



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

C09K 11/06 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0009972

(43) 공개일자 2007년01월19일

(21) 출원번호 10-2006-7008571

(22) 출원일자 2006년05월02일

심사청구일자 없음

번역문 제출일자 2006년05월02일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2004/004167

(87) 국제공개번호 WO 2005/033245

국제출원일자 2004년09월30일

국제공개일자 2005년04월14일

(30) 우선권주장 0323171.9 2003년10월03일 영국(GB)

(71) 출원인 코벤트리 유니버시티
영국 코벤트리 씨브이 1 5에프비 프라이어리 스트리트

(72) 발명자 런치, 다니엘, 에릭
영국 코벤트리 씨브이 1 5에프비 프라이어리 스트리트, 코벤트리 유니버
시티
헵턴스탈, 존
영국 코벤트리 씨브이 1 5에프비 프라이어리 스트리트, 코벤트리 유니버
시티

(74) 대리인 이상용
구현서
제갈혁

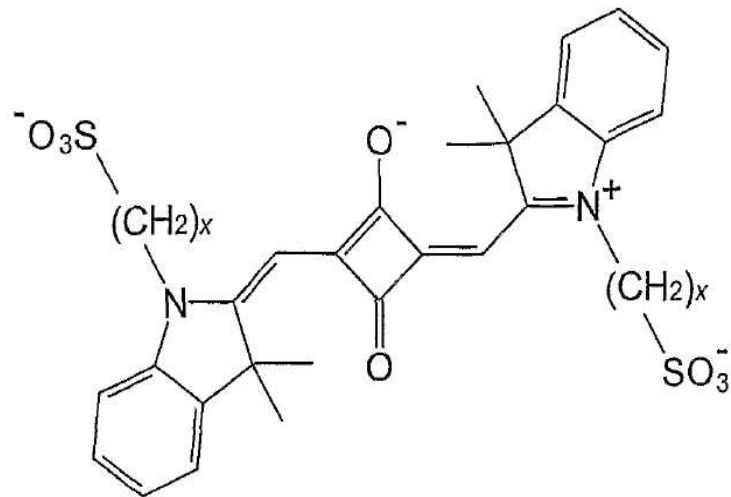
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 광발광 화합물, 단백질 검출기 및 단백질 검출 방법

(57) 요약

아래의 화학식 1의 대칭적 골격 구조를 갖는 수용성 광발광 화합물이 개시된다. 하기 화학식 1에서 X는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있다. 또한, 상기 화합물을 포함하는 단백질 검출기 및 용액 샘플에서의 용해된 단백질의 총량을 측정하는 방법이 개시된다.

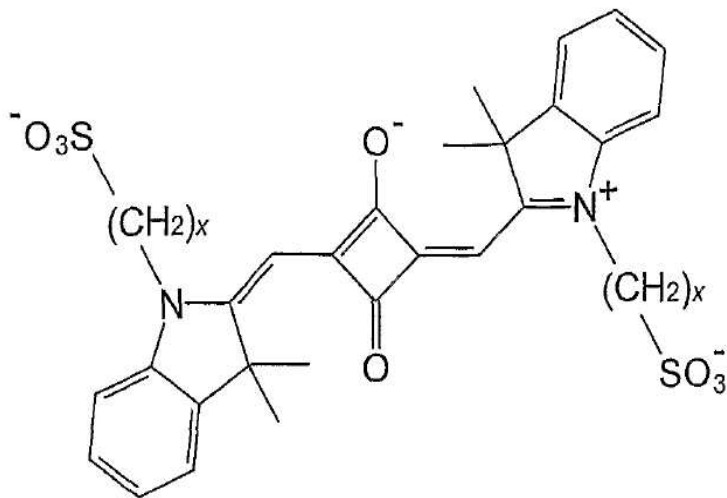
화학식 1



특허청구의 범위

청구항 1.

x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있는 하기 화학식의 대칭적 골격 구조를 포함하는 수용성 광발광 화합물



청구항 2.

제1항에 있어서,

상기 x=3인 광발광 화합물.

청구항 3.

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 광발광 화합물은 치환되지 않은 광발광 화합물.

청구항 4.

제1항 또는 제2항에 있어서,

한 쪽 또는 양 쪽 페닐 고리는 프로필 및 부틸을 포함하는 알킬기 또는 할로젠기를 가지고 5-위치(position)에서 치환된 것인 광발광 화합물.

청구항 5.

