

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0126777

(43) 공개일자 2024년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07F 15/00 (2024.01) C07F 5/02 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01) G01N 21/76 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07F 15/0033 (2013.01)

C07F 5/025 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0031788

(22) 출원일자 2023년03월10일

심사청구일자 2023년03월10일

(30) 우선권주장

1020230019440 2023년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

이준석

서울특별시 성북구 월곡로14길 26, 109동 1601호

윤혜영

서울특별시 서초구 효령로77길 20, 603호

박승빈

서울특별시 강남구 언주로146길 18, 6동 508호

(74) 대리인

위병갑

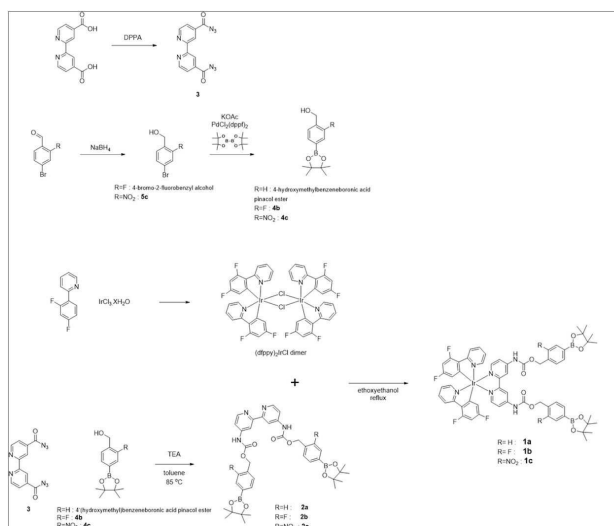
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 이중모달 이리듐 기반 자기불모성 화학센서

(57) 요약

본 발명은 RCS에 특이적으로 반응하여 형광 및/또는 ECL 신호 변화를 나타내는 이리듐 기반 탐침에 관한 것으로, 본 발명의 이리듐 기반 탐침은 스트로크-쉬프트(stokes-shift)가 크고, RCS에 대해 형광 및 ECL 신호를 나타내기 때문에, 기존의 형광 신호를 나타내는 탐침들에 비해 감도가 좋으며, 이들을 조합하면 형광 및 ECL 신호 변화를 유도할 수 있어 검출 민감도 및 선택성을 높일 수 있고, 이의 합성 및 수정이 용이하며, 다양한 질환 모델에 적용될 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 21/6428 (2013.01)

G01N 21/6456 (2013.01)

G01N 21/6486 (2013.01)

G01N 21/76 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711158352

과제번호 2018M3A9H4079286

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발

연구과제명 화학프로브 기반 숙주세포 단백질 프로파일링 기술개발 및 이를 활용한 AI 감염기전 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2022.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

신호 모이어티;

자가-희생(Self-Immolative) 모이어티; 및

활성 화학종(reactive chemical species: RCS) 반응성 모이어티를 포함하는 활성 화학종 반응성 탐침(probe).

청구항 2

제 1항에 있어서, 활성 화학종은 ROS(reactive oxygen species), RNS(reactive nitrogen species) 또는 RSS(reactive sulfur species)인 활성 화학종 반응성 탐침.

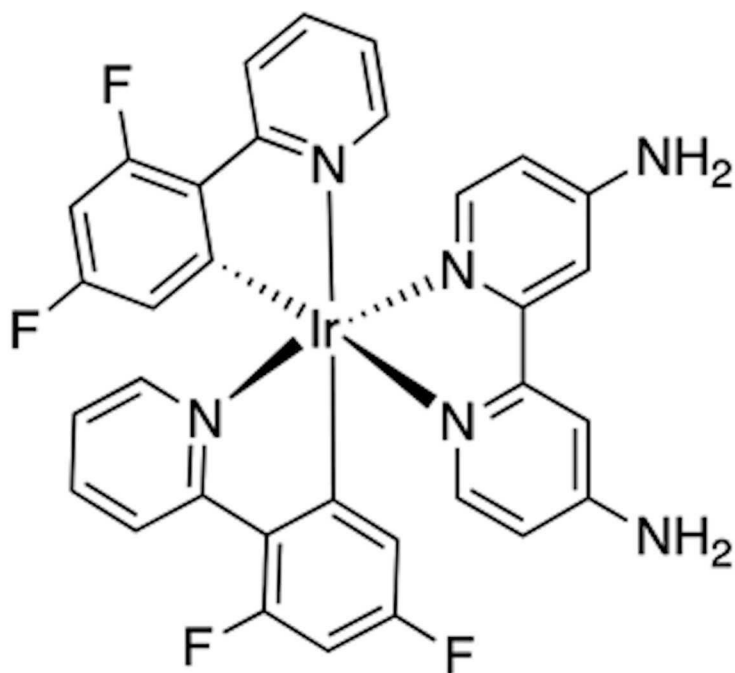
청구항 3

제 1항에 있어서, 신호 모이어티는 이리듐(iridium) 착물(complex)을 포함하는, 활성 화학종 반응성 탐침.

청구항 4

제 3항에 있어서, 이리듐 착물은 하기 화학식 7로 표시되는, 활성 화학종 반응성 탐침:

[화학식 7]



청구항 5

제 1항에 있어서, 자가-희생 모이어티는 카바메이트기인, 활성 화학종 반응성 탐침.

청구항 6

제 1항에 있어서, 활성 화학종 반응성 모이어티는 보론산기(boronic acid group) 또는 보론산 에스테르기(boronate ester group), 페닐보론산 피나콜 에스테르기(phenylboronic acid pinacol ester group) 또는 이의

유도체인, 활성 화학종 반응성 탐침.

청구항 7

제 6항에 있어서, 페닐보론산 피나콜 에스테르의 벤질 링커의 오쏘 위치에 전자 구인성 작용기로 H, F 또는 NO₂를 포함하는, 활성 화학종 반응성 탐침.

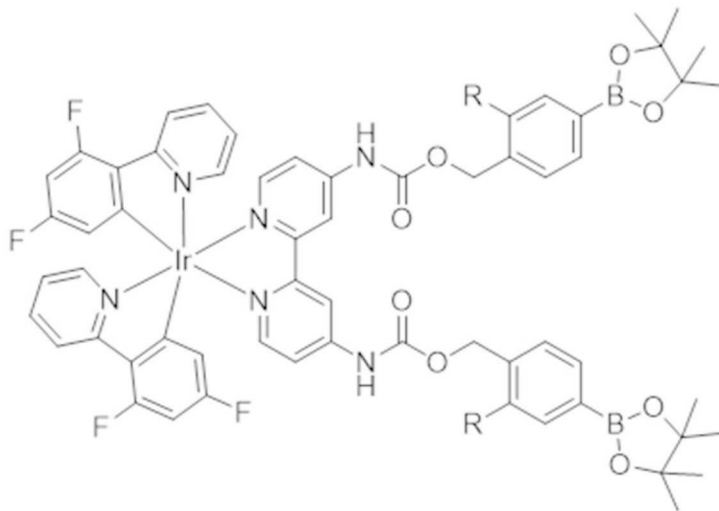
청구항 8

제 1항에 있어서, 활성산소종에 반응하여 자가-희생 모이어티를 제거함으로써 신호 모이어티에 의한 형광 (photoluminescence, PL) 또는 ECL(electrochemiluminescence) 신호 변화를 나타내는, 활성 화학종 반응성 탐침.

청구항 9

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

[화학식 1]



상기 화학식 1에서 R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

청구항 10

제 1항의 활성 화학종 반응성 탐침을 포함하는, 활성 화학종 검출용 조성물.

청구항 11

제 10항에 있어서, 활성 화학종에 반응하여 형광 또는 ECL 신호 변화를 나타내는, 활성 화학종 검출용 조성물.

청구항 12

제 10항의 조성물을 포함하는 활성 화학종 검출 센서.

청구항 13

제 10항의 조성물을 포함하는 활성 화학종 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 활성 화학종 관련 질환은 연령-관련 황반 변성, 파킨슨병, 알츠하이머병, 허혈성 및 재관류 손상, 폐동맥 고혈압, 피부경화증, 죽상동맥경화증, 심부전, 심근 경색, 관절염, 폐 독성, 심폐 질환, 염증성 질환, 암, 전이, 안트라시클린의 심장 독성, 기원과 상관 없는 심부전, 허혈, 심장 마비, 뇌졸중, 혈전증 및 색전증, 천식, 알레르기성/염증성 병태, 기관지 천식, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 헌팅턴병, 인지 장애,

조로증, 프로제로이드 증후군, 간질성 치매, 노년전 치매, 외상후 치매, 노인성 치매, 혈관 치매, HIV-1-연관 치매, 뇌졸중후 치매, 다운 증후군, 운동 뉴런 질환, 아밀로이드증, 제2형 당뇨병과 연관된 아밀로이드, 크로이츠펔트-야콥병, 괴사성 세포 사멸, 게르스트만-슈트로이스슬러 증후군, 쿠루병 및 동물 스크래피, 장기간의 혈액 투석과 연관된 아밀로이드, 노인성 심장 아밀로이드 및 가족성 아밀로이드성 다발신경병증, 대뇌병증, 뇌척수교 감신경 장애, 기억 상실, 알루미늄 중독, 살아 있는 대상체의 세포 중의 철의 수준의 감소, 포유동물에서 자유 전이 금속 이온 수준의 감소, 신체 중 또는 특정 신체 구역 중 유독성 양의 금속을 갖는 환자, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 백내장, 당뇨병, 암, 간 질환, 피부 노화, 이식, 아미노글리코시드의 내이신경독성 이차 효과, 신생물 및 항신생물제 또는 면역억제제 및 화학물질의 독성, 선천성 면역 반응, 바이러스 감염증 또는 프리드라이히 운동실조증인, 활성 화학종 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물.

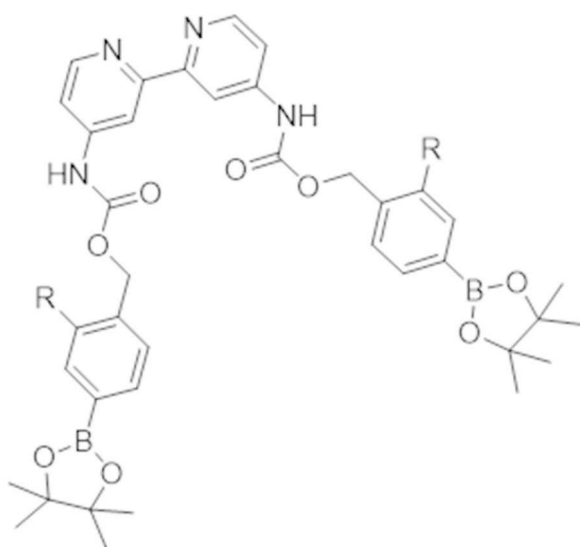
청구항 15

제 10항의 조성물을 포함하는 생체 내 또는 생체 외 이미징용 조성물.

