 개발하기 위해, 분석물과 수용체는 서로 다른 반응을 보이는 특이적인 선택성을 가져야 한다. 이러한 관점에서, "화학적 또는 인공적 코 (chemical and artificial nose)" 전략이 개발되어 개별적인 분석물과 일련의 반응 패턴을 보이는 교차반응성 수용체 사이의 상호작용을 통해 다양한 단백질을 검출하고 구별하였다[8,9]. 최근에는, 상이한 형광 반응을 갖는 포르피린[10], 폴리머[11], 단백질-나노입자 복합체[12], 및 합성적 폴리머-나노입자 복합체를 활용하는 것을 포함하여 다양한 분석-기반 단백질 감지 시스템이 개발되었다[13]. 게다가, 분석-기반 센서는 플라보노이드, 적포도주 품종[14], 당류[15], 금속 이온[16], 아미노산[17], 및 세포[18]를 포함하여 다양한 중요한 분석물을 구별하가 위해 조사되었다. 대부분의 연구는 하나의 수용체 및 여러 지표를 요구하는 경쟁적 결합을 이용한 분석-기반 센서에 대해 보고하였다. 만약 하나의 분자가 지표 및 수용체의 역할을 모두하고, 단백질 결합 후 여기 패턴이 단백질에 따라 상이하면, 형광 분자 및 특이적 단백질 사이의 직접적 결합을 활용하는 기술이 보다 편리하고 정밀한 분석-기반 감지 시스템이 될 것이다. 여기에, 본 발명자들은 단백질 및 응집-유도된 여기 발광체 (aggregation-induced emission luminogen; AIEgen) 간의 친화도에 기반한 빠르고, 정확하고, 단순한 "턴 온" 단백질-감지 플랫폼을 제시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 일 양상은 빠르고, 정확하고, 쉬우면서도 단백질의 농도 측정 및 복수의 단백질을 동시에 식별할 수 있는 응집-유도된 여기 발광체인 단백질 검출용 조성물에 관한 것이다.

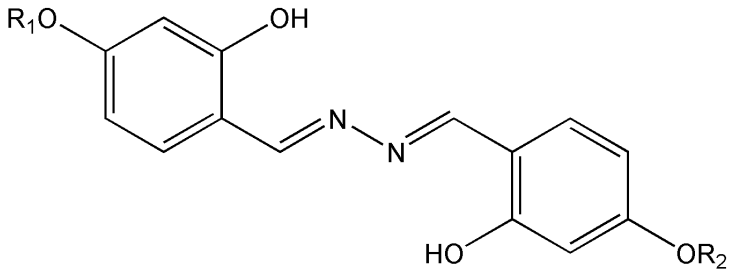
[0005] 본 발명의 다른 양상은 시료 내 단백질 검출 및 동정, 또는 질병 진단에 적용할 수 있는 상기 단백질 검출용 조성물을 이용한 단백질 검출 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 일 양상은,

[0007] 하기의 화학식 I로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염:

[0008] [화학식 I]

[0009] 

[0010] 상기 화학식 I 중,

[0011] R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(Q_1)$, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)-N(Q_1)(Q_2)$ 및 $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)\ N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$ 중 선택되는 것이고,

[0012] Q_1, Q_2, Q_3 및 Q_4는 서로 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록실기, 아민, C_1-C_6 알킬기, C_2-C_6 알케닐기, 및 C_2-C_6 알카이닐기 중 선택되는 것이고,

[0013] a는 0 내지 6의 정수이다.

발명의 효과

[0014] 일 양상에 따른 단백질 검출용 조성물 및 방법에 의해서, 단백질 및 응집-유도된 여기 발광체 (AIEgen) 간의 친화도에 기반하여 빠르고, 정확하고, 쉽게 혼합물 내 단백질을 검출 및 동정할 수 있다.

[0015] 일 양상에 따른 단백질 검출용 조성물은 하나 이상의 단백질의 혼합물에서, 각 단백질을 동정할 수 있다. 일 구체예에 따른 방법은 선형 판별 분석을 수행하는 단계를 더 포함하여 더욱 유의하고 성공도 높게 다수의 단백질을 구별할 수 있도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1A는 일 구체예에 따른 형광-패턴 인식에 기반한 단백질 센서의 작동 방식을 도식화 것이고, 도 1B는 일 구체예에 따른 AIEgen 및 다섯 종류의 단백질을 포함하는 분석을 이용한 "턴 온" 형광 센서 및 형광 강도의 정규화(normalization)에 따른, LDA에 의한 각 단백질 분류 방법을 도식화한 것이다.

도 2A 내지 2C는 물-THF 혼합물 및 물에서의 AIE 현상을 광학적으로 나타낸 것으로서, 도 2A는 UV-vis 흡광도스펙트럼 및 도 2B는 각각 물 (검은선) 및 물/THF (v/v, 5:95) (적색 선)의 혼합물에서 AIE-1의 형광 스펙트럼을 나타내고, 도 2C는 500 nM의 에스터라제 첨가 전후 AIE-2의 에스터라제의 부재 및 존재 하에 형광 스펙트럼을 나타낸다. λ_{ex}= 365 nm; [AIE-1] = 40 μM.

도 3A 내지 3C은 물 (검은선) 및 H_2O/THF (v/v, 5:95) (붉은선) 중의 UV-Vis 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것으로서, 도 3A는 AIE-2, 도 3B는 AIE-3 및 도 3C는 AIE-4의 UV-Vis 흡광도 스펙트럼을 나타낸 것이다. [AIEgen] = 40 μM.

도 4A 내지 4D는 THF의 물에 대한 점진적 첨가 (0%, 30%, 60%, 90% 및 95%)에서 형광 스펙트럼을 나타낸 것으로서, 각각 AIE-1, AIE-2, AIE-3 및 AIE-4의 형광 스펙트럼이다. λ_{ex}= 365 nm [AIEgen] = 40 μM.

도 5는 에스터라제의 부재 및 존재 하에서 AIE-2의 형광 스펙트럼을 나타낸다. (삽입된 그림은 500 nM 에스터라제 첨가 전후의 AIE-2 용액 이미지) λ_{ex}= 365 nm; [AIE-2] = 40 μM.

도 6A 및 6B는 상온에서 수 중 실시예에 따른 AIEgen (40 μM)을 이용하여 5 개의 단백질 (500 nM)에 대한 어레이-기반 감지 결과를 보여준다. 도 6A는 5 개의 단백질 (BSA, 에스터라제, 트랜스페린, 피브리노겐, 및 β-갈락토시다제)의 존재 하에서 합성된 AIE들의 형광 패턴을 평행으로 6회 측정하여 그 평균값을 나타낸 것이다. 도 6B는 2D 플롯을 사용한 LDA 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7A 및 7B는 분석-기반된 상이한 농도에서의 BAS 및 에스터라제의 감지 및 구별을 나타낸다. 도 7A는 200 nM, 500 nM, 1 μM 및 2 μM의 BSA 및 에스터라제의 존재 하에 AIE-1 내지 AIE-4 (40 μM)의 형광 패턴을 평행으로 6회 측정하여 그 평균값을 나타낸 것이다. 도 7B는 95 % 타원 컨피던스의 2D 플롯을 사용한 LDA 분석 결과를 나타낸다.

도 8A 및 8B는 4 %의 FBS 용액 중 세 가지 AIEgen (40 μM)의 분석-기반된 단백질 (1 μM)의 검출을 보여준다.

도 8A는 단백질 (BSA, 에스터라제 및 β-갈락토시다제)의 존재하에 합성된 AIEgen (AIE-1 내지 AIE-4)의 형광 패턴을 순차적 형광 실험을 수행한 결과로서, 각 수치는 4 회의 평행 실험의 평균이다. 도 8B는 95 % 타원 컨피던스로 2D를 이용한 LDA 분석을 나타낸다.

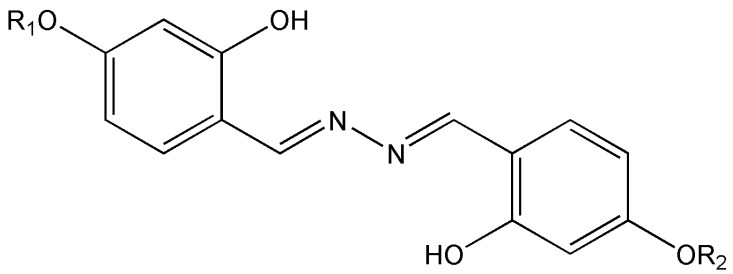
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0018] 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. 또한, 본 명세서에 기재된 수치는 명시하지 않아도 "약"의 의미를 포함하는 것으로 간주한다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 본 명세서에 참고로 통합된다.

[0019] 일 양상은, 하기의 화학식 I로 표시되는 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염을 제공한다:

[0020] [화학식 I]

[0021] 

[0022] 상기 화학식 I 중,

[0023] 상기 화학식 I 중,

[0024] R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(Q_1)$, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-O-C(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-C(=O)O(Q_1)$, $-(CH_2)_a-S(=O)(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)S(=O)_2(Q_4)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=O)-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-S(=O)_2-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-P(=O)(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)-N(Q_1)(Q_2)$ 및 $-(CH_2)_a-N(Q_1)-C(=NH)\ N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$ 중 선택되는 것이고,

[0025] Q_1, Q_2, Q_3 및 Q_4는 서로 독립적으로 수소, 할로겐, 히드록실기, 아민, C_1-C_6 알킬기, C_2-C_6 알케닐기, 및 C_2-C_6 알카이닐기 중 선택되는 것이고,

[0026] a는 0 내지 6의 정수이다.

