

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0047068

(43) 공개일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C09K 11/06 (2006.01) C12Q 1/28 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01) G01N 33/58 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C09K 11/06 (2013.01)

C12Q 1/28 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0129062

(22) 출원일자 2018년10월26일

심사청구일자 2018년10월26일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김영미

서울특별시 동대문구 이문로12길 3-10, 101동 1404호 (이문동, 래미안이문2차아파트)

김태일

경기도 이천시 부발읍 부발중앙로46번길 46, 104동 204호 (무촌리, 효양아파트)

황병희

서울특별시 용산구 녹사평대로 66, 201동 1001호 (동빙고동, 용산푸르지오파크타운)

(74) 대리인

특허법인 이노

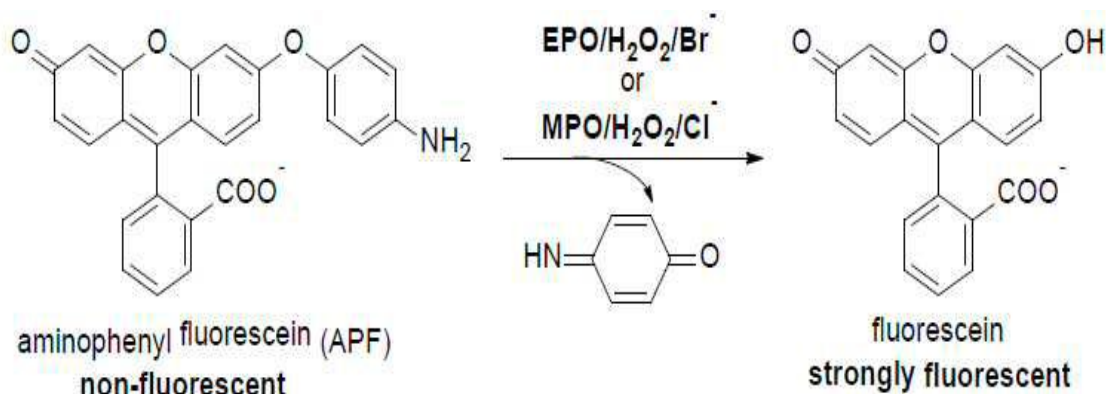
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브 및 이를 이용한 센서

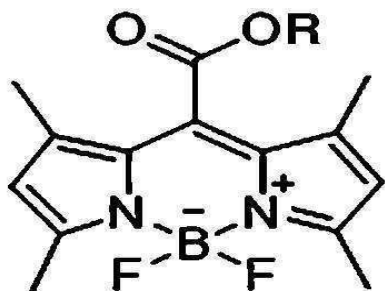
(57) 요약

본 발명은 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브 및 이를 이용한 센서 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



택적으로 탐지하는 하기 화학식 1의 메조-에스터-1,3,5,7-테트라메틸 BODIPY(meso-methylester-1,3,5,7-tetramethyl BODIPY) 화합물 1인 형광프로브에 관한 것이다.



[화학식 1]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

(52) CPC특허분류

G01N 21/64 (2013.01)

G01N 33/573 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

C09K 2211/104 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018044894

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업/일반기본연구자지원사업

연구과제명 시아노비닐렌 형광체의 광학적 성질의 연구 및 엑시머 형광 방출을 기반으로 한 다양한 형광 프로브의 개발에 관한 연구

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

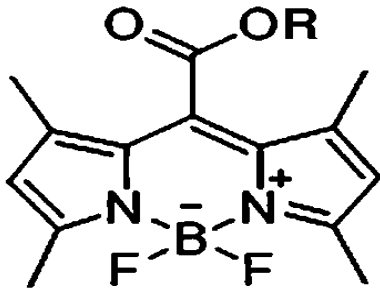
연구기간 2018.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 하기 화학식 1의 메조-에스터-1,3,5,7-테트라메틸 BODIPY(meso-methylester-1,3,5,7-tetramethyl BODIPY) 화합물 1인 형광프로브.



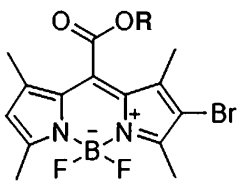
[화학식 1]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

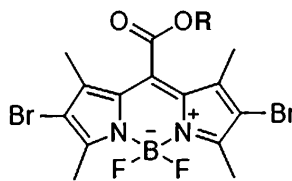
청구항 2

제1항에 있어서,

상기 화합물 1인 메조-에스터-1,3,5,7-테트라메틸 BODIPY(meso-methylester-1,3,5,7-tetramethyl BODIPY)가 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)와의 반응하여 하기 화학식 2의 화합물 2 및 화학식 3의 화합물 3이 생성되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.



[화학식 2]



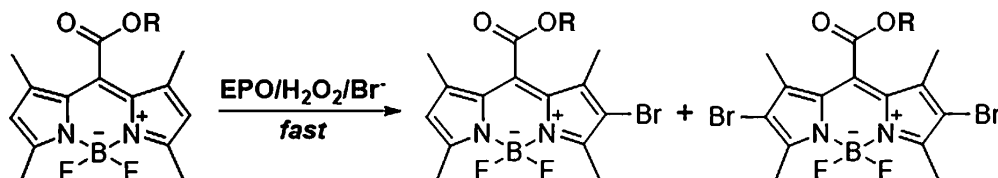
[화학식 3]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화합물 1의 반응식은 하기 반응식 1인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.



[반응식 1]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 화합물 1은 HOBr의 첨가시, 화합물 1인 형광프로브의 흡수 및 방출 피크는 감소하고, 화학식 3인 화합물 3의 적색 편이 흡수 및 방출 밴드가 증가하는 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 화합물 1은 HOBr의 첨가시, 핑크에서 퍼플로 변화하며, UV 램프 조사(365nm)에서 오렌지에서 빨간색으로 변화되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.

청구항 6

제2항에 있어서,

상기 반응식 1은 pH 의존적으로 pH 6이하에서 F/F₀이 12 이상인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.

청구항 7

제2항에 있어서,

상기 화합물 1은 1~5mM 범위에서 HOBr 농도와 방출 강도의 비율(I_{616}/I_{581})이 선형 관계($R^2 = 0.983$)이며, HOBr의 검출한계($3\sigma/\text{슬로프}$)는 3.8nM인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 화합물 1은 생물체의 박테리아 감염에 유무를 확인하는 EPO 발생여부 검출에 사용되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브.

청구항 9

제1항의 제1형광프로브가 고체형태로 종이 일면에 코팅된 딥 스틱 센서.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브 및 이를 이용한 센서에 관한 것으로, 보다 자세하게는 HOBr/EPO과 HOC1/MPO를 구별할 수 있는 발명에 관한 것으로, HOBr/EPO는 HOC1/MPO보다 *meso*-ester BODIPY 제1 형광프로브의 2번, 6번 위치에 친전자성 할로젠화 반응이 쉽게 일어날 수 있고, 특히, 할로젠화된 BODIPY 형광체가 고체상태에서 J-응집현상을 통해 밝은 적색 형광을 나타내므로 증원자효과에 의한 제한점을 극복할 수 있는 형광프로브로서 활용 가능하다.

배경 기술

- [0003] 호산구는 감염에 대한 숙주 방어에 중요한 역할을 하는 과립구 백혈구이며 천식 및 알레르기 질환의 병인에 관여한다.
- [0004] 또한, 자가 면역 질환에서 호지킨 림프종(Hodgkin's lymphoma)에 이르기까지 수많은 질환이 비정상적으로 증가된 호산구 수와 관련되어 있다.
- [0005] 과립구의 세포 독성 활성은 과산화수소를 사용하여 할로젠화물 (X-)을 차아 할로산 (HOX)으로 산화시키는 할로젠퍼옥시다아제를 통해 독성 활성 산소 중 (ROS)을 생성하는 능력에 부분적으로 의존한다.
- [0006] 호중구(neutrophils)에서 발견되는 미엘퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO)는 주로 염소 음이온(Cl^-)를 하이포아염소산(HOC1, $pK_a 7.6$)를 전환시킨다.
- [0007] 대신에 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)는 브롬화 이온보다 염소이온이 1000배 ($[Cl^-] 100\sim 140\text{ mM}$, $[Br^-] 20\sim 100\text{ }\mu\text{M}$) 많더라도 우선적으로 브롬화 이온(Br^-)를 하이포아브롬산으로 산화시킨다.
- [0008] HOBr의 강력한 산화 및 할로젠화 능력은 호산구성 질환으로 인한 염증 및 조직 손상에 기여한다.
- [0009] 현재 EPO 활성의 특이적 검출을 위한 형광성 프로브는 이용 가능하지 않다.
- [0010] H_2O_2 또는 HOC1(따라서 MPO 활성도)의 선택적 검출 및 이미징을 위한 화학 반응 형광 프로브의 개발에서 엄청난 발전이 있다.
- [0011] 그러나 EPO에 의해 생성된 HOBr를 특이적으로 검출하는 프로브의 설계의 지속적인 발전이 필요하다.
- [0012] HOC1은 HOBr보다 더 강력한 산화제이다. HOBr은 유사한 화학 작용으로 선택적 산화 환원 반응 신호가 차단된다.
- [0013] 다른 ROS (예 : H_2O_2 , $ONOO^-$, $\cdot O_2^-$)는 일부 산화 환원 기반 탐지 방식에서 알려져 왔다. 실제로, 도 1의 화학반응식은 이들은 EPO 활성을 모니터링하기 위한 상업적으로 이용 가능한 것으로, 가장 많은 형광 프로브인 아미노페닐 플루오레신(APF)과 관련된다.
- [0014] EPO 활동을 탐지할 수는 있지만 아미노페닐 플루오레신(APF)는 또한 MPO로 생성된 HOC1 및 히드록시 라디칼 ($\cdot OH$) 또는 퍼옥시 니트리트 ($ONOO^-$)와 같은 다른 ROS에 종종 높은 감도 반응한다.
- [0015] 알켄 또는 전자가 풍부한 방향족 기질의 친전자성 할로젠화 반응은 HOC1에 비해 HOBr에 대한 상당한 운동 선택성을 나타낸다 (Tyr 반응에 대해 10^4 : 1까지).
- [0016] 그러나, 생성된 브롬화 유도체는 일반적으로 시스템 간 교차 및 비방사(non-radiative)불활성화 속도를 증가시키는 중금속 효과(heavy atom effect)로 인해 용액에서 급냉되어 이러한 할로젠화 접근법을 형광 탐침의 개발에 장점이 없다.

[0017] 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)와 미엘퍼옥시다아제(myeloperoxidase, 이하 MPO)는 체내에 존재하는 할로젠화 이온 (Br^- , Cl^-)과 과산화수소(H_2O_2)를 이용해서 HOBr과 HOCl을 각각 만들어내며, 이 두 가지 물질은 다양한 질환에 밀접하게 연관되어 있어서 면역작용과 병리학적 기능면에서 중요한 기능을 한다. 그러나 HOBr과 HOCl은 화학적 특성과 성질이 거의 유사하기 때문에, 체내의 샘플로부터 두 가지 물질을 구별할 수 있는 방법이 없다. 따라서 감도와 선택성이 좋은 형광 분석법으로 두 가지 물질을 구별하여 정량/정성분석하는 기술을 개발하는 것은 매우 가치 있는 연구이다. 상업적으로 판매되는 HOBr의 탐지 형광프로브 (APF) 및 비특허문헌에 보고된 대부분의 형광프로브는 특정하게 HOBr을 탐지할 수 없고, HOCl과 기타 다른 ROS와의 반응성도 보고되었다.

[0018] HOBr과 HOCl은 알켄 혹은 전자가 풍부한 방향족 화합물들과 친전자성 할로젠화 반응에 참여한다. 최근에 티로신(tyrosine)에 대한 HOBr의 친전자성 브롬화 반응이 HOCl과의 염소화 반응에 비해서 10^4 배 빠르다고 보고되어 있으나, 브롬화반응을 형광체에 이용하게 되면 중원자효과에 의한 형광소멸을 유도하기 때문에 그 응용이 제한된다.

[0019] 본 발명은 세계 최초로 HOBr/EPO과 HOCl/MPO를 구별할 수 있는 발명에 관한 것으로, *meso*-ester BODIPY 형광프로브의 2번, 6번 위치에 친전자성 할로젠화 반응이 쉽게 일어날 수 있고, 특히, 할로젠화된 BODIPY 형광체가 고체상태에서 J-응집현상을 통해 밝은 적색 형광을 나타내므로 중원자효과에 의한 제한점을 극복할 수 있는 형광프로브로서 활용될 수 있다.

