

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2010년 10월 21일 (21.10.2010)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2010/120013 A1

- (51) 국제특허분류:
C07D 495/10 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2009/004077
- (22) 국제출원일: 2009년 7월 22일 (22.07.2009)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2009-0033186 2009년 4월 16일 (16.04.2009) KR
- (71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): 이화여자대학교 산학협력단 (EWAH UNIVERSITY-INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION) [KR/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 내, 120-750 Seoul (KR).
- (72) 발명자: 겸
- (75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): 윤주영 (YOON, Ju Young) [KR/KR]; 서울특별시 서초구 잠원동 50 롯데캐슬 207 동 1703 호, 137-795 Seoul (KR). 이원재 (LEE, Won Jae) [KR/KR]; 서울특별시 서초구 서초 4

동 아크로비스타 C 동 1401 호, 137-074 Seoul (KR). 첸샤오 창 (CHEN, Xiao Qiang) [CN/KR]; 서울특별시 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교 나노바이오기술연구소, 120-750 Seoul (KR). 하은미 (HA, Eun Mi) [KR/KR]; 서울특별시 도봉구 창동 715-18 귀빈빌라 401 호, 131-040 Seoul (KR). 김하나 (KIM, Ha Na) [KR/KR]; 서울특별시 양천구 신정동 311 목동신시가 지하파트 1021 동 1202 호, 158-070 Seoul (KR). 이경아 (LEE, Kyung Ah) [KR/KR]; 경기도 수원시 팔달구 우만동 현대아파트 10 동 203 호, 442-190 Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM); 서울특별시 강남구 역삼동 648-1 BYC 빌딩 501 호, 135-080 Seoul (KR).

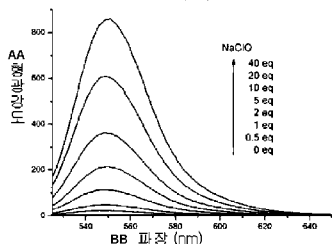
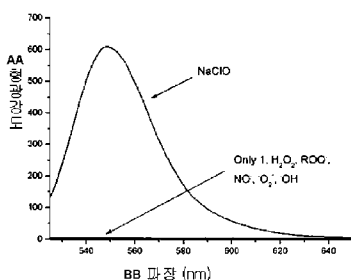
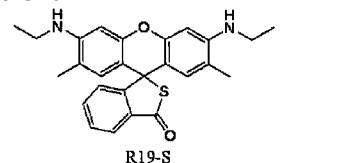
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: NOVEL RHODAMINE DERIVATIVE AND HYPOCHLOROUS ACID DETECTING SENSOR COMPRISING SAME

(54) 발명의 명칭: 신규한 로다민 유도체 및 이를 포함한 차아염소산 검출 센서

[Fig. 1]



AA ... Fluorescence intensity
BB ... Wavelength (nm)

(57) Abstract: The present invention relates to a novel rhodamine derivative and to a hypochlorous acid detecting sensor comprising the same, and more specifically hypochlorous-acid-selective fluorescing and colorimetric sensors employing the colourless, non-fluorescence rhodamine derivative of the present invention, have outstanding selectivity and sensitivity for hypochlorous acid since they exhibit a unique "off-on" type fluorescent and colorimetric change selectively and also have a detection threshold at the nanomole level. Further, sensors of the present invention can also be used in the imaging of hypochlorous acid *in vivo*, and can be advantageously employed in the detection of hypochlorous acid both *in vivo* and in the environment.

(57) 요약서: 본 발명은 신규한 로다민 유도체 및 이를 포함한 차아염소산 검출 센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 무색 무형광을 나타내는 본 발명에 따른 로다민 유도체를 이용한 차아염소산 선택적 형광 및 발색 센서는, 오직 차아염소산에 대해서만 선택적으로 "Off-on" 타입 형광 및 발색 변화를 나타낼 뿐만 아니라 나노몰 수준의 검출 한계를 갖는바, 선택성과 감도가 우수하다. 또한 본 발명에 따른 센서는 생체 내에서의 차아염소산의 이미지화에도 적용 가능할 수 있어, 생체 또는 환경 내의 차아염소산의 검출을 위해 유용하게 사용할 수 있다.



MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유

럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

신규한 로다민 유도체 및 이를 포함한 차아염소산 검출 센서 기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 로다민 유도체 및 이를 포함한 차아염소산 검출 센서에 관한 것으로, 보다 상세하게는 무색 무형광을 나타내는 본 발명에 따른 로다민 유도체를 이용한 차아염소산 선택적 형광 및 발색 센서는, 오직 차아염소산에 대해서만 선택적으로 "Off-on" 타입 형광 및 발색 변화를 나타낼 뿐만 아니라 나노몰 수준의 검출 한계를 갖는바, 선택성과 감도가 우수하다. 또한 본 발명에 따른 센서는 생체 내에서의 차아염소산의 이미지화에도 적용 가능할 수 있어, 생체 또는 환경 내의 차아염소산의 검출을 위해 유용하게 사용할 수 있다.

배경기술

- [2] 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성 질소종(reactive nitrogen species, RNS)의 생물학적 중요성 때문에, 최근 이들 종들을 검출할 수 있는 형광 프로브를 개발하고자 하는 연구들이 많이 수행되었다.
- [3] 차아염소산(hypochlorous acid, HOCl)은 중요한 ROS이며, 생리적 pH에서 일부가 차아염소산염 이온(OCl^-)으로 해리된다. 생물학적으로, 마이엘로페록시다제(myeloperoxidase, MPO)는 과산화수소 및 염소 이온으로부터 차아염소산의 합성을 촉매한다. 차아염소산의 제한된 생산은 미생물의 침입 시 일차 항미생물 제제로 작용하기 때문에 숙주에게는 매우 유익하다. 그러나, 차아염소산의 매우 높은 활성과 확산 특성 때문에, 차아염소산의 제한된 생산은 신경퇴화, 심혈관 질환, 및 염증성 질환 등 다양한 질병을 유발할 수 있다.
- [4] 활성 산소종 중에서 차아염소산의 뚜렷한 기능을 이해하기가 어렵다. 활성 산소종을 선택적이고 민감하게 검출하는 방법이 없다는 것이 주요한 이유이다. 따라서, 형광 변화에 의한 차아염소산 감지 방법이 활발하게 연구되어 왔다. 그러나, 이러한 생물학적 시스템에 적용할만한 센서가 없었다. 그러므로 차아염소산의 생물학적 이미지를 위해 합성하기 쉬운 우수한 검출 범위를 갖는 프로브의 개발이 매우 중요하다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

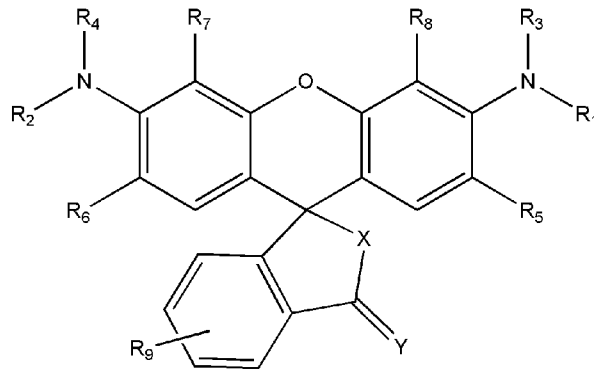
- [5] 본 발명의 목적은 로다민 유도체를 이용하여 차아염소산을 선택적으로 감지할 수 있는 센서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 차아염소산 검출방법을 제공하는 것이다.

기술적 해결방법

- [6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다:

[7] [화학식 1]

[8]



[9]

[10] 상기 식에서,

[11] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,

[12] R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[13] R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[14] R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[15] R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[16] R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[17] R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[18] R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[19] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[20] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[21] X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

[22] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[23] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

[24] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[25] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,

[26] X 가 황 원자이고, Y 가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_5 및 R_6 이 각각 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(R19-S),

[27] X 가 황 원자이고, Y 가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이고, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(RB-S), 및

[28] X 가 $N-NH_2$ 이고, Y 가 산소원자이며, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가

수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.

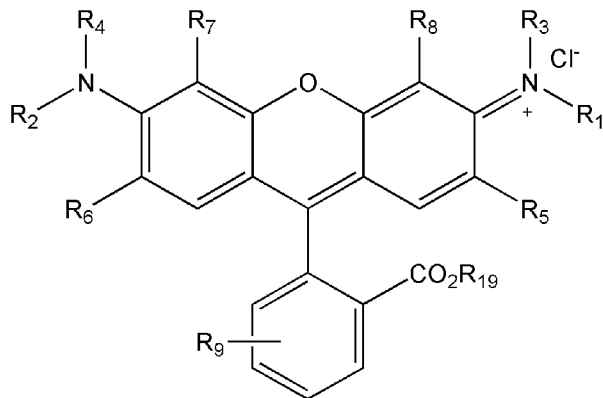
[29]

[30] 본 발명은 또한 하기 화학식 3의 화합물을 가수분해하여 하기 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계; 및

[31] 하기 화학식 4의 화합물을 하기 화학식 5와 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물의 제조방법을 제공한다:

[32] [화학식 3]

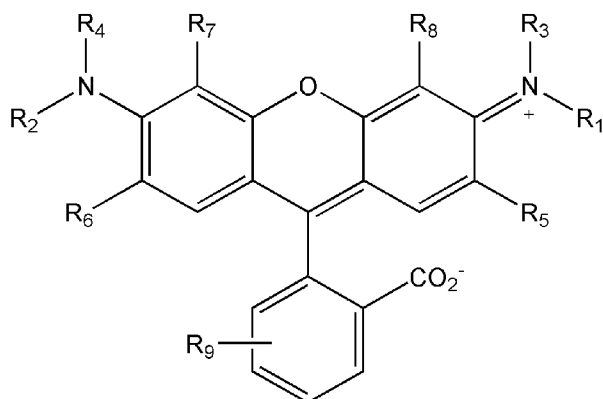
[33]



[34]

[35] [화학식 4]

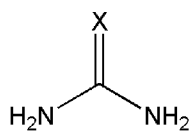
[36]



[37]

[38] [화학식 5]

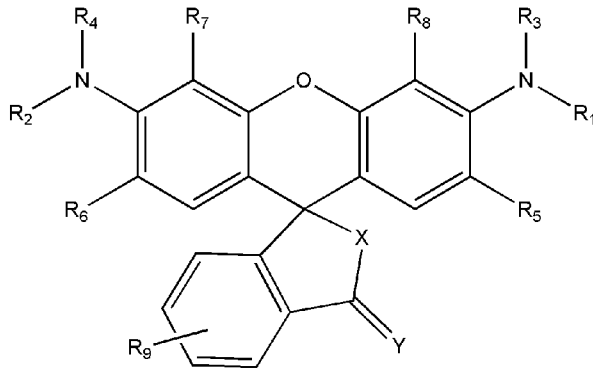
[39]



[40]

[41] [화학식 1]

[42]



[43]

[44] 상기 식에서,

[45] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,

[46] R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[47] R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[48] R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[49] R_6 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[50] R_7 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[51] R_8 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[52] R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[53] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[54] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[55] X는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

[56] Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[57] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

[58] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[59] R_{17} 내지 R_{19} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,

[60] X가 황 원자이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물(R19-S),

[61] X가 황 원자이고, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(RB-S), 및

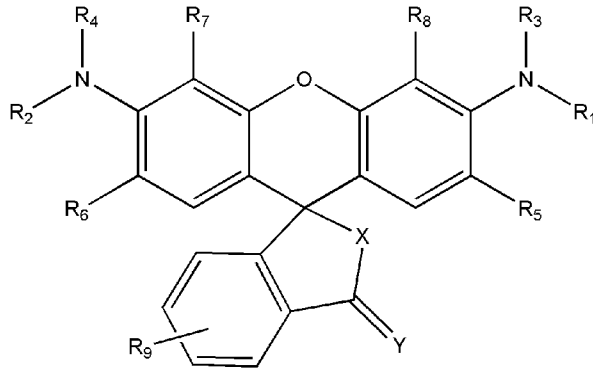
[62] X가 $N-NH_2$ 이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.

[63]

[64] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 차아염소산 검출용 센서를 제공한다:

[65] [화학식 2]

[66]



[67]

[68] 상기 식에서,

[69] R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나,

[70] R₁은 R₃과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[71] R₂는 R₄와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[72] R₅는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₁과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[73] R₆는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₂와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[74] R₇는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₈과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[75] R₈는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₄와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[76] R₉는 수소, 하이드록시, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, -C(O)R₁₀, 또는 -N(R₁₁)(R₁₂)를 나타내며,

[77] 여기서 R₁₀은 수소, 하이드록시, C₁₋₆ 알킬, C₁₋₆ 알콕시, 또는 -N(R₁₃)(R₁₄)를 나타내고,

[78] R₁₁ 및 R₁₂는 각각 독립적으로 수소, C₁₋₆ 알킬, -C(O)R₁₅, 또는 -C(S)R₁₅를 나타내며,

[79] X는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR₁₆을 나타내고,

[80] Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[81] 상기 R₁₃ 내지 R₁₅는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내고,

[82] 상기 R₁₆은 수소, C₁₋₆ 알킬 또는 -N(R₁₇)(R₁₈)을 나타내며,

[83] 여기서 R₁₇ 및 R₁₈은 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타낸다.

[84]

[85] 본 발명은 또한 본 발명의 센서를 사용하여 차아염소산을 검출하는 방법을

제공한다.