청구항 16

하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

[화학식 2]



상기 화학식 2에서,

R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

청구항 17

하기 반응식 1에 나타난 바와 같이,

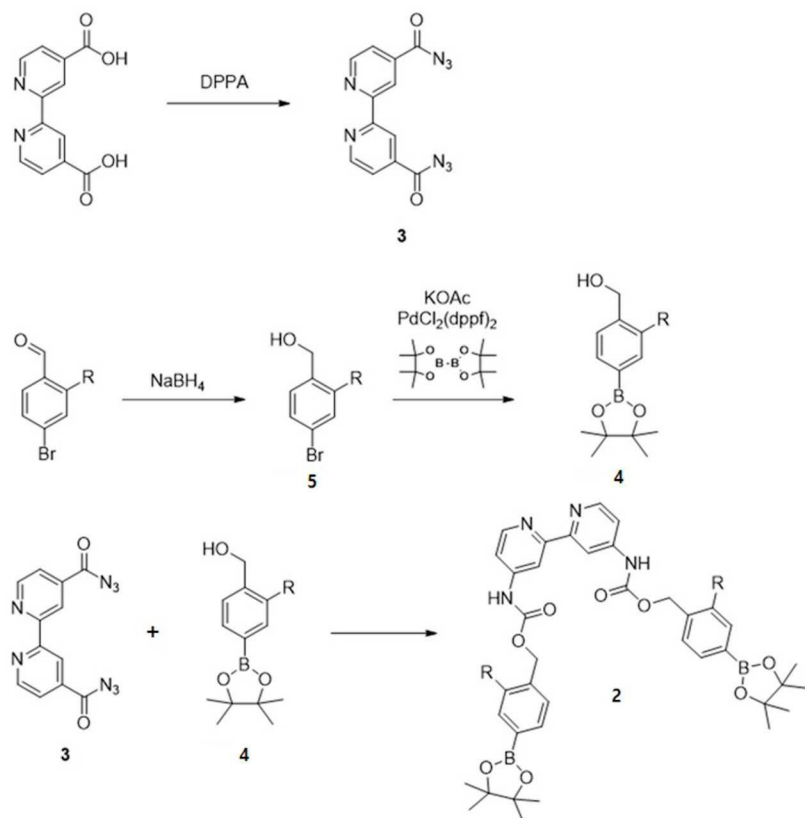
2,2'-비피리딘-4,4'-디카르복실산 및 DPPA (diphenylphosphoryl azide)를 유기용매에서 반응시켜 화합물 3을 제조하는 단계(단계 1);

2번 위치에 R이 치환된 4-브로모 벤즈알데하이드 및 NaBH₄를 유기용매에서 반응시켜 화합물 5를 제조하는 단계(단계 2);

화합물 5와 bis-피나콜디보론(bis-pinacoldiboron)을 유기용매에서 KOAc 및 PdCl₂(dppf)₂와 함께 반응시켜 화합물 4를 제조하는 단계(단계 3);

화합물 3과 화합물 4를 유기용매에서 반응시켜 화합물 2를 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 1]



상기 반응식 1에서,

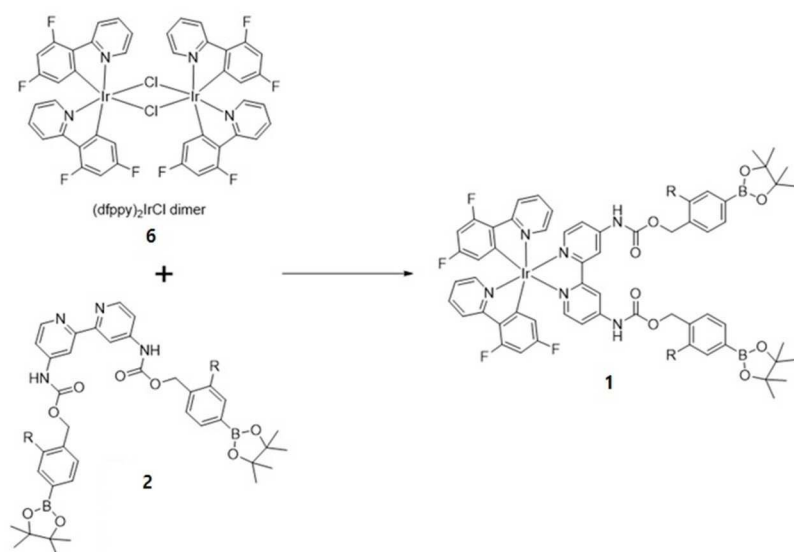
R은 H, 할로젠 또는 NO_2 이다.

청구항 18

하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

화합물 6 및 화합물 2를 유기용매에서 반응하여 화합물 1을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[반응식 2]



상기 반응식 2에서,
R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 RCS에 특이적으로 반응하여 형광 및/또는 ECL 신호 변화를 나타내는 이리듐 기반 탐침에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생명체는 세포 내 산화 및 환원 반응을 통하여 정상생리 및 항상성을 유지하며, 대사과정 중에 산화 및 환원 반응과 관련된 각종 활성 화학종(reactive chemical species: RCS)을 생성한다. 이 중, 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 반응성이 강한 산소 유도체들로서, 슈퍼옥사이드 음이온(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂) 및 하

이드록실 라디칼(OH⁻) 등을 포함한다. ROS는 세포의 호흡과정에서 부수적으로 생성되는 유해물질로 인식되어 왔으나, 세포의 신호전달을 매개하는 생체내 반응에 있어서 중요한 2차 전달자로서의 역할이 규명되어 중요성을 인정받고 있다. ROS는 다양한 경로를 통해 형성되며, 세포내에서 효소에 의해 형성되거나, 자외선, 담배, 약물 등의 각종 외부 스트레스에 의하여도 형성이 가능하다. ROS는 정상적인 수준에서는 세포의 성장과 호르몬의 합성 촉진 또는 면역 반응을 증가시키는 역할을 하나, 과도하게 생성된 수준에서는 DNA, 단백질, 지질에 손상을 주는 것으로 알려져 있고, 산화적 손상을 일으키며 노화와 염증을 매개하고, 광범위한 생물학적 및 병리학적 과정에 있어 필수적이다 (H. Wiseman et al., Biochem. J. 1996, 313, 17-29). 특히, 세포내 ROS의 농도가 과도하게 증가하면 세포내 필수적 생육을 위한 물질 또는 구조를 산화시키거나 손상시켜 암을 유발하는 것으로 알려져 있다. 특히, 암세포는 특이적으로 과산화수소 등의 형태로 고농도의 활성산소를 함유하는 것으로 알려져 있으며, 이들 활성산소는 대부분 세포 내 에너지 생산과 활성산소의 항상성을 유지하는 미토콘드리아에 존재한다고 알려져 있다. 또한, 감염 및 염증 과정에서, 호중구, 단핵구, 및 대식세포를 포함하는 침식형 백혈구는 침입 박테리아 및 병원균을 사멸시키기 위하여 반응성 산소종(ROS)을 발생시킨다 (M. B. Hampton et al., Blood 1998, 92, 3007-3017). 생체 내에서 과생성된 ROS는 핵산, 지질 및 단백질을 포함하는 생물학적 분자 상에 유해한 영향을 주게 되어, 다양한 단백질 기능을 억제하고 수많은 인간 질환 진행의 원인이 되며, 심할 경우에는, 장기 등에 치명적인 영향을 미칠 수 있는 질병, 가령 당뇨병, 암, 심장병, 뇌졸중, 동맥경화, 알츠하이머, 및 파킨슨 등을 유발할 수 있는 것으로 밝혀졌다 (C. C. Winterbourn, Biochim. Biophys. Acta 1985, 840, 204-210; J. M. Albrich et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1981, 78, 210-214; D. I. Pattison et al., Biochemistry 2006, 45, 8152-8162; J. I. Jr. Kang et al., Chem. Res. Toxicol. 2008, 21, 1028-1038).

[0003] 노화, 스트레스, 질병 등에 따라 산화 및 환원 반응의 균형이 깨지면 특정 ROS의 농도 변화가 야기되는 바, 최근 치료 내에 존재하는 각종 활성 화학종의 건강상태 및 질병 모니터링을 위한 주요 검출 마커로서의 가능성이 대두되고 있다. 또한, ROS는 암, 심혈관질환 및 염증질환과 같은 생물학적 손상에 의해 생성되므로, 예컨대, 종양, 류머티즘성 관절염 및 기타 염증질환의 병소부위의 이미징에 이용될 수 있다. 이러한 ROS를 검출하는 방법 중 하나로 자외선 가시광선 분광법(UV-Visible Spectrometry)이 있다. 자외선 가시광선 분광법은 시료가 흡수하는 빛의 양, 즉 흡광도(absorbance)로 시료의 농도, 종류, 구조 등을 결정할 수 있는 분석법이다. 즉, 자외선 가시광선 분광법은 일정한 세기의 빛을 물질에 통과시킨 후, 빛의 파장 또는 진동수에 따라 물질의 흡광도를 측정하여 기록한다. 가시광선 파장 대에서의 광학흡수에 기반한 분광학(spectroscopy)은 측정 및 데이터처리의 간단함, 범용성, 비표지 분석 등의 여러 장점들로 인해 오늘날 화학이나 생물학 분야에서 가장 널리 쓰이는 분석방법으로 볼 수 있다. 하지만, 이와 같은 분석 방법은 낮은 감도 및 공간 분해능으로 인하여 최근 그 중요성이 매우 커진 마이크로, 나노 스케일에서의 분자분석, 생체 내에서의 세포 이미징에 적용될 수 없는 한계를 가지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 신규한 활성 화학종 반응성 탐침을 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 목적은 활성 화학종 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 목적은 활성 화학종 검출 센서를 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 목적은 활성 화학종 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0008] 또한, 본 발명의 목적은 생체 내 또는 생체 외 이미징용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 아울러, 본 발명의 목적은 활성 화학종 반응성 탐침의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 신규한 활성 화학종 반응성 탐침을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 활성 화학종 검출용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 활성 화학종 검출 센서를 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 활성 화학종 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 화합물을 포함하는 생체 내 또는 생체 외 이미징용 조성물을 제공한다.
- [0015] 아울러, 본 발명은 상기 활성 화학종 반응성 탐침의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명의 이리듐 기반 탐침은 스트로크-쉬프트(stokes-shift)가 크고, RCS에 대해 형광 및 ECL 신호를 나타내기 때문에, 기존의 형광 신호를 나타내는 탐침들에 비해 감도가 좋으며, 이들을 조합하면 형광 및 ECL 신호 변화를 유도할 수 있어 검출 민감도 및 선택성을 높일 수 있고, 이의 합성 및 수정이 용이하며, 다양한 질환 모델에 적용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 RCS 검출용 이리듐 탐침의 합성 과정을 나타낸 도이다:

1a: 화학식 1a의 화합물;
 1b: 화학식 1b의 화합물;
 1c: 화학식 1c의 화합물;
 2a: 화학식 2a의 화합물;
 2b: 화학식 2b의 화합물;
 2c: 화학식 2c의 화합물;
 3: 화학식 3의 화합물;
 4b: 화학식 4b의 화합물;
 4c: 화학식 4c의 화합물; 및
 5a: 화학식 5a의 화합물.

도 2는 본 발명의 화합물이 ROS와 반응하는 반응식을 나타낸 도이다:

1a: 화학식 1a의 화합물;
 1b: 화학식 1b의 화합물; 및
 1c: 화학식 1c의 화합물.