[0020] 본 발명 형광프로브는 HOBr과의 할로젠화 반응성이 HOCl에 비해서 1200배 이상 빠르게 관측되었으며 심지어 훨씬 큰 농도의 HOCl에 비해서도 높은 반응성을 나타내었기 때문에 이를 통해 두 가지 물질을 민감하고 선택적으로 구별할 수 있음을 제안한다.

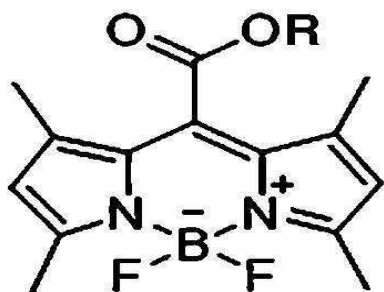
발명의 내용

해결하려는 과제

[0022] 본 발명의 목적은 천식, 알러지 등 호흡기 질환 환자 및 다양한 질환 (자가면역질환, 호지킨 림프종 등)에게 비정상적으로 발현되는 HOBr/eosinophil peroxidase(EPO)를 민감하고 선택적으로 탐지할 수 있는 형광프로브를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0024] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해 본 발명은 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 하기 화학식 1의 메조-에스터-1,3,5,7-테트라메틸 BODIPY(*meso*-methylester-1,3,5,7-tetramethyl BODIPY) 화합물 1인 형광프로브를 제공한다.

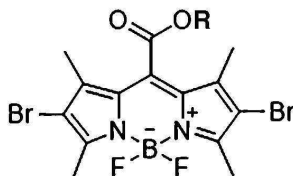
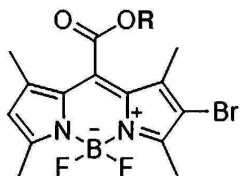


[0025]

[0026] [화학식 1]

[0027] R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

[0029] 또한 본 발명은 상기 화합물 1인 메조-에스터-1,3,5,7-테트라메틸 BODIPY(meso-methylester-1,3,5,7-tetramethyl BODIPY)가 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)와의 반응하여 하기 화학식 2의 화합물 2 및 화학식 3의 화합물 3이 생성되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

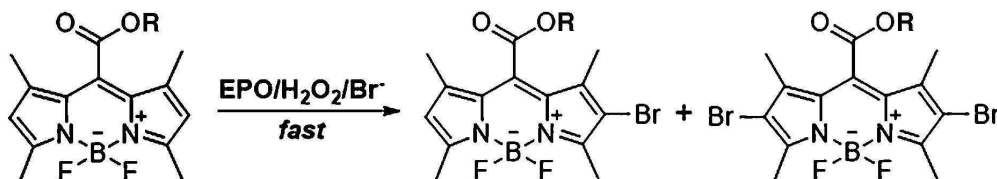


[화학식 2]

[화학식 3]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

[0035] 또한 본 발명은 상기 화합물 1의 반응식은 하기 반응식 1인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.



[반응식 1]

R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

[0040] 또한 본 발명은 상기 화합물 1은 HOBr의 첨가시, 화합물 1인 형광프로브의 흡수 및 방출 피크는 감소하고, 화학식 3인 화합물 3의 적색 편이 흡수 및 방출 밴드가 증가하는 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

[0041] 또한 본 발명은 상기 화합물 1은 HOBr의 첨가시, 핑크에서 퍼플로 변화하며, UV 램프 조사(365nm)에서 오렌지에서 빨간색으로 변화되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

[0042] 또한 본 발명은 상기 반응식 1은 pH 의존적으로 pH 6이하에서 F/F₀이 12 이상인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

[0043] 또한 본 발명은 상기 화합물 1은 1~5 mM 범위에서 HOBr 농도와 방출 강도의 비율(I₆₁₆ / I₅₈₁)이 선형 관계(R² = 0.983)이며, HOBr의 검출한계(3σ/슬로프)는 3.8nM인 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

[0044] 또한 본 발명은 상기 화합물 1은 생물체의 박테리아 감염에 유무를 확인하는 EPO 발생여부 검출에 사용되는 것에 특징이 있는 하이포아브롬산(Hypobromous acid, HOBr) 및 호산구 퍼옥시다아제(Eosinophil peroxidase, EPO)를 선택적으로 탐지하는 형광프로브를 제공한다.

[0045] 또한 본 발명은 제1형광프로브가 고체형태로 종이 일면에 코팅된 덩 스틱 센서를 제공한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명은 화합물 1인 형광프로브의 친전자성 방향족 할로젠화 속도와 생성된 할로젠화 BODIPY 염료의 광물리 특성에서의 차이를 이용하여 MPO에 의한 해당 HOC1의 간접없는 EPO에 의한 HOBr 생성의 선택적 검출, 분석 및 영상화에 효과적이다.

[0048] 또한 본 발명의 형광프로브는 반응은 빠르고 ($\leq 2s$), 매우 민감(EPO의 경우 LOD : 0.09 ng / mL)한 특징이 있으며 J-응집체는 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3의 자기 조립으로 인한 유리한 광물리특성으로 인한 이점(좁은 폭, 겹쳐지는 밝은 방출 밴드)을 활용하여 화합물 1인 형광프로브가 병리학적 바이오마커로서의 EPO 활성 및 HOBr 수준의 섬세한 변화를 조사하는데 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 EPO 활성을 모니터링하기 위한 상업적으로 이용 가능한 것으로, 형광 프로브인 아미노페닐 플루오레신 (APF)과 관련된 반응식이다.

도 2의 (a)는 화합물 3의 CH₃CN 및 CH₃CN:H₂O에서 흡방출에 대한 그래프이며, 삽입 사진은 A, B용액상태에서(A: CH₃CN, B: CH₃CN/H₂O=0.1:99.9 (v/v), irradiation at 365nm)의 사진이며, (b)는 DLS (540±10nm)에 의한 화학식 3의 제3 형광프로브의 응집체 크기 분포 및 삽입 사진은 제3형광프로브의 응집체 SEM 이미지(490 ± 30nm)이다.

도 3은 HOBr(10 μM) 첨가 전 (검정)및 즉시($\leq 2s$) 후 (적색)자기조립된 화합물 1인 형광프로브(2.5 μM)의 흡광도(a) 및 형광(b)에 대한 도면이며, (c)는 [HOBr](0-10 μM)의 함수로서의 616nm에서의 형광 강도에 대한 도면이며, (d)는 다양한 생물학적으로 관련된 종 (5 μM HOBr, 다른 ROS의 경우 50 μM, 아미노산 및 바이오 티올의 경우 1mM, 기타의 경우 1mg/mL)의 존재하에서 탐침 1 (2.5 μM)의 형광 스펙트럼이다.

도 4는 50 μM의 H₂O₂ 및 100 μM의 KBr를 함유 한 100 mM 아세테이트 완충액 (pH 5.0, 0.1% CH₃CN, 25℃)에서 EPO (0-150 ng/mL) 처리시 자기 조립 화합물 1인 형광프로브의 흡광 (a) 및 형광 (b)을 보여주며 (c)다양한 조건에서 화합물 1인 형광프로브의 형광 응답(I_{616}/I_{581})에 관한 도면이다. 각각의 분석 용액에 1을 첨가 한 직후 모든 스펙트럼을 얻었으며, 581nm 및 616nm에서 형광 강도를 기록하였다. [1] = 2.5 μM. λ_{ex} = 480nm.

도 5는 MPO /H₂O₂/Cl⁻ (왼쪽) 또는 EPO / H₂O₂/Br⁻ (오른쪽)의 용액에 15초 동안 침지된 화합물 1인 형광프로브-코팅된 종이 스트립의 색 (a) 및 형광 (b) 응답 사진이다([Cl⁻] = 100 mM, [H₂O₂] = 50 μM, [MPO] = 150 ng / mL; [Br⁻] = 100 μM, [H₂O₂] = 50 μM, [EPO] = 5, 10 및 20ng/mL. 형광 응답 이미지는 UV 조사 (365 nm) 하에서 촬영되었다.)

도 6은 (a)화합물 1인 형광프로브(10 μm)의 동일 초점 형광 이미지는 살아있는 macrophage 세포 (RAW264.7)로 로드된 다른 조건으로 다뤄진 사진이며, (b)는 화합물 1인 형광프로브의 비교 형광 세기비(Comparative fluorescence intensity ratios (I_{616}/I_{581}))에 대한 도면이다.

도 7은 (a) 위 : 마우스 실험 일정; 아래 : 살모넬라에 감염된 마우스 (적색 바)의 호산구와 호중구는 대조군 (감염되지 않은 마우스)과 비교하여 검은색 막대로 나타내며,(b) 감염되지 않은 (흑색) 및 살모넬라 감염 마우스 (적색)로부터의 혈장 및 과립구의 존재 하에서의 화합물 1인 형광프로브(25 μM)의 형광 응답 (I_{616} / I_{581})을 보여준다.

도 8은 CH₃CN- 물 혼합물 중 화합물 3의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼 그래프이다. 여기서 흡수 최대값은 CH₃CN 용액 539nm에서 CH₃CN- 물 혼합물 619nm로 이동된다.

도 9는 CH₃CN- 물 혼합물 (0.1:99.9, v/v) 중의 상이한 농도에서의 화학식 3의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼 그

래프이다.

도 10은 CH₃CN-물 혼합물에서 형광프로브의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼에 관한 것이다.

도 11은 CH₃CN-물 혼합물 (0.1:99.9, v/v)에서 상이한 농도의 형광프로브의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼이다.

도 12는 CH₃CN-물 혼합물 중 화합물 2의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼이다.

도 13은 CH₃CN-물 혼합물 (0.1:99.9, v/v) 중의 상이한 농도에서 화합물 2의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼이다.

도 14는 (a)화합물 1의 형광프로브의 HOBr의 반응시간에 따른 HPLC chromatograms이며 (b)는 11.3분 (c)는 17분 (d)는 23분 반응시간 후 체류 시간 피크의 ESI-MS 스펙트럼(ESI-MS spectra of the peak of retention time)에 관한 것으로, 순서대로 화합물 1,2,3에 해당된다.

도 15는 HOBr(5 당량) 및 HOCl (20, 40, 80 및 160 당량) 혼합물 첨가시 화합물 1인 형광프로브 반응에 관한 HPLC chromatogram이다.

도 16은 25℃에서 아세테이트 완충액(100mM, pH5.0, 0.1% CH₃CN)에 HOCl(0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300 및 400 μM)을 첨가했을 때 형광프로브(2.5 mM)의 형광 방출 스펙트럼이다.

도 17은 아세테이트 버퍼용액에서(100mM, pH 5.0, 0.1% CH₃CN) HOX의 농도에 따른 상대적인 형광세기에 관한 것이다.

도 18은 25℃에서 아세테이트 완충액(100mM, pH 5.0, 0.1% CH₃CN)에서 HOX (왼쪽: HOBr, 오른쪽: HOCl)와 화합물 1인 형광프로브의 반응에 대한 유사일차(Pseudo first-order)반응 곡선이다.

도 19는 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3에서 형성된 응집체의 형광 스펙트럼에 생체 분자가 미치는 영향에 관한 도면이다.

도 20은 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3에서 형성된 응집체의 형광 스펙트럼에 대한 pH의 영향에 도면이다.

도 21은 HOBr에 대한 화합물 1인 형광프로브의 형광 방출 반응에 대한 pH의 영향에 대한 도면이다.

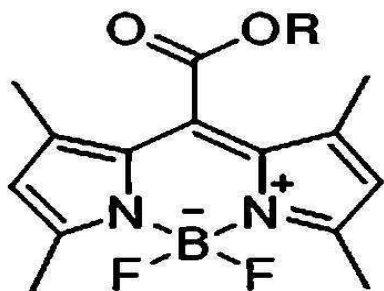
도 22는 EPO/H202/KBr 첨가 직후의 형광프로브의 반응에 대한 HPLC 크로마토그램이다

도 23은 24시간 동안 다양한 농도 (0-100 μM)에서 화합물 1인 형광프로브로 배양한 후 RAW264.7 (1×10⁵) 세포에서 세포 생존력 연구를 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0051] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 우선, 본 발명을 설명함에 있어, 관련된 공지기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명은 본 발명의 요지를 모호하지 않게 하기 위하여 생략한다.
- [0052] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 '약', '실질적으로' 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다.
- [0053] 호산구 과산화 효소(EPO) 활성의 특이적 검출은 EPO에 의해 생성된 차아염소산과 다른 할로페록시다제에 의해 생성된 차아염소산 사이의 구별을 요구된다.
- [0054] 본 발명은 HOCl 대비 HOBr에 대해 높은 반응 선택성(kinetic selectivity)(≥1200 : 1)을 갖는 할로젠화된 형광프로브에 관한 것이다.
- [0055] 또한 본 발명의 중금속 효과(Heavy atom effects)는 턴온 신호(turn-on signal)를 제공하는 방사성 J-응집체(J-aggregates)로의 자체조립(self-assembly) 때문에 디브롬화생성물을 소멸시키지 않은 특징이 있다. EPO 활성 분석, 스틱(dip-stick)센서, EPO 활성의 형광 이미징, 암세포에서의 산화 스트레스 분석, 생쥐에서의 면역 반응 검출에서 상기 형광 프로브가 응용될 수 있다.
- [0056] 본 발명은 EPO활성에 대한 검출에서 HOX 선택도 문제를 해결하기 위해 J-응집체(J-aggregates)를 형성하는 BODIPY 발색단에 대한 것이다.