유리한 효과

- [86] 본 발명의 로다민 유도체는 100% 수용액 내에서 차아염소산과 반응하여 강한 형광을 나타내고, 아울러 로다민 유도체의 무색이 분홍색으로 변하므로 "Off-On" 타입의 형광센서로 사용할 수 있다.

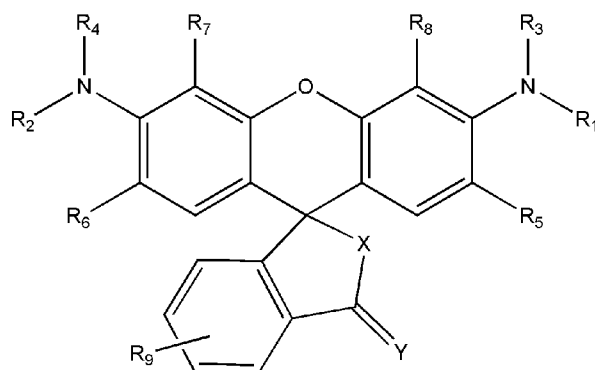
도면의 간단한 설명

- [87] 도 1 내지 6은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체의 구조, 이들의 활성 산소종에 대한 형광 변화 및 차아염소산 농도에 따른 형광 변화를 나타낸 것이다.
- [88] 도 7은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체의 차아염소산 반응에 따른 발색 변화를 나타낸 것이다.
- [89] 도 8은 본 발명의 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체의 농도별 형광 적정 실험 결과를 나타낸 것이다.
- [90] 도 9는 본 발명의 화학식 1로 표시되는 로다민 유도체와 차아염소산의 반응 결과로 얻은 가수분해 산물의 질량 스펙트럼 분석 결과를 나타낸 것이다.
- [91] 도 10은 초파리의 DUOX의 페록시다제 유사 도메인의 염소 의존적 HOCl 생성 능력을 조사한 결과를 나타낸 것이다.
- [92] 도 11은 세포 내 환경에서 HOCl 검출 결과를 나타낸 것이다.
- [93] 도 12 및 13은 초파리 mbn2 세포에서 미생물 처리에 따라 DUOX 의존적 방식으로 HOCl 생성을 유도한 결과를 나타낸 것이다.
- [94] 도 14는 초파리의 장 상피에서 DUOX를 재도입하여 미생물 감염에 의해 유도된 항균성 HOCl능을 조사한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [95] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [96] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:
- [97] [화학식 1]

[98]



[99]

[100] 상기 식에서,

[101] R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나,

- [102] R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는
- [103] R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
- [104] R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
- [105] R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
- [106] R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
- [107] R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
- [108] R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
- [109] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
- [110] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
- [111] X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,
- [112] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
- [113] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,
- [114] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
- [115] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,
- [116] X 가 황 원자이고, Y 가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_5 및 R_6 이 각각 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(R19-S),
- [117] X 가 황 원자이고, Y 가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이고, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(RB-S), 및
- [118] X 가 $N-NH_2$ 이고, Y 가 산소원자이며, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.
- [119]
- [120] 본 발명의 화합물의 치환체 정의에 사용된 용어는 하기와 같다.
- [121] "알킬"은 다른 기제가 없는 한, 탄소수 1 내지 6, 예를 들어 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분지쇄 또는 고리형의 포화 탄화수소를 가리킨다. C_{1-4} 알킬기의 예는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 이소부틸, sec-부틸, 또는 tert-부틸 등이 포함되나, 이들에 제한되지 않는다.
- [122] "알콕시"는 다른 기제가 없는 한, 상기 탄소수 1 내지 6, 예를 들어 탄소수 1 내지 4의 알킬기가 산소원자와 결합한 것을 나타낸다. C_{1-4} 알콕시기의 예는 메톡시, 에톡시, 프로톡시, 및 부톡시가 포함되나, 이들에 제한되지 않는다.
- [123] "할로젠"은 $-F$, $-Cl$, $-Br$ 또는 $-I$ 이다.
- [124] "헤테로고리"는 다른 기제가 없는 한, 질소원자를 포함하는 3 내지 8 환원의

비방향족 포화 탄화 수소환, 또는 방향족 환으로서 단일환 및 융합환을 포함한다.

[125]

[126] 상기 화학식 1의 화합물은 예를 들어

[127] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나,

[128] R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[129] R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[130] R_5 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[131] R_6 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[132] R_7 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[133] R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[134] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[135] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[136] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[137] X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

[138] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[139] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

[140] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[141] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

[142]

[143] 일 구체예에서 상기 화학식 1의 화합물은

[144] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

[145] R_5 내지 R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내며,

[146] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[147] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[148] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[149] X 는 셀레늄 원자를 나타내고,

[150] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[151] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

[152] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[153] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을

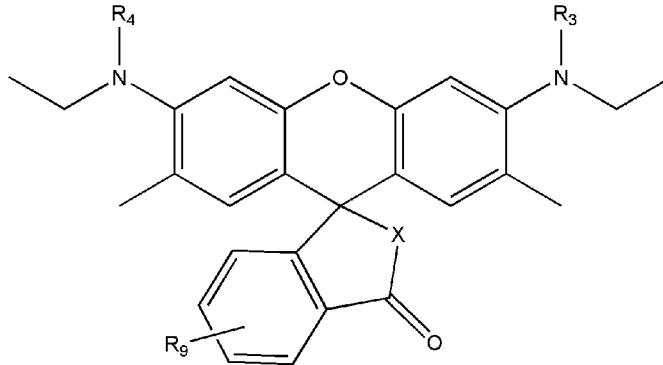
포함한다.

[154]

[155] 상기 구체 예는 하기 화학식 1a로 표시되는 화합물을 포함한다:

[156] [화학식 1a]

[157]



[158]

[159] 상기 식에서,

[160] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

[161] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[162] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[163] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

[164] X는 셀레늄 원자를 나타내고,

[165] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

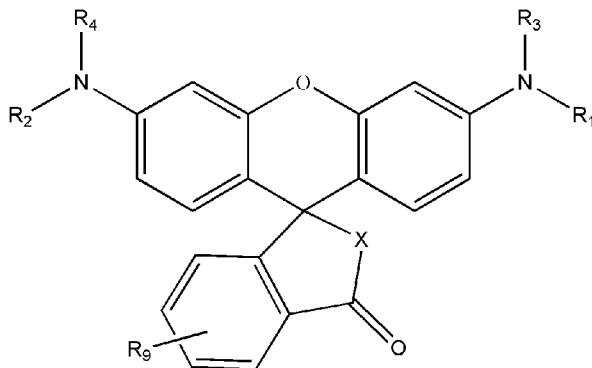
[166] 상기 화학식 1a의 화합물은 R_3 , R_4 , 및 R_9 는 수소를 나타내는 화합물을 포함한다.

[167]

[168] 상기 구체 예는 또한 하기 화학식 1b로 표시되는 화합물을 포함한다:

[169] [화학식 1b]

[170]



[171]

[172] 상기 식에서,

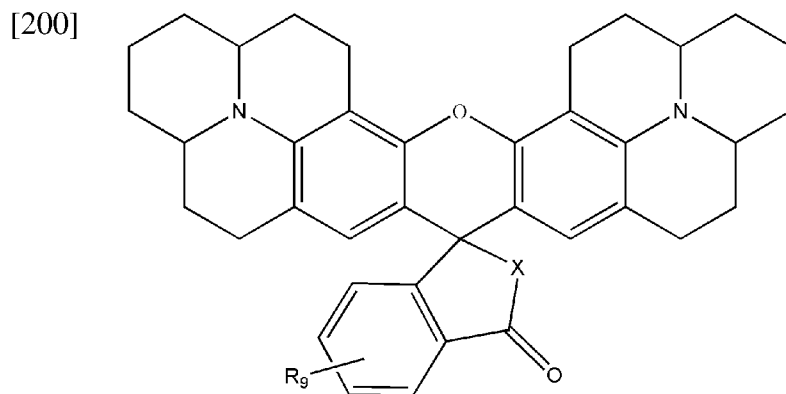
[173] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

[174] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[175] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

- [176] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,
 [177] X는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [178] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.
 [179] 상기 화학식 1b의 화합물은
 [180] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 메틸 또는 에틸을 나타내고,
 [181] R_9 는 수소를 나타내는 화합물을 포함한다.
 [182] 다른 구체예에서 상기 화학식 1의 화합물은
 [183] R_1 는 R_3 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [184] R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [185] R_5 는 R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [186] R_6 은 R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [187] R_7 은 R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [188] R_8 은 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [189] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [190] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [191] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 [192] X는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [193] Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 [194] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 [195] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
 [196] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

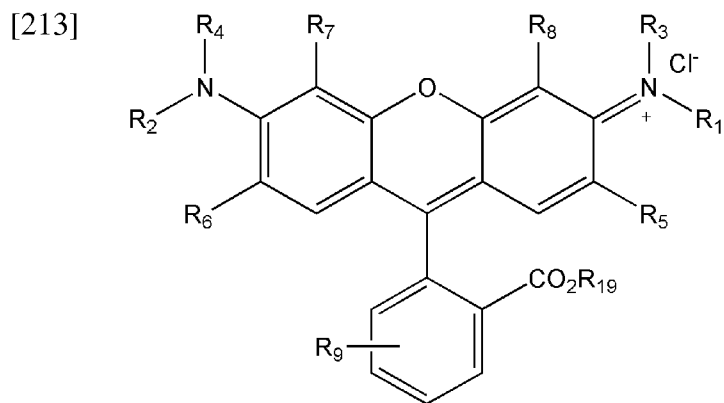
- [197]
 [198] 상기 구체예는 하기 화학식 1c로 표시되는 화합물을 포함한다:
 [199] [화학식 1c]



- [201]
 [202] 상기 식에서,
 [203] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

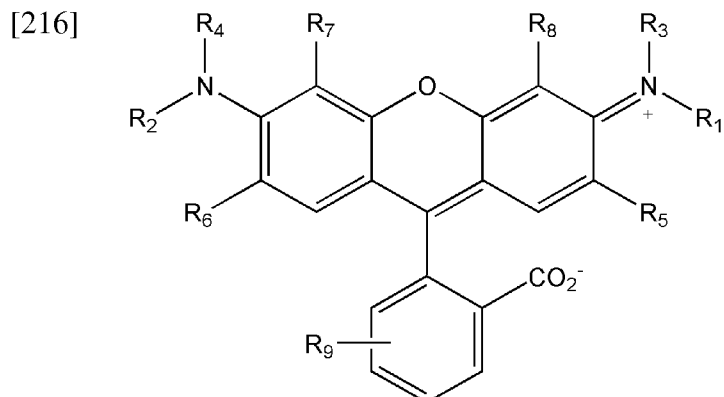
- [204] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [205] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,
 [206] X는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [207] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.
 [208]
 [209] 본 발명은 또한
 [210] 하기 화학식 3의 화합물을 가수분해하여 하기 화학식 4의 화합물을 제조하는
 단계; 및
 [211] 하기 화학식 4의 화합물을 하기 화학식 5와 반응시키는 단계를 포함하는 하기
 화학식 1의 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[212] [화학식 3]



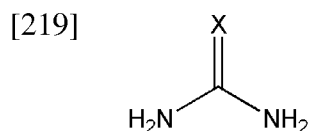
[214]

[215] [화학식 4]



[217]

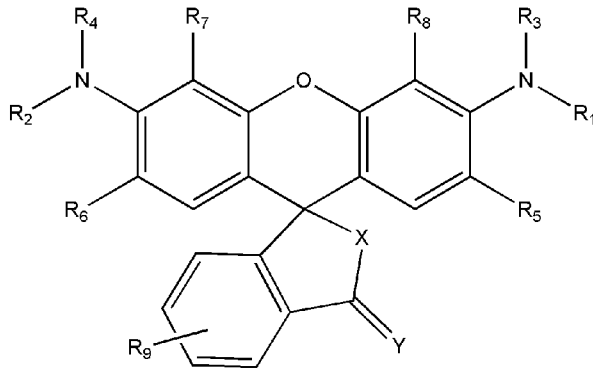
[218] [화학식 5]



[220]

[221] [화학식 1]

[222]



[223]

[224]

상기 식에서,

[225]

 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,

[226]

 R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[227]

 R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[228]

 R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[229]

 R_6 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[230]

 R_7 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[231]

 R_8 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[232]

 R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[233]

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[234]

 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[235]

 X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

[236]

 Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[237]

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

[238]

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[239]

 R_{17} 내지 R_{19} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,

[240]

 X 가 황 원자이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물(R19-S),

[241]

 X 가 황 원자이고, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(RB-S), 및

[242]

 X 가 $N-NH_2$ 이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.

[243]

[244] 상기 화학식 3의 화합물의 화학식 4의 화합물로의 가수분해는 화학식 3의 화합물을 용매의 존재 하에서 염기와 반응시킴으로써 수행될 수 있다.

[245] 상기 용매는 유기용매, 물 또는 이들의 혼합물일 수 있다. 유기용매는 화학식 3의 화합물의 화학식 4의 화합물로의 가수분해에 적합한 것이라면 어떠한 것이든 이용 가능하다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 유기용매는 C₁₋₁₂의 알코올, 에컨대, 메탄올 또는 에탄올일 수 있다.

[246] 화학식 3의 화합물의 가수분해를 위해 사용되는 염기의 종류는 특별히 제한되지 아니한다. 일반적인 가수분해 반응에서 사용되는 염기를 사용할 수 있으며, 이러한 염기로는 에컨대, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂, NH₄OH 등이 있다.

