

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0041303 (43) 공개일자 2011년04월21일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/453</i> (2006.01) <i>C12Q 1/16</i> (2006.01) <i>C07D 405/14</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2009-0098399 (22) 출원일자 2009년10월15일 심사청구일자 2009년10월15일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울 서대문구 대현동 11-1 이화여자대학교내 (72) 발명자 박성수 서울특별시 영등포구 여의도동 수성아파트 A동 1305호 윤주영 서울특별시 서초구 잠원동 50 롯데캐슬 207동 1703호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 특허법인다나	

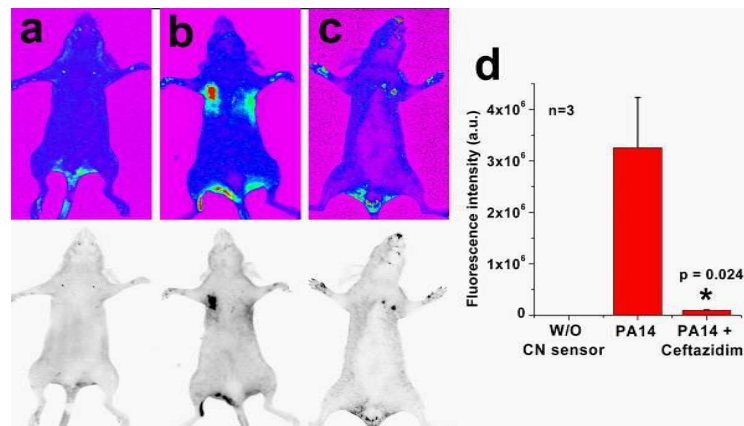
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 이용한 녹농균에 대한 항병원성 약물 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 이용한 녹농균에 대한 항병원성 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시안화 이온과 선택적으로 결합하여 녹색 형광 증강 효과를 나타내는 플루오레세인 유도체를 녹농균 감염 동물 모델 체내에 주입하고, 항병원성 후보 약물을 생체 내로 주입하여 형광 이미지를 통해 형광 강도의 변화를 실시간으로 분석함으로써 녹농균 치료에 효과가 있는 항생물질을 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

남성원

서울특별시 영등포구 여의도동 한양아파트 D동 20
4호

임지선

서울특별시 강남구 역삼동 674-35번지 401호

정소영

경기도 고양시 일산동구 마두1동 796번지

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R11-2005-008-02001-0

부처명 한국과학재단

연구관리전문기관

연구사업명 우수연구센터지원사업

연구과제명 나노구조를 이용한 바이오센서 연구

기여율

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

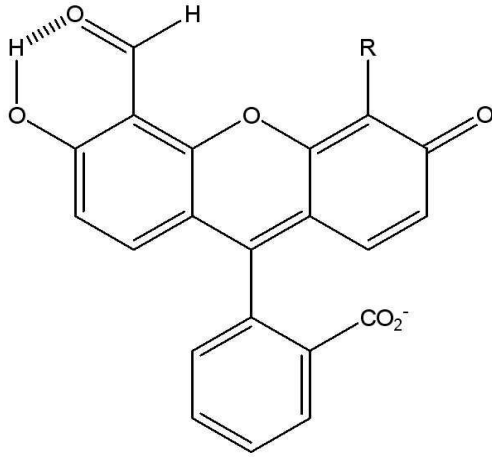
연구기간 2005년 04월 01일 ~ 2012년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 키트:

[화학식 1]



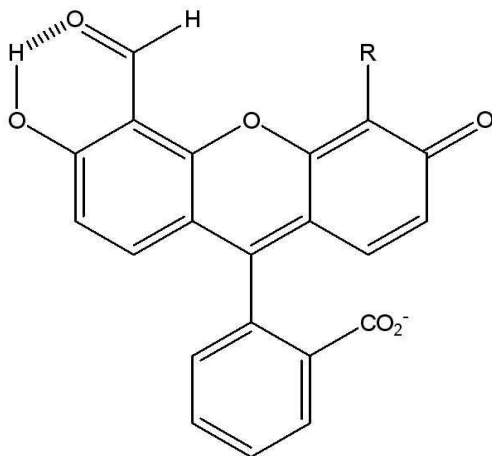
상기 식에서,

R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

청구항 2

하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 항병원성 후보 약물을 녹농균이 감염된 동물 모델에 투여하는 단계; 및 상기 동물의 생체 형광 이미지를 분석하는 단계를 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법:

[화학식 1]



상기 식에서,

R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 화학식 1의 화합물은 액제 상태인 것인 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

동물이 생쥐, 집쥐, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 또는 침팬지인 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

생체 형광 이미지는 동물의 기관지, 또는 폐에서 얻는 것인 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법.