[0057] 하기 화학식 1의 화합물 1인 형광프로브는 HOCl과의 염소화보다 높은 반응선택성으로 EPO로 생성된 HOBr과 반응하여 신속하게 디브로민화(dibromination)된다.



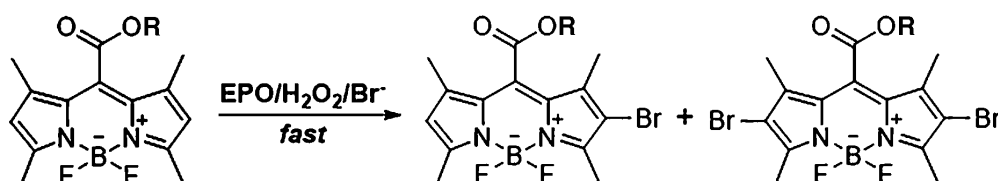
[0059]

[0060] [화학식 1]

[0061] R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나

[0063] 상기 화학식 1의 화합물 1은 하기 반응식 1에 의해 화학식 2의 화합물 2 및 화학식 3의 화합물 3을 생성한다.

[0065] [반응식 1]



[0066]

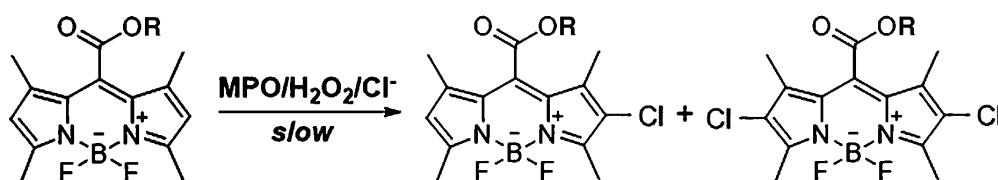
[0067] [화학식 1] [화학식 2] [화학식 3]

[0068]

[0069] R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나이다.

[0071] 상기 반응식 1과 대비되는 반응식 2는 아래와 같다.

[0072] [반응식 2]



[0073]

[0074] 마찬가지로 R은 알킬(C는 1~3개), 벤질, 펜타플로로벤질 중 어느 하나이다.

[0076] 본 발명 화합물 1인 형광프로브는 상기 반응식 2에 관한 HOBr과의 할로젠화 반응성이 HOCl에 비해서 1200배 이상 빠르게 관측되었으며 심지어 훨씬 큰 농도의 HOCl에 비해서도 높은 반응성을 나타낸다. 이를 통해 두 가지 물질을 민감하고 선택적으로 구별될 수 있다.

[0077] 상기 반응식 1의 생성물 중 하나인 화학식 3의 화합물 3은 브롬화 발색단(brominated chromophores)과 관련된 열등한 광물리적 특성(photophysical properties)을 갖지 않는다. 반대로, 상기 화학식 3의 화합물 3은 높은 방

출성의 적색편이된 J-응집체(J-aggregates)로 자기조립되어 완벽한 턴온 형광신호(urn-on fluorescence signal)를 발생시킨다.

[0078] 본 발명은 상기 반응식 1을 사용하여 MPO 및 생성 HOCl로부터의 간섭없이 EPO에 의한 생성 HOBr의 선택적 검출, 분석 및 영상화(imaging)가 진행되는 것이 특징이다.

[0079] 본 발명의 화학식 1인 화합물 1의 형광프로브는 Kim, S.; Bouffard, J.; Kim, Y. *Chem. Eur. J.* 2015, 21, 17459-17465.에서 소개된 제조방법에 의해 합성되며, 분석데이터 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ = 6.07 (s, 2H), 3.97 (s, 3H), 2.53 (s, 6H), 2.12 (s, 6H). $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3): δ = 165.7, 157.6, 141.0, 128.8, 128.6, 121.2, 53.1, 14.8, 12.6 으로 확인된다.

1. 광물리학 특성 및 자기 조립 연구(Photophysical Property and Self-Assembly Studies)

[0082] 일반적으로 메조-에스터-치환된 BODIPYs(meso-ester-substituted-BODIPYs)인 화학식 1-3의 화합물 1-3은 메조-치환된 1,3,5,7- 테트라 메틸 BODIPY와 같이 예상대로 입체적으로 혼잡한 용액에서 낮은 용액 방출 양자 수율(CH_3CN = 0.003 (1); 0.004 (2); 0.002 (3); 표 1)을 갖는다.

표 1

화학식	Solvent	$\lambda_{\text{abs. max}}$ [nm]	ϵ^b [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]	$\lambda_{\text{em. max}}^c$ [nm]	Φ_F
1	CH_3CN	509	81000	530	0.003 ^d
1	Buffer ^a	580	n/a	581	0.031 ^e
2	CH_3CN	522	68000	548	0.004 ^e
2	Buffer ^a	567	n/a	580	0.006 ^e
3	CH_3CN	539	76000	570	0.002 ^e
3	Buffer ^a	619	n/a	621	0.022 ^e
4	CH_3CN	521	70000	548	0.005 ^e
4	Buffer ^a	565	n/a	574	0.009 ^e
5	CH_3CN	538	61000	569	0.004 ^e
5	Buffer ^a	612	n/a	617	0.018 ^e

[0084]

[0086] 본 발명인 화합물 1 형광프로브는 응집시 509nm에서 581nm로의 큰 적색 이동한다. 또한, 작은 스톡스 시프트(Stokes shift)(176cm^{-1}), 좁은 방출밴드(176cm^{-1})로 입증된 J-응집체(J-aggregates)를 통해 응집-유도 방출증진(AIEE) FWHM = 560cm^{-1}), 증가된 형광속도상수(부유 응집체에서 $k_F = 3.3 \times 10^7 \text{s}^{-1}$ 인에서 $4.4 \times 10^8 \text{s}^{-1}$), 전이 쌍극자의 전후방 배열 (변위 각 $\theta < 54.7^\circ$; 화학식1(C가 1)에서는 33°)을 표시되는 것이 알려져있다.

[0087] 도 2의 (a)는 화합물 3의 CH_3CN 및 $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 에서 흡방출에 대한 그래프이며, 삽입사진은 A,B용액상태에서(A: CH_3CN , B: $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O} = 0.1:99.9$ (v/v), irradiation at 365nm)의 사진이며, (b)는 DLS ($540 \pm 10 \text{nm}$)에 의한 화학식 3의 화합물 3의 응집체 크기 분포, 삽입 사진은 화합물 3의 응집체 SEM 이미지($490 \pm 30 \text{nm}$)이다.

[0088] CH_3CN -물 혼합물 용액($f_w \geq 90\%$, DLS에 의한 $540 \pm 10 \text{nm}$, 도 2b)에서 dibromo-BODIPY인 화합물 3($20 \mu\text{M}$)의 현탁 콜로이드 응집체는 메조-치환된 1,3,5,7- 테트라메틸 BODIPYs(meso-substituted 1,3,5,7-tetramethyl BODIPYs)사이의 J-응집체 형성물과 일치하는 동일한 분광적인 특징을 나타낸다.

[0089] 도 8은 CH_3CN -물 혼합물 중 화합물 3의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼 그래프이다. 여기서 흡수 최대값은 CH_3CN 용액 539nm에서 CH_3CN -물 혼합물 619nm로 이동된다. 그 형광 방출은 작은 스톡스 시프트(Stokes shift) (52cm^{-1}), 좁은 방출 밴드 (FWHM= 724cm^{-1}), 형광속도상수의 6.3배 증가 ($k_F(\text{sol}) = 1.1 \times 10^7 \text{s}^{-1}$; $k_F(\text{agg})=6.9 \times 10^7 \text{s}^{-1}$)을 나타낸다.

- [0090] 도 9는 CH₃CN-물 혼합물 (0.1:99.9, v/v) 중의 상이한 농도에서의 화학식 3의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼 그래프이다. J-응집체의 특징적인 분광 특성은 *ca.* 0.25 μ M 만큼 낮은 화합물 3의 농도에서 관찰된다.
- [0091] 선명한 턴온 신호(turn-on signal)에 있어서 중요한 것은, 화합물 3의 적색 방출(621nm) 응집체는 화합물 1인 형광프로브로부터 완전히 분리된다. 즉, 581nm에서 날카로운 방출 밴드를 나타내는 주황색 방출 J-응집체인 화합물 1인 형광프로브에서 완전히 분리된다.
- [0092] 도 10은 CH₃CN-물 혼합물에서 화합물 1인 형광프로브의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼에 관한 것이며, 도 11은 CH₃CN-물 혼합물 (0.1 : 99.9, v / v)에서 상이한 농도의 화합물 1인 형광프로브의 흡광 및 형광 방출 스펙트럼을 보면 알 수 있다.
- [0093] 또한 동일한 CH₃CN-물 혼합물 ($fw \geq 90\%$)에서 화학식 2인 화합물 2의 응집체는 간섭되지 않으며 각각 *ca.* 567nm 및 580nm에서 흡수 및 방출 최대치를 나타낸다.
- [0094] 도 12는 CH₃CN-물 혼합물 중 화합물 2의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼이며, 도 13은 CH₃CN-물 혼합물 (0.1:99.9, v/v) 중의 상이한 농도에서 화합물 2의 흡수 및 형광 방출 스펙트럼으로 상기 설명을 뒷받침해준다.
- [0096] 2. 용액에서 HOBr 센싱(HOBr Sensing in Solution)
- [0097] HOBr에 대한 화합물 1인 형광프로브의 센서 반응은 25°C에서 수용액 (100mM 아세테이트 완충액, pH 5.0, 0.1 % CH₃CN)에서 먼저 평가되었다.
- [0098] 도 3은 HOBr(10 μ M) 첨가 전(검정) 및 즉시(≤ 2 초) 후(적색) 자기조립된 화합물 1인 형광프로브(2.5 μ M)의 흡광도(a) 및 형광(b)에 대한 도면이며, (c)는 [HOBr](0-10 μ M)의 함수로서의 616nm에서의 형광 강도에 대한 도면이고 (d)는 다양한 생물학적으로 관련된 종(5 μ M HOBr, 다른 ROS의 경우 50 μ M, 아미노산 및 바이오 티올의 경우 1mM, 기타의 경우 1mg/mL)의 존재하에서 화합물 1인 형광프로브(2.5 μ M)의 스펙트럼이다.
- [0099] HOBr의 첨가시, 화합물 1인 형광프로브의 흡수 및 방출 피크는 현저하게 감소하는 반면, 화학식 3인 화합물 3의 부유된 응집체의 특징적인 적색 편이 흡수 및 방출 밴드는 즉시 나타난다. 육안으로 볼 때 핑크에서 퍼플(도 3a, 삽입), 핸드헬드(handheld) UV 램프 조사(365nm)에서 오렌지에서 빨간색으로 변화(도 3b, 삽입)에 해당된다. 시간 경과(Time course) 연구는 형광 턴-온(turn-on) 프로세스가 빠르다는 것을 밝혀냈으며(≤ 2 s), 반응 혼합물의 HPLC-MS 분석은 주요 생성물로서 화학식 3의 화합물 3 형성을 확인했다.
- [0100] 도 14는 (a)화합물 1의 형광프로브의 HOBr의 반응시간에 따른 HPLC chromatograms이며 (b)는 11.3분 (c)는 17분 (d)는 23분 반응시간 후 채류 시간 피크의 ESI-MS 스펙트럼(ESI-MS spectra of the peak of retention time)에 관한 것으로, 순서대로 화합물 1,2,3에 해당된다.
- [0101] 도 3c에 도시된 바와 같이, 616nm에서의 형광강도는 측정된 범위(0-10 mM) 내에서 HOBr농도가 증가함에 따라 급격히 증가하고, 2당량의 HOBr가 *ca.* 616 nm에서 형광 강도가 22배 증가했다. 방출 강도의 비율(I_{616} / I_{581})과 $1 \sim 5 \text{ mM} (R^2 = 0.983)$ 범위의 HOBr 농도 사이에 선형 관계가 있다. 화합물 1인 형광프로브를 이용한 HOBr의 검출 한계($3\sigma / \text{슬로프}$)는 3.8nM으로 결정된다.
- [0102] 더 중요한 것은 화합물 1인 형광프로브(2.5mM)가 다른 생물학적으로 적절한 분자들에 비해 HOBr에 대한 뛰어난 선택성을 보였다는 것이다 (도 3d). 반응성 산소종(ROS) 중에서 HOBr만이 616nm에서의 방출을 크게 향상시킨다.
- [0103] HOCl/OCl⁻, H₂O₂, superoxide($\cdot O_2^-$), hydroxyl($\cdot OH$) 또는 tert-butoxy radicals($\cdot OtBu$), tert-부틸 하이드로 퍼옥사이드의 존재하에서, 심지어 고농도(HOBr의 경우 5 mM 및 기타의 경우 50 mM)에서는 화합물 1인 형광프로브 방출 스펙트럼에서 중요한 변화가 일어나지 않는다.
- [0104] 화합물 1인 형광프로브는 과량의 HOCl/OCl⁻ ($\geq 200 \text{ mM}$)과 반응하여 염소화된 생성물을 생성할 수 있다. 그러나, 염소화 반응은 브롬화 반응과 역학적으로 경쟁하지 않는다. HPLC-MS 분석은 HOBr(12.5 mM)과 HOCl(400 mM까지)의 존재하에서 화합물 1인 형광프로브(2.5 mM) 반응이 화합물 3의 형성만을 유도한다는 것이 확인된다.
- [0105] 도 15는 HOBr(5 당량) 및 HOCl (20, 40, 80 및 160 당량) 혼합물 첨가시 화합물 1인 형광프로브 반응에 관한

HPLC chromatograms에 관한 것으로 이를 뒷받침해준다.