제1항 내지 제4항에 있어서,

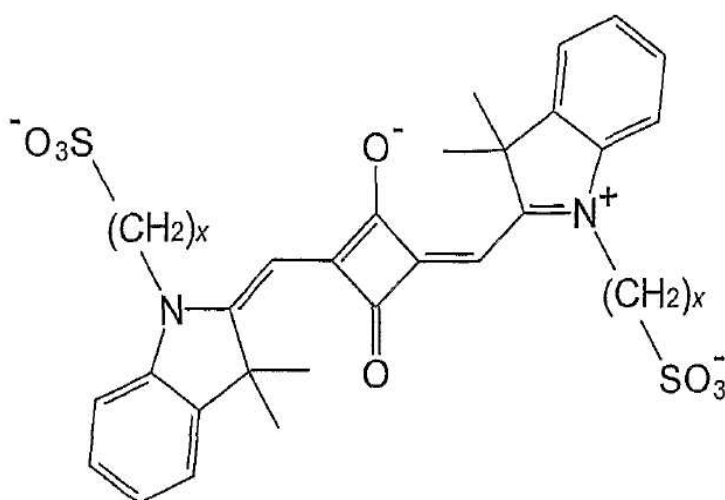
상기 광발광 화합물은 2,4-비스(1-(프로판-3-술포닉산)-3,3-트리메틸-2-인돌리닐리덴메틸)사이클로부텐디일리움-1,3-디올레이트(2,4-bis(1-(propan-3-sulfonic acid)-3,3-trimethyl-2-indolinyliidenemethyl) cyclobutenediylum-1, 3- diolate) 또는 금속 또는 상기 술포닉산의 칸터너리 질소(즉, 암모늄, 모노, 디 또는 트리 암모늄, 피리디늄 등) 염인 광발광 화합물.

청구항 6.

상세한 설명에서 실질적으로 묘사되거나 실시예와 관련한 광발광 화합물.

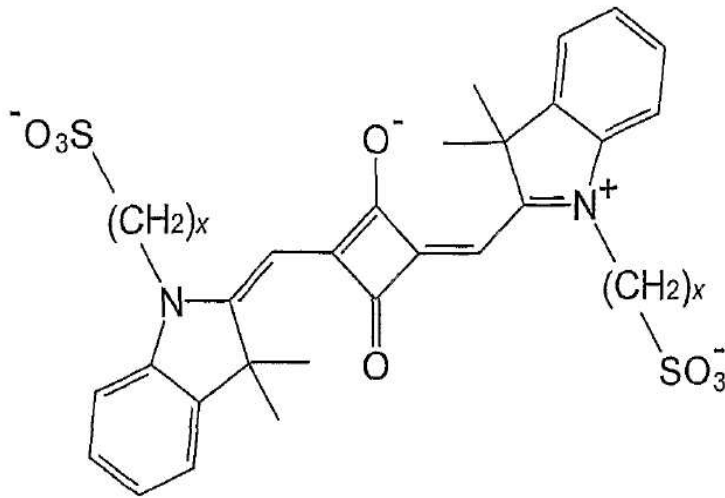
청구항 7.

x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있고, 물에 용액 형태로 하기 일반식의 대칭적 골격 구조를 포함하는 화합물을 리터당 1×10^{-10} 에서 1 몰(mole) 농도 범위로 포함하는 광발광 화합물을 포함하는 단백질 검출기.



청구항 8.

(a) x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있고, 물에 용액 형태로 하기 일반식의 대칭적 골격 구조를 포함하는 화합물을 리터당 1×10^{-10} 에서 1 몰(mole) 농도 범위로 포함하는 광발광 화합물을 용해시키는 단계;



(b) (a) 단계에서 제조된 용액을 테스트 용액 샘플과 혼합하는 단계;

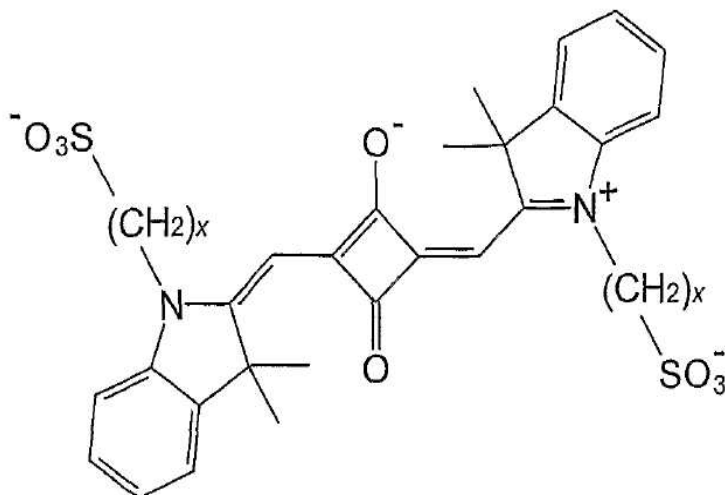
(c) 샘플의 형광성(fluorescence)을 측정하는 단계;