도 3은 본 발명의 RCS 검출용 이리듐 탐침(probe)의 과산화 수소 농도에 따른 형광 스펙트럼 및 다양한 RCS 종류에 따른 형광 스펙트럼을 나타낸 도이다:

- 1: 탐침 단독;
- 2: H_2O_2 ;
- 3: OCl^- (hypochlorite);
- 4: $^1O^2$ (singlet oxygen);
- 5: O^{2-} (superoxide);
- 6: $\cdot OH$ (hydroxyl radical);
- 7: $\cdot OOR$ (peroxy radical);
- 8: GSSG (oxidized glutathione);
- 9: GSH (reduced glutathione);
- 10: Hcy (homocysteine);
- 11: Cys (cysteine);
- a: 화학식 1a의 화합물의 과산화 수소 농도에 따른 형광 스펙트럼;
- b: 화학식 1b의 화합물의 과산화 수소 농도에 따른 형광 스펙트럼;
- c: 화학식 1c의 화합물의 과산화 수소 농도에 따른 형광 스펙트럼;
- d: 화학식 1a의 화합물의 RCS 종류에 따른 형광 스펙트럼;
- e: 화학식 1b의 화합물의 RCS 종류에 따른 형광 스펙트럼; 및
- f: 화학식 1c의 화합물의 RCS 종류에 따른 형광 스펙트럼.

도 4는 화학식 1c의 화합물의 과산화 수소 농도 (a) 및 다양한 RCS 종류 (b)에 따른 ECL 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 RCS 검출용 이리듐 탐침의 당뇨병 진단 효과를 형광 신호로 확인한 도이다:

파란색: 탐침 대조군;

보라색: 대조군 마우스의 혈소판;

노란색: 당뇨병 마우스의 혈소판;

- a: 화학식 1c의 화합물의 탐침을 이용하여 확인한 혈소판 시료의 형광 세기;
- b: 화학식 1c의 화합물의 탐침을 이용하여 확인한 혈소판 파쇄물 시료의 형광 세기;

AT: catalase inhibitor;

c: 본 발명의 세 가지 탐침 (화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침) 과 형광 및 ECL을 사용하여 작은 센서 어레이 세트를 수립하는 PCA(principal component analysis)를 적용한 혈소판 시료의 PCA 점수 플롯; 및

d: 본 발명의 세 가지 탐침과 형광 및 ECL을 사용하여 작은 센서 어레이 세트를 수립하는 PCA를 적용한 혈소판 파쇄물 시료의 PCA 점수 플롯.

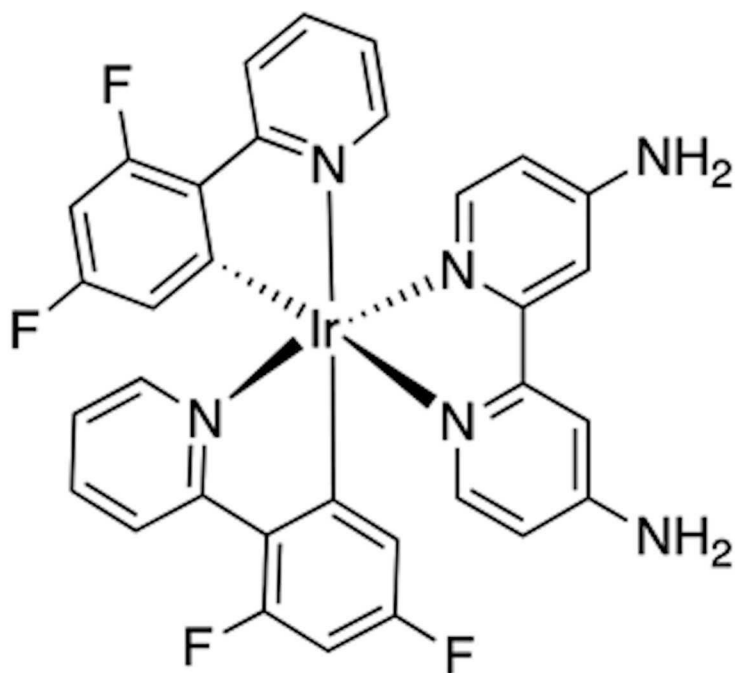
도 6은 본 발명의 RCS 검출용 이리듐 탐침의 바이러스 감염 세포 검출 효과를 형광 및 ECL 신호로 확인한 도이다:

- a: 화학식 1a의 화합물 탐침의 형광 신호 세기;
- b: 화학식 1b의 화합물 탐침의 형광 신호 세기;
- c: 화학식 1c의 화합물 탐침의 형광 신호 세기; 및
- d: 화학식 1c의 화합물 탐침의 ECL 신호 변화.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0019] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.
- [0022] 일 측면에서, 본 발명은 신호 모이어티; 자가-희생(Self-Immolative) 모이어티; 및 활성 화학종(reactive chemical species: RCS) 반응성 모이어티를 포함하는 활성 화학종 반응성 탐침(probe)에 관한 것이다.
- [0023] 일 구현예에서, 활성 화학종은 ROS(reactive oxygen species), RNS(reactive nitrogen species) 또는 RSS(reactive sulfur species)일 수 있다.
- [0024] 일 구현예에서, 신호 모이어티는 이리듐(iridium) 착물/착체(complex)를 포함할 수 있으며, 이리듐 착물은 하기 화학식 7로 표시될 수 있다:

화학식 7

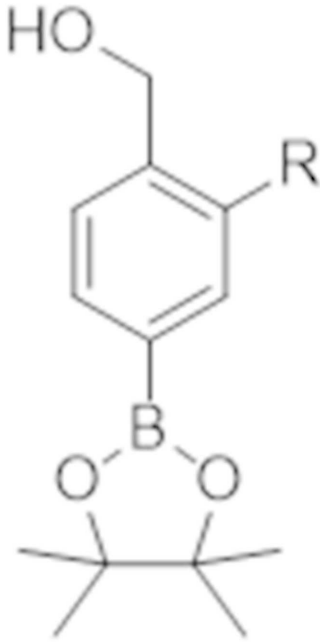


[0025]

[0026] 일 구현예에서, 자가-회생 모이어티는 카바메이트(carbamate)기일 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 활성 화학종 반응성 모이어티는 보론산기(boronic acid group) 또는 보론산 에스테르기(boronate ester group), 페닐보론산 피나콜 에스테르기(phenylboronic acid pinacol ester group) 또는 이의 유도체일 수 있으며, 페닐보론산 피나콜 에스테르의 벤질 링커의 오쏘 위치에 전자 구인성 작용기로 H, 할로겐 또는 NO₂를 포함하는 하기 화학식 4의 화합물을 포함할 수 있다:

화학식 4



[0028]

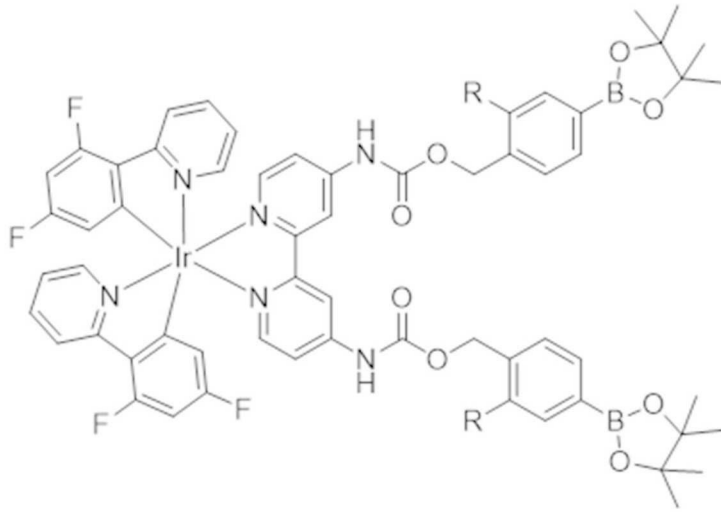
[0029] 상기 화학식 4에서 R은 H, 할로겐 또는 NO₂이다.

[0030] 일 실시예에서, 상기 화학식 4에서 R이 H인 화합물은 화합물 4a, F인 화합물은 화합물 4b 및 NO₂인 화합물은 화합물 4c이다.

[0031] 일 구현예에서, 활성산소종에 반응하여 자가-회생 모이어티를 제거함으로써 신호 모이어티에 의한 형광(photoluminescence, PL) 또는 ECL(electrochemiluminescence) 신호 변화를 나타낼 수 있다.

[0032] 일 구현예에서, 본 발명의 활성 화학종 반응성 탐침은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

화학식 1



[0033]

[0034]

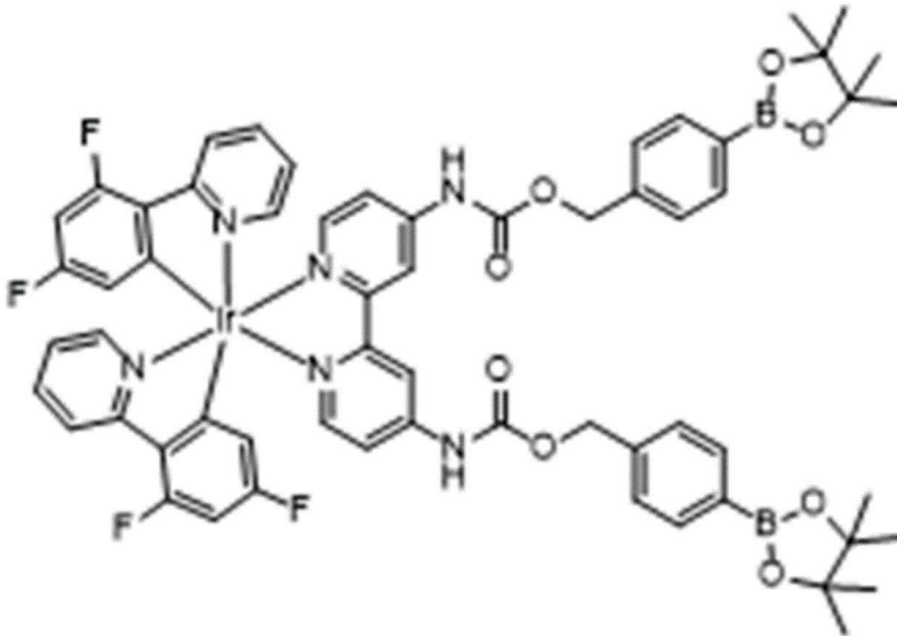
상기 화학식 1에서 R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

[0035]

일 구현예에서, 상기 화학식 1의 화합물에서 R이 H이면 하기 화학식 1a의 화합물((dfppy)₂Ir-bpyCBM-Bpin)이고, R이 F이면 하기 화학식 1b의 화합물((dfppy)₂Ir-bpyCBM-FBpin)이며, R이 NO₂이면 하기 화학식 1c의 화합물((dfppy)₂Ir-bpyCBM-NO₂Bpin)일 수 있다:

[0036]

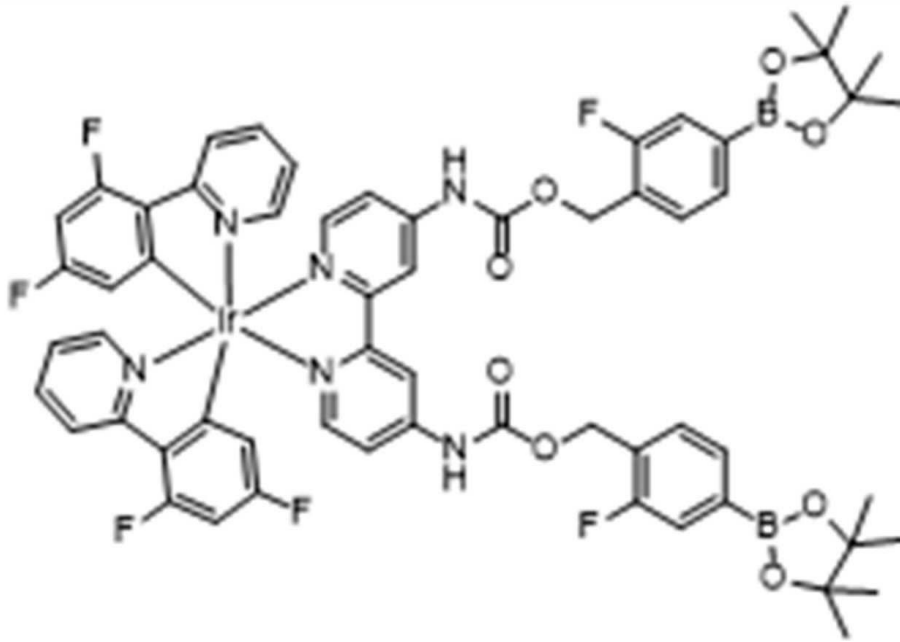
[화학식 1a]