- [0106] 또한, HOBr이 없는 경우, HOCl에 의해 유도된 상기 양성 반응은 생물학적으로 적절한 농도 내에서 일어나지 않는다($[HOCl] \leq 100 \mu M$). 도 16은 25°C에서 아세테이트 완충액(100mM, pH 5.0, 0.1% CH₃CN)에 HOCl(0, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 300 및 400 μM)을 첨가했을 때 형광프로브(2.5 mM)의 형광 방출 스펙트럼에 관한 것이고, 도 17은 아세테이트 버퍼용액에서(100 mM, pH 5.0, 0.1% CH₃CN) HOX의 농도에 따른 상대적인 형광세기에 관한 것으로 이를 확인할 수 있다.
- [0107] HOCl/OCl⁻의 간섭에 대한 상기 분석의 견고성은 BODIPY 염료의 할로젠화 반응에서 HOCl보다 HOBr에 대해 1,200 배의 반응 선택성(kinetic selectivity)을 나타낸다.
- [0108] 도 18은 25°C에서 아세테이트 완충액(100mM, pH 5.0, 0.1% CH₃CN)에서 HOX (왼쪽: HOBr, 오른쪽: HOCl)와 화합물 1인 형광프로브의 반응에 대한 유사일차(Pseudo first-order)반응 곡선이다. HOBr과의 반응을 위해, 616nm에서의 형광 강도는 200ms마다 기록되었고, HOCl과의 반응에 대하여, 611nm에서의 형광 강도가 10초마다 기록된 것으로 이를 알 수 있다.
- [0109] 또한, 화합물 1인 형광프로브는 친핵성 측쇄(Cys, His, Lys), 바이오 티올 (GSH, Hcy) 또는 일반적인 가수 분해 효소(에스테라제, 트립신, 리파아제, 리소자임)를 갖는 아미노산의 영향을 받지 않는다(도 3d). 또한 화합물 1인 형광프로브와 화학식 3의 화합물 3은 자기 응집의 J-응집체 단백질(미오글로빈, 헤모글로빈, 소 혈청 알부민) 및 지질(콜레스테롤, 올레산, 포스파티딜콜린) 및 pH 범위 4에서 9에서 안정하다. 그럼에도 불구하고 HOBr에 대한 화합물 1인 형광프로브의 형광 응답은 pH 의존적이다. 산성 조건 (pH <6)하에서 보다 큰 반응은 제안된 친전자성 할로젠화 경로와 일치한다.
- [0110] 도 19는 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3에서 형성된 응집체의 형광 스펙트럼에 생체 분자가 미치는 영향에 관한 도면이고, 도 20은 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3에서 형성된 응집체의 형광 스펙트럼에 대한 pH의 영향에 도면이며, 도 21은 HOBr에 대한 화합물 1인 형광프로브의 형광 방출 반응에 대한 pH의 영향에 대한 도면으로 이를 뒷받침해주고 있다.
- [0112] 3. 솔루션의 EPO 활성 분석(EPO Activity Assays in Solution)
- [0113] 도 4는 50 μM 의 H₂O₂ 및 100 μM 의 KBr를 함유한 100mM 아세테이트 완충액 (pH 5.0, 0.1 % CH₃CN, 25°C)에서 EPO(0-150ng/mL) 처리시 자기조립 화합물 1인 형광프로브의 흡광(a) 및 형광(b)를 보여주며 (c)다양한 조건에서 화합물 1인 형광프로브의 형광 응답 (I_{616}/I_{581})에 관한 도면이다. 각각의 분석 용액에 화합물 1인 형광프로브를 첨가 한 직후 모든 스펙트럼을 얻었으며, 581nm 및 616nm에서 형광 강도를 기록하였다. 형광프로브 농도 2.5 μM , $\lambda_{ex} = 480nm$ 이다.
- [0114] 25°C에서 아세테이트 완충용액 (100 mM, pH 5.0, 50 mM H₂O₂, 100 mM KBr, 0.1 % CH₃CN) 중 화합물 1인 형광프로브(2.5 mM)와 EPO(0.5-150 ng/mL)의 배양은 디브로모-BODIPY(dibromo-BODIPY)인 화학식 3인 화합물 3의 방사성 J-응집체 (도 4a 및 4b)와 일치하는 스펙트라 변이를 나타낸다. 특징적인 적색 편이 흡수 및 방출 밴드 (abs.max = 613 nm, ememax = 616 nm)는 즉시 증가하고(2≤s), 이후에 0-25 ng/mL범위에서 EPO 농도 범위에 따라 선형적($R^2 = 0.9957$)으로 증가한다(도 4b 삽입).
- [0115] 주요 반응생성물은 분석 용액의 HPLC-MS 분석에 의해 디브로모-BODIPY(dibromo-BODIPY)인 화합물 3으로 명확하게 확인된다. 도 22는 EPO/H₂O₂/KBr 첨가 직후의 화합물 1인 형광프로브의 반응에 대한 HPLC 크로마토그램이다.
- [0116] 화합물 1인 형광프로브는 건강한 피험자 (7.2ng/mL) 또는 중증 천식 환자의 EPO 혈청 농도의 중앙값보다 훨씬 낮은 0.09ng/mL (3 σ /슬로프, 도 4b 삽입)의 EPO 활성을 검출할 수 있다 (22.9ng/mL). 화학식 3의 화합물 3 생성은 pH 5에서 최적이었지만 pH 7.4에서도 생성이 상당하다.
- [0117] 알려진 EPO 억제제, 4,4'-디아미노디페닐설폰(4,4-diaminodiphenylsulfone, dapsone)또는 HOBr 스캐빈저 N-아세틸-시스테인(NAC)의 존재하에 616nm에서의 형광 강도의 증가가 용량 의존적으로 억제된다. 이러한 결과는 화합물 3의 형성이 EPO 의존 HOBr 생성에 의해 유도된다는 것이 확인된다.
- [0118] 대조군 실험은 분석시료에서 EPO, Br⁻ 및 H₂O₂의 동시 존재에서만 양성 반응이 관찰된다는 것이 입증된다(도

4c). MPO, H₂O₂ 및 Cl⁻ 시스템의 HOCl 생성 조합은 화합물 1인 형광프로브(항목 7)에서 응답을 이끌어 내지 못했다. 그럼에도 불구하고 이들의 존재는 EPO 활성 분석을 방해하지 않았다(항목 9-10). EPO와 MPO의 구조와 기능, 그리고 각각의 HOBr과 HOCl의 구조와 기능이 유사하다는 점을 감안할 때, 화합물 1인 형광프로브로 MPO에 대한 EPO를 선택적으로 검출하는 것은 상당하다. 화합물 1인 형광프로브는 MPO보다 EPO 활성을 선택적으로 검출할 수 있는 최초의 소형 분자 형광 "turn-on" 형광프로브이다.

[0120] 4. 딥 스틱 센서(Dip-Stick Sensors)

[0121] 도 5는 MPO/H₂O₂/Cl⁻(왼쪽)또는 EPO/H₂O₂/Br⁻(오른쪽)의 용액에 15초 동안 침지된 형광프로브-코팅된 종이 스트립의 색(a) 및 형광(b) 응답사진이다([Cl⁻] = 100 mM, [H₂O₂] = 50 μM, [MPO] = 150 ng/mL; [Br⁻] = 100 μM, [H₂O₂] = 50 μM, [EPO] = 5, 10 및 20 ng/mL. 형광 응답 이미지는 UV조사(365nm) 하에서 촬영되었다.

[0122] EPO 활성 분석은 고체 상태에서 화합물 1인 형광프로브 및 화학식 3의 화합물 3의 응집체의 밝은 방출을 이용함으로써 마침내 단순화될 수 있다. 도 5에서 볼 수 있듯이, 화합물 1인 형광프로브로 코팅된 종이 띠는 수성 시료에서 EPO의 농도를 측정하는 '딥 스틱(dip-sticks)'로 사용될 수 있다. 알레르기, 천식 또는 관련 호산구성 질환의 경우 코 점액 또는 기관지 폐포 세척액을 사용하는 요양 간호 측정에서 특히 간단하고 신속한 EPO 분석법에 장점이 있다.

[0124] 5. EPO에 의한 HOBr 생성의 형광 이미지(Fluorescence Imaging of HOBr Generation by EPO)

[0125] 도 6은 (a) 화합물 1인 형광프로브(10 μm)의 동일초점(Confocal) 형광 이미지는 살아있는 마크로파지(macrophage) 세포(RAW264.7)로 로드된 다른 조건으로 다루어진 사진이며, (b)는 화합물 1인 형광프로브의 비교 형광 세기비(Comparative fluorescence intensity ratios (I616/I581)에 대한 도면이다.

[0126] 화합물 1인 형광프로브는 살아있는 RAW264.7 마크로파지(macrophage) 세포에서 EPO/H₂O₂/Br⁻(HOBr)의 동일초점 형광 이미지에 적합하며 최대 100mM까지 세포 독성을 나타내지 않는다.

[0127] 도 23은 24시간 동안 다양한 농도 (0-100 μM)에서 화합물 1인 형광프로브로 배양한 후 RAW264.7 (1×10⁵) 세포에서 세포 생존력 연구를 보여주는 도면이다.

[0128] 화합물 1인 형광프로브(10 mM)만으로 배양된 세포는 강한 황색 채널 형광 (570-590 nm, λ_{ex} 488nm)을 보였으나 적색 채널 (600-620 nm, 그림 6a, # 1-2)에서는 관찰되지 않았다. 대조적으로, 외인성 EPO/H₂O₂/Br⁻ 처리시, 적색 채널 발광은 첨가된 EPO에 비례하여 세포 내에서 황색 채널에 대한 신호가 감소함에 따라 증가하였다 (도 6a, # 6-7). 적색 형광 신호는 10분 이내에 관찰되었고 적어도 90분 동안 안정을 유지했다.

[0129] 대조 실험에서 ROS 스캐빈저 N-acetylcysteine (NAC, Figure 6a, # 17) 또는 EPO 억제제 dapsone (그림 S49)과 세포의 동시 처리는 EPO/H₂O₂/Br⁻에 대한 화합물 1인 형광프로브의 반응을 저해했다. 또한 MPO(최대 600 ng/mL), H₂O₂(50mM) 및 KCl(100 mM) (도 6a, # 12 및 그림 S50)로 배양한 화합물 1인 형광프로브 로드된 세포에서 적색 형광이 관찰되지 않았다. DNA-결합 염료 DAPI를 이용한 동시 염색 실험은 화합물 1인 형광프로브가 핵 내에 공존하지 않고 세포의 세포질에 축적된다는 것을 나타낸다. 종합하여, 이들 결과는 화합물 1인 형광프로브가 대식 세포 세포에 효율적으로 흡수되고, 내재화된 프로브가 EPO에 의해 생성된 HOBr에 의해 선택적으로 활성화된다는 것을 나타낸다.

[0131] 6. 암세포에서 산화 스트레스의 형광 분석(Fluorescence Assays of Oxidative Stress).