(d) 용해된 총 단백질의 양에 대한 값을 구하기 위해 표준 값과 형광성을 비교하는 단계를 포함하는 용액 샘플에서의 용해된 총 단백질의 양을 측정하는 방법.

청구항 9.

소듐 도데실설페이트(SDS)이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에, 수용성 메탄올 및 아세트산을 포함하는 수용성/유기/산 혼합물에서 고정된(fixed) 지지 매트릭스에서 전기이동을 통해 단백질을 분리하고,

상기 매트릭스를 x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있는 하기 일반식의 대칭의 골격 구조를 갖는 광발광 화합물로 10%의 수용성 메탄올 또는 수용성 아세트산 용액에서, 리터당 1×10^{-10} 에서 1 몰(mole) 농도로 염색하고, 탈염색하여 밴드를 시각화하여 단백질을 검출 및/또는 정량하는 방법.



청구항 10.

제9항에 있어서,

상기 지지 매트릭스는 폴리아크릴아미드, 아가로스 또는 녹말인 것을 특징으로 하는 단백질 검출 및/또는 정량 방법.

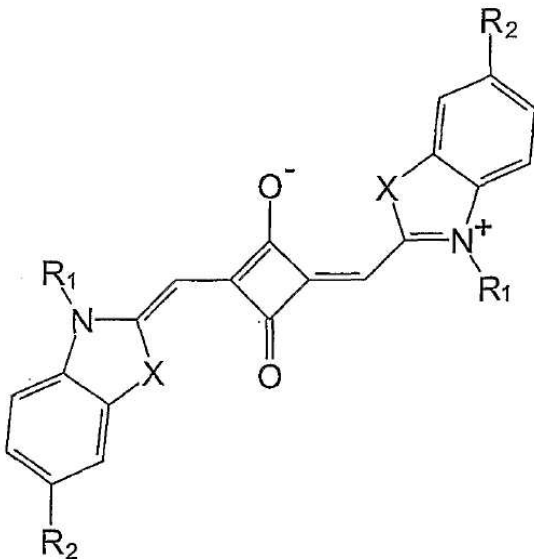
명세서

기술분야

본 발명은 새로운 광발광 화합물(photoluminescent compound), 새로운 단백질 검출기(protein detector) 및 액체, 특수한 물(particular water) 또는 체액(bodily fluid)에서 단백질을 검출하는 새로운 방법에 관한 것이다.

배경기술

현재까지 다양한 광발광 화합물이 알려져 왔다. 그리고, 알려진 광발광 화합물들은 스쿠아레인 염료(squaraine dye)로 알려진 염료의 부류, 특별히 인돌레닌(indolenine) 계열의 스쿠아레인 염료를 포함한다. 인돌레닌 계열의 스쿠아레인 염료는 아래 일반식으로 표시되는 치환 또는 비치환된 화합물이다.



상기 일반식에서, X는 S, Se 또는 $C(CH_3)_2$ 이고, R_1 은 알킬기이며, R_2 는 H, 알킬기 또는 할로젠이다.

알려진 인돌레닌 스쿠아레인 염료는 대칭 또는 비대칭 화합물을 포함하며, 예를 들어 E. Terpetschnig et al. in Anal. Chim. Acta 282 (1993) pages 633-641에 묘사되어 있다.

이 염료들은 물에 용해되지 않으며, 특별히 용액 중에서의 단백질의 존재에 대한 정성적인 검출(qualitative detection)을 위해 사용된다. 용액에서, 특히 수용액에서 용해되는 단백질의 존재를 검출하기 위하여 이 염료들을 사용하기 위해서는, 염료는 물 및 메탄올과 같은 알코올의 혼합물을 포함하는 용매에서 용해되지 않아야 한다. 단백질이 인돌레닌 스쿠아레인 염료의 물/메탄올 용액에 첨가될 때, 형광성에서의 증가가 있다. 위에서 인용된 논문에서 개시된 분석적 방법은 단지 테스트 용액 샘플에서의 단백질의 존재 또는 부존재만을 표시하는 정성적 방법일 뿐이며, 존재하는 단백질의 양을 결정하기 위해 사용될 수는 없다.