[0037]

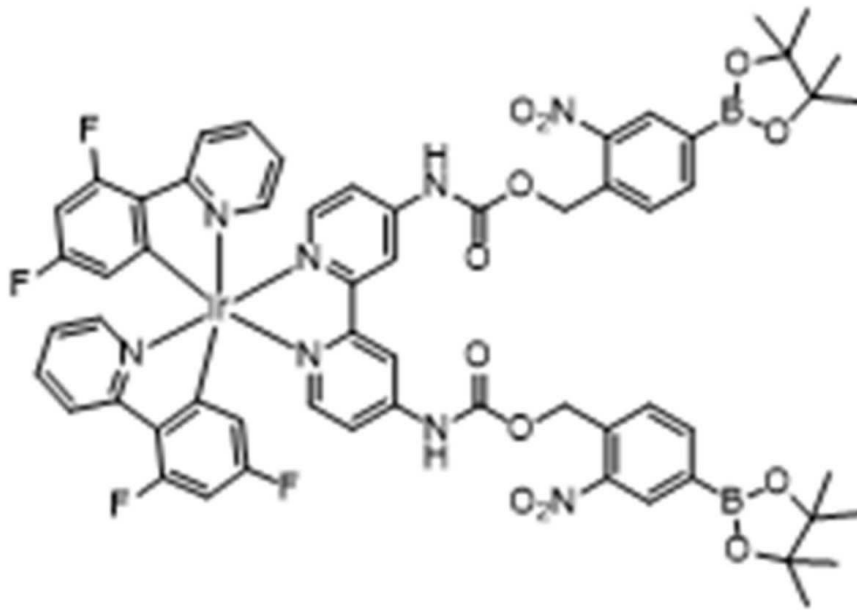
[0038]

[화학식 1b]



, 및

[화학식 1c]



일 구현예에서, 활성 화학종 반응성 탐침에 포함되는 화학식 1a의 화합물, 화학식 1b의 화합물 및 화학식 1c의 화합물은 ROS와 반응하여 형광 신호 변화를 나타낼 수 있으며, 화학식 1c의 화합물은 ROS와 반응하여 ECL 신호 변화를 나타낼 수 있다.

일 구현예에서, 화학식 1c의 화합물은 RCS에 대해 형광 신호가 온-오프(on-off)로 변화할 수 있다.

일 구현예에서, 본 발명의 활성 화학종 반응성 탐침은 ROS와 도 2에 나타낸 바와 같이 반응할 수 있다.

일 구현예에서, 활성 화학종 반응성 탐침은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용할 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로젠 포스페이트, 디아이드로젠 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오

네이트, 테카노에이트, 카프틸레이트, 아크틸레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부탄-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, 하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0046] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 상기 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수산화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한, 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시켜서 건조하거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다. 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은, 예를 들면 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이 때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 또한, 이에 대응하는 은 염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염(예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0047] 일 구현예에서, 활성 화학종 반응성 탐침은 표지 물질을 추가로 포함할 수 있으며, 표지 물질은 발색효소, 방사성동위원소, 크로모포어(chromophore), 발색 물질, 발광 물질, 형광 물질(fluorescer), 상자성 입자(superparamagnetic particles) 및 초상자성입자(ultrasuper paramagnetic particles)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0048] 일 구현예에서, 발색효소는 스트렙타비딘(streptavidin)이 결합된 홀스래디시 퍼옥시다아제(horseradish peroxidase; HRP), 알칼라인 포스파타아제(Alkaline phosphatase; AP), β -갈락토시다아제(galactosidase), 루시페라아제(luciferase), 아세틸콜린스테라제, 유레아제(urease), 카탈라아제(catalase), 아스파르기나아제(asparaginase), 리보뉴클레아제(ribonuclease), 말레이트 데하이드로지나아제(malate dehydrogenase), 스탕필로코칼 뉴클레아제(staphylococcal nuclease), 트리오스 포스페이트 이소머라아제(triose phosphate isomerase), 글루코오스산화효소, 사이토크롬 P450 및 퍼옥시다아제 화합물일 수 있다.

[0049] 일 구현예에서, 형광 물질은 형광 단백질(fluorescent protein), 발광 단백질(photoprotein), 루시페라제(luciferase), 형광염료(fluorescent dye) 또는 시분해 형광입자(Time-resolved Fluorescence, TRF)일 수 있으며, 형광 물질은 알렉사 플루오르 350, 405, 430, 488, 500, 514, 633, 647, 660, 680, 700, cy3, cy5, cy7, 루피(Rubpy)(tris(2,2-bipyridyl)ruthenium(II)), FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(5(6)-Carboxytetramethylrhodamine), 텍사스 레드(Texas Red), DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole) 및 쿠마린으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[0050] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 활성 화학종 반응성 탐침을 포함하는, 활성 화학종 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0051] 일 구현예에서, 활성 화학종에 반응하여 형광 또는 ECL 신호 변화를 나타낼 수 있다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 활성 화학종 검출 센서에 관한 것이다.

[0053] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 활성 화학종 관련 질환의 진단 또는 검출용 조성물에 관한 것이다.

[0054] 일 구현예에서, 활성 화학종 관련 질환은 연령-관련 황반 변성, 파킨슨병, 알츠하이머병, 허혈성 및 재관류 손상, 폐동맥 고혈압, 피부경화증, 죽상동맥경화증, 심부전, 심근 경색, 관절염, 폐 독성, 심폐 질환, 염증성 질환, 암, 전이, 안트라시클린의 심장 독성, 기원과 상관 없는 심부전, 허혈, 심장 마비, 뇌졸중, 혈전증 및 색전증, 천식, 알레르기성/염증성 병태, 기관지 천식, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 헌팅턴병, 인지 장애, 조로증, 프로제로이드 증후군, 간질성 치매, 노년성 치매, 외상후 치매, 노인성 치매, 혈관 치매, HIV-1-연관 치매, 뇌졸중후 치매, 다운 증후군, 운동 뉴런 질환, 아밀로이드증, 제2형 당뇨병과 연관된 아밀로이드, 크로이츠펠트-야콥병, 괴사성 세포 사멸, 게르스트만-슈트로이스러 증후군, 쿠루병 및 동물 스크래피, 장기간의 혈액 투석과 연관된 아밀로이드, 노인성 심장 아밀로이드 및 가족성 아밀로이드성 다발신경병증, 대뇌병증, 뇌척수교감 신경 장애, 기억 상실, 알루미늄 중독, 살아 있는 대상체의 세포 중의 철의 수준의 감소, 포유동물에서 자유 전이 금속 이온 수준의 감소, 신체 중 또는 특정 신체 구역 중 유독성 양의 금속을 갖는 환자, 다발성 경화증, 근

위축성 측삭 경화증, 백내장, 당뇨병, 암, 간 질환, 피부 노화, 이식, 아미노글리코시드의 내이신경독성 이차 효과, 신생물 및 항신생물제 또는 면역억제제 및 화학물질의 독성, 선천성 면역 반응, 바이러스 감염증 또는 프리드라이히 운동실조증일 수 있다.

[0055] 일 구현예에서, 활성 화학종 관련 질환은 당뇨병 또는 바이러스 감염증일 수 있다.

[0056] 일 구현예에서, 암은 위암, 뇌종양, 흑색종, 골수종, 비소세포성폐암, 구강암, 간암, 결장암, 유방암, 폐암, 골암, 췌장암, 피부암, 두부 또는 경부암, 자궁경부암, 난소암, 대장암, 소장암, 직장암, 나팔관암종, 항문부근암, 자궁내막암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병(Hodgkin's disease), 식도암, 임파선암, 방광암, 담낭암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장 또는 수뇨관암, 신장세포 암종, 신장골반암종, 중추신경계 종양, 1차 중추신경계 림프종, 척수 종양, 뇌간 신경교종 및 뇌하수체 선종으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0057] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 진단 또는 검출용 조성물을 포함하는 활성 화학종 관련 질환 진단 키트에 관한 것이다.

[0058] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 생체 내 또는 생체 외 이미징용 조성물에 관한 것이다.

[0059] 일 구현예에서, 상기 조성물은 표지 물질을 추가로 포함할 수 있다.

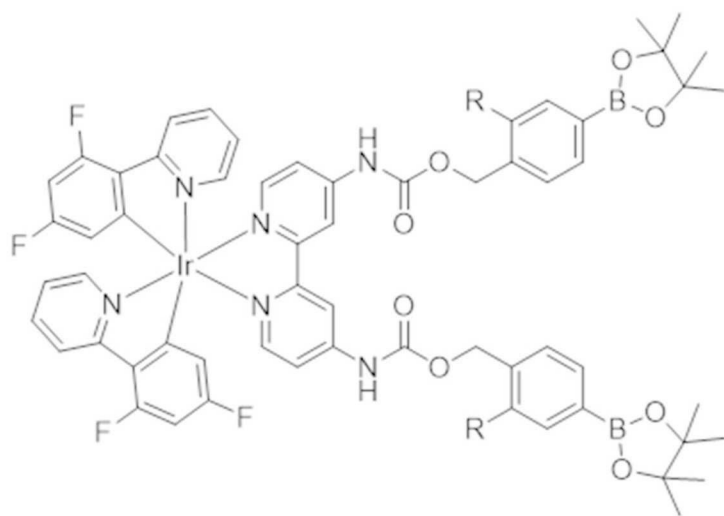
[0060] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 이용하여 검사 대상체로부터 분리한 생물학적 시료에서 활성 화학종을 검출하는 단계를 포함하는, 당뇨병 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0061] 일 구현예에서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈소판 또는 혈청일 수 있다.

[0062] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 포함하는 바이러스 감염 여부 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0063] 일 구현예에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

[0064] [화학식 1]

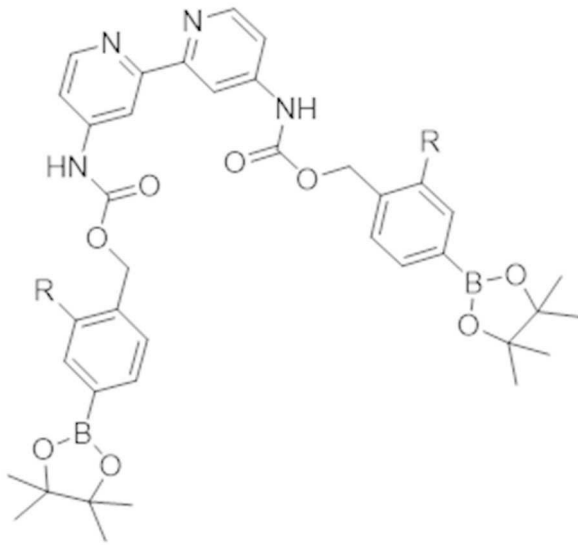


[0065]

[0066] 상기 화학식 1에서 R은 H, 할로겐 또는 NO₂이다.