[0027] 본 명세서에서 용어 "할로겐"은 F, Cl, Br, 또는 I일 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 용어 "알킬"은 다른 언급이 없으면, 치환 또는 비치환될 수 있는, 직쇄형, 또는 분지형의 탄화수소 잔기를 의미한다. 상기 알킬기는 예를 들면, 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 또는 이소프로필, 이소부틸, 및 t-부틸과 같이 이들의 가능한 모든 이성질체들을 제한없이 포함할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "알콕시"는 다른 언급이 없으면, 치환 또는 비치환될 수 있는, 직쇄형, 또는 분지형 탄화수소 잔기가 산소로 연결된 것을 나타낸다. 상기 알콕시는 예를 들면, 메톡시, 에톡시, 프로폭시, 및 부톡시, 또는 이소프로폭시, 이소부톡시, 및 t-부톡시와 같이 이들의 가능한 모든 이성질체들을 제한없이 포함할 수 있다.

[0030] 본 명세서에서 용어 "알케닐"은 상기한 알킬과 길이 및 치환 가능성에서 유사하지만, 하나 이상의 탄소-탄소 이중결합을 함유하는 불포화 지방족기를 나타낸다. 예를 들면, 에테닐, 프로페닐, 부테닐, 펜테닐, 헥세닐, 및 분

지쇄 알케닐기, 또는 이들의 (E) 또는 (Z)와 같은 모든 이성질체를 제한없이 포함할 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 용어 "알카이닐"은 상기한 알킬과 길이 및 치환 가능성에서 유사하지만, 하나 이상의 탄소-탄소 삼중결합을 함유하는 불포화 지방족기를 의미한다. 예를 들면, 에티닐, 프로피닐, 부티닐, 펜티닐, 헥시닐, 및 분지쇄 알키닐기 등 제한없이 포함할 수 있다.

[0032] 본 명세서에서 용어 "내지"를 이용하여 표시된 수치 범위는 용어 "내지" 전과 후에 기재되는 수치를 각각 하한 및 상한으로서 포함하는 범위를 말한다.

[0033] 본 명세서에서 용어 "용매화물(solvate)"은 비공유적 분자간력에 의해 결합된 화학양론적 또는 비화학양론적 량의 용매를 포함하고 있는 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있다. 그에 관한 바람직한 용매들로는 휘발성, 비독성, 및/또는 인간에게 투여되기에 적합한 용매들일 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "입체 이성질체"는 동일한 화학식 또는 분자식을 가지지만 광학적 또는 입체적으로 다른 본 발명의 화합물 또는 그것의 염을 의미할 수 있고, 구체적으로, 부분입체이성질체, 거울상이성질체, 기하이성질체, 또는 형상이성질체일 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "유도체(derivative)"는 상기 화합물의 구조 일부를 다른 원자나 원자단으로 치환하여 얻어지는 화합물을 말한다.

[0036] 일 구체예에서, 상기 화학식 I 중,

[0037] R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$, $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$ 및 $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$ 중 선택되는 것이고,

[0038] Q_1, Q_2 및 Q_3 는 서로 독립적으로 수소, C_1-C_6 알킬기, C_2-C_6 알케닐기, 및 C_2-C_6 알카이닐기 중 선택되는 것이고,

[0039] Q_4 가 히드록실기일 수 있다.

[0040] 일 구체예에서, 상기 화학식 I의 화합물 중, R_1 및 R_2 는 수성 용액에서 전하를 갖는 것일 수 있다. 상기 전하는 음전하 또는 양전하로서, 상기 화합물은 용액에 용해되기 전에는 중성이더라도, 양성자에 의해서 음전하 또는 양전하로 변하는 것일 수 있다. 예를 들어, 화학식 I 중, R_1 및 R_2가 서로 독립적으로 $-(CH_2)_a-N(Q_1)(Q_2)$ 또는 $-(CH_2)_a-N^+(Q_1)(Q_2)(Q_3)$의 경우, 상기 화합물은 양전하를 가질 수 있고, $-(CH_2)_a-C(=O)(Q_4)$ 및 $-(CH_2)_a-S(=O)_2(Q_4)$이고 Q_4 가 히드록실기인 경우, 상기 화합물은 음전하를 갖는 것 (예를 들어, $-(CH_2)_a-C(=O)-O^-$ 또는 $-(CH_2)_a-S(=O)_2-O^-$)일 수 있다. 상기 전하를 갖는 화학식 I의 화합물은 안정성을 위해 적절한 염을 형성한 것일 수 있다 (예를 들어, $-(CH_2)_a-C(=O)-O^-Na^+$ 또는 $-(CH_2)_a-S(=O)_2-O^-Na^+$).

[0041] 일 구체예에서, 상기 화학식 I의 화합물은 하기의 화합물 1 내지 4로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다:

[0042] 1) 2,2'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 다이아세트산;

[0043] 2) 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메탄일일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시) (N,N,N-트라이메틸프로판-1-아미니움);

[0044] 3) 6,6'-((1E,1'E)-하이드라진-1,2-디일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-(3-(다이메틸아미노)프로폭시)페놀); 및

[0045] 4) 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 비스 (프로판-1-설폰산).

[0046] 다른 양상은 상기 일 양상 또는 일 구체예에 따른 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염을 포함하는 단백질 검출용 조성물을 제공한다.

[0047] 상기 일 양상 또는 일 구체예에 따른 화합물, 용매화물, 입체 이성질체 또는 이들의 염은 단백질과 접촉되어 응집-유도된 여기 발광체 (aggregation-induced emission luminogen; AIEgen)로서 작동한다. 따라서 일 구체예에

따른 단백질 검출용 조성물은 단백질 및 AIEgen 간의 친화도에 기반하여 빠르고, 정확하고, 단순한 작동방식을 갖는 "턴 온" 단백질-감지 플랫폼을 제공할 수 있다. 응집-유도된 여기 물질인 AIE는 "턴 온" 형광-센서를 포함한 생물학적 이미징 및 감지를 위한 새로운 플랫폼으로서 이용될 수 있다[19]. AIEgen은 용액 내 분자 내 회전이 자유로우면 아무런 신호를 보여주지 않고, 응집 상태 하에 이들의 분자적 구조(conformation)가 제한될 때 강한 형광 신호를 보여준다. 본 발명자들은 하기의 시험예에서 일 구체예에 따른 상이한 작용기를 갖는 본 발명의 AIEgen을 이용하여 단백질을 구별할 수 있는 단분산적(monodispersive)이고 재현성 있는 화학적-코(chemical-nose) 시스템으로 작동할 수 있음을 입증하였다. AIEgen은 단백질 결합하여 비-공유결합성 상호작용인 정전기적 및 소수성 상호작용에 따른 친화도에 의존하여 특이적인 형광 반응을 나타낸다. 이러한 상호작용을 유발하기 위해, R_1 및 R_2는 전하를 갖거나 적어도 수성 용액에서 상기 화학식 I의 화합물이 쉽게 전하를 갖는 분자가 될 있도록 하는 작용기인 것이 바람직하다. 상기 특이적인 형광 반응에 기반하여, 선형 판별 분석 (linear discriminant analysis; LDA)을 수행하면, 단백질 패턴을 구별하고 동정할 수 있었다. 이러한 결과는 일 구체예에 따른 수용성의 AIEgen이 분석-기반 시스템의 개발에 사용하는데 새로운 단백질-감지 프로브로서 적용될 수 있음을 의미한다.

[0048] 일 구체예에서, 상기 화합물 또는 이의 염은 혼합물로 사용될 수 있다. AIE 각각은 특정 단백질 및 그 농도에 따라 특이적인 흡광도 및 세기의 형광을 발산하는 것이 확인되었다. 따라서, 각 AIE의 값을 모집하여 정규화하거나 및/또는 선형 판별 분석함으로써 표적 단백질을 높은 유의성으로 검출할 수 있다.

[0049] 일 구체예에서, 상기 화합물 또는 이의 염은 수용성일 수 있다.

[0050] 일 구체예에서, 상기 화합물 또는 이의 염은 단백질과 응집하여 형광을 여기하는 것일 수 있다. 상기 응집은 단백질 및 AIEgen 간의 정전기적 및/또는 소수성 상호작용에 의한 것일 수 있다.

[0051] 일 구체예에서, 단백질 검출용 조성물은 표적 단백질의 농도를 측정하기 위한 것일 수 있다.

[0052] 또 다른 양상은, 일 양상 또는 일 구체예에 따른 단백질 검출용 조성물을 시료와 접촉시키는 단계; 및 접촉된 시료에서 여기되는 형광을 측정하는 단계를 포함하는 단백질 검출 방법을 제공한다.