액체에서의 단백질의 정량적 분석을 위한 현재의 방법은 액체를 위한 브래드포드(Bradford)[M. M. Bradford in Anal. Biochem. 72 (1976) 248], 로리(Lowry)[O. H. Lowry et al. in J. Biol. Chem. 193 (1951) 265] 및 BCA(bicinchoninic acid) [P. K. Smith et al. in Anal. Biochem. 150 (1985) 76]와 겔을 위한 은 스테인(silver stain)[C. R. Merril in Meth.

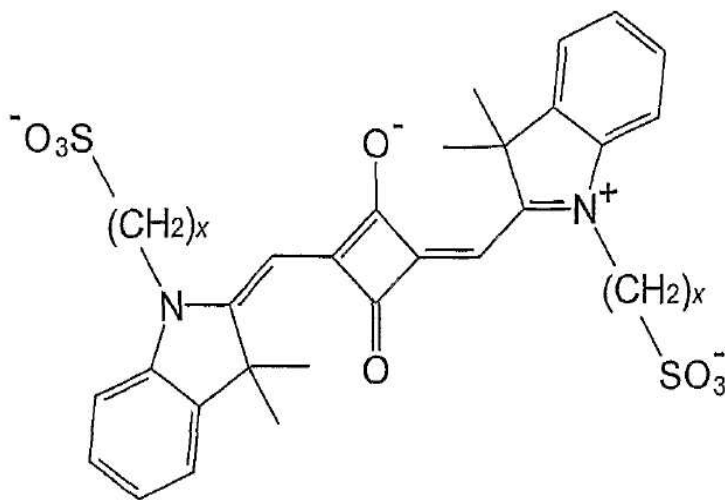
Enzymol. 182 (1990) 477], 쿠마시 블루(Coomassie Blue)[S.Fazekas de St. Groth et al. in Biochim. Biophys. Acta 71 (1963) 377]를 포함한다. 브래드포드 방법, 로리 방법 및 BCA 방법은 칼라리메트릭 기술들(colourimetric techniques)(즉, 색깔 변화)이고 단백질의 범위(protein range)가 8-2000 $\mu\text{g/mL}$ 인 용액에 적합하며, 다수의 반응물과 잠복 시간(incubation time)을 요하고 수많은 일반적인 반응물들로부터의 간섭(interference)을 경험하게 된다. 브래드포드 방법에 사용되는 쿠마시 블루(Coomassie Blue)에는 20-30분의 시간이 소요되고, 삼중 버퍼(tris buffer)에 의해서 방해되지 않는다. 은 스테인(Silver stain)은 매우 민감한 염색 기술(chromatogenic-technique)이고(10-100ng/mL), 젤 스테인(gel stain)으로서 사용된다. 그러나, 그 젤을 다룰 때 주의가 요구되고 그 전체 기술에는 2-3시간이 소요된다. 쿠마시 블루 역시 젤 스테인이고, 단백질 범위(Protein range)가 크로마토제닉한 μg 범위에 있다면은 스테인 대신에 사용될 수 있다. 단백질 농도의 검출을 위한 다른 상업적인 기술들은 Molecular Probes로부터의 NanoOrangeTM Protein Quantitation Kit와 CBQCATM Protein Quantitation Kit을 포함한다. 이들은 형광에서의 변화와 관련한 과민감 용액 기술(ultrasensitive solution technique)이나, 스쿠아레인 유도체(squaraine derivative)를 위해 주어진 범위에 대해서는 선형적(linear)이지 않다. 이 두 기술들은 역시 30분의 예비 시간(preparation time)을 필요로 한다.

발명의 상세한 설명

본 발명의 목적은, 새로운 광발광 화합물(photoluminescent compound), 특별히 수용액 또는 물 함유 혼합 용매(solvent mixture)에 용해되고 이러한 매질(media)에서 그것의 광발광 성질을 유지하는 광발광 화합물을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 또한, 상기 시간 제약을 감소시키고 또는 실질적으로 제거하는 그리고 더 대단한 민감성을 갖는, 액체에서의 단백질의 존재를 검출하는 것을 위한 방법을 제공하는 것이다.

본 발명은 아래의 화학식의 대칭적인 골격 구조를 포함하는 수용성 광발광 화합물을 제공한다.