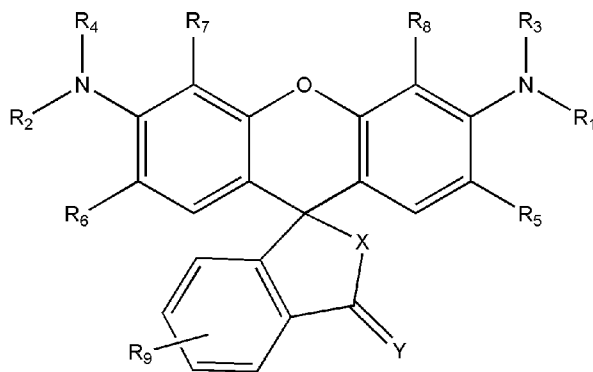
[247] 화학식 4의 화합물을 화학식 1의 화합물로 제조하는 단계는 화학식 4의 화합물을 촉매 및 용매의 존재 하에 화학식 5의 화합물과 반응시킴으로써 수행될 수 있다.

[248]

[249] 본 발명은 또한 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 차아염소산 검출용 센서에 관한 것이다:

[250] [화학식 2]

[251]



[252]

[253] 상기 식에서,

[254] R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나,

[255] R₁은 R₃과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[256] R₂는 R₄와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[257] R₅는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₁과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[258] R₆는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₂와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[259] R₇는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₈과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[260] R₈는 수소 또는 C₁₋₆ 알킬을 나타내거나, R₄와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의

헤테로 고리를 형성하고,

[261] R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[262] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[263] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

[264] X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

[265] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

[266] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

[267] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

[268] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타낸다.

[269]

[270] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물은 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 차아염소산과 반응하여 분홍색의 발색과 밝은 형광을 나타낸다. H_2O_2 , $ROO\cdot$, $NO\cdot$, $\cdot O_2$, $\cdot OH$ 등의 활성 산소종에 대해서는 이러한 발색 반응 및 형광 발광을 나타내지 않고 오로지 차아염소산에 대해서만 높은 선택성과 민감성을 나타낸다. 본 발명의 로다민 유도체는 차아염소산의 농도에 의존적으로 발색 반응 및 형광 발광의 강도가 강해지므로 정량적 검출 또한 가능하다. 뿐만 아니라 본 발명의 로다민 유도체는 나노몰 수준의 미량의 차아염소산의 존재까지도 탐지 가능하다. 또한 본 발명의 화학식 2의 화합물을 미생물에 감염된 초파리에 구강 투여할 경우, 강한 형광이 초파리의 몸에서 발광하는 것을 가시적으로 확인할 수 있다. 따라서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 환경 또는 생체 내 차아염소산 검출을 위한 화학센서로서 매우 유용하게 이용될 수 있다.

[271]

[272] 상기 화학식 2의 화합물은 예를 들어,

[273] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나,

[274] R_1 는 R_3 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나, 또는

[275] R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[276] R_5 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_1 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

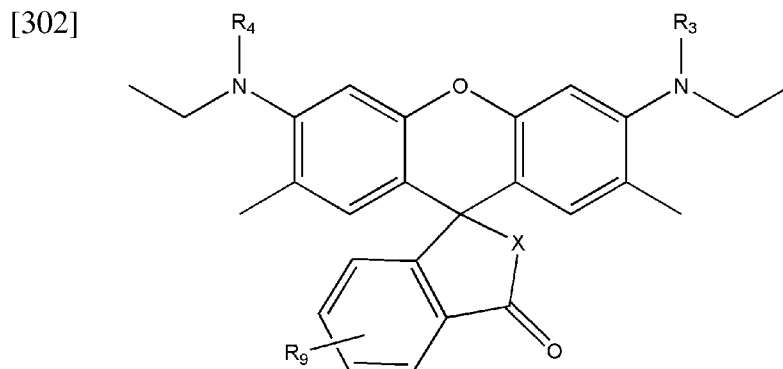
[277] R_6 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

[278] R_7 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

[279] R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

- [280] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [281] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [282] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 [283] X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,
 [284] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 [285] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 [286] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
 [287] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.
- [288]
- [289] 일 구체예에서 상기 화학식 2의 화합물은
- [290] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 [291] R_5 내지 R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내며,
 [292] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [293] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [294] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 [295] X 는 황원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [296] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 [297] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 [298] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
 [299] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.
- [300] 상기 구체예에서 상기 화학식 2의 화합물은 하기 화학식 2a의 화합물을 포함한다:

[301] [화학식 2a]

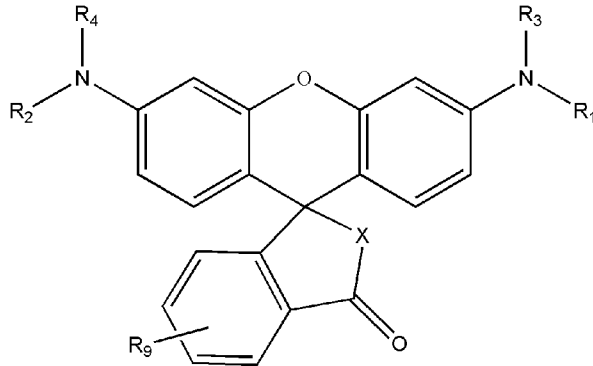


- [303]
- [304] 상기 식에서,
- [305] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

- [306] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [307] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [308] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,
 [309] X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [310] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.
 [311] 상기 구체예에서 상기 화학식 2의 화합물은 또한 하기 화학식 2b의 화합물을 포함한다:

[312] [화학식 2b]

[313]



[314]

- [315] 상기 식에서,
 [316] R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 [317] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [318] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [319] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,
 [320] X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [321] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.
 [322] 다른 구체예에서 상기 화학식 2의 화합물은
 [323] R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [324] R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [325] R_5 는 R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [326] R_6 은 R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [327] R_7 은 R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 [328] R_8 은 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 [329] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 [330] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 [331] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 [332] X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 [333] Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 [334] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

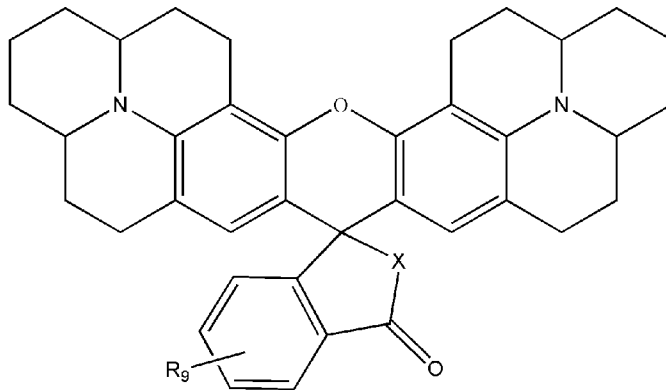
[335] 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
 [336] 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물을 포함한다.

[337]

[338] 상기 구체예에서 상기 화학식 2의 화합물은 하기 화학식 2c의 화합물을 포함한다:

[339] [화학식 2c]

[340]



[341]

[342] 상기 식에서,

[343] R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

[344] 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

[345] R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

[346] X는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

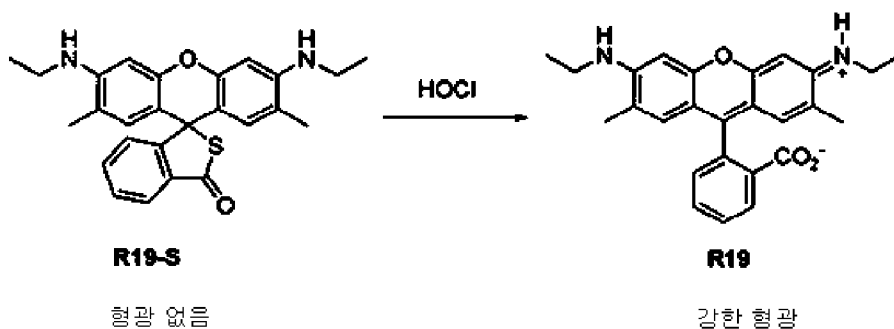
[347] 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

[348]

[349] 하기 반응식 1의 메커니즘에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 pH 6.5 내지 8.5의 100% 수용액 내에서 무색 무형광을 나타내나, 완충용액 내 차아염소산에서 해리된 차아염소산염 이온(OCl^-) 결합하면 분홍색으로 변함과 동시에 강한 형광을 나타낼 수 있다.

[350] [반응식 1]

[351]



[352] 본 발명은 또한 상기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 차아염소산 검출용 조성물에 관한 것이다.

[353] 상기의 차아염소산 검출용 조성물 또는 차아염소산 검출용 센서는 화학식 2로 표시되는 화합물 외에 완충용액을 포함할 수 있다. 완충용액의 종류 및 농도는 특별히 제한되지 아니하나, 상기 차아염소산 검출용 센서의 적용 용도에 따라 적절히 변경할 수 있을 것이다. 예컨대, 본 발명의 차아염소산 검출용 센서를 생체 내 차아염소산의 검출을 위해 사용하고자 하는 경우 상기 완충용액은 생체 내 pH 농도에 상응하는 완충범위를 갖는 것이 바람직할 것이다.

[354]

[355] 본 발명은 또한 상기의 센서를 사용하여 차아염소산을 검출하는 방법에 관한 것이다.

[356] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 생체 또는 환경으로부터 수득한 시료 내에 차아염소산의 존재 유무는 화학식 2로 표시되는 로다민 유도체를 시료와 반응시킨 후 분홍색의 발색 변화 또는 형광 발광 여부를 관찰함으로써 쉽게 탐지할 수 있으며, 차아염소산의 농도에 의존적으로 형광 발광 및 분홍색으로의 발색 현상이 강해지므로 시료 내 차아염소산의 정량 분석 또한 가능하다.

[357] 또한, 본 발명의 화학식 2의 로다민 유도체는 살아있는 세포 및 동물 조직에서 신호 의존적 내제성 HOCl를 선택적으로 검출할 수 있다.

[358] 따라서, 상기 시료는 차아염소산의 존재 검출이 요구되는 생체 또는 환경으로부터 얻은 시료이면 어떠한 것이든 가능하다. 예를 들어, 상기 시료는 동물 또는 사람의 활성 산소종의 조절 이상으로 인한 심혈관 및 염증성 질환 등을 평가하기 위한 체액 또는 혈액일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[359] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[360]

[361] <실시예 1> 3',6'-bis(ethylamino)-2',7'-dimethyl-3H-spiro[benzo[c]thiophene-1,9'-xanthen]-3-one (R19-S)의 합성

[362] 에탄올 30mL 및 물 60mL에 용해시킨 NaOH(4.8g, 0.12mol) 용액에 로다민 6G(Rhodamine 6G, R6G(3g, 6.3mmol))를 첨가하였다. 상기 혼합 용액을 12시간 동안 환류시킨 후, 냉각하고, 에탄올을 진공 증발시킨 다음 2M 염산으로 pH를 6-7로 조정하였다. 상기에서 얻은 침전물을 여과하고, 물로 수회 세척하고, 건조하여 적색 분말 형태의 3',6'-bis(ethylamino)-2',7'-dimethyl-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one(R19)을 수득하였다(2.52g, 수율 97%).

[363] ¹H NMR (DMSO-d₆, 250 MHz) δ(ppm): 7.93 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 7.77-7.62 (m, 2H), 7.15 (d, 1H, J = 7.5 Hz), 6.31 (s, 2H), 6.19 (s, 2H), 5.29 (t, 2H, J = 5.0 Hz), 3.43-3.10

(q, 4H, $J = 7.5$ Hz), 1.87 (s, 6H), 1.19 (t, 6H, $J = 7.2$ Hz).

[364] ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 62.5 MHz) δ (ppm): 168.978, 152.745, 150.876, 148.469, 135.183, 129.625, 127.694, 126.687, 124.349, 123.952, 118.376, 104.676, 95.121, 85.535, 16.955, 14.011.

[365]

[366] 다음으로, 상기에서 제조한

3',6'-bis(ethylamino)-2',7'-dimethyl-3H-spiro[isobenzofuran-1,9'-xanthen]-3-one(2g, 4.8mmol)를 녹인 1,2-디클로로에탄 15mL에 옥시염화인(phosphorus oxychloride) 3mL을 한 방울씩 첨가하였다. 상기 혼합 용액을 4시간 동안 환류하고, 냉각하고, 진공 증발시키고 나서, 염화아실(acid chloride) 원유를 6mL의 THF에 녹였다. 상기 용액을 티오우레아(thiourea, 1.52g, 20mmol) 및 트리에틸아민(triethylamine, 12mL)을 녹인 THF (50mL)/water (10mL) 의 혼합 용액에 실온에서 한 방울씩 첨가하였다. 오버나이트 동안 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하였다. 다음으로, 50mL의 물을 첨가하고, 형성된 침전물을 여과하였다. 상기 침전물을 물로 수회 세척한 후 건조하고, 용매로 CH_2Cl_2 를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 3',6'-bis(ethylamino)-2',7'-dimethyl-3H-spiro[benzo[c]thiophene-1,9'-xanthen]-3-one (R19-S)를 수득하였다(1.1g, 수율 53%).

[367] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 7.89 (d, 1H, $J = 7.0$ Hz), 7.49 (m, 2H), 7.15 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.52 (s, 2H), 6.20 (s, 2H), 3.52 (m, 2H), 3.22 (m, 4H), 1.93 (s, 6H), 1.29 (t, 6H, $J = 6.5$ Hz).