[0053] 상기 형광을 측정하는 단계는 예를 들어, 형광 흡광도 (absorbance) 및/또는 형광 세기 (intensity)를 측정하는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명자들은 AIE 특성을 기반으로 단백질을 구별할 수 있는 민감하고 빠른 "턴 온"센서를 개발하였다. 하기의 시험예에서 입증한 바와 같이, AIEgen-단백질 친화성과 관련된 형광 패턴은 AIE 작용기와 단백질 사이의 비특이적인 정전기 상호 작용 및 소수성 상호 작용에 의존하여 구별화가 가능하도록 하였다. 특이적인 AIEgen에 대해 더 강한 친화도을 갖는 단백질은 더 높은 형광 강도를 나타내어 각 단백질에 대한 고유한 형광 패턴을 얻을 수 있었다. 이러한 패턴 인식 및 정확한 분류는 LDA 분석에 의해 보다 유의하고 정확도 높게 수행 가능하다. 하기의 시험예에서 입증된 결과에 의하면, 일 구체예에 따른 단백질 검출 방법에 의해서 200 nM에서도 특정 단백질을 정확하게 검출하고 구별할 수 있으므로, 적어도 200 nM의 단백질 검출이 가능하다. 상기 언급한 바와 같은 특이적인 반응과 함께, 단백질 분석물의 나노 몰 및 마이크로 몰 스케일과 같은 다양한 농도가 LDA 분석의 도움으로 차별화되었다. 따라서, 일 구체예에서, 상기 방법은 측정된 형광 값에 선형 판별 분석법(LDA)을 적용하여 특징데이터를 구축함으로써 단백질을 분류하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 특징데이터는 2차원 (2D) 또는 3차원 (3D) 그래프로 도시될 수 있고, 상기 그래프 상에 각 표준 인자에 대해 90% 이상, 92% 이상, 95% 또는 95% 이상의 타원 컨피던스(ellipse confidence)를 갖는 값을 그룹화하는 단계를 포함하는 프로세스에 의해서 제작된 것일 수 있다. 또한, 일 구체예에 따른 방법에 의하면 단백질의 정성적 및 정량적 분석이 가능하므로, 상기 방법에 적용되는 시료는 복수의 단백질을 포함하거나, 또는 상이한 농도의 복수의 단백질을 포함하는 것일 수 있다.

[0055] 일 구체예에서, 상기 단백질 검출용 조성물은 본 발명의 화합물 또는 이의 염을 혼합물로 포함하는 것일 수 있다.

[0056] 일 구체예에서, 상기 방법은 정규화 (normalization)하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 정규화는 단백질 부재시 측정된 형광 세기 (F_0)에 대한 단백질 존재시 측정된 형광 세기 (F)의 비율 값 (즉, F/F_0) 또는 단백질 존재시 측정된 형광 세기 (I)에 대한 단백질 부재시 측정된 형광 세기 (I_0)의 차이 값 (즉, $I-I_0$)으로 산출하는 것을 의미할 수 있다. 각각의 정규화 방식에 따른 그래프는 도 6 내지 8에서 확인할 수 있다. 하나의 단백질에 대해 각 AIEgen은 특이적인 형광 흡광도 또는 세기를 가지므로, 표적하는 단백질, 혼합물 중에 함께 존재하는 다

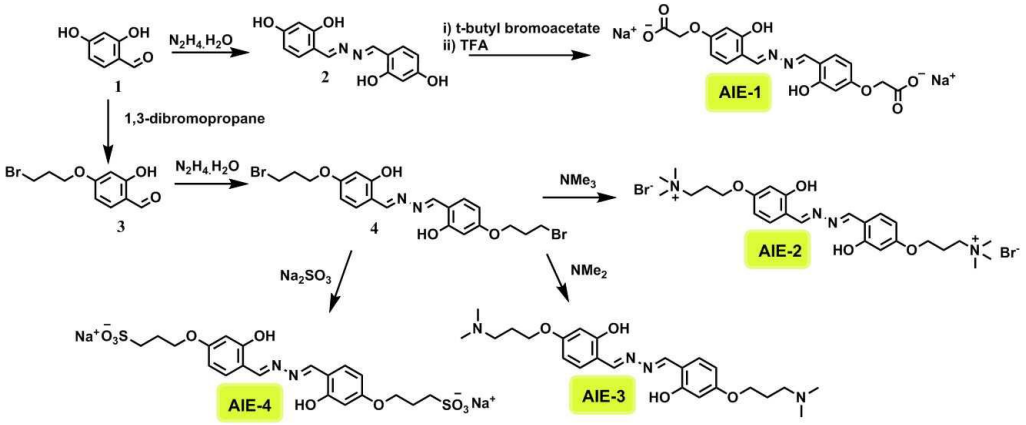
른 단백질, 또는 AIEgen의 성질에 따라 관찰되는 형광 흡광도 또는 세기가 다를 수 있다. 따라서, 분석에 용이한 결과 값을 얻을 수 있도록 적절한 정규화 방법을 선택하여 상기 방법에 적용할 수 있다.

[0057] AIEgen가 저렴한 감지 수단을 제공한다는 점을 감안할 때, 본 발명의 일 구체예에 따른 방법은 다양한 분석물의 검출을 포함하는 생물 의학 응용 분야에 잠재적으로 적합하다. 따라서 일 구체예에서, 상기 단백질 검출용 조성물 또는 방법은 개체로부터 분리된 시료에서 질병과 관련된 특정 단백질을 검출하여 질병을 진단하기 위한 것일 수 있다. 이 경우, 질병을 진단하기 위한 정규화 데이터를 수집하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 정규화 데이터를 수집하는 단계는 예를 들어, 특정 질병을 앓는 다수의 환자 또는 정상인 각각의 집단으로부터 수득된 시료에 AIEgen을 가한 후, 그 값을 집단별로 정규화하는 것을 의미하는 것을 수 있다. 상기 정규화 데이터는 검사 대상이 되는 환자의 시료에 AIEgen을 가하여 측정된 형광 세기를 분석하기 위한 양성 및/또는 음성 대조군으로 사용됨으로써 환자의 질병을 예측하는데 유용할 것이다.

[0058] 이하, 본 발명에 따르는 화합물의 제조방법에 대하여 상세하게 설명한다.

[0059] 본 발명에 따른 상기 화학식 I의 화합물은 하기 반응식 1에 대표적으로 도시된 방법에 따라 유기/의약 화학 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려진 화학적 변환을 이용하여 제조할 수 있다.

[0060] [반응식 1]



[0061]

[0062] 일 구체예에 따른 네 가지 수용성인 AIEgen을 상기 반응식 1에 도시한 바와 같이, 온화한 조건에서 벤즈알데히드 및 하이드라진 간의 하이드라존-형성 반응에 의해 합성하였다. 2,4-다이하이드록시벤즈알데히드 (화합물 1) 및 하이드라진 간의 반응은 중간체 화합물 2를 생산하였고, 이를 t-부틸 브로모아세테이트와 반응시켜 트라이플루오로아세트산으로 t-부틸기를 탈보호화시킴으로써 음전하를 갖는 카르복실레이트인 AIE-1을 생산하였다. 중간체 3인 5-브로모프로필-2-하이드록시벤즈알데히드를 화합물 1 및 1,3-다이브로모프로판을 반응시켜 생산하고, 하이드라진과 순차적인 반응에 의해서 화합물 3를 생산하였다. AIE-2, AIE-3, 및 AIE-4를 화합물 3로부터 각각 양전하, 중성 및 음전하인 분자를 형성하기 위해 트라이메틸아민, 다이메틸아민, 및 아황산나트륨과 작용기화(functionalization)하여 화합물 4를 합성하였다. 모든 중간체 및 AIEgen을 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR에 의해서 확인하고 특성화하였다. 그 결과는 도 2A, 3A, 3B 및 3C에 도시한 바와 같다.

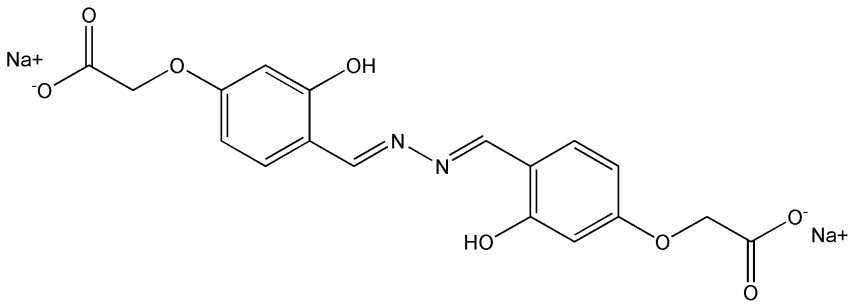
[0063] 일 구체예에 따른 네 가지 AIEgen의 구체적인 합성 방법은 하기의 실시예 1 내지 4에서 설명한다. 2,4-다이하이드록시 벤즈알데히드, 1,3-다이브로모프로판, 수 중 다이메틸아민 용액 40% 및 tert-부틸 브로모아세테이트는 Alfa Aesar(USA)로부터 구입하였다. 하이드라진 모노하이드레이트 ($N_2H_4.H_2O$), 수 중 트라이메틸아민 45 % 수성 용액 및 모든 단백질 (소 혈청 알부민, 에스터라제, 피브리노겐, 트랜스페린 및 β-갈락토시다제)은 Sigma Aldrich (USA)로부터 구입하였다. 트라이플루오로아세트산 (TFA)은 TCI (Japan)로부터 구매하였다. 에틸 아세테이트 (EtOAc) 및 헥산은 SK 케미칼 (Korea)에서 얻었다. 탄산칼륨 (K_2CO_3), 중탄산 칼륨 ($KHCO_3$), 수산화 나트륨 (NaOH), 염화수소 (NaCl), 및 무수 아황산 나트륨 (Na_2SO_3)을 Samchun pure chemical Co.,Ltd (Korea)로부터 구입하였다. THF 및 아세토나이트릴 (ACN)의 HPLC 등급을 Burdick & Jackson Honeywell (USA)로부터 구입하였다. 다이클로로메탄 (DCM) HPLC를 대정 Co.,Ltd (Korea)으로부터 구입하였다. PBS 1X, pH 7.4를 Gibco, ThermoFisher SCIENTIFIC (USA)로부터 얻었다.

[0064] AIEgen (AIE 1 내지 4)는 400MHz FT-NMR (Agilent Technologies) 및 0.1% TFA 및 2,5-디히드록시벤조산 (2,5-

DHB)과 함께 50:50의 물/아세토니트릴로 이루어진 MALDI 매트릭스를 갖춘 MALDI-TOF/TOF (Bruker Ultraflex III)를 사용하여 특성화하였다. UV-vis 분광법 (Jasco V-670 분광 광도계), 형광 측정기 (Hitachi F-7000), 마이크로 플레이트 판독기 (Molecular devices SpectraMax i3x)를 이용하여 측정하였다.