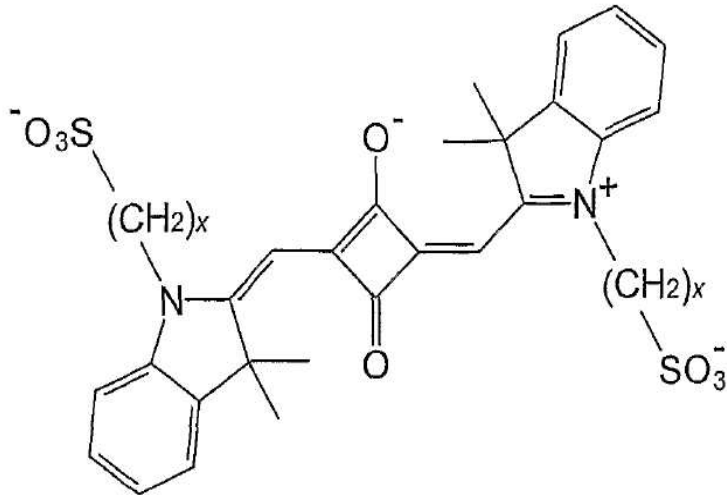
상기 화학식에서 x는 정수이고, 페닐 고리(phenyl ring)는 치환될 수 있다.

특별히, 더 선호되는 화합물은 x=3인 경우를 포함한다.

본 발명에 따른 한층 더 선호되는 화합물은 치환되지 않은 것 또는 한 쪽 또는 양쪽의 페닐기가 알킬(i프로필 그리고 t-부틸을 포함한다)또는 할로젠 그룹으로 5개의 위치에서 치환된 것을 포함한다.

본 발명에 따른 특별하게 선호되는 화합물은 2,4-비스(1-(프로판-3-술폰산)-3,3-트리메틸-2-인돌리닐리덴메틸)시클로부테네디리움-1,3-디올레이트(2,4-bis(1-(propan-3-sulfonic acid)-3,3-trimethyl-2-indolynylidenemethyl)cyclobutenediylum-1,3-diolate) 또는 금속 또는 술폰산의 쿼터너리 질소(quaternary nitrogen)(즉 암모늄, 모노, 디 또는 트리알킬암모늄, 피리디늄 등) 염을 포함한다.

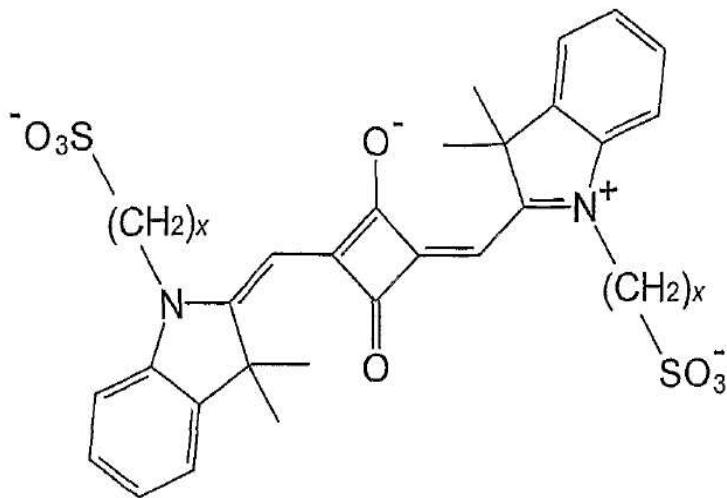
본 발명은 또한, 수용액 또는 물-함유 혼합 용매에 아래 일반식의 대칭적 골격 구조를 포함하는 화합물을 리터당 1×10^{-9} 에서 1 몰(mole) 농도 범위로 포함하는 단백질 검출기를 제공한다.



상기 일반식에서 x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있다.

본 발명은 또한 액체 샘플에서 용해된 단백질의 총 양을 측정하는 방법을 제공한다. 상기 측정 방법은

(a) 아래의 일반식의 대칭적 골격 구조를 포함하는 화합물을 수용액 또는 물-함유 혼합 용매에서 리터당 1×10^{-10} 에서 1 몰(mole) 농도로 용해시키는 단계;



상기 일반식에서 x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있다.