[0132] 암세포는 대사 활동의 변화와 미토콘드리아 기능 장애로 인해 정상적인 세포에 비해 정상적인 H₂O₂ 수준이 높아져서 산화스트레스가 증가하고 있다. 화합물 1인 형광프로브는 H₂O₂에 반응하지 않지만 EPO/Br⁻에 의한 HOBr로의 촉매 전환-암과 정상 세포에서 발견되는 산화 스트레스 수준을 구별하기에 충분히 민감한 반응을 유도한다(도

6b). 형광 응답(I_{616}/I_{581})은 화합물 1인 형광프로브와 함께 배양된(incubated) 인간 결장 및 폐암 세포 (HCT116 및 A549)lysates에서 측정되었고, 각각의 정상 CCD-18Co 결장 세포 및 MRC-5 폐 세포 lysates의 그것과 비교된다(도 6b). 첨가된 EPO/ Br^- 의 존재하에서, 암세포 용해물은 그들의 각각의 정상 세포에 비해, 형광 강도비(I_{616}/I_{581})의 증가를 1.5-2배 증가시켰다. 이 반응은 mitochondrial electron-transport-chain blocker antimycin A (AntA)에 의해 산화 스트레스에 민감한 암세포에서 더 증폭되었다(4-7 배).

[0134] 7. 생쥐의 호산구 면역 반응 검출(Eosinophil Immune Response Detection in Live Mice).

[0135] 도 7은 (a) 위의 마우스 실험 일정에 대한 것이고 아래는 살모넬라에 감염된 마우스(적색 바)의 호산구와 호중구는 대조군(감염되지 않은 마우스)과 비교하여 검은색 막대로 나타내며, (b) 감염되지 않은(흑색) 및 살모넬라 감염 마우스(적색)로부터의 혈장 및 과립구의 존재하에서의 화합물 1인 형광프로브(25 μ M)의 형광 응답(I_{616}/I_{581})을 보여준다.

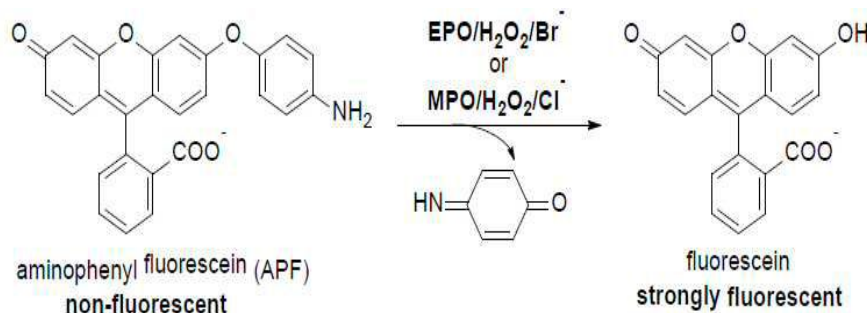
[0136] 화합물 1인 형광프로브의 유용성은 마우스(mouse) 모델에서 박테리아 감염에 대한 반응에서 EPO 생성 HOBr의 검출에까지 확장된다. BALB/c 마우스의 급성 감염은 살모넬라균의 복강 내 주사에 의해 유도된다. 접종 후 72시간에 쥐가 질병의 눈에 띄는 흔적을 보이지는 않았지만, 살모넬라에 감염된 호산구 수가 유의하게 증가된 마우스가 확인되었다(도 7a). 혈장과 과립구를 전혈에서 분리하고 화합물 1인 형광프로브로 처리하였다. 감염되지 않은 생쥐에서 얻은 혈장과 과립구 혼합물에서 형광 강도비(I_{616}/I_{581})의 현저한 증가는 관찰되지 않았다. 반대로 살모넬라에 감염된 마우스의 샘플에서는 3.5 배의 증가(I_{616} / I_{581})가 관찰되었다(도 7b). 화합물 1인 형광프로브로 코팅된 종이 스트립은 또한 동일한 샘플에서 증가된 EPO 활성을 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 결과는 살아있는 포유동물의 초기 단계 세균 감염에 의해 유발된 호산구 면역 반응의 검출에서 화합물 1인 형광프로브의 적용 가능성을 입증된다.

[0137] 본 발명인 화합물 1인 형광프로브의 친 전자성 방향족 할로젠화 속도와 생성된 할로젠화 BODIPY 염료의 광물리 특성에서의 차이는 MPO에 의한 해당 HOCl의 간접적인 EPO에 의한 HOBr 생성의 선택적 검출, 분석 및 영상화를 가능하게 하기 위해 이용되었다. 화합물 1인 형광프로브의 반응은 빠르고 ($\leq 2s$), 매우 민감(EPO의 경우 LOD : 0.09 ng / mL)하다. J-응집체는 화합물 1인 형광프로브와 화합물 3의 자기 조립으로 인한 유리한 광물리특성으로 인한 이점(좁은 폭, 겹쳐지는 밝은 방출 밴드)등 이러한 특징은 화합물 1인 형광프로브가 병리학적 바이오마커로서의 EPO 활성 및 HOBr 수준의 섬세한 변화를 조사하는데 장점이 있다.

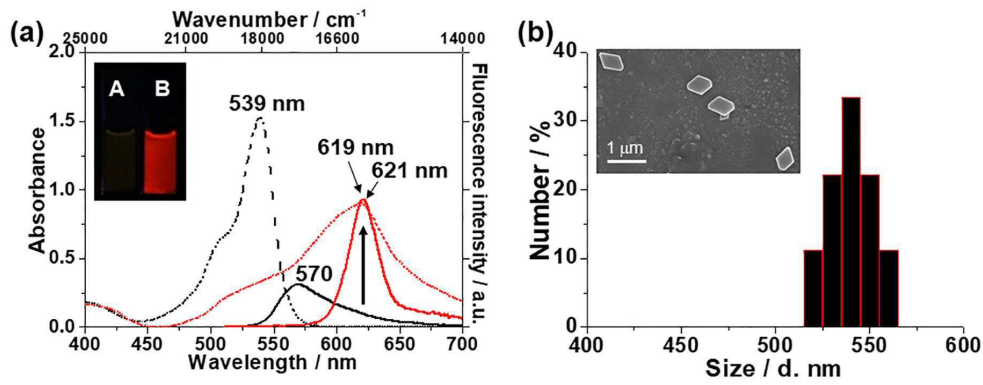
[0139] 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능함은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백할 것이다.