청구항 6

제2항에 있어서,

분석은 형광 강도의 소광을 측정하는 것인 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 이용한 녹농균에 대한 항병원성 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 시안화 이온과 선택적으로 결합하여 녹색 형광 증강 효과를 나타내는 플루오레세인 유도체를 녹농균 감염 동물 모델 체내에 주입하고, 항병원성 후보 약물을 생체 내로 주입하여 형광 이미지를 통해 형광 강도의 변화를 실시간으로 분석함으로써 녹농균 치료에 효과가 있는 항생물질을 스크리닝할 수 있는 시안화 이온 선택성을 갖는 플루오레세인 유도체를 이용한 녹농균에 대한 항병원성 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 감염성 병원균인 녹농균 (*Pseudomonas aeruginosa*)은 면역력이 저하된 환자나 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자의 폐에 기생하여 치명적인 증상을 유발한다. 녹농균 감염의 위험성은 이미 오래 전부터 알려졌고 이를 극복하기 위한 항생제 연구도 오래 전부터 진행되어 항생제의 개별적 효능도 임상적으로 연구되었다 (G. Doring et al. Eur. Respir. J. 2000, 16, 749). 녹농균 감염의 치료제로 사용되는 항생제는 작용 기작에 따라서 몇 종류로 분류된다. 페니실린이나 세팔로스포린 (Cephalosporins) 등은 베타 락탐 계열 항생제로 세균의 세포벽 형성을 저해하며 그 중에서도 세프트아지딴 (Ceftazidime)이 녹농균 치료제로 널리 사용된다. 세프트아지딴은 주로 혈관을 통해 주입되며 일일 적정 주사량은 체중의 kg 당 100-250 mg 이다. 노보바이오신 (Novobiocin)이나 퀴놀론 (Quinolones) 등은 토포아이스오머라아제 (topoisomerase)와 반응하여 DNA의 생성을 방해한다. 이들 중 널리 사용되는 시프로플록사신 (Ciprofloxacin)은 주로 경구 투여되며 일일 적정 주입량은 체중의 kg 당 30 mg 이다. 그밖에도 리팜핀 (Rifampin) 등은 DNA로부터 RNA로의 전사를 방해하며, 클로르암페니콜 (Chloramphenicol), 테트라사이클린 (Tetracycline) 계열의 항생제 들은 세균의 리보솜과 결합하여 단백질 형성을 억제한다. 이들 항생제 들은 각각 효능에서도 차이를 나타내지만 낭포성 섬유증 환자와 같은 만성 감염자의 경우에 한 종류의 항생제를 장기간 처방되었을 경우에 항생제에 대한 내성 균주들이 발생된다. 녹농균의 내성은 돌연변이를 통해 발생되거나 다른 개체로부터 항생제 내성 유전자를 전달 받아 항생제 내성 균주로 발전한다. 이러한 항생제 내성 균주 발생을 억제하기 위해서 임상적으로는 여러 항생제의 혼합을 통한 복합적 처방이

이용되고 있으나 내성 균주의 발현을 유도하지 않는 새로운 종류의 신약이 필요한 실정이다.

[0003] 기존의 항생제 효능을 검사하는 방법도 여러 가지 면에서 제한적이다. 기존의 효능 검사 방법은 시험관에서 세균의 성장을 검사하거나 환자의 체액을 추출하여 세균용 배지 위에서 배양된 세균을 확인하는 방법이 사용되고 있다. 이러한 방법을 통해서도 항생제의 효능을 간접적으로 확인하여 정확한 검진은 불가능 할 뿐만 아니라 세균 배양을 위해 3-4일 간의 시간이 소요되므로 오진의 위험성도 배제할 수는 없으므로 보다 직접적이며 정확한 방법이 요청된다.