[0067] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 관한 것이다:

화학식 2



[0068]

[0069]

상기 화학식 2에서,

[0070]

R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

[0071]

일 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 1에 나타낸 바와 같이,

[0072]

2,2'-비피리딘-4,4'-디카르복실산 및 DPPA (diphenylphosphoryl azide)를 유기용매에서 반응시켜 화합물 3을 제조하는 단계(단계 1);

[0073]

2번 위치에 R이 치환된 4-브로모 벤즈알데하이드 및 NaBH₄를 유기용매에서 반응시켜 화합물 5를 제조하는 단계(단계 2);

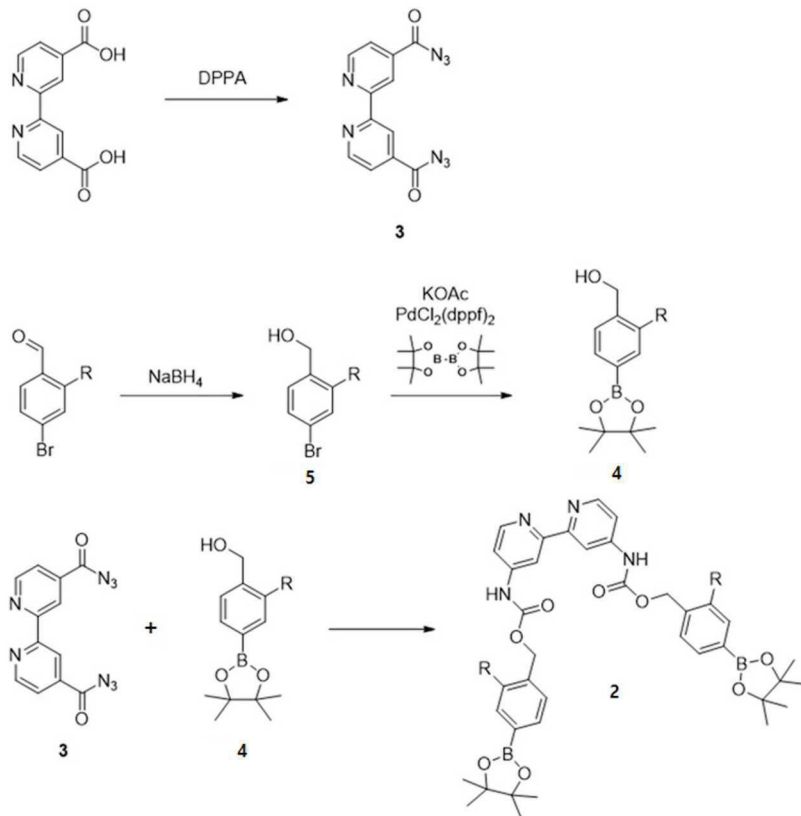
[0074]

화합물 5와 bis-피나콜디보론(bis-pinacoldiboron)를 유기용매에서 KOAc 및 PdCl₂(dppf)₂와 함께 반응시켜 화합물 4를 제조하는 단계(단계 3);

[0075]

화합물 3과 화합물 4를 유기용매에서 반응시켜 화합물 2를 제조하는 단계(단계 4);를 포함하는 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0076] [반응식 1]



[0077]

[0078] 상기 반응식 1에서,

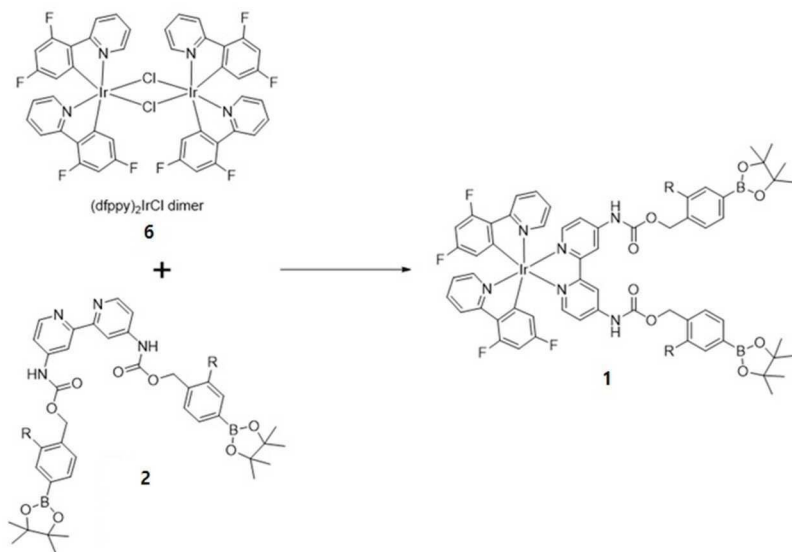
[0079] R은 H, 할로젠 또는 NO₂이다.

[0081] 상기 유기용매는 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤, 클로로벤젠, 트리에탄올아민(TEA), 1,4-다이옥세인, 메틸렌클로라이드, 2-에톡시에탄올 등을 사용할 수 있다.

[0083] 일 측면에서, 본 발명은 하기 반응식 2에 나타난 바와 같이,

[0084] 화합물 6 및 화합물 2를 유기용매에서 반응하여 화합물 1을 제조하는 단계(단계 1);를 포함하는 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법에 관한 것이다:

[0085] [반응식 2]



[0086]

[0087] 상기 반응식 2에서,

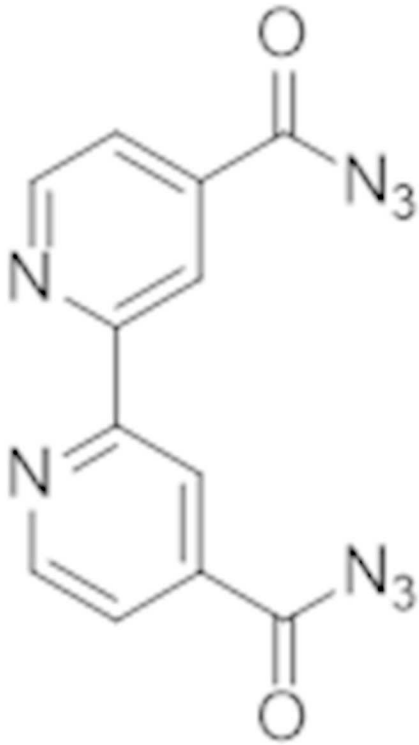
[0088] R은 H, 할로겐 또는 NO₂이다.

[0090] 상기 유기용매는 에탄올, 무수 테트라하이드로퓨란(THF), 벤젠, KOH/MeOH, MeOH, 톨루엔, CH₂Cl₂, 헥산, 디메틸포름아미드(DMF), 디이소프로필에테르, 디에틸에테르, 디옥산, 디메틸아세트아미드(DMA), 디메틸설폭사이드(DMSO), 아세톤, 클로로벤젠, 트리에탄올아민(TEA), 1,4-다이옥세인, 메틸렌클로라이드, 2-에톡시에탄올 등을 사용할 수 있다.

[0092] 일 측면에서, 본 발명은 a) 보조 리간드를 합성하는 단계; b) 활성 화학종 반응성 모이어티를 합성하는 단계; c) 보조 리간드와 활성 화학종 반응성 모이어티를 반응시키는 단계; d) 주 리간드를 합성하는 단계; 및 e) 주 리간드와 상기 단계 c)의 반응 결과물을 반응시키는 단계를 포함하는, 활성 화학종 반응성 탐침의 제조방법에 관한 것이다.

[0093] 일 구현예에서, 보조 리간드는 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

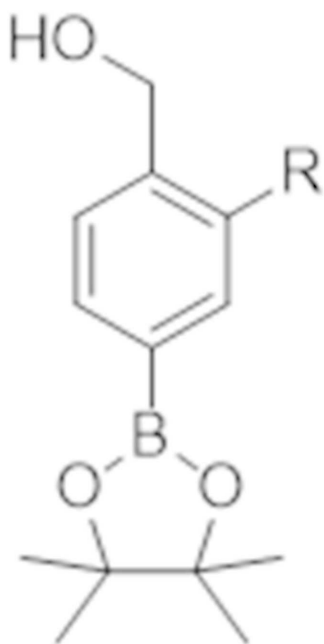
화학식 3



[0094]

[0095] 일 구현예에서, 활성 화학종 반응성 모이어티는 하기 화학식 4로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0096] [화학식 4]

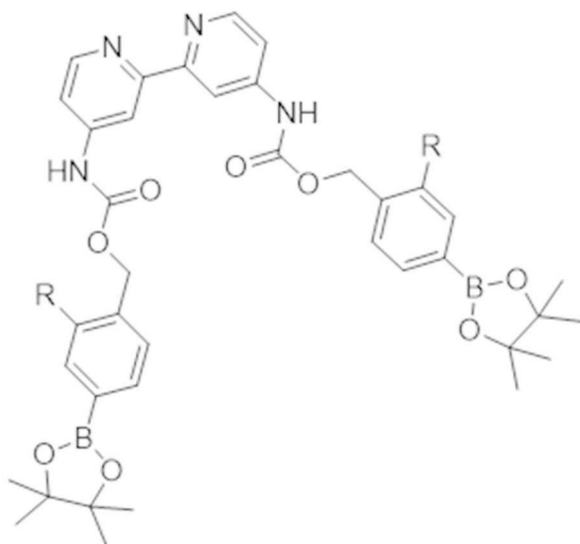


[0097]

[0098] 상기 화학식 4에서 R은 H, 할로겐 또는 NO₂이다.

[0099] 일 구현예에서, 단계 c)의 반응 결과물은 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

[0100] [화학식 2]

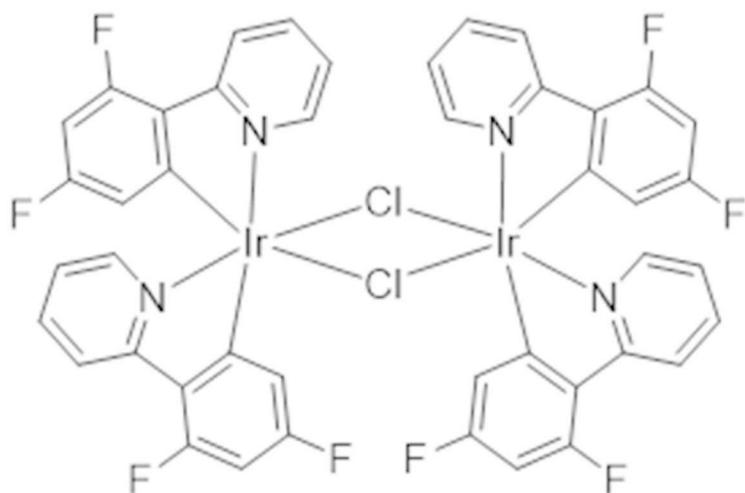


[0101]

[0102] 상기 화학식 2에서 R은 H, 할로겐 또는 NO₂이다.