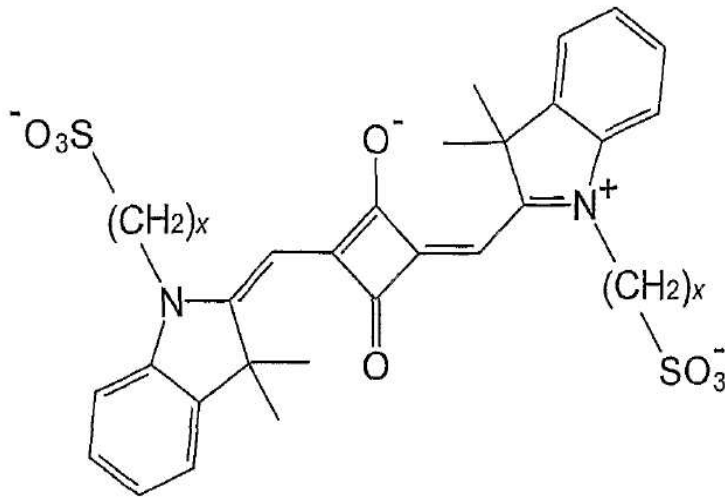
(b) (a) 단계에서 제조된 용액을 테스트 용액 샘플과 혼합하는 단계;

(c) 샘플의 형광성(fluorescence)을 측정하는 단계;

(d) 총 단백질의 양(total protein content)에 대한 값을 구하기 위해 표준값 또는 표준값들(즉, 칼리브레이션 플롯)과 형광성을 비교하는 단계;를 포함한다.

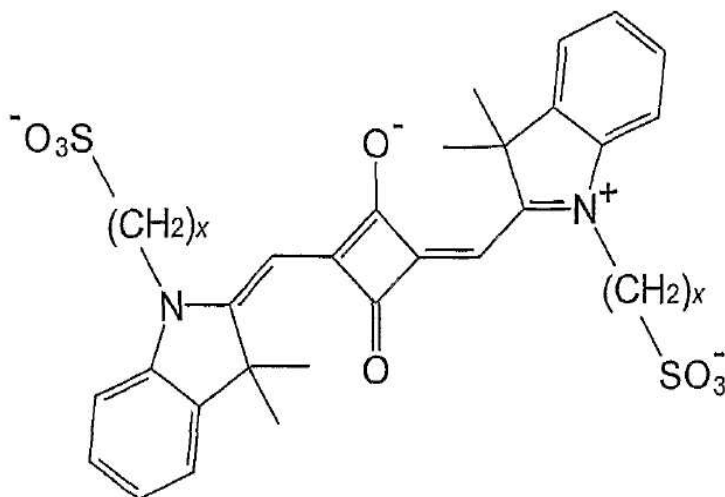
본 발명은 또한, 소듐 도데실설페이트(SDS)가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우에, 수용성 메탄올 및 아세트산을 포함하는 수용성/유기/산 혼합물에서 고정된(fixed) 지지 매트릭스(예를 들어 폴리아크릴아미드(polyacrylamide), 아가로

스(agrose) 또는 스타치(starch))에서 전기이동을 통해 분리된 단백질을 검출 및/또는 양을 측정하는 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 매트릭스는 10%의 수용성 메탄올 또는 수용성 아세트산 용액에서, 리터당 1×10^{-10} 에서 1 몰(mole) 농도로 하기 일반식의 대칭의 골격 구조를 갖는 광발광 화합물로 염색되고, 탈염색되어 밴드를 가시화한다.



상기 일반식에서 x는 정수이고, 페닐 고리는 치환될 수 있다.

요구되어지는 탐지 범위에 걸친 단백질의 수용성 용액의 형광성에 대한 표준값들을 확립하기 위하여, 단백질 BSA의 알려진 농도를 함유하는 용액의 형광성은, 아래의 화학식의 대칭적 골격 구조를 갖는 화합물의 5×10^{-8} M의 수용성 용액을 사용하면, 624 nm($\epsilon = 1.0 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)의 여기 파장(excitation wavelength) 및 638 nm의 검출 파장(detection wavelength)에서 측정된다.



상기 화학식에서 x는 3이다.