[0004] 한편, 시안화물은 생체 내에서 세포 내의 산소 운반을 저해함으로써 구토, 의식 불명을 초래하며 수 분 이내에 사망에 이르게 하는 유독성 물질이다. 시안화물의 독성으로 사망을 초래하는 농도는 1.5 mg/kg 체중이며, 혈중 시안화물 농도는 약 23-26 μM 이다. 최근에는 환자의 타액 내에서 시안화 이온에 특수한 전극을 이용하여 시안화 이온을 검출하는 방법이 발표되었다 (B. Ryal et al. *Eur. Respir. J.* 2008, 32, 740). 그러나 이 방법을 이용한 진단 방법은 동물 세포나 조직 등의 생체 내에서의 세균의 양을 직접적으로 반영하지 못하며, 시료 채취의 어려움 등의 제약을 가지고 있다. 따라서 생체 내에서의 시안화 이온의 직접적인 검출 방법은 필수적이고, 질병의 연구와 극복에 많은 도움을 줄 것이다.

발명의 내용

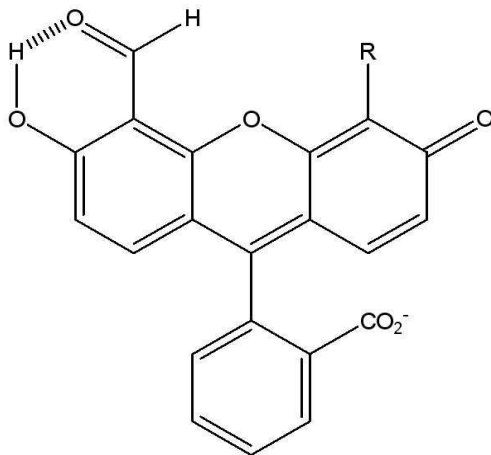
해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 시안화 이온을 선택적으로 검출할 수 있는 플루오레세인 유도체를 이용하여 녹농균 감염 동물 모델에서 형광 이미지를 실시간으로 관찰하여 항병원성 후보 약물을 스크리닝할 수 있는 키트 및 이를 이용한 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 키트를 제공한다:

[0007] [화학식 1]



[0008]

[0009] 상기 식에서,

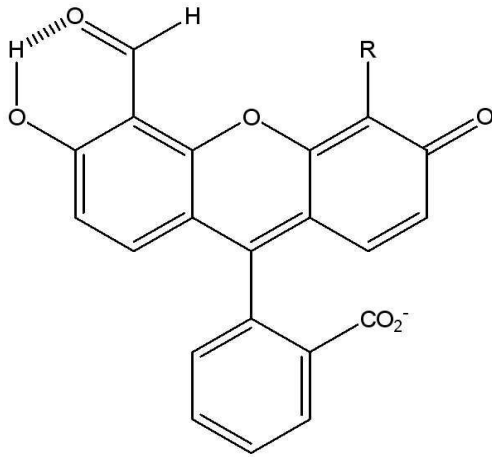
[0010] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0011] 본 발명은 또한

[0012] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 항병원성 후보 약물을 녹농균이 감염된 동물 모델에 투여하는 단계; 및

[0013] 상기 동물의 생체 형광 이미지를 분석하는 단계를 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0014] [화학식 1]



[0015]