[0103] 일 구현예에서, 주 리간드는 화학식 6으로 표시되는 화합물을 포함할 수 있다:

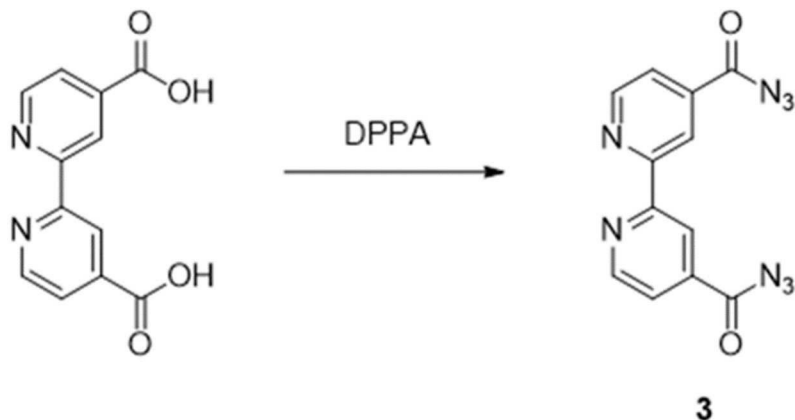
화학식 6



[0104]

[0106] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0108] 실시예 1. 보조리간드 (3) 합성



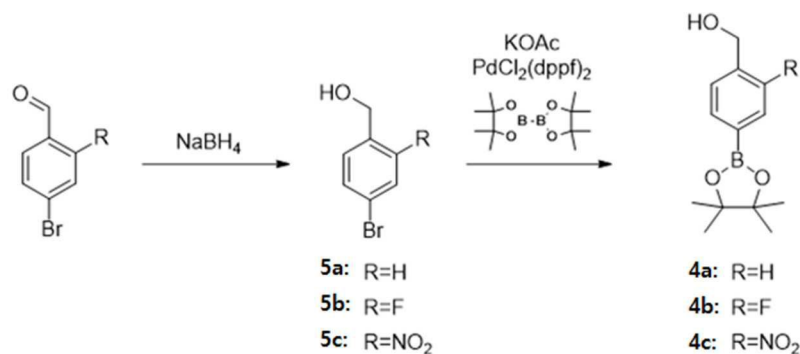
[0109]

[0110] 2,2'-비피리딘-4,4'-디카르복실산(2,2'-bipyridine-4,4'-dicarboxylic acid) (300 mg, 1.34 mmol)를 DMF에 녹인 용액에 DPPA (diphenylphosphoryl azide, 2.5 equiv. 720 μ l) 및 TEA (4 equiv. 750 μ l)를 넣고 실온에서 밤새 교반하였다. 반응 후 용매를 감압하여 제거하고, 메틸렌 클로라이드(methylene chloride)에 다시 녹이고 포화된 NaHCO_3 용액으로 2~3회, 염수(brine)로 1회 씻어 유기 용매층을 얻었다. 얻은 유기 용매를 제거하고 소량의 메틸렌 클로라이드에 녹이고 에테르(ether)로 침전물을 만들어 보조리간드로서 비피리딘 화합물 [2,2'-bipyridine]-4,4'-dicarbonyl diazide (화학식 3)을 얻었다. ^1H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼(spectra)은 Bruker Advance DPX-300 또는 Bruker Advance 500 분광기를 사용하여 분석하였다. (221 mg, 수득률: 56%)

[0111] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.00 (s, 2H), 8.93 (d, 2H, $J=5.2$ Hz), 7.93 (d, 2H, $J=4.8$ Hz).

[0112] HRMS (FAB) calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_8\text{O}_2$ $[\text{M}]^+$ 294.0614, found 294.0621.

[0114] 실시예 2. RCS 반응기 합성



[0115]

[0116] 2-1. 전자 구인성 작용기로서 H를 가지는 RCS 반응기 합성 (4a)

[0117] THF에 4-브로모벤즈알데하이드(4-bromobenzaldehyde) (300 mg, 1.3 mmol)를 녹이고, 0 °C에서 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride) (1.1 equiv. 50 mg)를 천천히 넣어주고 3시간 가량 교반하였다. TLC로 반응이 종결된 것을 확인한 뒤, 반응 혼합물에 물을 부어 남은 NaBH₄를 킨칭(qenching)시키고 용매를 제거하였다. 이 후, EA에 녹이고, 염수로 씻어낸 뒤, 유기층을 모아 용매를 제거하였다. 이렇게 얻은 생성물 4-브로모벤질 알코올(4-bromobenzyl alcohol; 5a) (300 mg, 1.46 mmol)을 1,4-다이옥세인(1,4-dioxane) (9 mL)에 녹이고, bis-피나콜디보론(bis-pinacoldiboron) (1.3 equiv. 480 mg), KOAc (3 equiv. 430 mg) 및 PdCl₂(dppf)₂ (0.05 equiv. 53 mg)를 첨가하여 80 °C로 밤새 가열하고 실온으로 다시 낮추어 셀라이트(celite)로 여과하여 남은 Pd를 제거하였다. 이 후 감압으로 용액에서 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography) (Hexane:EtOAc, 3:1-1:1)로 분리하여 생산물인 4-hydroxymethylbenzeneboronic acid pinacol ester (4a) 화합물, 즉, 벤질 링커에서 오쏘(ortho) 위치에 전자 구인성 작용기(electron withdrawing group)로서 H를 가지는 반응기를 합성하였다.

[0119] 2-2. 전자 구인성 작용기로서 F를 가지는 RCS 반응기 합성 (4b)

[0120] THF에 4-브로모-2-플루오로벤즈알데하이드(4-bromo-2-fluorobenzaldehyde) (300 mg, 1.3 mmol)를 녹이고, 0 °C에서 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride) (1.1 equiv. 50 mg)를 천천히 넣어주고 3시간 가량 교반하였다. TLC로 반응이 종결된 것을 확인한 뒤, 반응 혼합물에 물을 부어 남은 NaBH₄를 킨칭(qenching)시키고 용매를 제거하였다. 이 후, EA에 녹이고, 염수로 씻어낸 뒤, 유기층을 모아 용매를 제거하였다. 이렇게 얻은 생성물 4-브로모-2-플루오로벤질 알코올(4-bromo-2-fluorobenzyl alcohol; 5b) (300 mg, 1.46 mmol)을 1,4-다이옥세인(1,4-dioxane) (9 mL)에 녹이고, bis-피나콜디보론(bis-pinacoldiboron) (1.3 equiv. 480 mg), KOAc (3 equiv. 430 mg) 및 PdCl₂(dppf)₂ (0.05 equiv. 53 mg)를 첨가하여 80 °C로 밤새 가열하고 실온으로 다시 낮추어 셀라이트(celite)로 여과하여 남은 Pd를 제거하였다. 이 후 감압으로 용액에서 용매를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography) (Hexane:EtOAc, 3:1-1:1)로 분리하여 생산물인 화학식 4에서 R이 F인 화합물, 즉, 벤질 링커에서 오쏘 위치에서 전자 구인성 작용기로서 F를 가지는 반응기 (4b)를 합성하였다 (298 mg, 수득률: 73%).

[0121] ¹H NMR (400 MHz, CDC13) δ 7.61 (d, J=7.2 Hz, 1H), 7.51-7.45 (m, 2H), 4.817 (s, 2H), 1.38 (s, 12H).

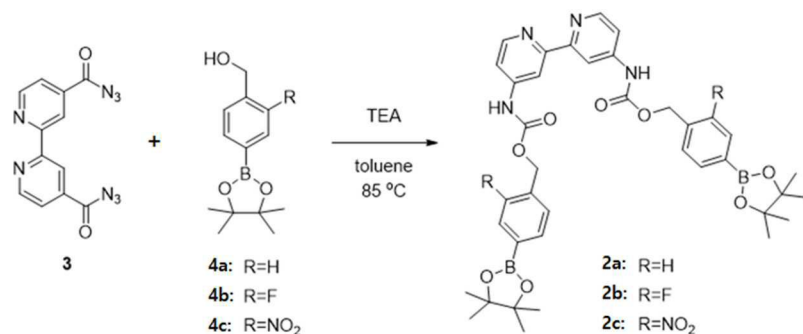
[0123] 2-3. 전자 구인성 작용기로서 NO₂를 가지는 RCS 반응기 합성 (4c)

[0124] THF에 4-브로모-2-나이트로벤즈알데하이드(4-bromo-2-nitrobenzaldehyde) (300 mg, 1.3 mmol)를 녹이고, 0 °C에서 소듐 보로하이드라이드(sodium borohydride) (1.1 equiv. 50 mg)를 천천히 넣어주고 3시간 가량 교반하였다. TLC로 반응이 종결된 것을 확인한 뒤, 반응 혼합물에 물을 부어 남은 NaBH₄를 킨칭(qenching)시키고 용매를 제거하였다. 이 후, EA에 녹이고, 염수로 씻어낸 뒤, 유기층을 모아 용매를 제거하였다. 얻어진 생성물 (5c) (260 mg, 1.12 mmol)을 별도의 분리 과정없이 1,4-다이옥세인 (10 mL)에 녹이고, bis-피나콜디보론 (1.5

equiv. 430 mg), KOAc (3 equiv. 330 mg) 및 $\text{PdCl}_2(\text{dppf})_2$ (0.05 equiv. 28 mg)를 첨가하여 80 °C로 밤새 가열하고 실온으로 다시 낮추어 셀라이트로 여과하여 남은 Pd를 제거하고 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 (Hexane:EtOAc, 3:1-1:1)로 분리하여 생산물인 화학식 4에서 R이 NO_2 인 화합물, 즉, 벤질 링커에서 오쏘 위치에 전자 구인성 작용기로서 NO_2 를 가지는 반응기 (4c)를 합성하였다 (239 mg, 0.86 mmol, 수득률: 65.66%).

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.47 (s, 1H), 8.05 (d, $J=7.2$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 1.35 (s, 12H).

실시예 3. 보조리간드 및 RCS 반응기 결합 (2a, 2b, 2c)



상기 실시예 1 및 2에서 합성한 보조리간드와 RCS 반응기를 결합시키기 위해, 톨루엔(Toluene)에 보조리간드 (화학식 3의 화합물) (110 mg, 0.37 mmol)를 넣고 10분 정도 환류하여, 용액이 투명해지는 때, RCS 반응기 (4a, 4b 또는 4c) (2.5 equiv.)을 각각 넣고 80 °C에서 밤새 환류하였다. 반응 종결을 확인한 후, 톨루엔을 제거하고 메틸렌 클로라이드에 녹인 뒤, NaHCO_3 용액으로 2~3회 씻고, NH_4Cl 용액으로 씻어 유기층을 얻었다. 용매를 제거하고 소량의 메틸렌 클로라이드에 다시 녹이고 에테르를 부어 생성된 침전물을 수득하여, 보조리간드 (bipyridine) 및 RCS 반응기가 카바메이트 모이어티에 의해 결합된 화학식 2의 화합물 (2a: 화학식 2에서 R이 H, 2b: 화학식 2에서 R이 F 및 2c: 화학식 2에서 R이 NO_2)을 얻었다.

화학식 2a (bpyCBM-Bpin) (178.7 mg, 0.25 mmol, 수득률: 67.57%):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ = 8.55 (d, $J=5.6$ Hz, 1H), 8.23 (s, 1H), 7.86 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 7.81 (m, 1H), 7.43 (d, $J=8.0$ Hz, 2H), 5.29 (s, 2H), 1.38 (s, 12H);

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.2, 152.8, 150.2, 146.5, 138.5, 135.2, 127.7, 127.5, 112.8, 110.2, 84.0, 67.4, 24.9;

HRMS (FAB) calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{44}\text{B}_2\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 707.3418, found 707.3419.

화학식 2b (bpyCBM-FBpin) (78.7 mg, 0.11 mmol, 수득률: 38.51%):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.59 (s, 1H), 8.23 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.57 (m, 1H), 7.39 (d, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.30 (m, 2H), 5.12 (s, 2H), 1.16 (s, 12H);

^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 161.7, 159.2, 155.9, 153.2, 149.7, 147.4, 130.5, 129.9, 125.9, 120.8, 112.8, 110.4, 84.2, 60.8, 24.7;

HRMS (FAB) calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{B}_2\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 743.3230, found 743.3234.