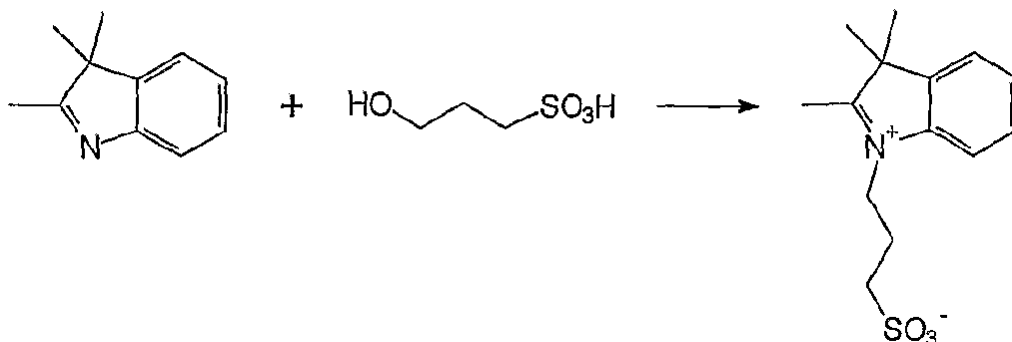
0-100ng/mg의 BSA에 대한 두 개의 분리된 칼리브레이션 플롯(calibration plot)에 대한 결과가 도 1에 도시된다. 0-500ng/mg의 BSA의 검출 범위(detection)에 대한 세 개의 분리된 칼리브레이션 플롯에 대한 결과는 도 2에 도시되고, 0-10 μ g/mg의 BSA의 검출 범위에 대한 세 개의 분리된 칼리브레이션 플롯에 대한 결과는 도 3에 도시된다.

이 검출 범위에 대한 선형적 응답(linear response)은 매우 놀랍다.

일단 BSA를 사용하면서 칼리브레이션 커브가 그려지면, 즉시 단백질 농도의 어떤 값도 측정될 수 있다는 것은, 역시 본 발명의 광발광 화합물의 이점이다. 형광은 역시 높은 파장에 있고, 어떠한 흠뜨러진 더 낮은 파장의 유기 형광에 의해서 가려지지 않는다.

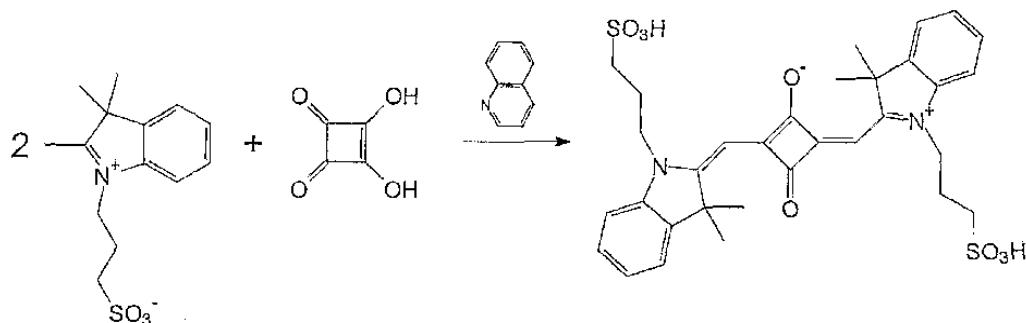
실시예

출발 물질(Starting materials)



2,3,3-트리메틸-1-(프로판-3-술폰)인돌레닌(2,3,3-trimethyl-1-(propan-3-sulfonyl) indolenine)은, 딘스탁 장치(Dean and Stark apparatus)를 사용하면서, 과량 1,3-프로판술폰(propanesultone)과 톨루엔(toluene)에서 2,3,3-트리메틸인돌레닌(2,3,3-trimethylindolenine)을 가열함에 의하여, E. Havinga et al. in Synthetic Metals 69 (1995) pages581-582의 방법으로 제조될 수 있었다. 냉각(cooling) 후, 과량 용매는 디켄트(decant)되고, 프로덕트(product)는 적색 오일(red oil)을 산출(yield)하기 위해 페트롤레움 에테르(petroleum ether)로 반복적으로 세척된다. 몇 주 동안 고여 있는(standing) 상기 오일로부터 형성되는 2,3,3-트리메틸-1-(프로판-3-술폰)인돌레닌(2,3,3-trimethyl-1-(propan-3-sulfonyl) indolenine)의 결정과 단일 결정 x-레이 구조(single crystal x-ray structure)는 도 4에 도시된다.