[0016] 상기 식에서,

[0017] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

효과

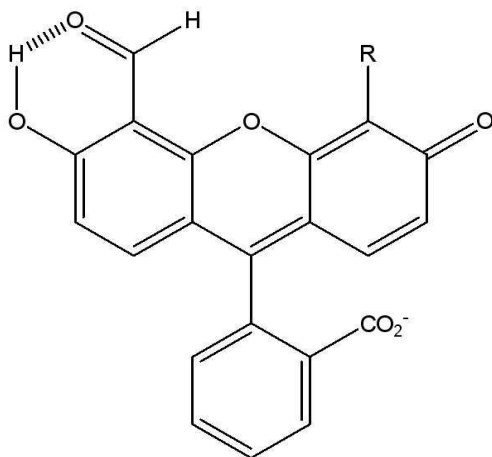
[0018] 본 발명은 체내에서 녹농균 감염으로 인해 발생하는 시안화 이온을 플루오레세인 유도체와 반응시켜 발생하는 형광 강도를 측정하여 광학적 방법으로 녹농균 감염을 확인할 수 있다. 이 방법은 수술이나 조직의 추출 없이 녹농균 감염 정도를 파악할 수 있으므로 실험용 동물의 불필요한 희생을 막을 수 있으며, 생체 내에서 녹농균 감염의 정도를 장기간 동안 관찰할 수 있다. 항생제 투여 후에는 시안화 이온의 발생 정도를 실시간으로 확인함으로써 항생제의 효능을 신속, 정확하게 관찰할 수 있다. 이를 통하여 특정 항생제에 대한 저항성 균주의 확인이나 항생제로 치료하기 힘든 치명적인 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis) 환자들에 있어서 항생제의 효능을 정성적, 정량적으로 연구할 수 있는 새로운 스크리닝 시스템을 제공할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0020] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 키트에 관한 것이다:

[0021] [화학식 1]



[0022]

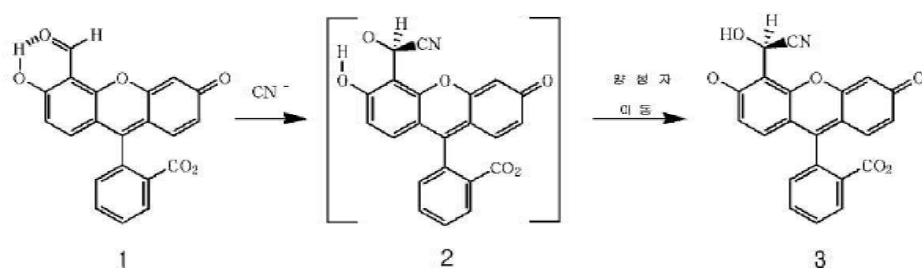
[0023] 상기 식에서,

[0024] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0025] 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 시안화 이온을 수용액 상태에서 검출할 수 있는 "OFF-ON" 타입의 센서로서 형광의 세기가 낮은 상태(OFF)에서 시안화 이온을 감지하면 형광의 세기가 매우 커지는 사실(ON)을 센서화시킨 타입의 센서이며, 녹농균에 감염된 생체는 시안화 이온을 발생하므로 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 녹농균의 감염 여부나 정도를 형광 이미징을 통해 실시간으로 측정할 수 있다.

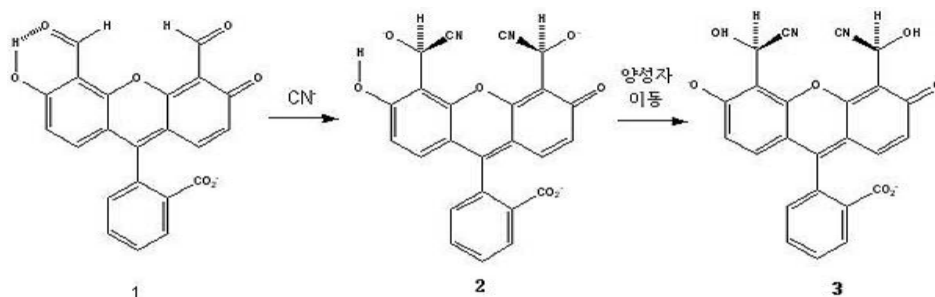
[0026] 상기 화학식 1의 화합물의 형광 검출은 하기 반응식 1 및 2의 메커니즘에 따라 일어날 수 있다. 즉, 수용액 내에서 화학식 1의 플루오레세인 유도체는 시안화 이온과 반응하여 화학식 2의 화합물을 거쳐 양성자 이동 결과 녹색 형광을 발광하는 화학식 3의 화합물을 생성할 수 있다. 상기 플루오레세인 유도체의 시안화 이온에 대한 선택성은 수용액 내에서 시안화물의 친핵성에 기인한 것일 수 있다.