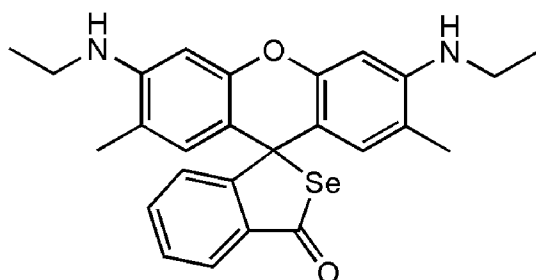
[368] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 197.991, 158.293, 150.615, 147.126, 135.373, 134.309, 129.663, 128.120, 127.251, 122.578, 118.071, 108.782, 96.353, 62.909, 38.346, 18.760, 14.742.

[369] FAB MS $m/z = 431.1793$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{S} = 431.1793$.

[370]

[371] <실시예 2> R19-Se의 제조

[372]



[373] 로다민 19(1g, 2.4mmol)을 녹인 1,2-디클로로에탄 15mL에 옥시염화인 2mL을 한 방울씩 첨가하여 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액을 4시간 동안 환류한 후, 반응 혼합물을 냉각하고, 진공 하에서 증발시켰다. 상기 용액을 티오우레아(500mg, 4.1mmol) 및 트리에틸아민 6mL을 녹인 THF (25mL)/water (5mL) 의 혼합 용액에 실온에서 한 방울씩 첨가하였다. 오버나이트 동안 교반한

후, 감압 하에서 용매를 제거하였다. 다음으로, 30mL의 물을 첨가하고, 형성된 침전물을 여과하였다. 상기 침전물을 물로 수회 세척한 후 건조하고, 용출용매로 CH_2Cl_2 를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 R19-Se를 수득하였다(240mg, 수율 21%).

[374] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 7.81 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 7.49-7.32 (m, 2H), 7.14 (d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.44 (s, 2H), 6.20 (s, 2H), 3.43 (s, 2H), 3.14 (q, 4H, $J = 7.0$ Hz), 1.84 (s, 6H), 1.24 (t, 6H, $J = 7.0$ Hz).

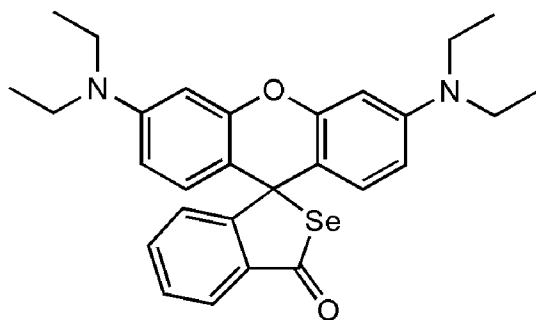
[375] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 201.875, 159.023, 150.583, 146.893, 140.698, 134.217, 130.010, 128.405, 128.131, 122.520, 118.010, 111.235, 96.305, 62.953, 38.359, 16.826, 14.760.

[376] FAB MS $m/z = 479.1241$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calc. for $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2\text{Se} = 479.1239$.

[377]

[378] <실시예 3> RB-Se의 제조

[379]



[380] 로다민 B(1g, 2.2mmol)을 녹인 1,2-디클로로에탄 10mL에 옥시염화인 2mL을 한 방울씩 첨가하여 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액을 4시간 동안 환류한 후, 반응 혼합물을 냉각하고, 진공 하에서 증발시켰다. 미정제 염화아실을 THF 6mL에 녹이고, 상기 용액을 셀레노우레아(500mg, 4.1mmol) 및 트리에틸아민 6mL을 녹인 THF (25mL)/water (5mL) 의 혼합 용액에 실온에서 한 방울씩 첨가하였다. 오버나이트 동안 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하였다. 다음으로, 30mL의 물을 첨가하고, 형성된 침전물을 여과하였다. 상기 침전물을 물로 수회 세척한 후 건조하고, 용출용매로 CH_2Cl_2 를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 RB-Se를 수득하였다(0.410mg, 수율 37%).

[381] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 7.79 (d, 1H, $J = 6.9$ Hz), 7.46-7.34 (m, 2H), 7.18 (d, 1H, $J = 6.6$ Hz), 6.62 (d, 2H, $J = 8.3$ Hz), 6.24 (s, 2H), 6.20 (d, 2H, $J = 8.5$ Hz), 3.26 (q, 8H, $J = 7.0$ Hz), 1.08 (t, 12H, $J = 7.0$ Hz).

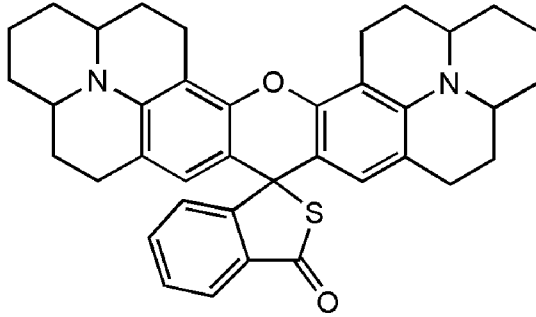
[382] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 201.688, 158.732, 152.283, 148.191, 140.878, 134.121, 130.090, 128.418, 128.158, 122.522, 110.957, 108.130, 97.449, 62.725, 44.371, 12.634.

[383] FAB MS $m/z = 507.1548$ [$\text{M} + \text{H}$] $^+$, calc. for $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_2\text{Se} = 507.1553$.

[384]

[385] <실시예 4> R110-S의 제조

[386]



[387] 로다민 110(2g, 3.5mmol)을 녹인 1,2-디클로로에탄 15mL에 옥시염화인 3mL을 한 방울씩 첨가하여 혼합 용액을 제조하였다. 상기 혼합 용액을 4시간 동안 환류한 후, 반응 혼합물을 냉각하고, 진공 하에서 증발시켰다. 미정제 염화아실을 THF 6mL에 녹이고, 상기 용액을 티오우레아(1.5g, 20mmol) 및 트리에틸아민 12mL을 녹인 THF (50mL)/water (10mL) 의 혼합 용액에 실온에서 한 방울씩 첨가하였다. 오버나이트 동안 교반한 후, 감압 하에서 용매를 제거하였다. 다음으로, 50mL의 물을 첨가하고, 형성된 침전물을 여과하였다. 상기 침전물을 물로 수회 세척한 후 건조하고, 용출용매로 CH_2Cl_2 를 사용하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 R110-S 를 수득하였다(860mg, 수율 42%).

[388] ^1H NMR (CDCl_3 , 250 MHz) δ (ppm): 7.96 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 7.48-7.35 (m, 2H), 7.18 (d, 1H, $J = 7.4$ Hz), 6.18 (s, 2H), 3.07-2.99 (m, 8H), 2.80 (t, 4H, $J = 6.3$ Hz), 2.52-2.35 (m, 4H), 1.95 (t, 4H, $J = 4.3$ Hz), 1.79 (t, 4H, $J = 5.3$ Hz).

[389] ^{13}C NMR (CDCl_3 , 62.5 MHz) δ (ppm): 198.211, 157.908, 147.480, 143.329, 135.834, 134.154, 128.055, 127.502, 125.612, 122.504, 117.444, 108.751, 107.518, 64.008, 49.886, 49.427, 27.189, 21.988, 21.481, 21.186.

[390]

[391] <제조예 1> 활성 산소종의 제조

[392] 하기의 방법에 따라 H_2O_2 , $\text{ROO}\cdot$, $\text{NO}\cdot$, $\cdot\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ 및 HOCl 의 다양한 ROS 및 RNS를 제조하였다.

[393] H_2O_2 (최종 농도: $200\mu\text{M}$)를 0.1M KH_2PO_4 완충용액(pH 7.4)에 첨가하고, 25°C 에서 1시간 동안 교반하였다.

[394] 2,2'-Azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride ($200\mu\text{M}$)로부터 생성된 $\text{ROO}\cdot$ 를 0.1M KH_2PO_4 완충용액 (pH 7.4)에 첨가하고 25°C 에서 1시간 동안 교반하였다.

[395] 산화질소(nitric oxide)는 SNP(Sodium Nitroferricyanide (III) Dihydrate)로부터 생성하였다. SNP (최종 농도: $200\mu\text{M}$)를 포함하는 0.1 M KH_2PO_4 를 25°C 에서 30분 동안 교반하였다.

[396] $\cdot\text{O}_2$ 는 잔틴 및 잔틴 옥시다제를 첨가하여 생성하였다. 특히, 잔틴 옥시다제를 먼저 첨가하여 녹인 후 잔틴(최종 농도: $200\mu\text{M}$)을 첨가하여 혼합 용액을 25°C 에서 1시간 동안 교반하였다.

[397] $\cdot\text{OH}$ 는 과염소산 철(ferrous perchlorate) 및 과산화수소를 첨가하여 생성하였다.

특히, 과염소산 철($200\mu\text{M}$) 및 H_2O_2 (2mM)는 실온에서 $0.1\text{M KH}_2\text{PO}_4$ 완충용액(pH 7.4)에 첨가하고, 상기 혼합 용액을 25°C 에서 30분 동안 교반하였다.

[398] 치아염소산은 실온에서 NaClO 로부터 제조하였다.

[399]

[400] <실험예 1> 로다민 유도체를 이용한 활성 산소종의 형광 변화 및 적정 실험

[401] 상기 실시예 1 내지 4의 로다민 유도체 및 공지 또는 시판중인 로다민 유도체를 사용하여 생리적 pH에서 치아염소산에 대한 고도의 선택적 형광 및 발색 변화를 관찰하였다.

[402] 활성 산소종의 형광 변화를 관찰하기 위해 다음과 같이 실험 용액을 제조하였다. CH_3CN 에서 호스트 스톱 용액(1mM)을 제조하였다. 통상의 실험에서, $30\mu\text{l}$ 의 프로브 스톱 용액을 테스트 튜브에 넣고, 각 ROS 스톱 또는 $0.1\text{M KH}_2\text{PO}_4$ 완충용액(pH 7.4)을 첨가하여 실험 용액을 제조하였다. 상기 시료는 일반적으로 515nm 에서 여기되었다. 여기 및 방출 슬릿 너비는 각각 3nm 및 1.5nm 였다. 낮은 농도의 HOCl 적정을 위해, 5nm 의 여기 및 방출 슬릿을 사용하여 1분간 HOCl 를 첨가한 후 515nm 에서 형광 스펙트럼을 측정하였다.

[403] 도 1 내지 6에 나타난 바와 같이, 로다민 유도체들($10\mu\text{M}$)은 HOCl (0.7 eq.)를 포함하는 $\text{CH}_3\text{CN-KH}_2\text{PO}_4$ 완충용액(0.1M , pH 5.5) ($1:99$, v/v)과의 반응에서 매우 선택적인 형광 증가를 나타냈다.

[404] 반대로, H_2O_2 , $\text{NO}\cdot$, $\text{HO}\cdot$, $\text{ROO}\cdot$ 및 $\cdot\text{O}_2^-$ (20 eq.) 등의 다른 활성 산소종의 경우, 형광 변화를 나타내지 않았다.

[405]

[406] 또한, HOCl 의 농도별 형광 적정 실험을 실시하여 형광 강도를 측정하였다.

[407] 도 1 내지 6에 나타난 바와 같이, 0.7 당량의 HOCl ($7\mu\text{M}$)을 첨가하면, 최대 형광 강도를 나타냈다.

[408]

[409] 또한, HOCl 에 의한 비색 변화는 육안으로 관찰할 수 있다.

[410] 도 7에 나타난 바와 같이, HOCl 첨가로 무색에서 분홍색으로의 색깔 변화와 530nm 에서 새로운 UV 흡수 피크가 관찰되었다.

[411]

[412] 또한, 저 농도의 HOCl 를 이용한 형광 적정 실험 결과, 센서 R19-S는 nM 범위까지 HOCl 를 검출하였다(도 8a 참조). 또한, 센서 R19-S의 형광 강도는 HOCl 농도 의존적으로(1 내지 20nM) 직선 비례하였고(도 8b), 3의 신호 대 잡음비(S/N ratio)는 HOCl 농도별 반응에서 10nm 만큼 높게 관찰되었다. 이들 데이터를 기초로 하여, HOCl 에 대한 R19-S의 검출 범위는 0.5ppb 인 것으로 평가하였다.

[413]

[414] 또한, R19-S와 NaClO 의 반응 결과로 R19가 생성되는 지를 확인하기 위해, R19-S (50mg , 0.11mmol)를 포함하는 CH_2Cl_2 (5mL)/ CH_3CN (10mL)/ H_2O (5mL) 용액을 2mL 의 100mM NaClO (5 당량) 용액에 첨가하였다. 상기 혼합 용액을

실온에서 2시간 동안 교반하였다. 감압 하에서 용매를 증발시킨 후, 미정제산물을 실리카겔 컬럼($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 100:20)을 통해 정제하여 R19 27mg을 수득하였다. 정제산물을 메스 스펙트럼(mass spectrum)을 통해 확인하였다.

[415] 도 9에 나타난 바와 같이, 가수분해 산물이 R19임을 확인할 수 있었다.

[416] 상기 결과로부터, 형광 및 비색 변화는 HOCl 하에서 R19-S로부터 로다민 19(R19)가 생성되는 데 영향을 미침을 알 수 있었다.