도면

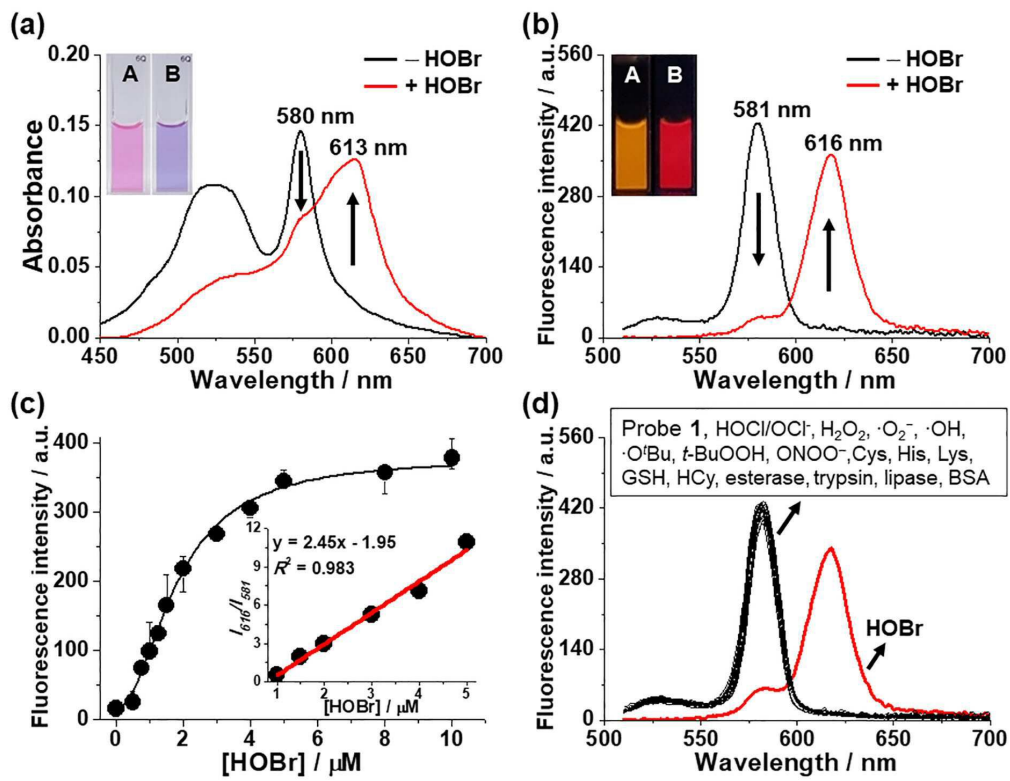
도면1



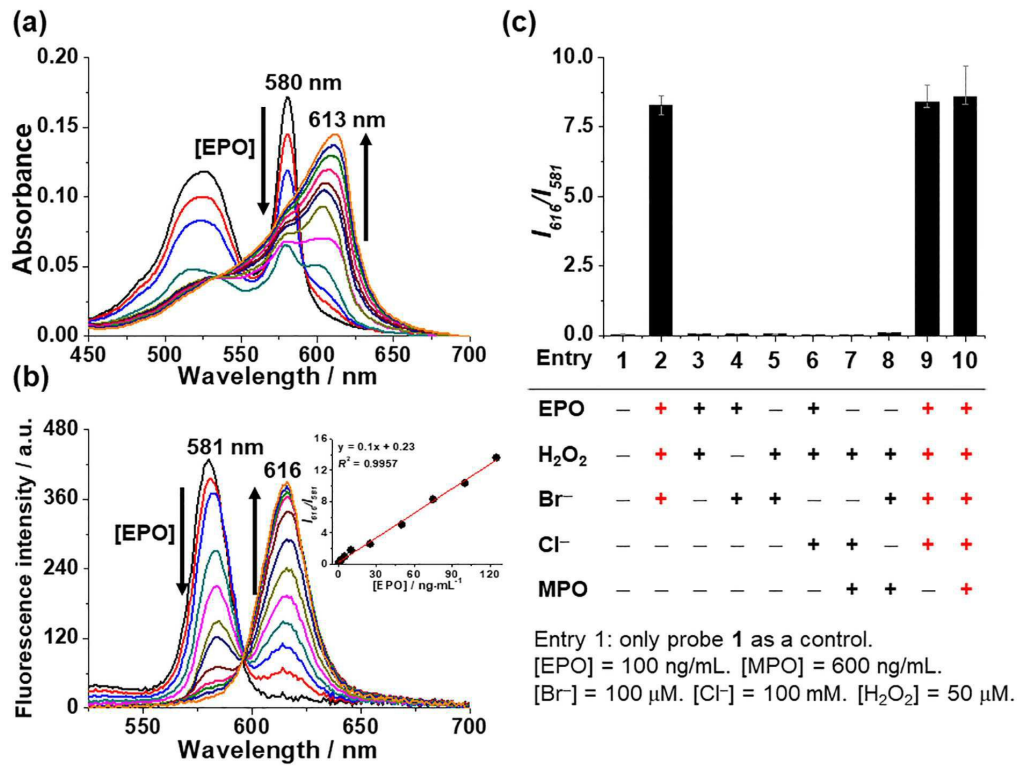
도면2



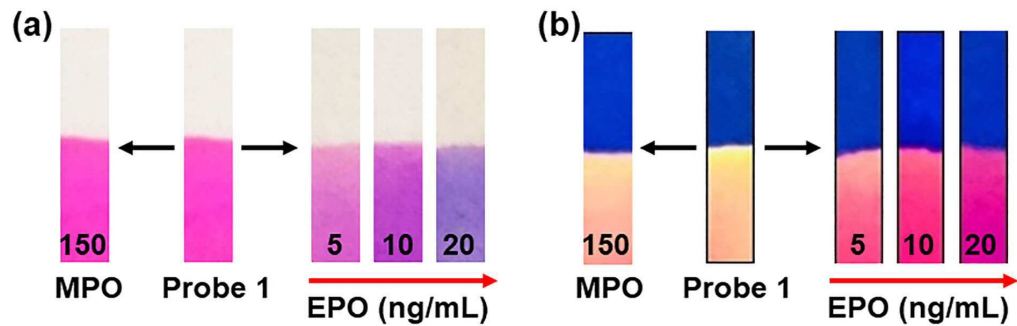
도면3



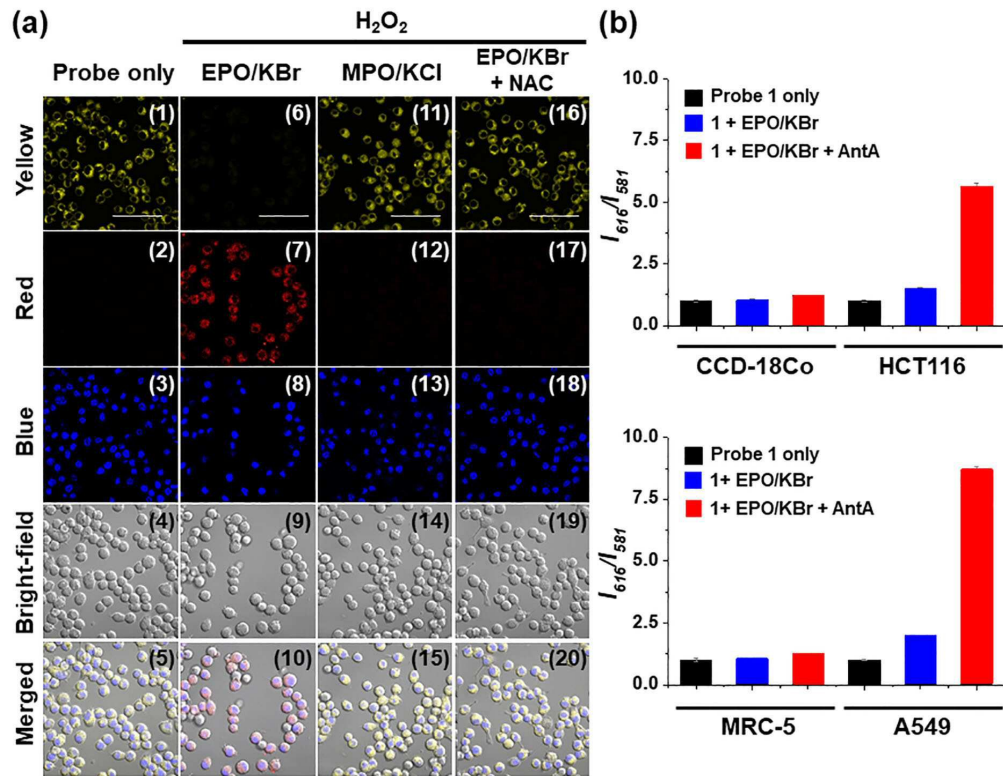
도면4



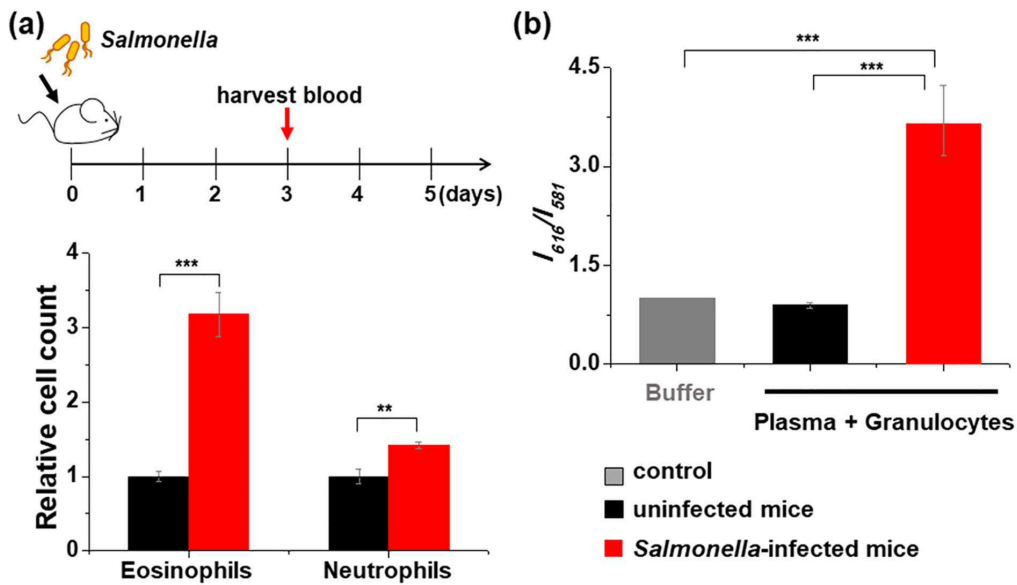
도면5



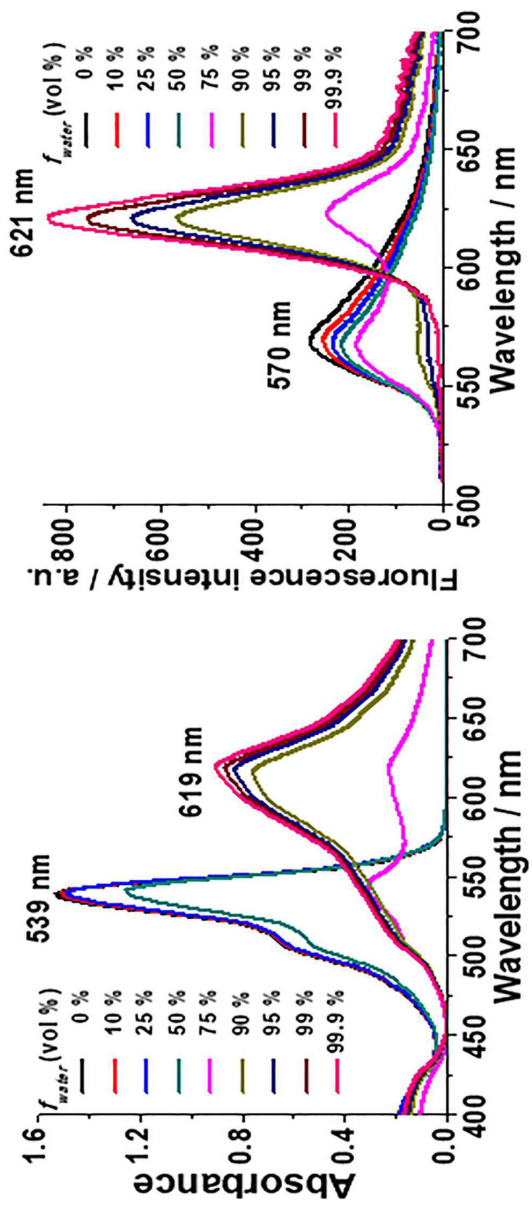
도면6



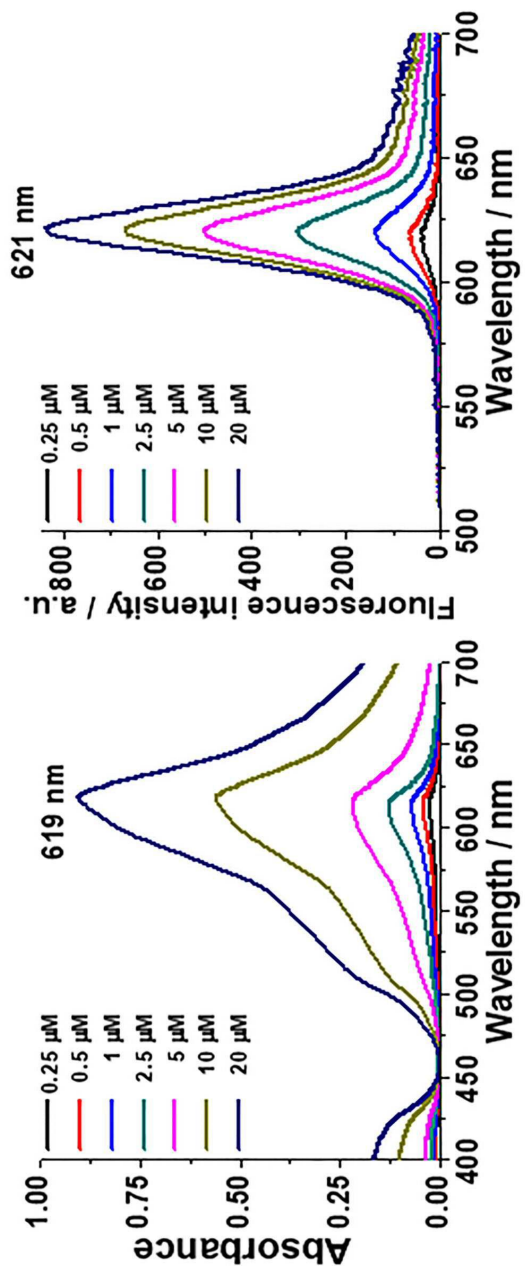