[0027] [반응식 1]



[0028]

[0029] [반응식 2]



[0030]

[0031] 본 발명에 따른 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 100% 수용액에서 CN^- 첨가에 따라 농도의 존적으로 520 nm의 여기파장에서 선택적인 킬레이트 증폭 형광 효과를 나타내므로 상기 플루오레세인 유도체를 "Off-On" 타입의 형광 프로브로 사용하여 시안화 이온을 검출할 수 있다.

[0032] 상기 화학식 1의 화합물의 제조방법은 공지된 방법(W. Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15949)에 따라 합성할 수 있어, 이에 특별히 제한하지는 않는다.

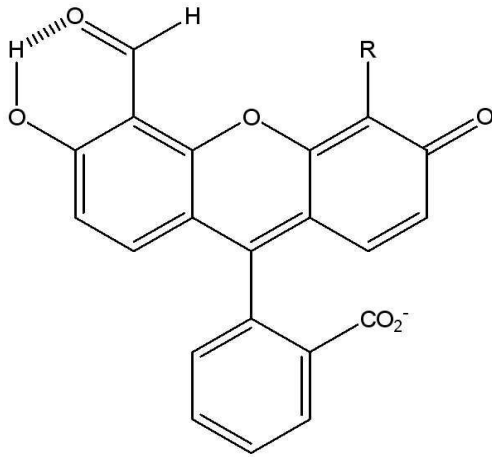
[0033] 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드는 플루오레세인, 클로로폼, 메탄올 및 15-crown-5를 혼합하고, 일정 온도, 보다 구체적으로는 40 내지 70℃의 온도를 유지하면서 50% 수산화나트륨 용액을 조심스럽게 넣는다. 이 혼합물을 상기와 같은 온도 범위에서 3 내지 7시간 동안 반응시킨다. 반응이 끝나면 냉각시킨 후 강산을 첨가하여 상기 혼합물을 산성화시킨다. 침전물을 모아서 건조시킨 다음 정제하여 본 발명의 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드를 수득할 수 있다.

[0034] 따라서, 본 발명의 키트는 상기 "Off-On" 타입의 형광 프로브인 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드를 이용하여 실험용 동물 모델의 생체 내에서 녹농균 감염에서 비롯되는 시안화 이온을 검출하고 항생제 투약 후에 항

생체 효과를 생체 내에서 실시간으로 확인함으로써 항생제 후보 약물을 스크리닝할 수 있는 것을 특징으로 한다.