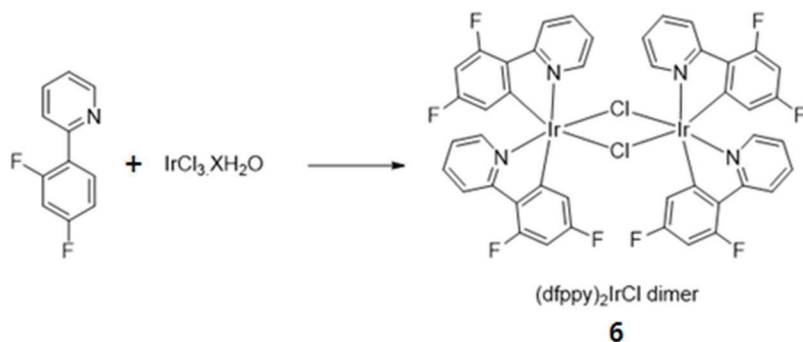
화학식 2c (bpyCBM- NO_2 Bpin) (180.70 mg, 0.23 mmol, 수득률: 61.16%):

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.52 (s, 1H), 8.44 (d, 1H, $J=6.0$ Hz), 8.06 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 8.02 (d, 1H, $J=5.2$ Hz), 7.84 (s, 1H), 7.71 (d, 1H, $J=7.6$ Hz), 5.66 (s, 2H), 1.35 (s, 12H);

[0140] ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 156.3, 152.8, 149.9, 147.1, 139.9, 135.0, 131.0, 130.7, 128.3, 128.0, 112.9, 110.4, 84.7, 63.7, 24.9;

[0141] HRMS (FAB) calcd. for $\text{C}_{38}\text{H}_{42}\text{B}_2\text{N}_6\text{O}_{12}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 797.3120, found 797.3126.

[0143] 실시예 4. 주 리간드 합성 (6)

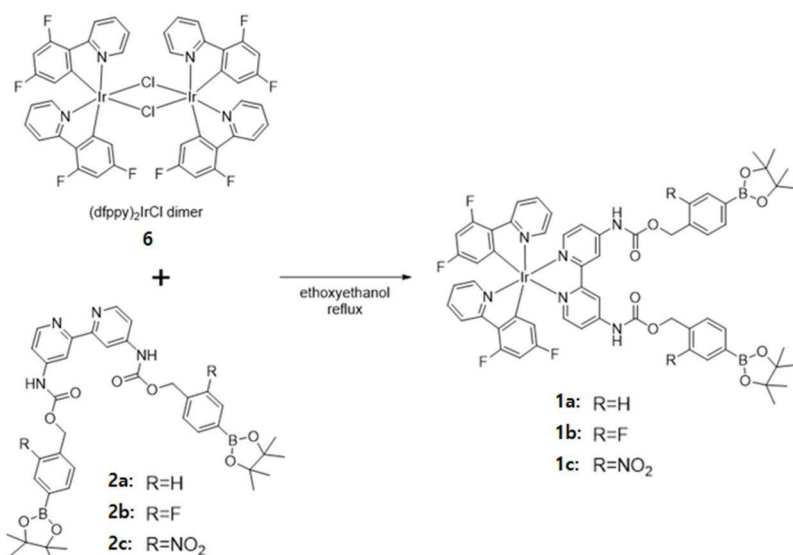


[0144]

[0145] $\text{IrCl}_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich, 150mg, 0.5 mmol) 및 3.5 equiv의 dfppy(2-(2,4-difluorophenyl)pyridine)를 2-EtOCH₂CH₂OH:H₂O = 3:1 (v/v)의 용액에 녹이고, 130 °C에서 밤새 가열하였다. 반응 혼합물을 실온으로 낮추고 생성된 침전물을 필터하여 얻고 이를 에테르로 세척하여 침전물로 주 리간드인 (dfppy)₂IrCl 이합체(dimer) (화학식 6)를 수득하였다 (200.2 mg, 0.16 mmol, 수득률: 65.85%).

[0146] ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.16 (d, 4H, $J=4.8$ Hz), 8.35 (d, 4H, $J=8.4$ Hz), 7.86 (t, 4H, $J=7.6\text{Hz}$), 6.88 (4H, t, $J=7.2$ Hz), 6.40–6.34 (m, 4H), 5.34 (d, 4H, $J=6.8$ Hz).

[0148] 실시예 5. RCS 반응성 이리듐 기반 탐침 합성 (1a, 1b, 1c)



[0149]

[0150] 상기 실시예 4에서 합성한 주리간드인 화학식 6의 (dfppy)₂IrCl 이합체 (50 mg, 0.04 mmol)를 메틸렌 클로라이드에 녹이고, 여기에 상기 실시예 3에서 보조 리간드와 RCS 반응기를 반응시켜 합성한 화학식 2a, 2b 및 2c의 화합물 1.5 equiv를 각각 첨가하여 밤새 환류하였다. 반응 후, 실온으로 온도를 낮춘 뒤, 용매를 제거하고, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \sim \text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH} = 20:1$)를 이용하여 분리하여, 이리듐 착물-카바메이트-반응기(phenylboronic acid pinacol ester)의 구조를 가지는, 화학식 1a의 화합물, 화학식 1b의 화합물 및 화학식 1c의 화합물 ((dfppy)₂Ir-bpyCBM-Bpins)을 얻었다. 이렇게 제작된 본 발명의 RCS 반응성 이리듐 기반 탐침은

신호 유닛으로 이리듐 착물을, 자가-희생기(Self-Immolative group)로 카바메이트기를, 및 RCS 반응 유닛으로 페닐보론산 피나콜 에스테르(phenylboronic acid pinacol ester) 유도체 (벤질 링커의 오쏘 위치에 전자 구인성 작용기로서 H, F 또는 NO₂를 포함)의 반응기를 포함한다. 본 발명의 이리듐 기반 탐침은 RCS와 반응하여 도 2와 같이 신호 물질로서 이리듐 착물 (화학식 7)을 방출한다.

- [0151] 화학식 1a ((dfppy)₂Ir-bpyCBM-Bpin) (74 mg, 0.054 mmol, 수득률: 70.4%):
- [0152] ¹H NMR (400 MHz, CDC13) δ 8.87 (s, 1H), 8.40-8.15 (m, 3H), 7.81-7.73 (m, 3H), 7.58 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.51 (d, J=5.6 Hz, 1H), 7.35-7.31 (m, 2H), 7.03 (t, J=6.4 Hz, 1H), 6.53 (td, J=10.4 Hz, 1H), 5.68 (dd, J=8.4 Hz, 1H), 5.16 (s, 2H), 1.32 (s, 12H);
- [0153] ¹³C NMR (101 MHz, CDC13) δ 165.1, 164.7, 163.0, 162.6, 160.2, 155.6, 153.4, 150.3, 150.1, 148.4, 138.9, 138.7, 135.1, 127.3, 127.1, 123.6, 123.3, 115.8, 114.5, 114.0, 99.1, 83.9, 67.3, 24.9;
- [0154] HRMS (FAB) calcd. for C₆₀H₅₆B₂F₄IrN₆O₈ [M]⁺ 1279.3911, found 1279.3923. 화학식 1b ((dfppy)₂Ir-bpyCBM-FBpin) (20.1mg, 0.015mmol, 수득률: 18.7%):
- [0155] ¹H NMR (400 MHz, CDC13) δ 8.90 (s, 1H), 8.30 (d, J= 7.6 Hz, 1H), 8.15 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.79 (t, J=8.4 Hz, 1H), 7.58 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.50 (m, 2H), 7.41 (m, 2H), 7.03 (t, J=6.0 Hz, 1H), 6.53 (t, J=10.4 Hz, 1H), 5.69 (dd, J=8.0 Hz, 1H), 5.25 (s, 2H), 1.32 (s, 12H);
- [0156] ¹³C NMR (101 MHz, CDC13) δ 164.8, 162.9, 162.5, 161.4, 158.9, 155.6, 154.6, 153.2, 150.3, 150.1, 148.4, 138.9, 130.6, 129.2, 127.6, 125.8, 123.7, 123.3, 121.1, 115.8, 114.6, 114.0, 99.1, 84.2, 61.3, 24.9;
- [0157] HRMS (FAB) calcd. for C₆₀H₅₄B₂F₆IrN₆O₈ [M]⁺ 1315.3723, found 1315.3719. 화학식 1c ((dfppy)₂Ir-bpyCBM-NO₂Bpin) (54 mg, mmol, 0.038 mmol, 수득률: 48.0%):
- [0158] ¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.60 (s, 1H), 8.24- 8.20 (m, 2H), 7.99- 7.94 (m, 3H), 7.71 (d, J =7.6 Hz, 2H), 7.64 (d, J=6.4 Hz, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.19 (t, J=7.2 Hz, 1H), 6.86 (m, 1H), 5.56-5.51 (m, 3H), 1.25 (s, 12H);
- [0159] ¹³C NMR (101 MHz, CDC13) δ 165.1, 164.7, 162.9, 162.6, 160.3, 155.6, 154.3, 152.8, 150.5, 149.9, 148.4, 146.6, 140.3, 139.0, 134.8, 130.9, 127.7, 123.7, 123.4, 115.9, 114.5, 114.1, 99.1, 84.7, 64.1, 24.9;
- [0160] HRMS (FAB) calcd. for C₆₀H₅₄B₂F₄IrN₈O₁₂ [M]⁺ 1369.3613, found 1369.3611.

[0162] 실험예 1. RCS 반응성 이리듐 기반 탐침의 형광 및 ECL 신호 변화 확인

[0163] 상기 실시예 5에서 합성한 이리듐 탐침 3종 (화학식 1a의 화합물, 화학식 1b의 화합물 및 화학식 1c의 화합물)의 RCS 반응 후 형광(photoluminescence) 또는 ECL(electrochemiluminescence) 신호 변화를 확인하였다. 구체적으로, 이리듐 탐침 3종 5 uM과 다양한 농도의 과산화수소 (1~500 uM)를 DMSO:PBS=6:4의 환경에서 각각 40분간 인큐베이션하고 310 nm에서 여기(excitation)하여 얻어지는 형광 스펙트럼을 확인하였다. 또한, 5uM의 탐침과 500uM의 다양한 ROS (H₂O₂) 및 RSS (OCl⁻, $\text{I}_2^{\cdot -}$, O²⁻, ·OH, ·OOR, GSSG, GSH, Hcy 및 Cys)를 40분 동안 인큐베이션하고 310 nm에서 여기(excitation)하여 얻어지는 형광 스펙트럼을 확인하였다. 또한, 상기 다양한 농도의 과산화수소 (1~500 uM) 또는 다양한 RCS (H₂O₂, OCl⁻, $\text{I}_2^{\cdot -}$, O²⁻, ·OH, ·OOR, GSSG, GSH, Hcy 및 Cys)와 화학식 1c 화합물 5 uM을 10 mm TPrA 및 100 mm TBAP을 포함하는 ACN(acetonitrile):PBS=6:4 혼합물에 넣어 40분 동안 인큐베이션한 뒤 ECL를 측정하였다. 아울러, 이들의 검출 한도(limit of detection, LOD)를 계산하였다 (표 1).