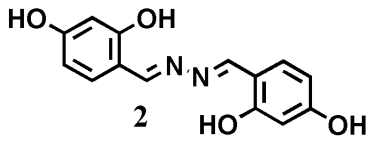
[0065] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0066] **실시예 1: 2,2'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 다이아세트산 나트륨 (AIE-1)**



[0067]

[0068] 단계 1) 화합물 2의 합성



[0069]

[0070] 화합물 2는 10 mL 메탄올 중에 하이드라진 모노히드레이트 (90 μL, 1.81 mmol)를 화합물 1인 2,4-다이하이드록시 벤즈알데히드 (0.5 g, 3.65 mmol)를 첨가함으로써 합성하였다. 상기 혼합물을 75℃에서 4 시간 환류시켰다. 상기 용액을 실온에서 냉각시켜 황색 고체를 형성시키고 이를 여과 및 진공 하에 건조하여 단리하였다. 수득률 (72%, 0.357 g) δ_H (400 MHz, DMSO) 6.29 (2H, s), 6.37 (2H, s), 7.39 (2H, s) 8.73 (2H, s), 10.13 (2H, s) and 11.38 (2H, s). δ_C (400 MHz, DMSO) 102.91, 108.65, 110.71, 133.39, 161.11, 162.20 및 162.51. 계산된 [M], $C_{14}H_{12}N_2O_4$, 분자량: m/z calcd 272.26 ; measured 272.60

[0071] 단계 2) AIE-1의 합성

[0072] a. t-부틸-보호된 AIE 분자의 합성

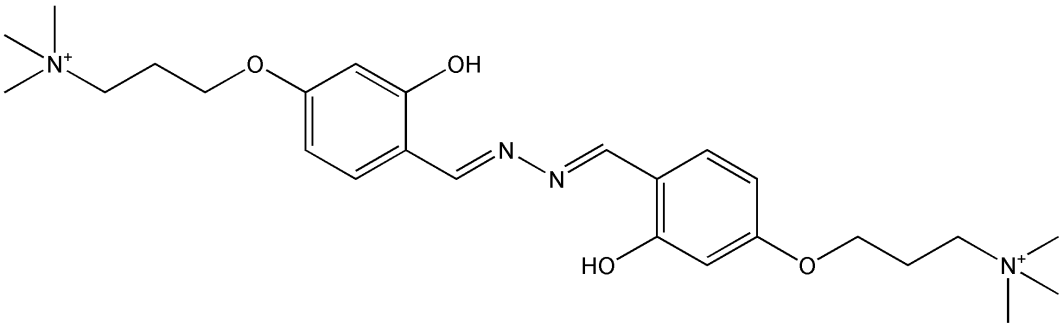
[0073] AIE-1을 합성하기 위해, 화합물 2 (500 mg, 1.836 mmol) 및 K_2CO_3 (507.6 mg, 3.673 mmol)을 아세토 나이트릴 10 mL에 용해시켰다. 30 분 후, t-부틸 브로모아세테이트 (542 μL, 3.673 mmol)를 혼합물에 적가하였다. 60 ℃에서 밤새 환류시켜 반응시켰다. 반응 종료 후, 반응물을 실온으로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 물로 처리하고 에틸 아세테이트 (EA)로 추출하였다. 유기층을 염수 용액으로 세척하였다. 유기층을 Na_2SO_4상에서 건조시키고 진공 하에 농축하였다. 정제는 헥산 : EA = 4 : 1을 사용하여 실리카 플래쉬 칼럼 크로마토그래피에 의해 수행하였다. 수득률 (21%, 187 mg) δ_H (400 MHz, DMSO) 1.46 (18H, s), 4.68 (4H, s), 6.43 (2H, s), 6.55 (2H, s), 7.39 (2H, s) 7.52 (2H, s), 8.91 (2H, s). δ_C (400 MHz, DMSO) 27.82, 65.59, 82.79, 102.17, 107.28, 111.44, 133.58, 158.84, 161.76, 163.03, 167.42.

[0074] b. t-부틸기의 탈보호화

[0075] AIE-1을 합성하기 위해, boc-보호된 AIE 분자 (244 mg, 0.487 mmol)를 5 mL의 DCM에 용해시켰다. TFA (0.2 mL, 과량)를 DCM 중 boc-보호된 AIE에 첨가하였다. 반응물을 실온에서 12 시간 동안 교반하였다. 반응 후, DCM 및 TFA를 회전식 증발기를 사용하여 제거하고 고진공 펌프를 사용하여 건조시켰다. 음전하를 띤 AIE-1을 만들기 위해 2 당량의 NaOH를 물에 첨가하였다. 수득률 (180 mg, 95%) δ_H (400 MHz, DMSO) 4.72 (4H, s), 6.48 (2H, s), 6.65 (2H, s), 7.54 (2H, s), 8.93 (2H, s). δ_C (400 MHz, DMSO) 64.88, 102.18, 107.52, 112.22, 132.80, 159.09, 160.52, 162, 및 170.08. 계산된 $[M]^-$, $C_{18}H_{14}N_2O_8^{2-}$, 분자량: m/z calcd 386.32 ; measured

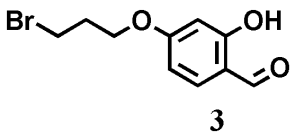
386.03

[0076] **실시예 2: 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메탄일일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시) (N,N,N-트라이메틸프로판-1-아미니움) (AIE-2)**



[0077]

[0078] 단계 1) 화합물 3의 합성

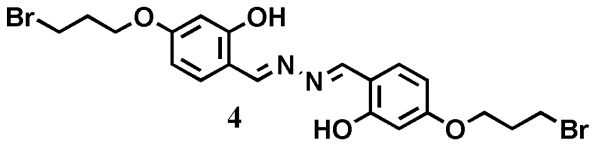


3

[0079]

[0080] 화합물 3은 참고 문헌 [23]을 통해 합성되었다. 화합물 1인 2,4-다이하이드록시 벤즈 알데하이드 (2g, 14.48mmol) 및 중탄산 칼륨 ($KHCO_3$, 1.448g, 14.48mmol)을 무수 아세톤에 용해시킨 다음 1,3-다이브로모프로판 (1.47mL, 14.48mmol)을 혼합물에 적가 하였다. 반응물을 60 ℃에서 60 시간 동안 환류시켰다. 반응 후, 용매를 가압하에 증발시켰다. 20 mL의 물을 첨가하고 30 mL의 클로로포름으로 3 회 추출하였다. 유기층을 Na_2SO_4상에서 건조시키고 진공 하에 농축시켰다. 헥산 : EA = 1 : 1로 실리카 플래쉬 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제를 수행하였다. 수득률 (17%, 1.2 g) δ_H (400 MHz, CDCl3) 2.36 (4H, m), 3.57 (4H, t), 4.12 (4H, t), 6.48 (2H, s), 6.59 (2H, s), 7.48 (2H, s), 9.85 (2H, s), 및 11.50 (2H, s). δ_C (400 MHz, CDCl3) 29.47, 31.90, 65.79, 101.27, 108.50, 115.30, 135.30, 164.41, 165.81, 194.37. 계산된 [M], $C_{10}H_{11}BrO_3$, 분자량: m/z calcd 259.10 ; measured 258.36

[0081] 단계 2) 화합물 4의 합성



4

[0082]

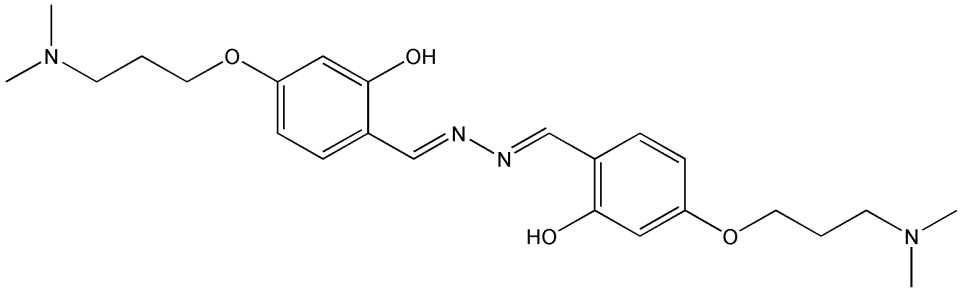
[0083] 화합물 4는 아세토나이트릴 3 mL 중의 화합물 3 (92.6 mg, 0.18 mmol)에 하이드라진 일수화물 (7.5 μL, 0.09 mmol)을 첨가하여 합성하였다. 혼합물을 60 ℃에서 12 시간 동안 환류시켰다. 반응 후, 용매를 진공하에 건조시켰다. 수득율 (91%, 168 mg) δ_H (400 MHz, CDCl3) 2.34 (4H, m), 3.60 (4H, t), 4.15 (4H, t), 6.53 (4H, s), 8.61 (2H, s), 및 11.73 (2H, s). δ_C (400 MHz, CDCl3) 29.65, 32.11, 50.86, 65.52, 101.82, 107.72, 111.28, 133.52, 161.71, 162.80, 16.89. 계산된 [M], $C_{20}H_{22}Br_2N_2O_4$, 분자량: m/z calcd 514.21; measured 515.12