[417]

[418] <실험예 2> 생물학적 환경에서 센서 검증: DUOX의 PHD 조사

[419] 새로운 로다민 유도체를 HOCl의 생물학적 연구에 적용할 수 있는지를 결정하기 위해, 자연상태의 생물학적 과정에서 세포 내 내재하고 있는 HOCl 생산을 검출하고자 하였다.

[420] HOCl의 역할은 산화제 의존적인 선천성 면역에서 일어나는 소위 식세포로부터의 "산화적 폭발"에 의해 잘 묘사되어 있다. 이 과정에서, HOCl은 침입하는 미생물을 죽이기 위해 백혈구가 이용하는 강력한 항균 제제로 작용한다. 최근에, 산화적 폭발 개념은 점막 상피 세포와 같은 비-식세포로 확대되었다. 초파리에서 듀옥스(dual oxidative, DUOX)가 미생물 침입에 반응하여 장 상피에서 항균성 활성 산소종을 생산한다는 유전적 증거가 입증되었다. DUOX 의존적 활성 산소종은 장에서 장 면역 및 숙주 생존에 필수적인 일차 항균 제제로 작용한다. DUOX는 2개의 특징적인 효소로 구성된 NADPH 옥시다제 군에 속한다. 첫 번째 효소는 초과산화물 음이온(superoxide anion) 및 이의 불균등화(dismutation) 산물인 과산화수소의 생성에 관여하는 NADPH 옥시다제 도메인이다. 두 번째 효소는 페록시다제 유사 도메인(peroxidase homology domain, PHD)으로 알려져 있으며, 염소 이온 하에서 과산화수소에서 HOCl을 생성할 수 있는 MPO 유사 활성을 갖는 것으로 알려져 있다. 비록 DUOX의 과산화수소 생성 능력이 입증되어 있지만, HOCl 특이 염료가 없기 때문에 DUOX가 장 상피에서 일차 항균 제제로서 HOCl 분자를 생성하는지는 명백하지 않았다. 따라서, HOCl을 생화학적으로 생산할 수 있는 MPO 유사 활성을 갖고 있는지를 측정하기 위해 DUOX의 PHD를 조사하였다.

[421] 이를 위해, *in vitro* 효소 반응을 위해 초파리(*Drosophila*) S2 세포주를 이용하여 재조합 초파리(*Drosophila*) PHD를 제작하였다.

[422] 초파리 S2 세포(*Drosophila* S2 cells) 및 mbn2 세포는 통상의 방법에 따라 배양하고, DUOX의 재조합 PHD 도메인은 pMT-V5/His 벡터를 이용하여 S2 세포에서 제조하고 역시 통상의 방법에 따라 정제하였다. 또한, HOCl-특이 화합물인 R19-S와 결합시켜 형광 분광광도계를 이용하여 HOCl 생성을 측정하였다.

[423] 도 10에 나타난 바와 같이, Cl^- 및 H_2O_2 가 둘 다 있는 경우에만 PHD가 생성된 HOCl을 검출할 수 있었다. 이는 DUOX의 PHD가 MPO 유사 활성을 가짐을 *in vitro* 에서 최초로 입증한 것이다.

[424]

[425] <실험예 3> DUOX 유도에 의한 세포 내 HOCl 생성 검출 조사

[426] 최근에 세균 효능제(agonist)가 Gαq-PLCβ-Ca⁺⁺ 경로를 통해 DUOX 의존적으로 ROS를 유도함이 입증되었다. 본 발명의 R19-S는 HOCl에 매우 특이적이기 때문에 미생물 자극이 DUOX 의존적 방식으로 세포 내 HOCl를 생성할 수 있는지를 측정하는 검출 시스템을 사용하였다.[427] 이를 위해, 초파리에 감염하는 세균으로 잘 알려진 어위니아 카로토보라 카로토바라(*Erwinia carotovora carotovara*) 15 (Ecc15)의 미생물 추출물을 초파리의 대식세포 유사 mbn2 세포주에 처리하였다.[428] 또한, DUOX가 고갈된 mbn2 세포를 제조하기 위해, 이용 전에 세포 (세포수: ~10⁶ cells)를 이중 가닥 RNA(DUOX의 975 내지 1145의 아미노산을 코딩하는 510 bp)와 함께 48시간 동안 처리하였다. 초파리는 표준 콘밀 아가 배지(cornmeal-agar medium)에서 25°C, 60% 상대습도 조건에서 유지하였다. 본 실험을 위해 사용한 초파리 라인은 다음과 같다: *UAS-DUOX-RNAi*; *UAS-DUOX*; *UAS-DUOX-PHD*; *UAS-hDUOX1* and *-hDUOX2*; *norpA*⁷; 및 *Da-GAL4*(Ha *et al.*, *Science* 310, 847-850, 2005).

[429] 형질전환 초파리 및 다른 유전적 배경을 갖는 넉다운 초파리를 제조하기 위해 표준 초파리의 유전적 기술을 사용하였다.

[430] 도 11에 나타난 바와 같이, *Ecc15* 추출물은 mbn2 세포에서 HOCl의 생성을 유도할 수 있다. 또한, 일정 농도의 HOCl를 mbn2 세포에 처리한 경우, 상기 염료는 수 μM의 낮은 농도의 HOCl를 검출할 수 있다. 또한, 미생물의 유도에 의해 생성된 HOCl의 농도는 약 50μM 정도로 낮은 것으로 평가될 수 있다.

[431] 그러나, 미생물의 유도에 의해 생성된 HOCl는 DUOX가 고갈된 mbn2 세포 (DUOX-RNAi를 발현하는 mbn2 세포)에서 완전히 사라졌다. 이는 HOCl 생성은 완전히 DUOX 활성 때문임을 입증하는 것이다(도 12 및 13). 또한, 프로브 R19-S는 세포 환경에서 효능제(agonist)에 의해 유도된 HOCl의 정량적 측정 시 이용될 수 있음을 입증한 것이다.

[432]

[433] <실험예 4> 초파리에서 R19-S를 이용한 *in vivo* HOCl 검출 실험[434] *In vivo* 조건에서 본 발명 R19-S의 적용을 확장하기 위해, 초파리 성체의 장 상피에서 미생물 침입에 반응하여 자연적인 방어 사건으로 일어나는지를 측정하기 위해 *de novo* HOCl 생성을 조사하였다. DUOX 의존적 ROS 생성을 유도하기 위해, R19-S를 넣지 않고 *Ecc15* 추출물(1mg/mL)을 포함하는 5%의 슈크로오스 용액을 30분 동안 초파리에 구강 섭취시켜 장에 도입하였다. 다음으로, 장에서 *in situ* HOCl 생성을 관찰하기 위해 R19-S(5μM)를 2시간 동안 섭취시켜 장에 도입하였다.

[435] 도 14에 나타난 바와 같이, 야생형 초파리의 장은 세균 감염 시 HOCl를 생성하였으며, 이는 장 감염은 장 상피에서 HOCl 생성을 유도할 수 있음을

입증한 것이다. 그러나, 미생물에 의해 유도된 HOC1 생성은 DUOX-활성 신호 경로가 없거나(*PLC*?돌연변이 초파리의 장에서), 또는 DUOX가 없으면(*DUOX-RNAi* 초파리의 장에서) 완전히 사라졌다. 이는 미생물에 의해 유도된 HOC1 생성이 일어나기 위해서는 *PLC* 조절에 따른 DUOX 활성이 필요함을 입증한 것이다.

[436]

[437] 또한, *DUOX-RNAi* 초파리에서 보이는 HOC1 생성 능의 손상이 불충분한 DUOX 효소 활성으로 인해 일어날 수 있는지를 입증하기 위해, 다양한 DUOX 효소(사람의 DUOX 1-2(hDUOX), 초파리의 DUOX(dDUOX) 및 PHD도메인을 제거한 초파리의 DUOX(dDUOX-PHD)를 재-도입하여 *DUOX-RNAi* 초파리의 HOC1 생성 능력을 회복시키고자 하였다.

[438]

이때 사용한 초파리의 유전자형은 다음과 같다: Cont (*Da-GAL4/+*); *PLCβ^{-/-}* (*norpA⁷*); dDUOX-RNAi (*UAS-dDUOX-RNAi/+*; *Da-GAL4/+*); dDUOX-RNAi + dDUOX (*UAS-dDUOX-RNAi/UAS-dDUOX*; *Da-GAL4/+*); dDUOX-RNAi + dDUOX-ΔPHD (*UAS-dDUOX-RNAi/+*; *UAS-DUOX-ΔPHD/Da-GAL4*); dDUOX-RNAi + hDUOX1 (*UAS-dDUOX-RNAi/UAS-hDUOX1*; *Da-GAL4/+*); dDUOX-RNAi + hDUOX2 (*UAS-dDUOX-RNAi/UAS-hDUOX2*; *Da-GAL4/+*).

[439]

도 14에 나타난 바와 같이, PHD도메인을 제거한 초파리의 DUOX를 제외하고, 초파리의 DUOX 및 사람의 DUOX를 도입한 경우 *DUOX-RNAi* 초파리의 장에서 HOC1 생성 및 미생물 자극에 의한 HOC1 생성 능이 거의 완전히 회복되었다. 또한, DUOX가 세균 감염에 반응하여 점막 상피에서 생체 내 항균성 HOC1의 생성에 관여한다는 사실은 최초로 입증한 것이다.

산업상 이용가능성

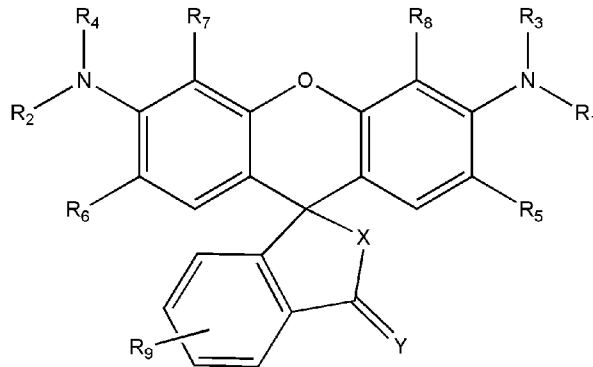
[440]

본 발명의 로다민 유도체는 "Off-On" 타입의 차아염소산 검출용 형광센서로 사용할 수 있다.

청구범위

[1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,
 R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
 또는

R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,

X 가 황 원자이고, Y 가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_5 및 R_6 이 각각 수소 또는 C_{1-6} 알킬이고, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(R19-S),

X가 황 원자이고, Y가 산소원자이며, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이고, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물(RB-S), 및
 X가 N-NH₂이고, Y가 산소원자이며, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.

[2]

제1항에 있어서,
 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내거나,
 R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
 또는
 R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_5 는 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_6 은 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_7 은 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_8 은 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_9 는 수소, -C(O) R_{10} , 또는 -N(R_{11})(R_{12})를 나타내며,
 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C₁₋₄ 알콕시, 또는 -N(R_{13})(R_{14})를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C₁₋₄ 알킬, -C(O) R_{15} , 또는 -C(S) R_{15} 를 나타내며,
 X는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR₁₆을 나타내고,
 Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내고,
 상기 R_{16} 은 수소, C₁₋₄ 알킬 또는 -N(R_{17})(R_{18})을 나타내며,
 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내는 화합물.

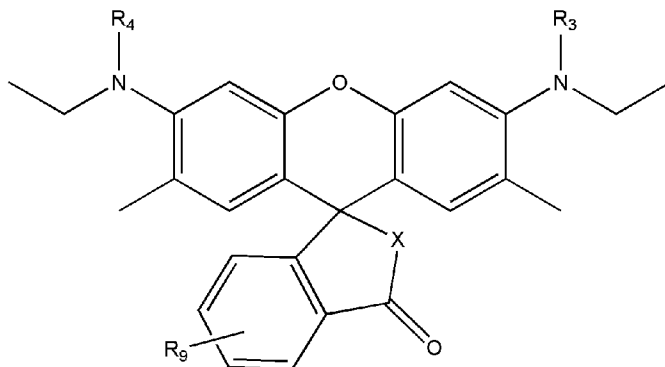
[3]

제1항에 있어서,
 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내고,
 R_5 내지 R_8 은 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내며,
 R_9 는 수소, -C(O) R_{10} , 또는 -N(R_{11})(R_{12})를 나타내며,
 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C₁₋₄ 알콕시, 또는 -N(R_{13})(R_{14})를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C₁₋₄ 알킬, -C(O) R_{15} , 또는 -C(S) R_{15} 를 나타내며,
 X는 셀레늄 원자를 나타내고,
 Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁₋₄ 알킬을 나타내고,
 상기 R_{16} 은 수소, C₁₋₄ 알킬 또는 -N(R_{17})(R_{18})을 나타내며,

여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물.

- [4] 제3항에 있어서,
하기 화학식 1a로 표시되는 화합물:

[화학식 1a]



상기 식에서,

R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

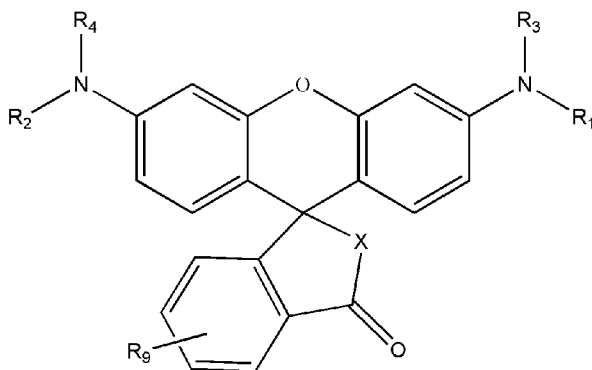
X 는 셀레늄 원자를 나타내고,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

- [5] 제4항에 있어서,
 R_3 , R_4 , 및 R_9 는 수소를 나타내는 화합물.