도면7



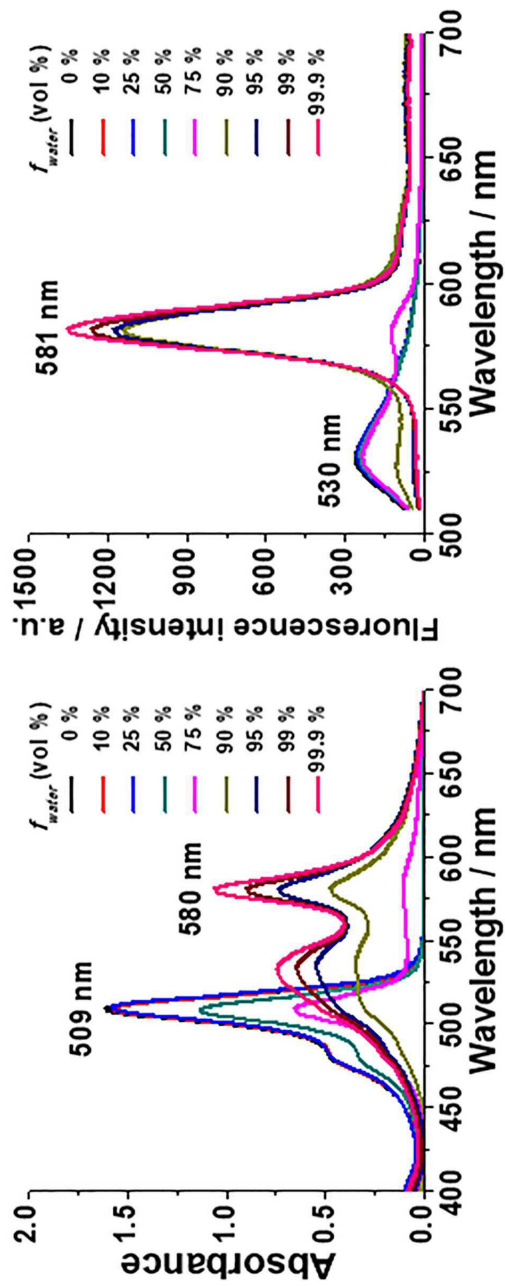
도면8



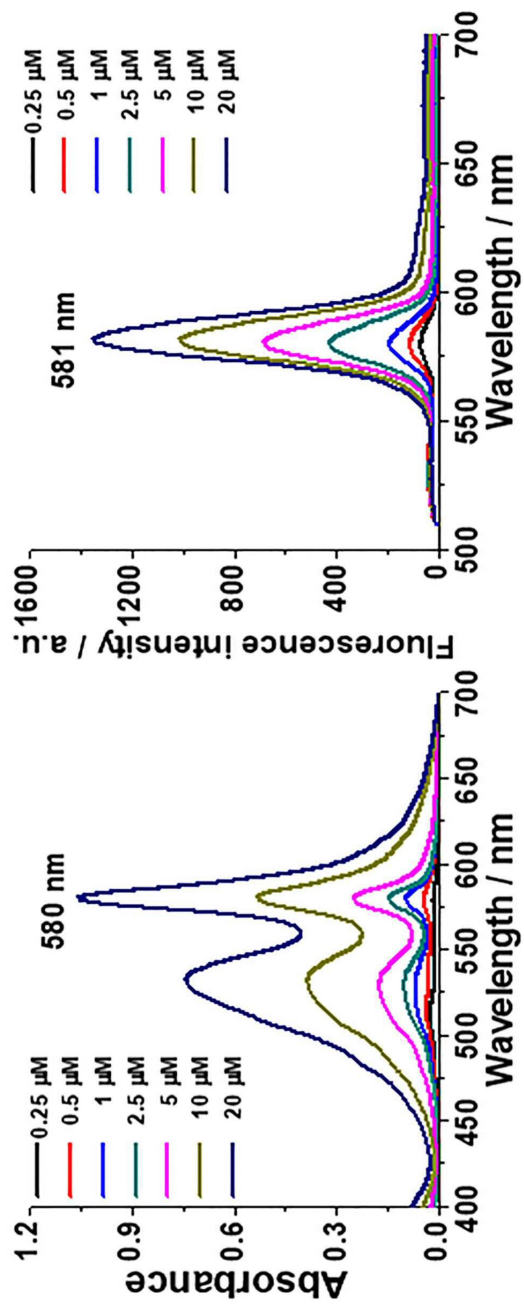
도면9



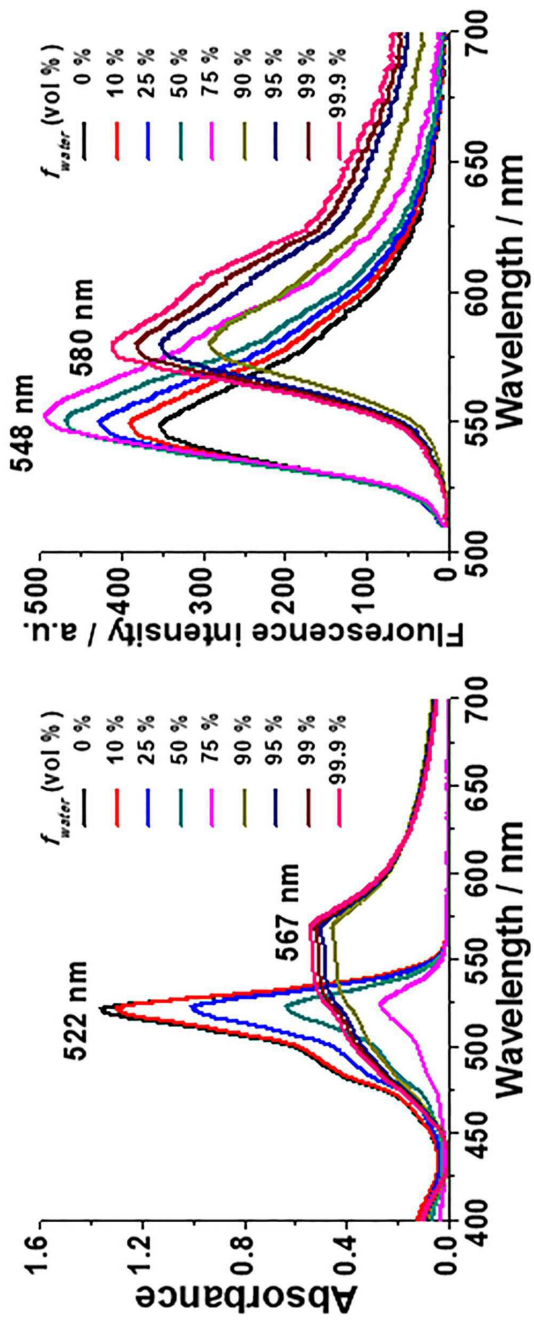
도면10



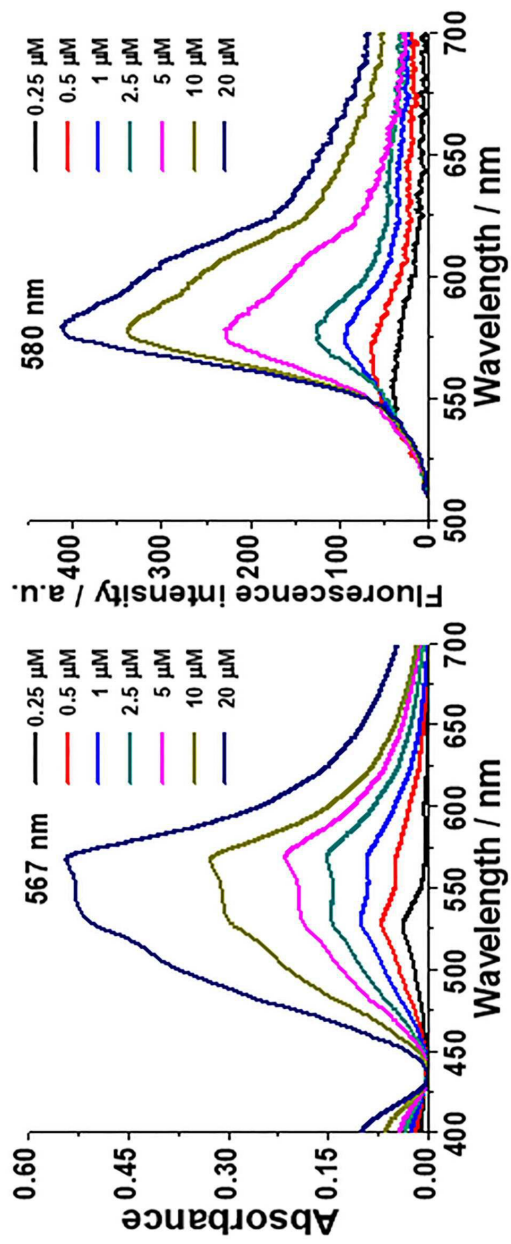
도면11



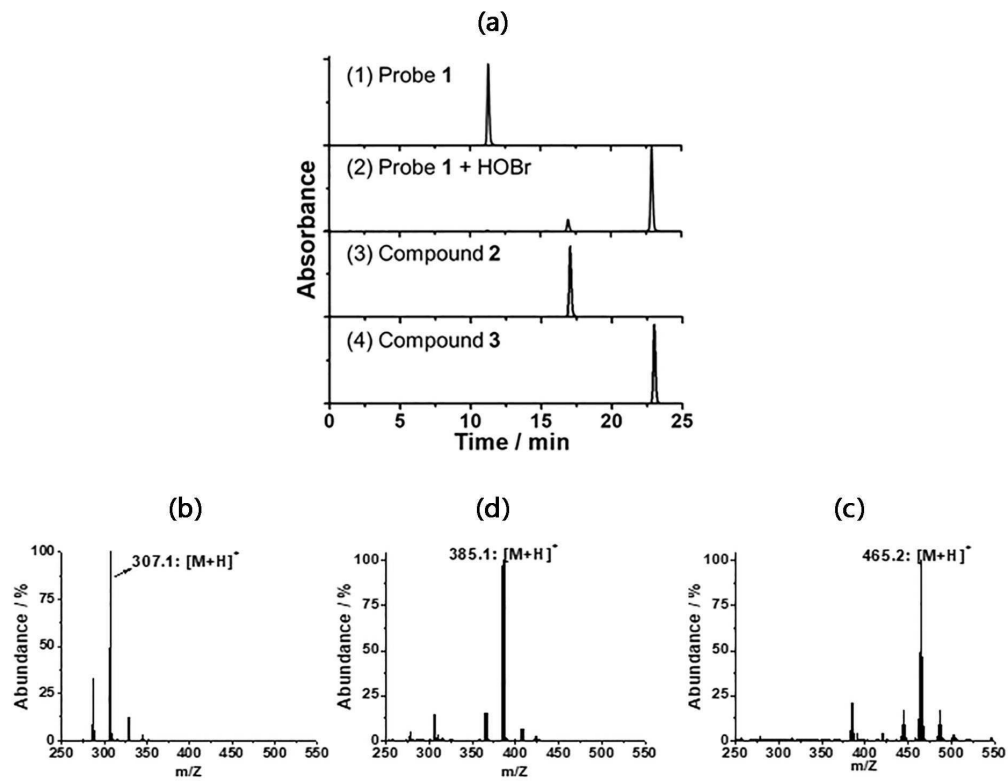
도면12



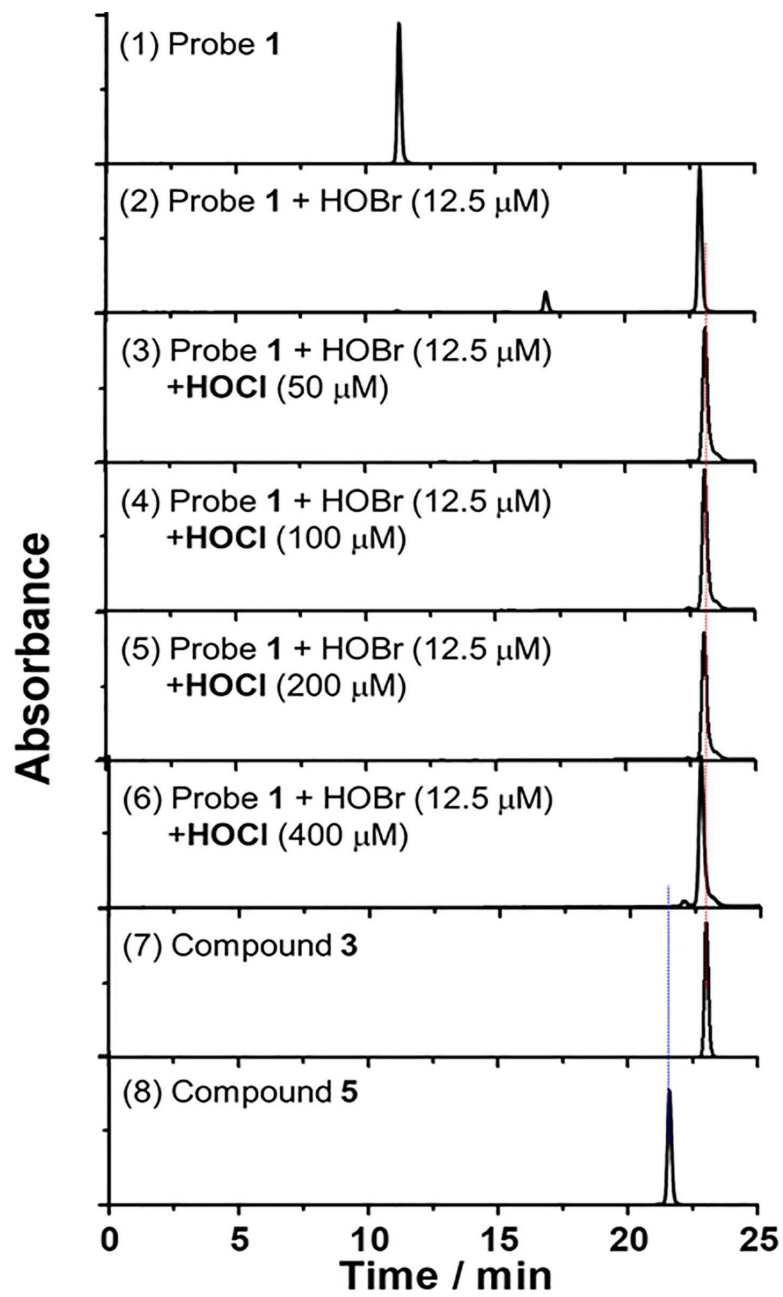
도면13



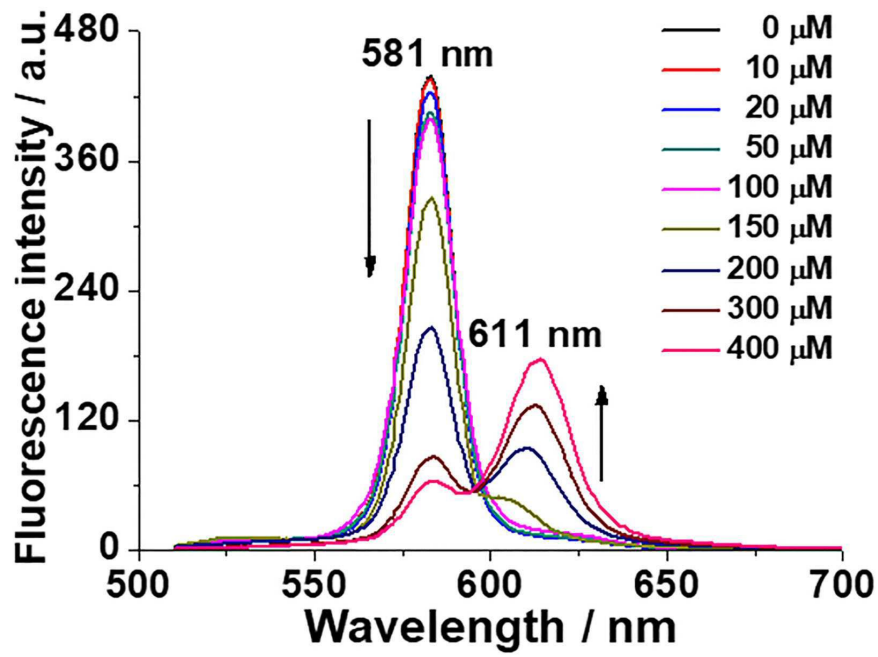