[0084] 단계 3) AIE-2의 합성

[0085] THF 및 물 공-용매에서 화합물 4 (20 mg, 0.039 mmol) 및 물 중 다이메틸아민 40 % 용액 (17 μL, 0.155 mmol)을 교반하고 밤새 동안 60 ℃로 가열하였다. 반응 후, 용매 (THF 및 물)는 증발에 의해 제거된 미반응 트라이메틸아민이었다. 생성물인 AIE-3을 16mg (98 %) 수득하였다. δ_H (400 MHz, D2O) 1.98 (4H, m), 2.68 (4H, t), 4.13 (4H, t), 6.38 (4H, s), 6.62 (4H, s), 7.16 (2H, s), 및 7.85 (2H, s), 11.70 (2H, s). δ_C (400 MHz, D2O) 22.44, 52.84, 63.74, 64.60, 101.62, 107.58, 111.80, 133.88, 159.85, 161.87, 162.89. 계산된 $[M]^+$,

$C_{26}H_{40}N_4O_4^{2+}$, 분자량: m/z calcd 472.63; measured 471.39

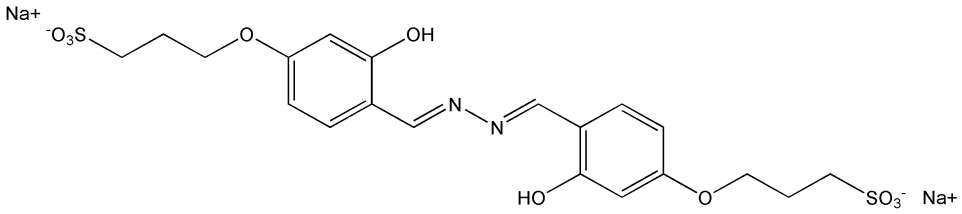
[0086] **실시예 3: 6,6'-((1E,1'E)-하이드라진-1,2-디일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-(3-(다이메틸아미노)프로폭시)페놀) (AIE-3)**



[0087]

[0088] 1 mL의 THF 및 물의 공-용매에서 화합물 4 (20 mg, 0.039 mmol) 및 물 중 디메틸아민 40 % 용액 (17 μL, 0.155 mmol)을 교반하고 밤새 60 ℃까지 가열하였다. 반응 후, 용매 (THF 및 물) 및 미반응 디메틸아민을 증발시켜 제거하였다. 생성물인 AIE-3을 16mg (98 %) 수득하였다. δ_H (400 MHz, DMSO) 1.98 (4H, m), 2.68 (4H, t), 4.13 (4H, t), 6.53 (4H, s), 7.51 (2H, s), 및 8.80 (2H, s). δ_C (400 MHz, DMSO) 34.41, 42.99, 54.68, 65.55, 101.82, 107.84, 112.01, 133.06, 160.84, 162.32, 162.73. 계산된 $[M]^+$, $C_{26}H_{40}N_4O_4^{2+}$, 분자량: m/z calcd 472.63; measured 471.39

[0089] **실시예 4: 3,3'-((((1E,1'E)-하이드라진-1,2-다이일리덴비스 (메타닐일리덴)) 비스 (3-하이드록시-4,1-페닐렌)) 비스 (옥시)) 비스 (프로판-1-설폰산) 나트륨 (AIE-4)**



[0090]

[0091] 2 mL의 THF 및 물 공-용매 중 화합물 4 (10 mg, 0.019 mmol) 및 아황산나트륨 ($NaSO_3$ 6 mg, 0.042 mmol)을 교반하고 밤새 질소 대기 하에서 100 ℃까지 가열하였다. 반응 후, 혼합물을 실온에서 유지하였다. 아세톤 (다이에틸 에테르)을 첨가하여 백색 결정을 수득하였다. 생성물 AIE-4를 4mg (80 %) 수득하였다. δ_H (400 MHz, D2O) 1.98 (4H, m), 2.68 (4H, t), 4.13 (4H, t), 6.53 (4H, s), 7.51 (2H, s), and 8.80 (2H, s). δ_C (400 MHz, D2O) 24.10, 47.67, 66.48, 101.39, 107.51, 111.99, 133.25, 159.80, 162.05, 162.50. 계산된 $[M]^-$, $C_{26}H_{40}N_4O_4^{2-}$, 분자량: m/z calcd 514.52; measured; 514.42

[0092] **시험예 1: 용매 극성에 따른 응집-유도된 여기 현상 확인**

[0093] 물/테트라히드로퓨란(THF) 중 AIE 현상을 조사하기 위해, 실시예 1 내지 4에 따른 화합물 (이하 AIE-1 내지 4)의 광학 특성을 THF의 양을 다양화하여 수성 용액에서 연구하였다.

[0094] AIE-1 내지 4는 수용성이지만 THF엔 불용성이므로 AIEgen을 함유한 수성 용액에 THF를 첨가함으로써 응집을 유도하였다. 도 2A에 나타낸 바와 같이, 물에서 AIE-1은 365 nm에서 강한 흡광도를 보였으나, 95 % THF 수용액에서의 흡수는 감소하여 365 nm에서 355 nm로 청색 편이를 나타내었다. 이는 H-응집의 존재를 나타낸다[20]. AIE-2, AIE-3, 및 AIE-4는 수성 용액 및 H_2O/THF (v/v, 5:95)의 수용액에서 유사한 경향을 보여, 수성 용액 중 365 nm에서 강한 흡광도를 나타내었지만, 95 % THF 수성 용액에서는 넓고 감소된 흡광도를 보였다 (도 3). THF (fTHF = 095%)의 체적 분율(volumetric fraction)으로부터 THF를 점진적으로 첨가하여, AIEgen의 AIE 현상을 관찰하였다. 물 (fTHF = 0%)에서, 네 개의 모든 AIEgen (AIE-14)이 이들의 응집되지 않은 상태에서 N-N-결합 회전의 제한이 없으므로 비-형광이었다 (도 4A 내지 4D). fTHF = 60%까지의 레벨에서, 520 nm 에서 방출 강도는 현저하게 변화하지 않았다; 그러나, fTHF = 60% 내지 95%로부터, 강한 방출을 관찰하여, 높은 양의 THF에서 용해도가

좋지 않아 응집의 형성이 유발되었음을 의미한다. 도 2B에 나타낸 바와 같이, 상기 투명한 수성 용액은 365nm UV 조사 하에서 95 % THF에서 녹황색이된다. fTHF = 95%에서 네 개의 AIEgen의 방출 강도는 물에서 보다 12 내지 100 배 더 강하게 나타났고, AIE 특성과 분자 내 양성자 이동 (excited state of intramolecular proton-transfer; ESIPT) 특성 모두에서 흥분 상태를 나타내어 녹색 방출을 일으키는 큰 스트로크 (Stoke) 변이를 허용했다. 이러한 결과는 합성된 AIEgen이 응집된 상태에서 높은 방출 강도를 나타내지만, 이들의 용해도 때문에 물에서 형광을 나타내지 않음을 보여주었다.

[0095] **시험예 2: 단백질 존재 하에서 응집-유도된 여기 현상 확인**

[0096] 상기 실시예 1 내지 4와 같은 AIEgen은 순수한 물에서는 형광을 나타내지 않지만, AIEgen과 단백질 사이의 정전기적 및 소수성 상호작용이 AIEgen의 자유로운 분자 내 회전을 방해할 수 있기 때문에 단백질 존재 하에서 강하게 형광을 나타낼 수 있다. 이러한 가정을 바탕으로, 본 발명자들은 AIEgen이 단백질 센서의 "턴 온" 센서로 사용될 수 있을 것이라 가설을 세웠다. 이 가설을 검증하기 위해, 본 발명자들은 AIE-2와 에스터라제(esterase) 사이의 상호작용을 평가하였다.

[0097] 구체적으로, 물에서 상기 실시예 1 내지 4에 따른 AIEgen 용액 모두를 제 3 증류수를 사용하여 42.1 μM 스톡 용액으로 제조하였다. 또한, 5 개의 단백질을 1X PBS pH 7.4에서 10 uM으로 제조하였다. 개별적인 96 개의 웰에서, 95㎕의 42.1uM AIE 스톡 용액을 첨가 한 후 5㎕의 10uM 단백질 용액을 첨가하고, 상기 제조된 단백질을 첨가한 직후 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 형광을 측정했다.

[0098] 그 결과, AIE-2는 40 μM 수성 용액에서 거의 형광을 나타내지 않았으나, AIE-2 방출 강도는 pH 인산 완충 식염수 (pH 7.4)에서 에스터라제를 첨가 한 후 5 배 증가하여 365 nm 자외선 조사 하에서 형광에서 독특한 변화를 관찰할 수 있었다 (도 5).

[0099] 상기 실시예 1 내지 4에 따른 AIEgen에 있는 서로 다른 작용기는 이들의 결합 친화력에 기반하여 단백질과의 상호작용에 영향을 미친다. 따라서, 본 발명자들은 두 가지 복합체 사이의 강한 상호 작용이 분자 내 회전 제한으로 인해 높은 수준의 형광 방출을 발생시키는 반면, 약한 상호 작용은 낮은 방출 강도가 발생시킬 것이라 예측하였다. 본 발명자들은 광범위한 분자량 (~ 66-540 kDa) 및 등전점 (pI: 4.6-6.3)을 나타내는 5 개의 단백질 [소 혈청 알부민 (bovine serum albumin; BSA), 에스터라제, 트랜스페린, 피브리노겐 및 β-갈락토시다제(β-galatosidase)]를 선택했다. 본 발명자들은 각 AIEgen 40 μM과 각 단백질 500 nM을 96-웰 플레이트에 분주하고 520 nm에서 강도를 6 회 반복하여 기록했다. 도 5a에 나타낸 바와 같이, 단백질의 존재 및 부재 하에 각 AIEgen에 대한 형광 강도 (F/F0)의 정규화 후에 독특한 형광 반응 패턴이 생성되었다. AIEgen과 단백질 간의 상이한 상호 작용에 기반하여 독특한 형광 패턴이 생성되므로 각 단백질이 구별될 수 있다. 여기서 정규는 각 실시예의 각 단백질에 대한 형광 세기를 수회 측정하여 그 값을 평균화하는 것을 의미한다.