- [6] 제3항에 있어서,
하기 화학식 1b로 표시되는 화합물:

[화학식 1b]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

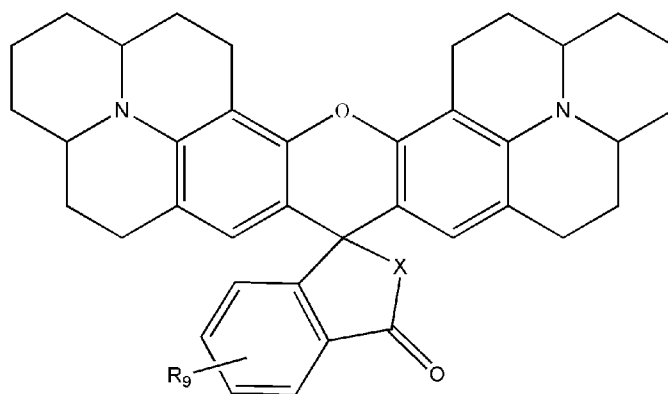
R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

- X는 셀레늄 원자를 나타내고,
 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.
- [7] 제6항에 있어서,
 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 메틸 또는 에틸을 나타내고,
 R_9 는 수소를 나타내는 화합물.
- [8] 제1항에 있어서,
 R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_5 는 R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_6 은 R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_7 은 R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_8 은 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 X는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 Y는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
 상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
 여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 화합물.
- [9] 제8항에 있어서,
 하기 화학식 1c로 표시되는 화합물:

[화학식 1c]



- 상기 식에서,
 R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
 여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

[10]

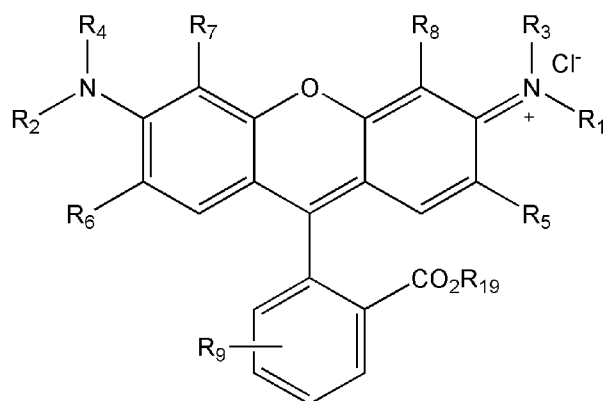
X는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

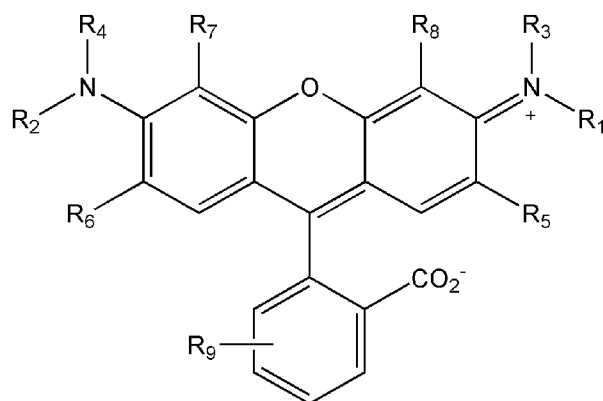
하기 화학식 3의 화합물을 가수분해하여 하기 화학식 4의 화합물을 제조하는 단계; 및

하기 화학식 4의 화합물을 하기 화학식 5와 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 1의 화합물의 제조방법:

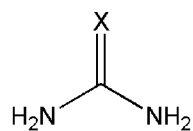
[화학식 3]



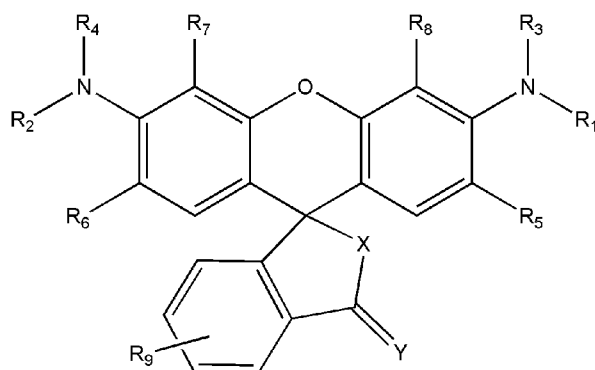
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 1]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,

R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
또는

R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

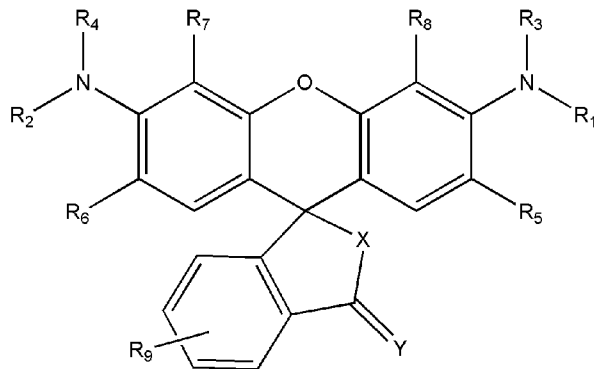
R_{17} 내지 R_{19} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내며,

X 가 황 원자이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물(R_{19-S}),

X 가 황 원자이고, R_1 , R_2 , R_3 , 및 R_4 가 에틸이며, R_5 , R_6 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소인 화합물($RB-S$), 및

X 가 $N-NH_2$ 이고, R_1 및 R_2 가 에틸이며, R_3 , R_4 , R_7 , R_8 및 R_9 가 수소이며, R_5 및 R_6 이 메틸인 화합물은 제외된다.

[11] 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 차아염소산 검출용 센서:
[화학식 2]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,

R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
또는

R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타낸다.

[12] 제11항에 있어서, 화학식 2의 화합물은

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나,

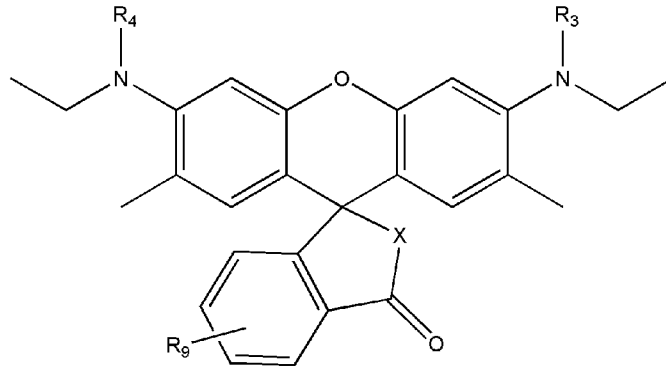
R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
또는

R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_5 는 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring

member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_6 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_7 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_9 은 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,
 Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 차아염소산 검출용 센서.

- [13] 제12항에 있어서, 화학식 2의 화합물은
 R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
 R_5 내지 R_8 은 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내며,
 R_9 은 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,
 X 는 황원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,
 Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,
상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,
상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,
여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 차아염소산 검출용 센서.
- [14] 제13항에 있어서,
화학식 2의 화합물은 하기 화학식 2a로 표시되는 차아염소산 검출용 센서:
[화학식 2a]



상기 식에서,

R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

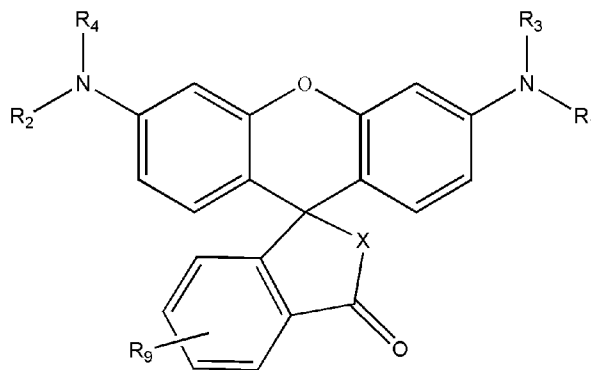
상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

[15]

제13항에 있어서,

화학식 2의 화합물은 하기 화학식 2b로 표시되는 차아염소산 검출용 센서:

[화학식 2b]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

[16]

제12항에 있어서, 화학식 2의 화합물은

R_1 는 R_3 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_2 는 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_5 는 R_1 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_6 은 R_2 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_7 은 R_8 과 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,
 R_8 은 R_4 와 함께 5 내지 7 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,
여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,
 R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내고,

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-4} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

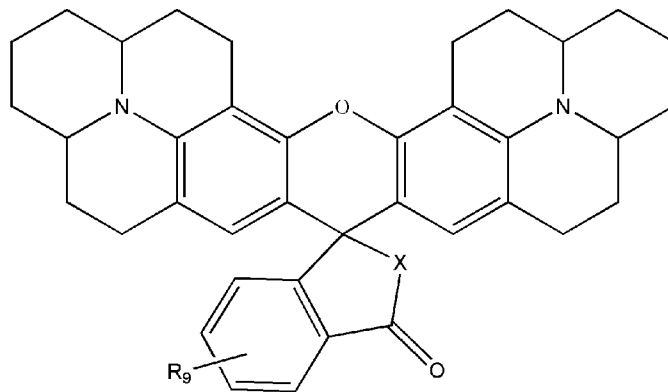
여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타내는 차아염소산 검출용 센서.

[17]

제16항에 있어서,

화학식 2의 화합물은 하기 화학식 2c로 표시되는 차아염소산 검출용 센서:

[화학식 2c]



상기 식에서,

R_9 는 수소, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-4} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-4} 알킬, 또는 $-C(O)R_{15}$ 를 나타내며,

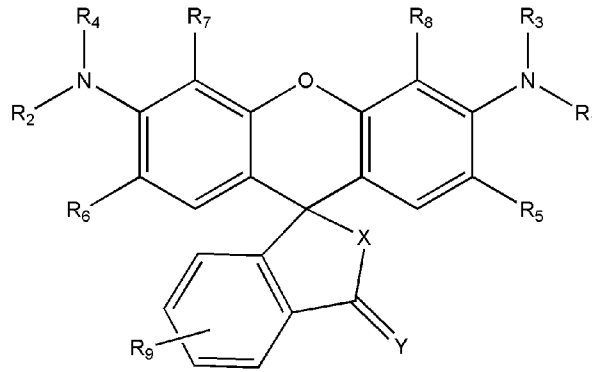
X 는 황 원자 또는 셀레늄 원자를 나타내고,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-4} 알킬을 나타낸다.

[18]

하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 차아염소산 검출용 조성물:

[화학식 2]



상기 식에서,

R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나,
 R_1 는 R_3 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하거나,
 또는

R_2 는 R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,
 R_5 는 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_1 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_6 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_2 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_7 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_8 과 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하며,

R_8 은 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내거나, R_4 와 함께 3 내지 8 환원(ring member)의 헤테로 고리를 형성하고,

R_9 는 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, $-C(O)R_{10}$, 또는 $-N(R_{11})(R_{12})$ 를 나타내며,

여기서 R_{10} 은 수소, 하이드록시, C_{1-6} 알킬, C_{1-6} 알콕시, 또는 $-N(R_{13})(R_{14})$ 를 나타내고,

R_{11} 및 R_{12} 는 각각 독립적으로 수소, C_{1-6} 알킬, $-C(O)R_{15}$, 또는 $-C(S)R_{15}$ 를 나타내며,

X 는 황 원자, 셀레늄 원자 또는 NR_{16} 을 나타내고,

Y 는 산소 또는 황 원자를 나타내며,

상기 R_{13} 내지 R_{15} 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타내고,

상기 R_{16} 은 수소, C_{1-6} 알킬 또는 $-N(R_{17})(R_{18})$ 을 나타내며,

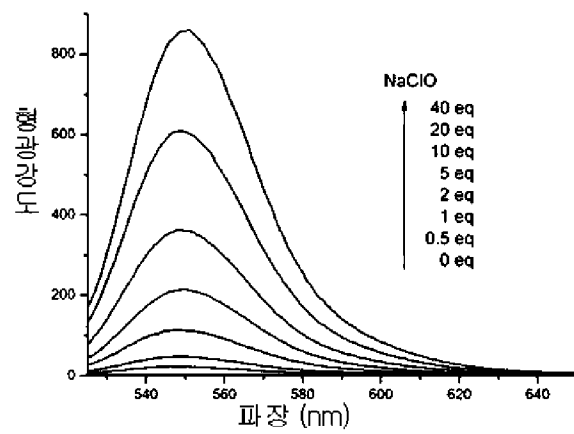
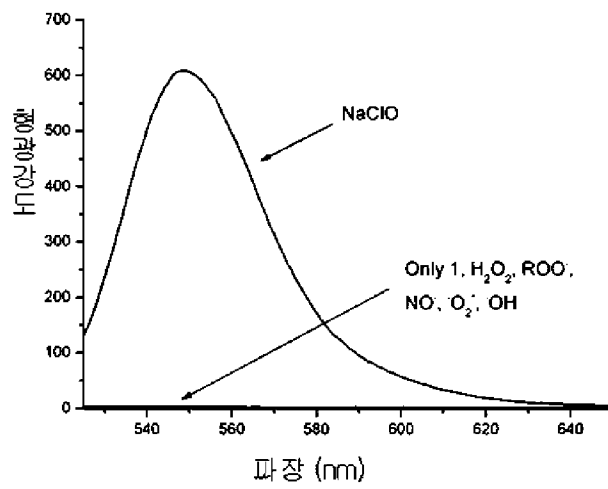
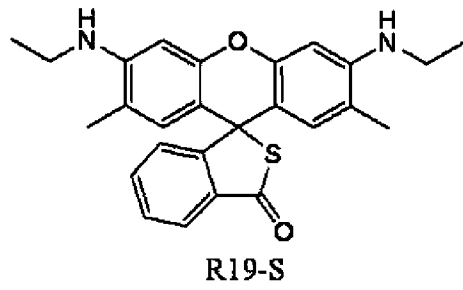
여기서 R_{17} 및 R_{18} 은 각각 독립적으로 수소 또는 C_{1-6} 알킬을 나타낸다.