염료 1의 제조(Preparation of Dye 1)



2,4-비스(1-(프로판-3-술폰)인돌-3,3-디메틸-2-인돌리덴메틸)사이클로부텐비스(일리움)-1,3-디올레이트(2,4-bis(1-(propan-3-sulfonic acid)-3,3-dimethyl-2-indolylidenemethyl) cyclobutenebis (yli-um)-1,3-diolate)는, 딘스탁 장치(Dean and Stark apparatus)를 사용하면서, 50/50 톨루엔/부탄-1-올(50/50toluene/butan-1-ol)에서 2,3,3-트리메틸-1-(프로판-3-술폰)인돌레닌(2,3,3-trimethyl-1-(propan-3-sulfonyl) indolenine)과 퀴날린의 촉매적 양(catalytic amounts of quinaline)을 갖는 스퀘릭 산(squaric acid)을 2:1 몰비로 환류(refluxing)함에 의해서, Sprenger and Ziegenbein in Angew. Chem. Int. Ed. 6 (1967) page 533의 방법으로 제조될 수 있다. 프로덕트는 반응 용매의 제거 및 페트롤레움 에테르(petroleum ether)를 가지고 반복된 가열 세척(repeated heated washings)을 한 후에 배큐오(vacuo)에서 모아진다.

도면의 간단한 설명

도 1은 0-100ng/mg의 BSA에 대한 두 개의 분리된 칼리브레이션 플롯(calibration plot)에 대한 결과.

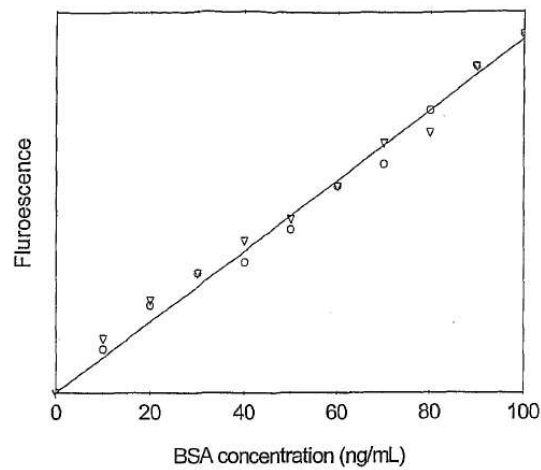
도 2는 0-500ng/mg의 BSA의 검출 범위(detection)에 대한 세 개의 분리된 칼리브레이션 플롯에 대한 결과.

도 3은 0-10 μ g/mg의 BSA의 검출 범위에 대한 세 개의 분리된 칼리브레이션 플롯에 대한 결과.

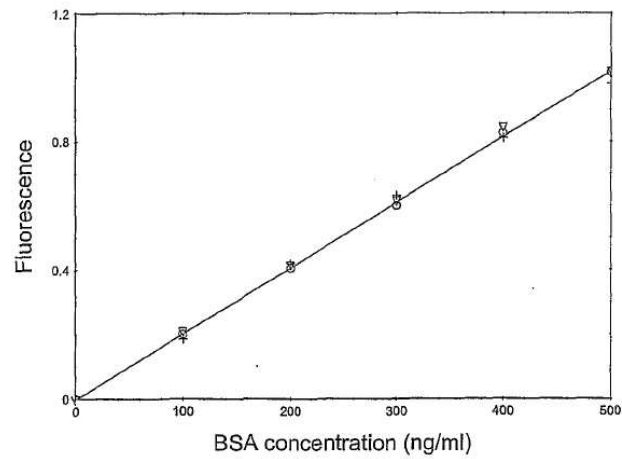
도 4는 2,3,3-트리메틸-1-(프로판-3-술포닐)인돌레닌의 구조에 대한 분자 형태(Molecular conformation) 및 원자-네이밍 스킴(atom-naming scheme).

도면

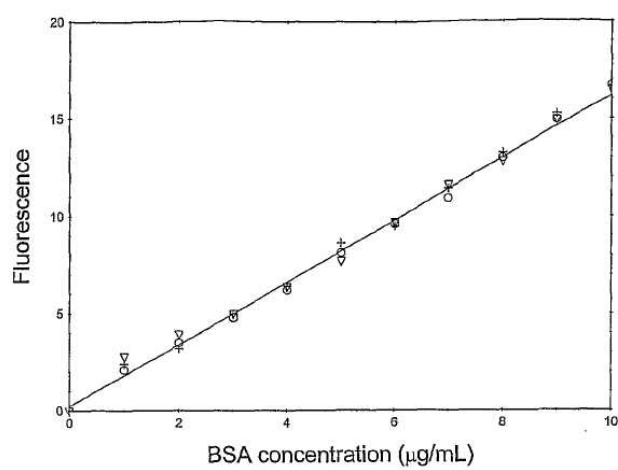
도면1



도면2



도면3



도면4