[0100] 상기 독특한 형광 패턴에 따라 단백질을 구별하고 정성적 및 정량적으로 분류하는데 선형 판별 분석법(linear discriminant analysis; LDA)이 사용될 수 있다[21]. LDA는 분류 내 분리를 극대화하고 차별화가 필요한 분류 내에서의 편차를 최소화하기 위해 데이터를 감소시키는데 사용되는 진보된 통계 수단이다[22]. 4 개의 AIEgens × 5 개의 단백질 × 6 회 반복으로 총 120 개 데이터의 형광 패턴을 얻었고, 본 발명자들은 LDA를 수행하여 2 차원 (2D) 플롯으로 변환(Matlab R2016a 이용)하였다. 그 결과는 5 가지 단백질을 각각 82.15%, 16.39% 0.85% 및 61%의 표준 인자(canonical factor)로 구분하였다. 도 6B에 도시된 바와 같이, 처음 2 개의 인자의 95% 타원 컨피던스 (ellipse confidence)를 갖는 2D LDA 스코어 플롯은 5 개의 단백질을 서로 중첩되지 않게 분명한 분류하였다. LDA 플롯에서 측정된 데이터는 밀접하게 이웃하는 단백질 간의 재현성 및 거리를 나타내었다. 또한 상기 처음 두 표준 인자는 2D 플롯의 생성 및 5 개의 단백질 중 98.5 %로 우수한 군집화를 허용하고, AIEgens를 사용하는 본 발명의 단백질-감지 시스템이 5 가지 단백질을 분류하는데 적절하다는 것을 입증하였다.

[0101] **시험예 3: 상이한 농도의 단백질 동정**

[0102] 하나의 고정된 농도에서 여러 단백질을 성공적으로 검출하고자, 본 발명자들은 이러한 방법을 임상적으로 잠재적으로 적용할 수 있는 상이한 농도에서 단백질의 동정을 조사하였다. 따라서 본 발명자들은 4 가지 상이한 상태 (200 nM, 500 nM, 1 μM 및 2 μM)에서 BSA와 에스터라제를 사용하여 추가 실험을 수행하였다.

[0103] 도 7A에 나타낸 바와 같이, 2 μM의 BSA 존재하에 AIE-1 및 AIE-4의 형광 세기는 200 nM BSA의 존재하에 비해 3 배 더 높은 형광 세기를 보여주었다. 추가적으로, 2 μM 존재하에 AIE-2 및 AIE-3의 형광 세기는 200 μM의 에스터라제의 존재 하에 비해 5 배 더 높은 방출 세기로 강한 형광 세기를 보여주었다. 이러한 결과는 단백질과

AIE 작용기 사이의 결합이 각각의 분석물의 인식을 가능하게 하는 독특한 형광 패턴을 허용한다는 것을 나타냈다. 또한, 이러한 센서 분석은 4 개의 상이한 농도 (200 nM, 500 nM, 1 μM 및 2 μM)에서 두 개의 분석물 (BSA, 에스터라제)을 겹치지 않고 성공적으로 구별하였다. 순차적인 LDA 분석은 각각 71.17 %, 26.58 % 및 2.23 % 및 2.02 %의 4 가지 표준 인자를 나타내었다. 95 % 타원 컨피던스로 첫 번째 두 개 인자의 2D 플롯이 분명하게 나타났다 (도 7B). 이러한 결과는 본 발명의 일 구체예에 따른 방법이 특정 질병의 진단을 위해 다양한 농도의 단백질을 분류할 수 있음을 나타낸다.

[0104] 또한, 2 개의 단백질 분류를 확인한 후, 본 발명자들은 상기 단백질 혼합물 중에 표적 단백질을 분류하는 실험을 수행하였다. 표적 단백질 (BSA, 에스터라제, 및 β-갈락토시다제)을 4 % FBS와 혼합하고 단백질의 AIE 형광을 측정하였다. AIE 형광의 기본 사항 (4 %의 FBS로부터)을 감지함으로써, 구별되는 형광 반응을 수득하였고 LDA 분석하여 상기 단백질 혼합물로부터의 표적 단백질 구별을 보였다. 두 개의 표준 인자는 96.45 % 및 3.55 %였고, 1차 데이터는 FBS에서 세 개의 단백질을 94.65 %로 구별할 수 있다 (도 8A 및 8B). 이러한 발견은 이 방법이 상이한 농도의 단백질을 구별할 수 있도록 하고, 특정 질병의 진단을 위해 단백질 혼합물 중에 표적하는 단백질을 구별할 수 있음을 입증한다.

[0105] [참고문헌]

[0106] 1. Daniels, M. J., Wang, Y., Lee, M., Venkitaraman, A. R. Abnormal cytokinesis in cells deficient in the breast cancer susceptibility protein BRCA2. *Science* 2004, *306*, 876-879.

[0107] 2. Lao, Y.-H., Chi, C.-W., Friedrich, S. M., Peck, K., Wang, T.-H., Leong, K. W., Chen, L.-C. Signal-on Protein Detection via Dye Translocation between Aptamer and Quantum Dot. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2016, *8* , 12048-12055.

[0108] 3. Zhang, Y., Guo, Y., Xianyu, Y., Chen, W., Zhao, Y., Jiang, X. Nanomaterials for ultrasensitive protein detection. *Adv. Mater.*2013, *25*, 3802-3819.

[0109] 4. Huang, A., Li, W., Shi, S., Yao, T. Quantitative Fluorescence Quenching on Antibody-conjugated Graphene Oxide as a Platform for Protein Sensing. *Sci Rep* 2017, *7*, 40772.

[0110] 5. Fredriksson, S., Gullberg, M., Jarvius, J., Olsson, C., Pietras, K., Gústafsdσttir, S. M., Φstman, A., Landegren, U. (2002) Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. *Nat. Biotechnol.* 2002, *20*, 473-477.

[0111] 6. Hansen, J. A., Wang, J., Kawde, A.-N., Xiang, Y., Gothelf, K. V., Collins, G. Quantum-dot/aptamer-based ultrasensitive multi-analyte electrochemical biosensor. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 2228-2229.

[0112] 7. Le. N. D., Yazdani. M., Rotello. V. M. Array-based sensing using nanoparticles: an alternative approach for cancer diagnostics. *Nanomedicine.*2014, *9*, 1487-1498.

[0113] 8. Diehl, K. L., Anslyn, E. V. Array sensing using optical methods for detection of chemical and biological hazards. *Chem. Soc. Rev.* 2013, *42*, 8596-8611.

[0114] 9. Lavigne, J. J., Anslyn, E. V. Sensing a paradigm shift in the field of molecular recognition: from selective to differential receptors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, *40*, 3118-3130.

[0115] 10. Baldini, L., Wilson, A. J., Hong, J., Hamilton, A. D. Pattern-based detection of different proteins using an array of fluorescent protein surface receptors. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, *126*, 5656-5657.

[0116] 11. Kim, I.-B., Phillips, R., Bunz, U. H. F. Carboxylate Group Side-Chain Density Modulates the pH-Dependent Optical Properties of PPEs. *Macromolecules* 2007, *40*, 5290-5293

[0117] 12. De, M., Rana, S., Akpinar, H., Miranda, O. R., Arvizo, R. R., Bunz, U. H., Rotello, V. M. Sensing of proteins in human serum using conjugates of nanoparticles and green fluorescent protein. *Nat. Chem.* 2009, *1*, 461-465.

[0118] 13. You, C. C., Miranda, O. R.; Gider, B., Ghosh, P. S., Kim, I. B., Erdogan, B., Krovi, S. A.; Bunz, U. H., Rotello, V. M. Detection and identification of proteins using nanoparticle-fluorescent polymer

'chemical nose' sensors. *Nat. Nanotechnol.* 2007, *2*, 318-323.

[0119] 14. Umali, A. P., LeBoeuf, S. E., Newberry, R. W., Kim, S., Tran. L., Rome, W. A., Tian, T., Taing, D., Hong, J., Kwan, M., Heymann, H., Anslyn, E. V. Discrimination of flavonoids and red wine varietals by arrays of differential peptidic sensors. *Chem. Sci*. 2011, *2,* 439-4457.

[0120] 15. Resendez, A., Panescu, P., Zuniga, R., Banda, I., Joseph, J., Webb, D. L., Singaram, B. Multiwell Assay for the Analysis of Sugar Gut Permeability Markers: Discrimination of Sugar Alcohols with a Fluorescent Probe Array Based on Boronic Acid Appended Viologens. *Anal. Chem.* 2016, *88*, 5444-5452.

[0121] 16. Wu, Y., Tan, Y., Wu, J., Chen, S., Chen, Y. Z., Zhou, X., Jiang, Y., Tan, C. Fluorescence array-based sensing of metal ions using conjugated polyelectrolytes. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2015, *7*, 6882-6888.

[0122] 17. Shcherbakova, E. G., Brega, V., Minami, T., Sheykhi, S., James, T. D., Anzenbacher, P. Jr. Toward Fluorescence-Based High-Throughput Screening for Enantiomeric Excess in Amines and Amino Acid Derivatives. *Chem. Eur. J.* 2016, *22*, 10074-10080.