[19] 제11항에 기재된 센서를 사용하여 차아염소산을 검출하는 방법.

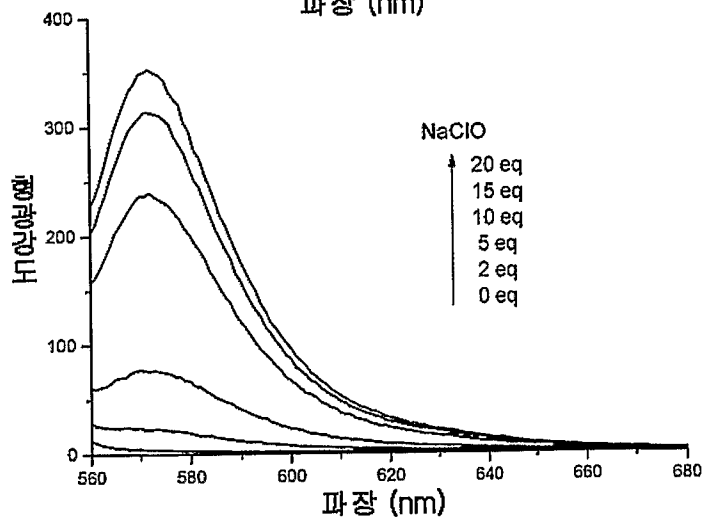
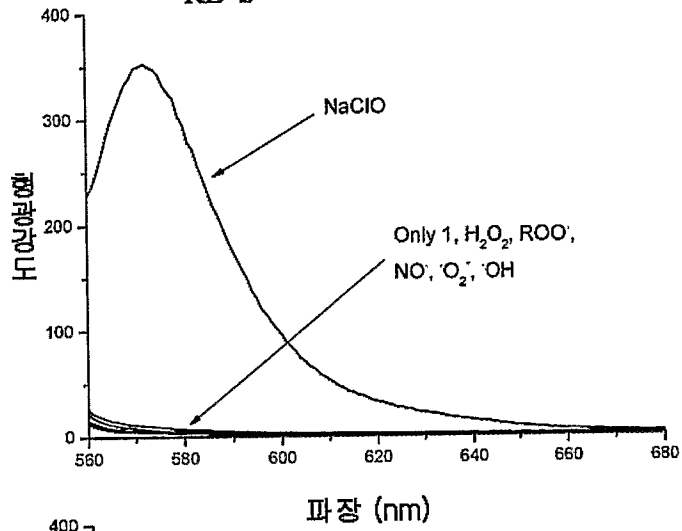
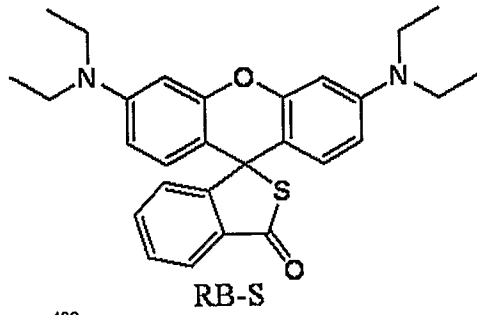
[20] 제19항에 있어서,

생체 내에 존재하는 차아염소산을 검출하는 방법.

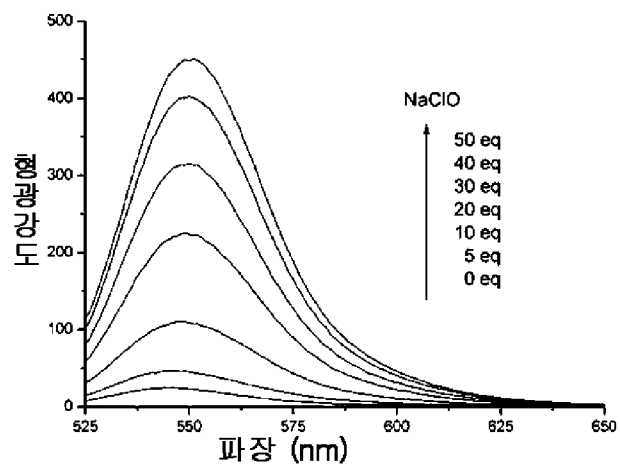
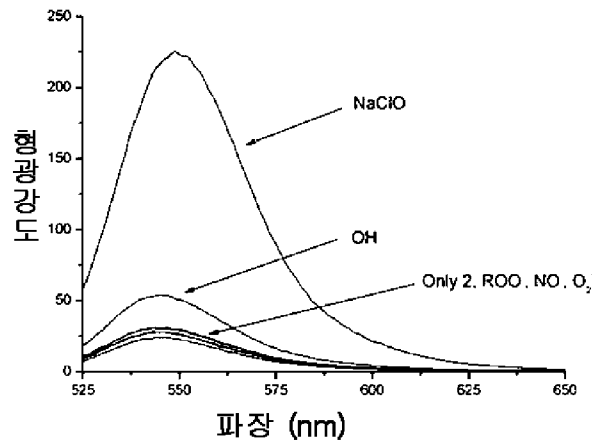
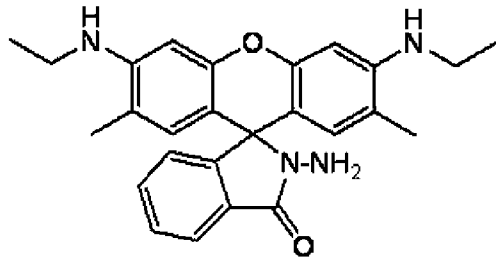
[Fig. 1]



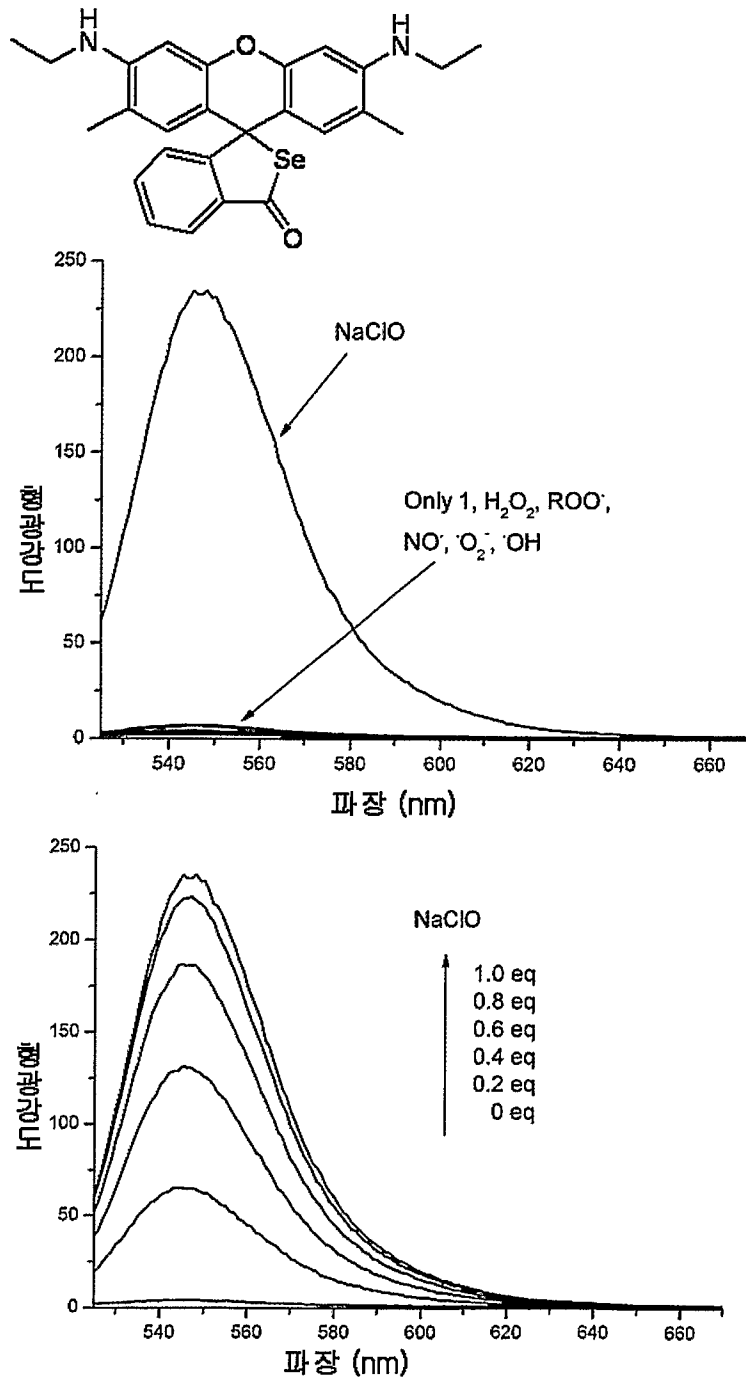
[Fig. 2]



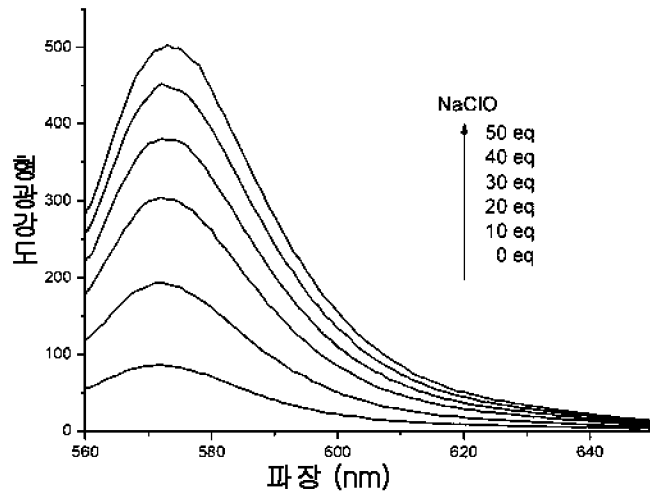
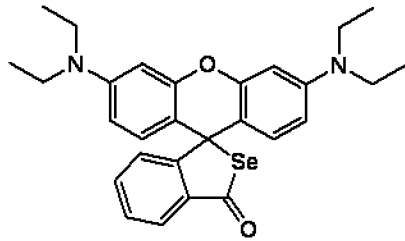
[Fig. 3]



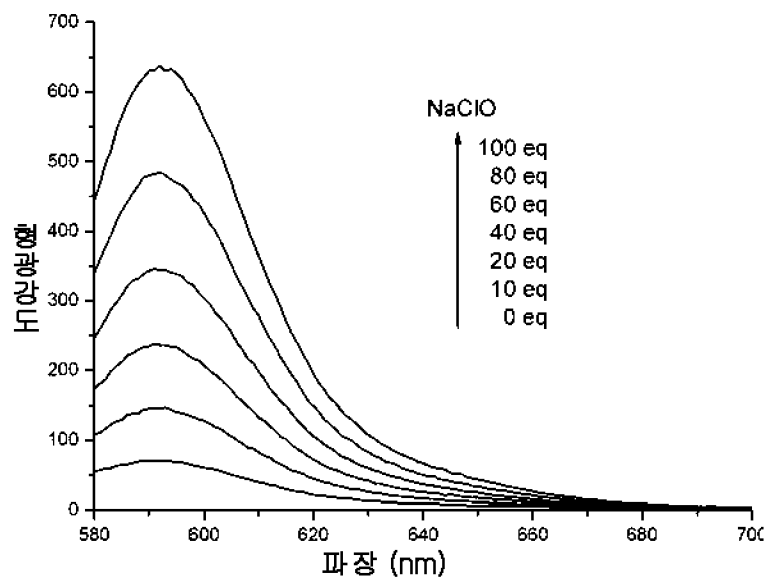
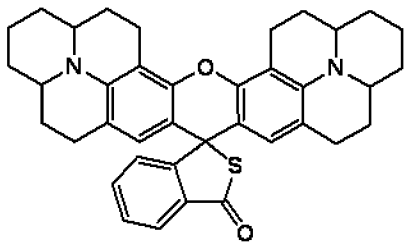
[Fig. 4]



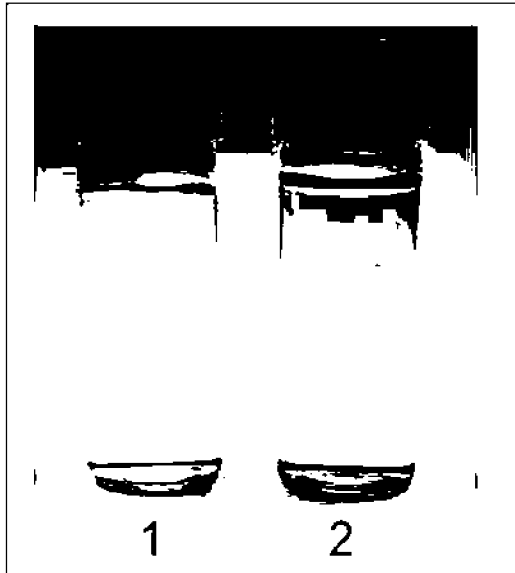
[Fig. 5]