표 1

	PL	ECL
1a	2.768 μM	—
1b	2.698 μM	—
1c	3.084 μM	1.645 μM

[0164]

[0165]

그 결과, 본 발명의 3가지 탐침인 화학식 1a의 화합물 및 화학식 1b의 화합물은 520 nm에서 강한 방출을 나타냈으나, H_2O_2 의 농도가 증가함에 따라 형광의 최대 피크가 500 nm로 이동하였으며 (도 3a 및 b), 화학식 1c의 화합물은 H_2O_2 의 농도가 증가함에 따라 490 nm에서 형광 강도가 향상되는 것으로 나타났다 (도 3c). 이를 통해, 본 발명의 RCS 반응성 탐침인 화학식 1a의 화합물, 화학식 1b의 화합물 및 화학식 1c의 화합물이 형광 발광을 통해 ROS를 검출할 수 있음을 확인하였다. 또한, 본 발명의 3가지 탐침 (화학식 1a의 화합물, 화학식 1b의 화합물 및 화학식 1c의 화합물) 모두 다른 활성종에 비해 H_2O_2 및 O^{2-} 에 대해 현저히 높은 형광 강도를 나타냈으며 (도 3d 내지 f), 생리학적 환경에서 H_2O_2 가 초과산화물(superoxide)보다 더 안정적이고 지속가능하다는 점을 고려하여 본 발명의 탐침 (화학식 1a 내지 1c의 화합물)은 생물학적 환경에서 선택적으로 H_2O_2 를 검출할 수 있음을 확인하였다.

[0166]

또한, ECL 측정 결과, 화학식 1c의 화합물 탐침의 ECL 강도는 H_2O_2 의 농도에 의존적으로 현저히 증가하였으며 (약 2.7배 증가) (도 4a), ECL 방법을 이용한 화학식 1c의 화합물 탐침의 검출 한계(LOD)는 1.645 μM 로, 형광 (photoluminescence, PL) 방법을 이용한 검출한계 3.084 μM 보다 현저히 민감한 것으로 나타났다 (표 1). 아울러, H_2O_2 에 대한 ECL 강도가 가장 강했으나, $\text{HO}^\bullet$ 및 O^{2-} 에 대한 신호도 현저히 증가한 것으로 나타났다 (도 4b).

[0168]

실험예 2. RCS 반응성 이리듐 탐침을 이용한 당뇨병 진단 효과

[0169]

2-1. 형광 신호를 이용한 당뇨병 진단

[0170]

당뇨병에서는 혈소판이 여러 자극에 의해 활성화되는데 활성화된 혈소판은 활성산소종(ROS)을 생성하여 혈소판 응집을 유도한 후 혈전 형성을 일으켜 각종 심혈관계 질환을 유발한다. 따라서 혈소판에서 ROS 변화 (perturbation)를 감지하는 탐침은 당뇨병 진단에 이용할 수 있을 것으로 판단하여, 본 발명의 이리듐 탐침이 당뇨병 모델 랫트의 혈소판에서 ROS를 검출할 수 있는지 확인하였다. 구체적으로, 당뇨병 모델 랫트 (D) 및 정상 랫트 (N)의 정제된 혈소판 시료 (2×10^8 cells/ml) 또는 이의 파쇄물을 이용하여, 혈소판이 생성하는 활성산소와 본 발명의 이리듐 탐침 (화학식 1c의 화합물)을 37 $^\circ\text{C}$ 에서 1시간 동안 반응시킨 후, 형광 신호를 확인하였다. 이 때, 생물학적 환경에서 카탈라아제가 H_2O_2 를 분해하기 때문에, 카탈라아제 억제제인 AT(3-amino-1,2,4-triazole, 10mM)을 상기 혈소판 시료 및 이의 파쇄물 시료에 화학식 1c의 화합물을 처리하기 1시간 전에 전처리하였다. 또한, 화학식 1c의 화합물은 세포 불투과성이기 때문에 혈소판 시료에 대한 화학식 1c의 화합물의 반응은 세포외 ROS에 의해 유도되고, 혈소판 파쇄물에 대한 화학식 1c의 화합물의 반응은 세포내 ROS에 의해 유도된다.

[0171]

그 결과, 당뇨병 랫트의 시료에서 본 발명의 탐침 (화학식 1c의 화합물)의 형광 강도가 정상 랫트의 시료에 비해 현저히 증가한 것으로 나타났으며, AT를 포함하는 정상 랫트 및 당뇨병 랫트의 시료 모두에서 AT를 처리하지 않은 시료에 비해 현저히 높은 형광 강도를 나타내 (도 5a 및 b), 본 발명의 탐침 (화학식 1c의 화합물)이 혈소판 및 이의 파쇄물의 H_2O_2 에 반응하여 형광 변화를 나타내는 것을 확인하였다.

[0173]

2-2. 형광 및 ECL 신호를 이용한 당뇨병 진단

[0174]

본 발명의 화학식 1c의 화합물 탐침은 고유의 민감도(sensitivity) 때문에 ECL 방법을 사용할 때 낮은 LOD 값을

나타냈고, 화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침 모두 형광 방법을 사용할 때 높은 선택성(selectivity)을 나타냈으므로, 본 발명의 세 가지 화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침을 함께 사용하여 형광 및 ECL 신호로 당뇨병을 진단하면 구별능(differential capability)이 향상될 수 있는지 PCA(principal component analysis) 분석을 수행하였다. 구체적으로, 당뇨병 모델 랫트 (D) 및 정상 랫트 (N)의 혈액 2 mL에서 혈소판을 정제하고, 실제 시료와 동일한 농도로 만들기 위해 혈소판 시료와 파쇄물 시료를 수집한 혈액 부피와 동일한 부피로 준비하였다. 준비한 혈소판 및 파쇄물 용액에 본 발명의 화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침을 각각 처리하고 37 °C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이 후, 화학식 1c의 화합물 탐침을 처리한 시료는 형광 강도와 ECL을 모두 측정하고, 화학식 1a의 화합물 탐침 또는 화학식 1b의 화합물 탐침을 처리한 시료는 형광 강도를 측정하였다 (4회 반복). 이렇게 얻은 데이터로 PCA 분석을 수행하였다.

[0175] PCA 분석 결과, 파쇄물 시료로 분석한 도 5d에 나타났듯이, 당뇨병 그룹은 오른쪽 상단에, 정상 그룹은 오른쪽 하단에 위치하였으며, 탐침 그룹은 왼쪽에 위치하였고, 세포의 ROS로 간주되는 혈소판 시료의 결과에서도 유사한 클러스터링을 나타냈다 (도 5c). 이를 통해, 본 발명의 탐침들을 듀얼 모드로 이용한 어레이를 사용한 PCA 분석이 질병 상태에 따라 시료를 구별하고 클러스터링함으로써 당뇨병을 진단할 수 있음을 확인하여, 본 발명의 탐침들을 조합하면 형광 신호 및 ECL 신호 변화를 조합하여 더욱 정확한 질병의 진단이 가능함을 알 수 있다.

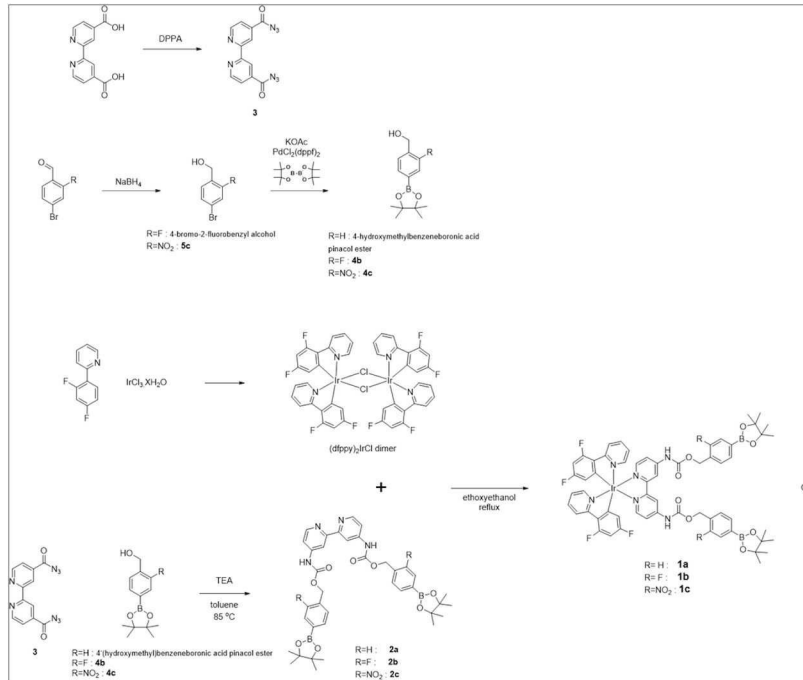
[0177] 실험예 3. RCS 반응성 이리듐 탐침을 이용한 바이러스 감염 진단

[0178] 바이러스 감염된 세포 및 정상 세포의 용해물을 이용하여, 본 발명의 이리듐 탐침으로 활성산소의 변화를 형광 및 ECL 신호로 확인하였다. 구체적으로, 조류독감 바이러스(avian influenza virus) H1N1를 세포주(Du145)에 농도별로 감염시킨 후, 이를 파쇄하고 본 발명의 화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침을 각각 처리한 뒤, ROS의 변화를 세 화합물 탐침의 형광 신호 변화 및 화학식 1c의 화합물 탐침의 ECL 신호 변화로 확인하였다.

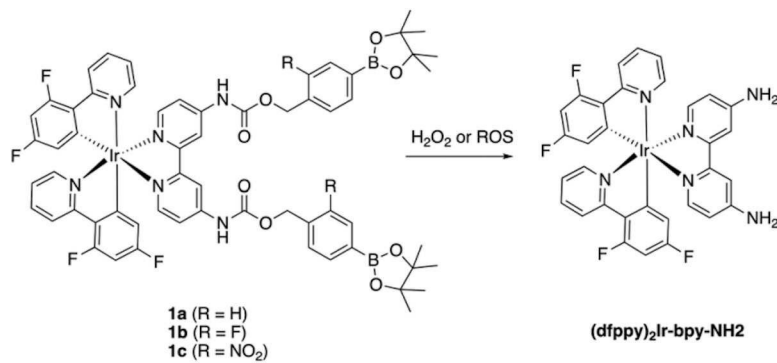
[0179] 그 결과, 본 발명의 화학식 1a의 화합물 탐침, 화학식 1b의 화합물 탐침 및 화학식 1c의 화합물 탐침 모두 바이러스 감염을 형광 신호 변화로 감지할 수 있었으며 (도 6a 내지 c), 화학식 1c의 화합물 탐침으로 바이러스 감염을 ECL 신호 변화로 감지할 수 있는 것으로 나타났다 (도 6d).

도면

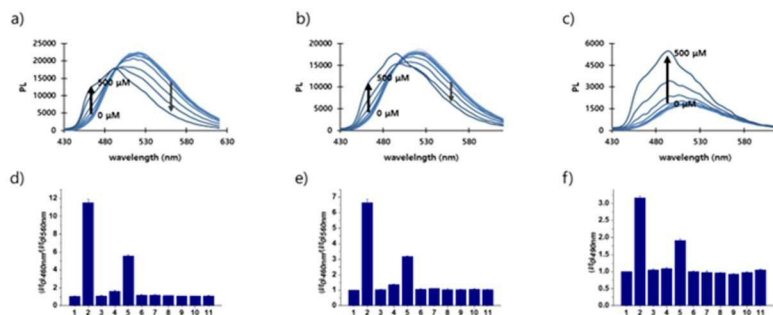
도면1



도면2



도면3



도면4