[0123] 18. Rana, S., Elci, S. G., Mout, R., Singla, A. K., Yazdani, M., Bender, M., Bajaj, A., Saha, K., Bunz, U. H., Jirik, F. R., Rotello, V. M. Ratiometric Array of Conjugated Polymers-Fluorescent Protein Provides a Robust Mammalian Cell Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* 2016, *138*, 4522-4529.

[0124] 19. Mei, J., Leung, N. L., Kwok, R. T., Lam, J. W., Tang, B. Z. Aggregation-induced emission: together we shine, united we soar! *Chem. Rev.* 2015, *115*, 11718-11940.

[0125] 20. Zhang, X.-F., Xi, Q., Zhao, J. Fluorescent and triplet state photoactive J-type phthalocyanine nano assemblies: controlled formation and photosensitizing properties. *J. Mate. Chem.* 2010, *20*, 6726-6733.

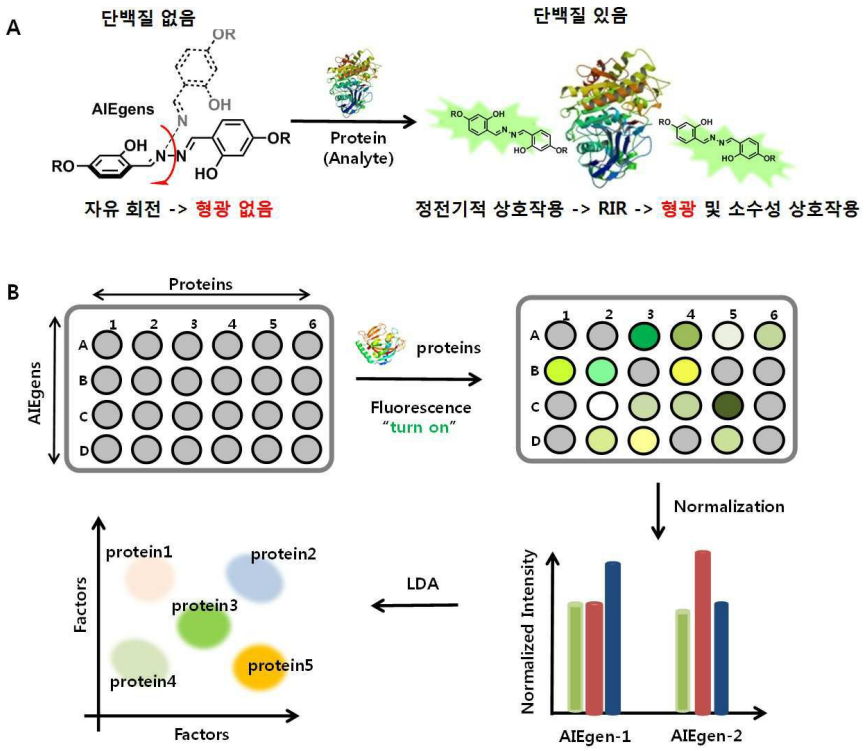
[0126] 21. Hughes, A. D., Glenn, I. C., Patrick, A. D., Ellington, A., Anslyn, E. V. A pattern recognition based fluorescence quenching assay for the detection and identification of nitrated explosive analytes. *Chem. Eur. J.* 2008, *14*, 1822-1827.

[0127] 22. Keinosuke, F. Introduction to Statistical Pattern Recognition, 2nd ed; Werner. R.; Academic Press: New York, 1990; pp:1-616

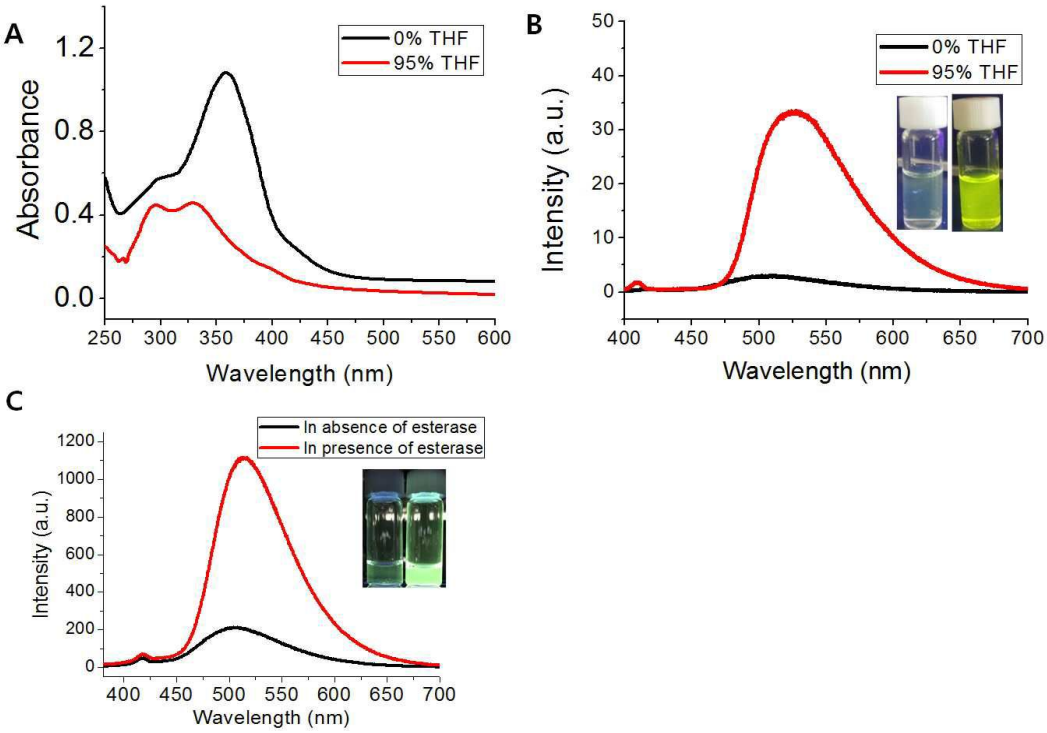
[0128] 23. Ali, A., Kamra, M., Roy, S., Muniyappa, K., Bhattacharya, S. Novel Oligopyrrole Carboxamide based Nickel(II) and Palladium(II) Salens, Their Targeting of Human G-quadruplex DNA, and Selective Cancer Cell Toxicity. *Chem. Asian. J.* 2016, *11*, 2542-2254.

도면

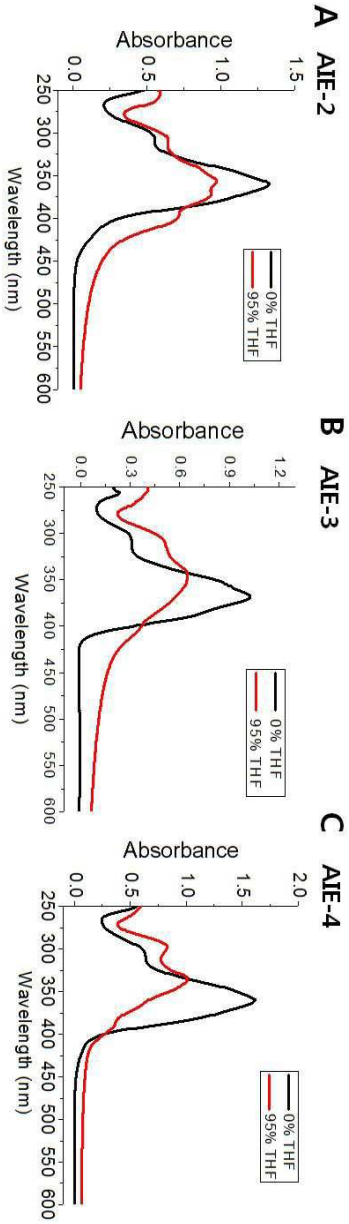
도면1


A
단백질 없음
단백질 있음
AIEgens
Protein
(Analyte)
자유 회전 -> 형광 없음
정전기적 상호작용 -> RIR -> 형광 및 소수성 상호작용
B
Proteins
AIEgens
proteins
Fluorescence
"turn on"
Normalization
protein1
protein2
protein3
protein4
protein5
Factors
LDA
Normalized Intensity
AIEgen-1
AIEgen-2

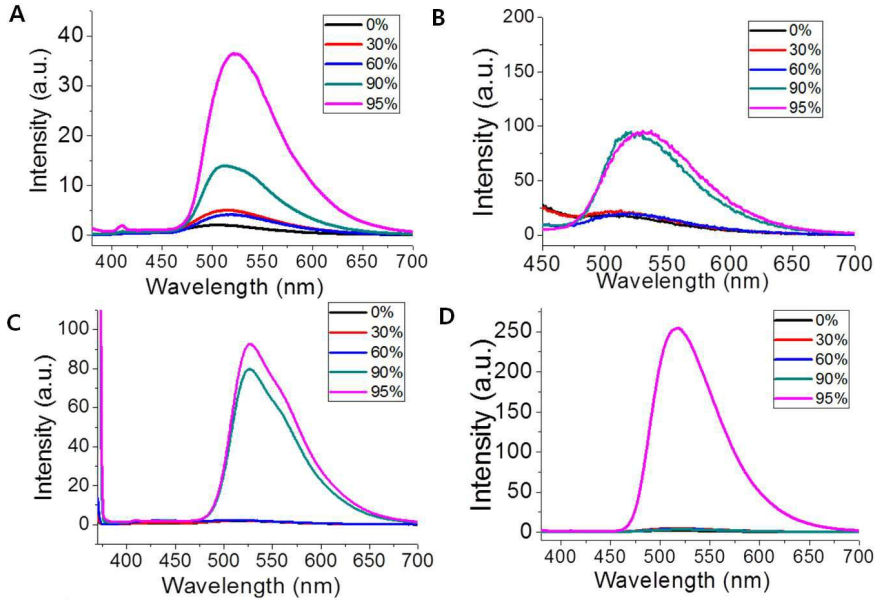
도면2


A
Absorbance
0% THF
95% THF
Wavelength (nm)
B
Intensity (a.u.)
0% THF
95% THF
Wavelength (nm)
C
Intensity (a.u.)
In absence of esterase
In presence of esterase
Wavelength (nm)