도면14



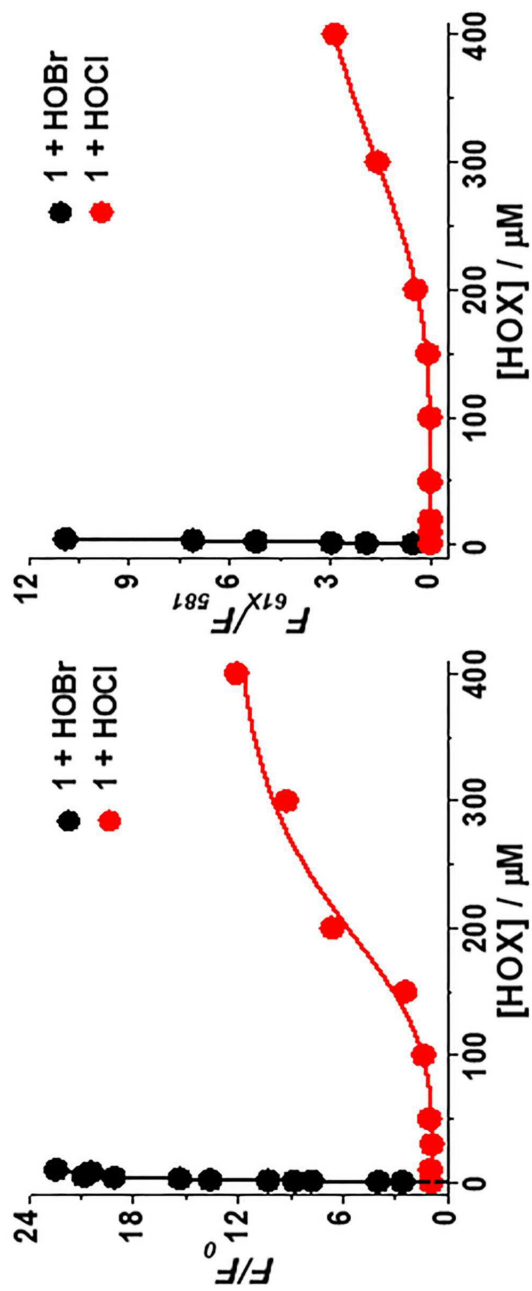
도면15



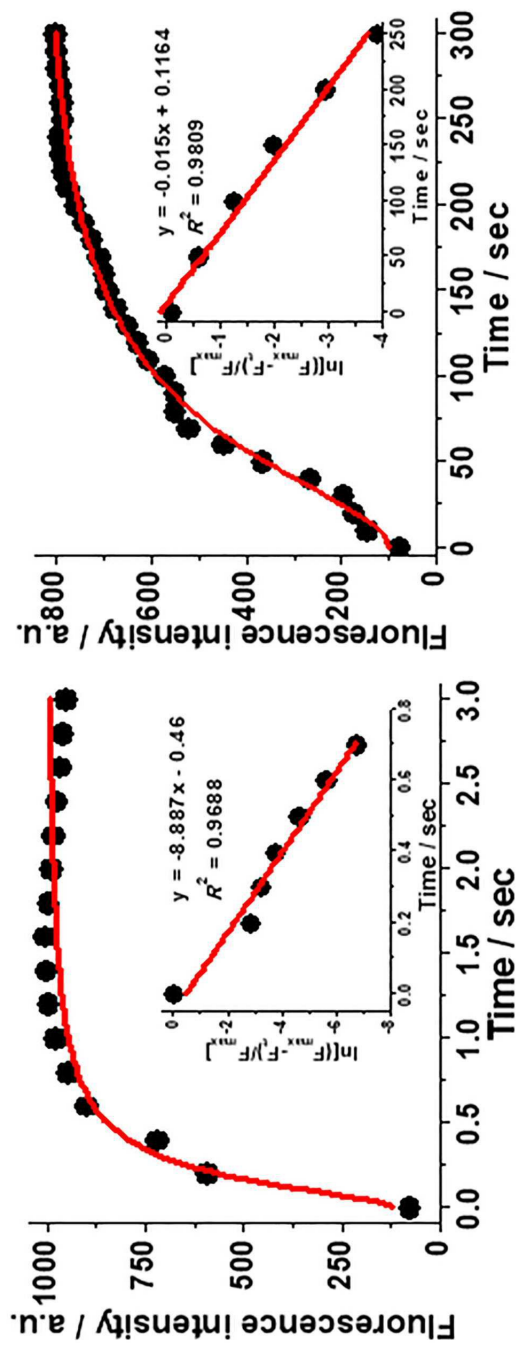
도면16



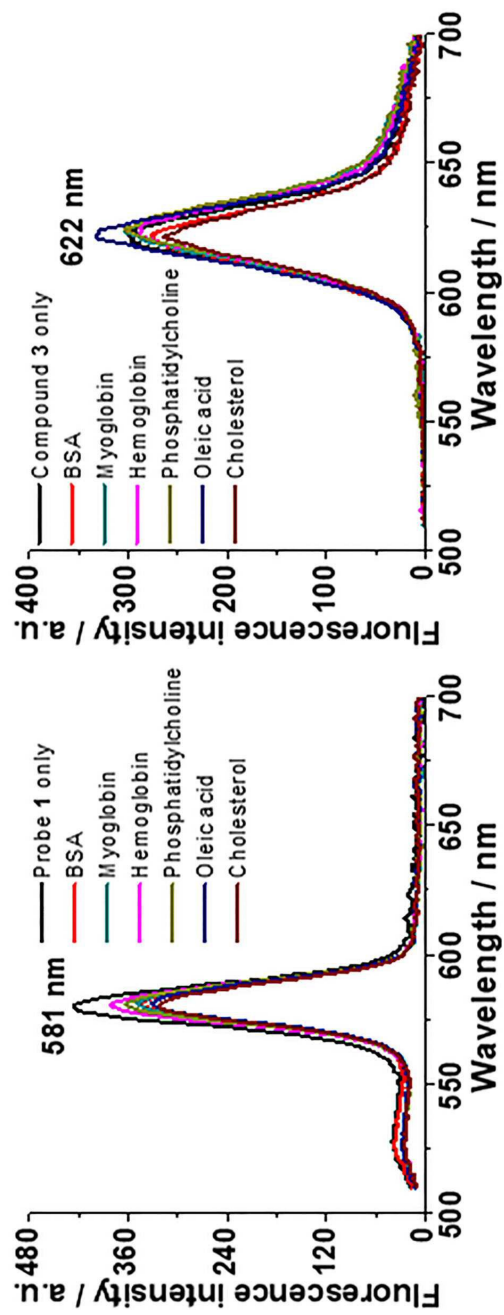
도면17



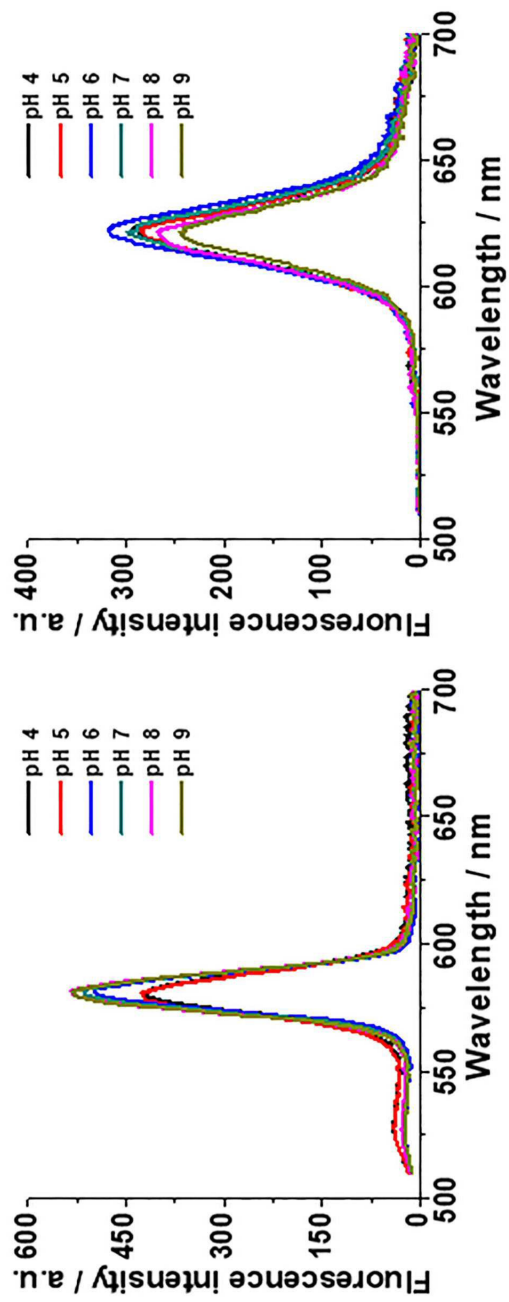
도면18



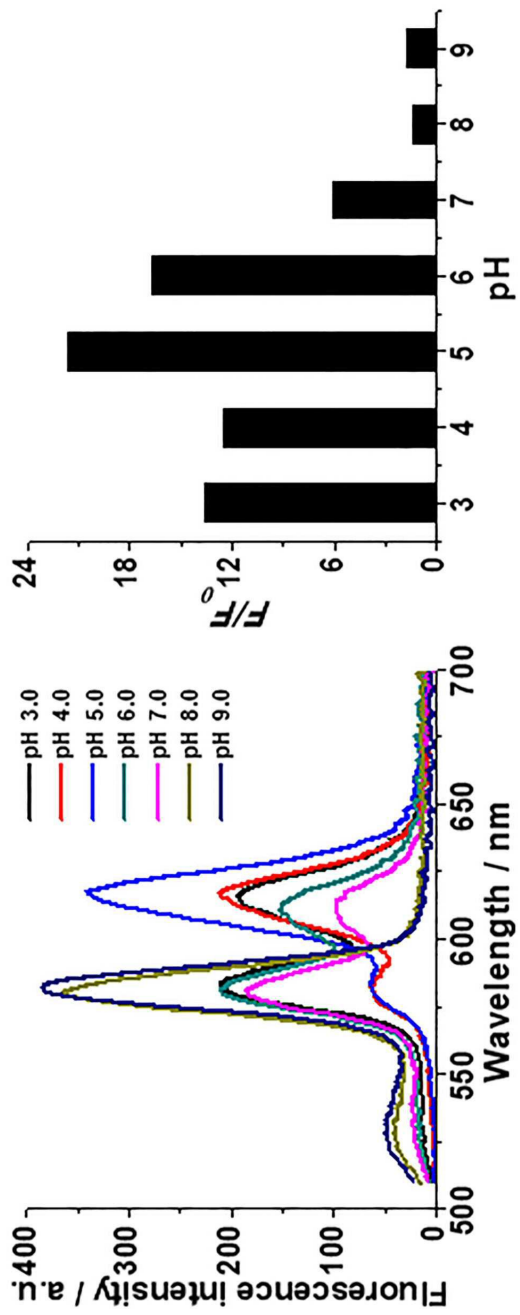
도면19



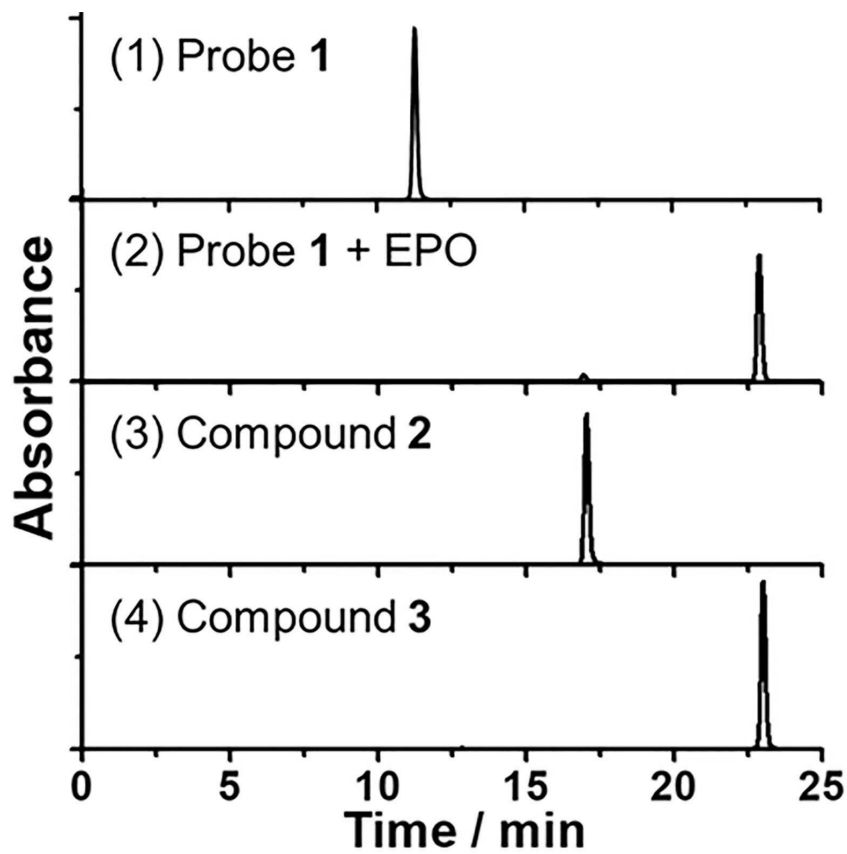
도면20



도면21



도면22



도면23