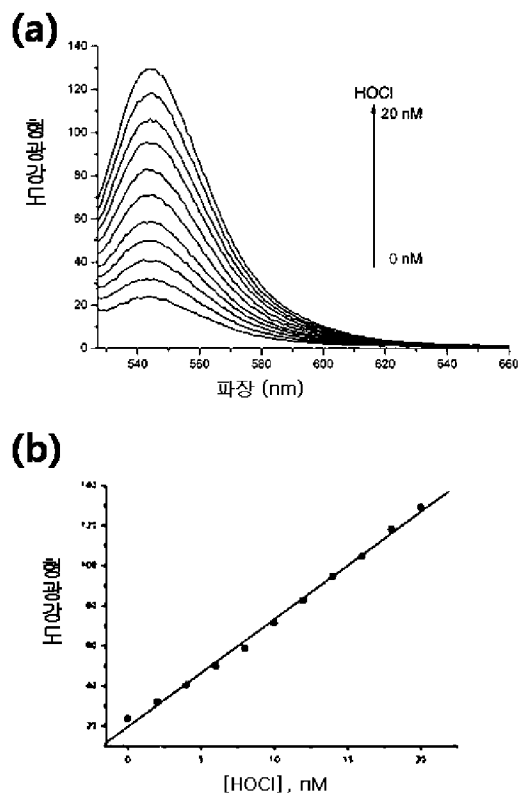
[Fig. 6]



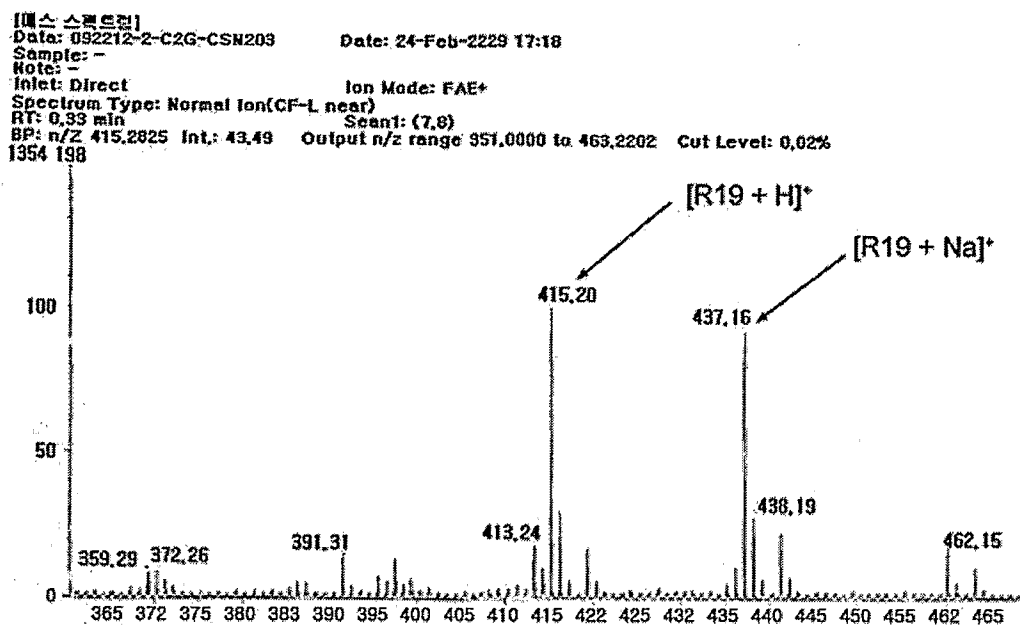
[Fig. 7]



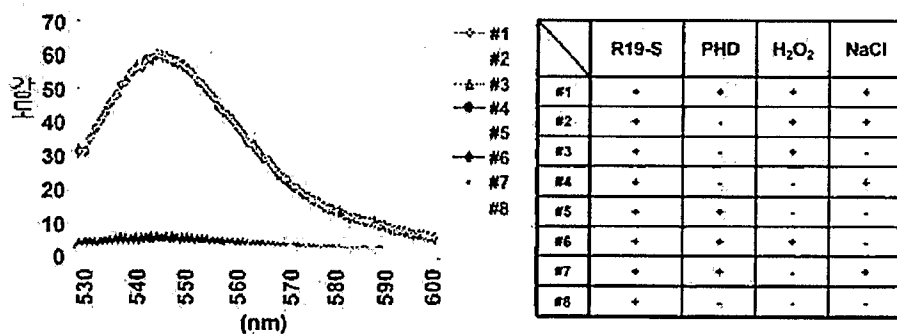
[Fig. 8]



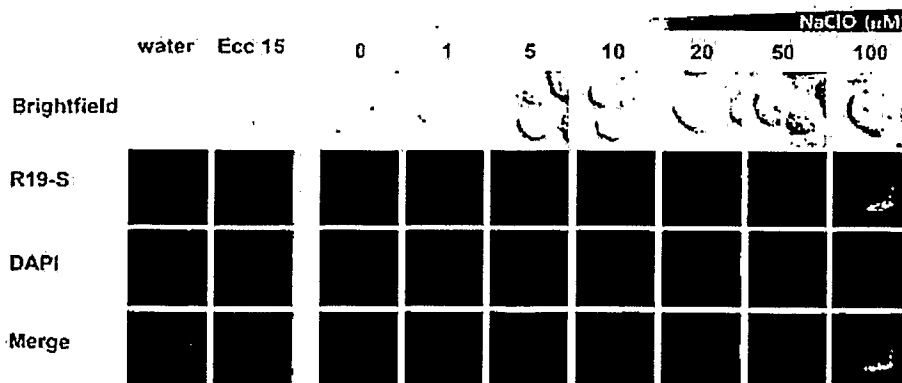
[Fig. 9]



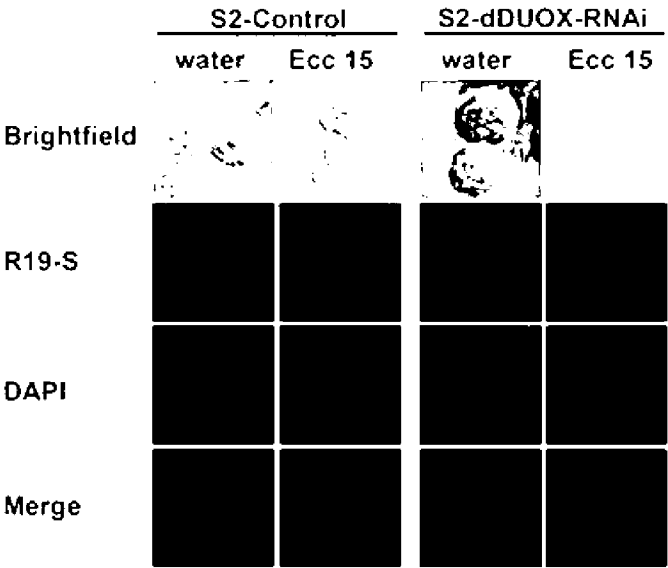
[Fig.10]



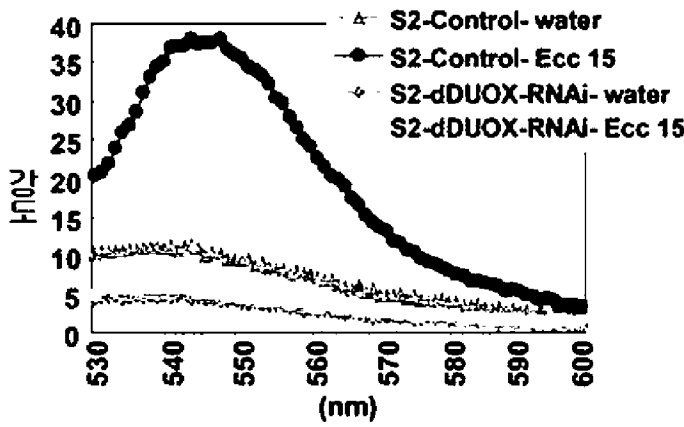
[Fig.11]



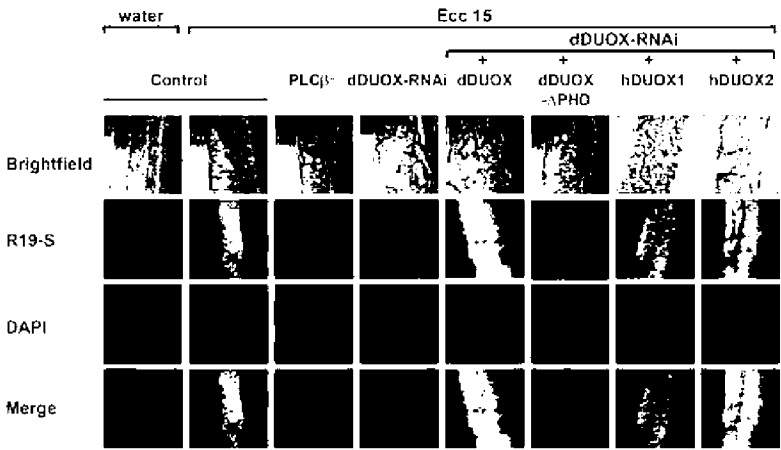
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2009/004077**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****C07D 495/10(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07D 495/10; B41M 5/26; B41N 1/12; B41N 1/14; G03C 1/02; G11B 7/24; G11B 7/26

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & STN(REG, CAplus)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	B.-Y. Su et al., '3',6'-Bis(diethylamino)-3H-spiro[2-benzothiophene-1,9'-xanthene]-3-thione', Acta Cryst., 2008, E64, o2068 See Sup-1 comment and the figures	1-20
A	WO 2007-007550 A1 (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC, INC. et al.) 18 January 2007 See the entire document	1-20
A	WO 01-29837 A1 (MAGNITSKII SERGEI et al.) 26 April 2001 See the entire document	1-20
A	WO 87-03541 A2 (POLAROID CORPORATION) 18 June 1987 See the entire document	1-20



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 MAY 2010 (14.05.2010)

Date of mailing of the international search report

17 MAY 2010 (17.05.2010)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2009/004077

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2007-007550 A1	18.01.2007	CN 101218109 A0	09.07.2008
		JP W020-070075 50A1	18.01.2007
		US 2007-0015085 A1	18.01.2007
WO 01-29837 A1	26.04.2001	AU 2000-80118 A1	30.04.2001
		AU 2001-11956 A1	30.04.2001
		WO 01-29835 A1	26.04.2001
		WO 01-29837A8	20.09.2001
WO 87-03541 A2	18.06.1987	DE 3670803 D1	07.06.1990
		EP 0250558 A1	07.01.1988
		EP 0250558 B1	02.05.1990
		JP 02-628607 B2	18.04.1997
		JP 06-098835 B2	07.12.1994
		JP 07-010869 A	13.01.1995
		JP 2628607 B2	09.07.1997
		US 4970309 A1	13.11.1990
		US 5028725 A1	02.07.1991
		US 5196297 A1	23.03.1993
		US 5220036 A1	15.06.1993
		WO 87-03541A2	18.06.1987
		WO 87-03541A3	24.09.1987
		WO 87-03541A3	24.09.1987

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07D 495/10(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07D 495/10; B41M 5/26; B41N 1/12; B41N 1/14; G03C 1/02; G11B 7/24; G11B 7/26 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & STN(REG, CAplus)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	B.-Y. Su 외 4명, '3',6'-Bis(diethylamino)-3H-spiro[2-benzothiophene-1,9'-xanthene]-3-thione', Acta Cryst., 2008, E64, o2068 Sup-1 comment 및 그림 참조	1-20
A	WO 2007-007550 A1 (KONICA MINOLTA MEDICAL & GRAPHIC, INC. 외 1명) 2007.01.18 문헌 전체 참조	1-20
A	WO 01-29837 A1 (MAGNITSKII SERGEI 외 16명) 2001.04.26 문헌 전체 참조	1-20
A	WO 87-03541 A2 (POLAROID CORPORATION) 1987.06.18 문헌 전체 참조	1-20
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2010년 05월 14일 (14.05.2010)		국제조사보고서 발송일 2010년 05월 17일 (17.05.2010)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 선사로 139, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140		심사관 김용 전화번호 82-42-481-8164

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2007-007550 A1

2007.01.18

CN 101218109 A0

2008.07.09

JP W020-070075 50A1

2007.01.18

US 2007-0015085 A1

2007.01.18

WO 01-29837 A1

2001.04.26

AU 2000-80118 A1

2001.04.30

AU 2001-11956 A1

2001.04.30

WO 01-29835 A1

2001.04.26

WO 01-29837A8

2001.09.20

WO 87-03541 A2

1987.06.18

DE 3670803 D1

1990.06.07

EP 0250558 A1

1988.01.07

EP 0250558 B1

1990.05.02

JP 02-628607 B2

1997.04.18

JP 06-098835 B2

1994.12.07

JP 07-010869 A

1995.01.13

JP 2628607 B2

1997.07.09

US 4970309 A1

1990.11.13

US 5028725 A1

1991.07.02

US 5196297 A1

1993.03.23

US 5220036 A1

1993.06.15

WO 87-03541A2

1987.06.18

WO 87-03541A3

1987.09.24

WO 87-03541A3

1987.09.24