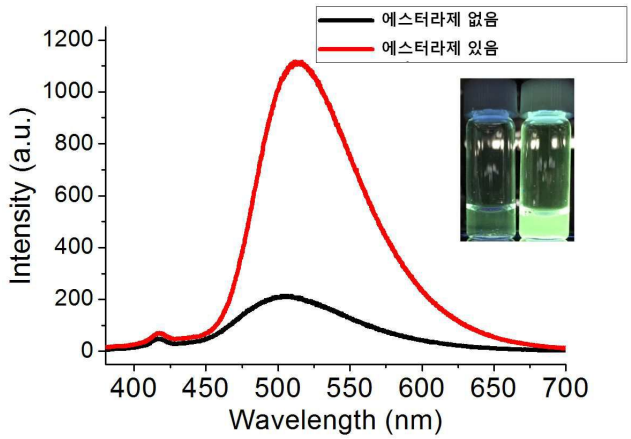
도면3


A
AIE-2
Absorbance
0.0
0.5
1.0
1.5
250 300 350 400 450 500 550 600
Wavelength (nm)
0% THF
95% THF
B
AIE-3
Absorbance
0.0
0.3
0.6
0.9
1.2
250 300 350 400 450 500 550 600
Wavelength (nm)
0% THF
95% THF
C
AIE-4
Absorbance
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
250 300 350 400 450 500 550 600
Wavelength (nm)
0% THF
95% THF

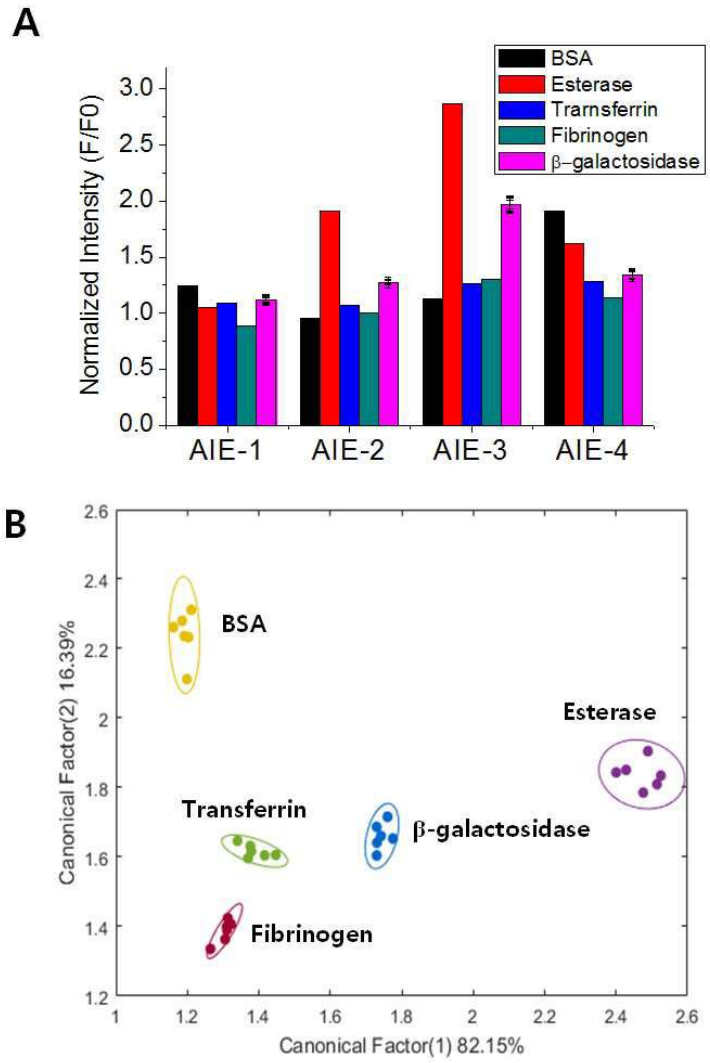
도면4


A
B
C
D
Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
0%
30%
60%
90%
95%

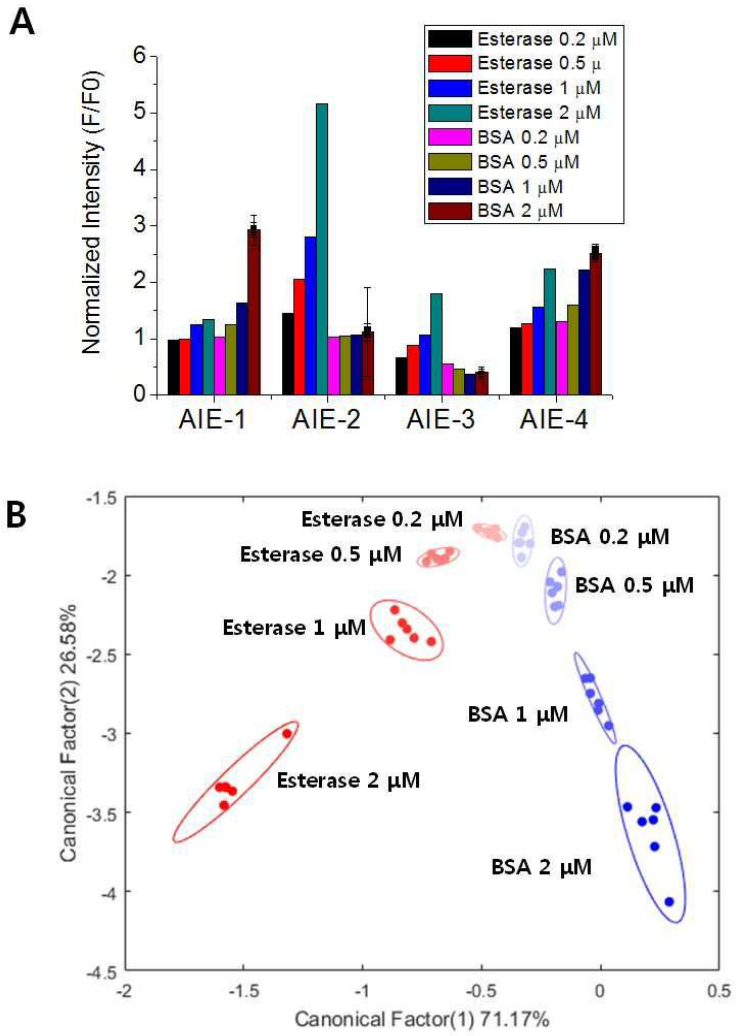
도면5


에스터라제 없음
에스터라제 있음
Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)

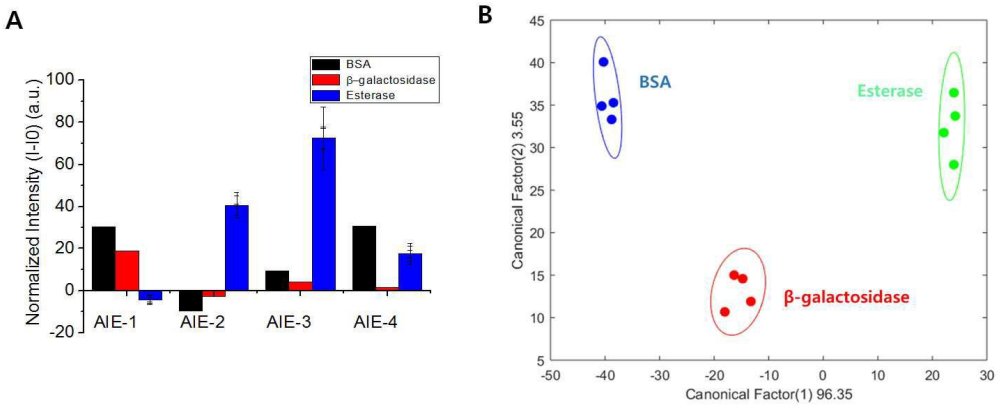
도면6


A
BSA
Esterase
Trarnsferrin
Fibrinogen
β–galactosidase
Normalized Intensity (F/F0)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AIE-1
AIE-2
AIE-3
AIE-4
B
BSA
Esterase
Transferrin
β-galactosidase
Fibrinogen
Canonical Factor(2) 16.39%
Canonical Factor(1) 82.15%
2.6
2.4
2.2
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
2.2
2.4
2.6

도면7


A
Esterase 0.2 μM
Esterase 0.5 μ
Esterase 1 μM
Esterase 2 μM
BSA 0.2 μM
BSA 0.5 μM
BSA 1 μM
BSA 2 μM
Normalized Intensity (F/F0)
AIE-1
AIE-2
AIE-3
AIE-4
B
Esterase 0.2 μM
Esterase 0.5 μM
Esterase 1 μM
Esterase 2 μM
BSA 0.2 μM
BSA 0.5 μM
BSA 1 μM
BSA 2 μM
Canonical Factor(2) 26.58%
Canonical Factor(1) 71.17%

도면8


A
BSA
β-galactosidase
Esterase
Normalized Intensity (I-I0) (a.u.)
AIE-1
AIE-2
AIE-3
AIE-4
B
BSA
Esterase
β-galactosidase
Canonical Factor(2) 3.55
Canonical Factor(1) 96.35