- [0035] 구체적으로, 상기 화학식 1의 화합물과 항병원성 후보 약물을 통상의 투여 방식을 통해 녹농균 감염 동물에 주입한 다음 소형 동물용 형광 촬영 장치를 통해 생체 형광 이미지를 얻고 형광 강도의 소광을 관찰하여 항생물질을 스크리닝할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 키트는 항생제의 종류, 투여 방식, 또는 투여 순서의 제한 없이 실시간으로 정량적으로 스크리닝할 수 있는 특징이 있다.
- [0037] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물을 실험 동물의 폐에 직접 주사할 경우, 시안화 화합물을 상기 동물의 폐에 직접 주사한 후 실시간으로 형광 이미지를 얻을 수 있다.
- [0038] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물을 녹농균에 감염된 동물의 폐에 직접 주사할 경우, 상기 동물의 폐에서 실시간으로 형광 이미지를 얻을 수 있다.
- [0039] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물을 녹농균에 감염된 동물의 폐에 직접 주사하고, 항생제를 혈관 주사 또는 경구 투여할 경우, 실시간으로 동물의 폐에서 형광 이미지를 얻을 수 있다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 구체예에 따르면, 항생제를 녹농균에 감염된 동물에 혈관 주사 또는 경구 투여한 후, 상기 화학식 1의 화합물을 상기 동물의 폐에 직접 주사하면 실시간으로 동물의 폐에서 형광 이미지를 얻을 수 있다.
- [0041] 본 발명의 키트는 대조군 시약(양성 및/또는 음성)과 함께 상기 화학식 1의 화합물을 투여 형태로 제형화한 것을 포함할 수 있다. 예를 들면, 필요에 따라, 당-코팅된 정제, 캡슐제, 엘릭서제 및 마이크로캡슐제로서 경구투여될 수 있으며, 또는 물 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 액체를 가지는 멸균 용액 또는 현탁액의 주사제 형태로 비경구 투여될 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 화합물은 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 매질(media), 구체적으로는 멸균수, 생리 식염수, 식물성 오일, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향신제, 부형제, 비히클(vehicle), 보존제, 결합제등과 혼합될 수 있다. 상기 제제화에서 활성 성분의 양은 바람직한 범위 내에서 적절한 투여량으로 한다.
- [0043] 정제 및 캡슐제에 혼합될 수 있는 첨가제의 예는 젤라틴, 옥수수 녹말, 트라거캔스 고무 및 아라빅 고무와 같은 결합제; 크리스탈 셀룰로스와 같은 부형제; 옥수수 녹말, 젤라틴, 알긴산(alginic acid)과 같은 팽윤제; 마그네슘 스테아레이트와 같은 윤활제; 설탕, 락토스 또는 사카린과 같은 감미제; 및 페퍼민트, 가울테리아 아테노쓰릭스(Gaultheria adenostrix) 오일 및 체리와 같은 향신제이다.
- [0044] 단위-투여 형태가 캡슐일 경우, 오일과 같은 액상 담체가 또한 추가로 상기의 성분에 포함될 수 있다. 주사제용 멸균 합성물들은 주사제에 사용된 멸균수와 같은 비히클을 사용하는 정상 약물 제조법에 따라 제형화될 수 있다. 생리 식염수, 글루코스, 및 D-솔비톨, D-만니톨, D-만노스, 및 염화 나트륨과 같은 보조제를 포함하는 다른 등장액이 주사제의 수용액으로 사용될 수 있다. 이는 알코올, 구체적으로는 에탄올, 프로필렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜과 같은 폴리알코올, 폴리솔베이트 80(TM) 및 HCO-50과 같은 비-이온성 계면 활성제와 같은 적합한 용해제와 함께 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 키트에는 분석을 수행하기 위한 사용설명서(예, 서면, 테이프, VCR, CD-ROM 등)가 포함될 수 있다. 상기 키트의 분석 포맷은 당해 기술분야에 알려진 소형 동물용 형광 촬영 장치를 이용한 형광 이미지이다.
- [0046] 본 발명은 또한
- [0047] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 및 항병원성 후보 약물을 녹농균이 감염된 동물 모델에 투여하는 단계; 및
- [0048] 상기 동물의 생체 형광 이미지를 분석하는 단계를 포함하는 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다:

[0049] [화학식 1]



[0050]

[0051] 상기 식에서,

[0052] R은 수소 또는 알데하이드를 나타낸다.

[0053] 본 발명의 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법을 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0054] 제1단계는 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드 및 항병원성 후보 약물을 녹농균이 감염된 동물 모델에 투여하는 단계이다.

[0055] 상기 화학식 1의 화합물은 통상의 제형으로 제조된 것을 사용할 수 있다. 바람직하게는, 액제인 것이 좋으나 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0056] 또한, 상기 항병원성 후보 약물 역시 통상의 제형으로 제조된 것을 사용할 수 있다. 예를 들어 직접 주사를 위한 액제 형태, 경구 투여를 위한 캡슐제 등을 사용할 수 있으나 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0057] 상기 투여는 직접 주사, 경구 투여, 혈관 주사 등 통상의 투여방식에 따라 실시될 수 있으며, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0058] 또한, 상기 화학식 1의 화합물 또는 항병원성 후보 약물의 투여 순서는 제한 없이 사용될 수 있다.

[0059] 또한, 상기 동물로 생쥐, 집쥐, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 또는 침팬지 등을 사용할 수 있다.

[0060] 본 발명의 녹농균 치료 약물의 스크리닝 방법에 있어서, 제2단계는 상기 화학식 1의 화합물과 항병원성 후보 약물이 투여된 녹농균 감염 동물에서 생체 내 형광 이미지를 얻고, 이를 분석하는 단계이다.

[0061] 상기 생체 내 형광 이미지는 녹농균에 감염된 동물의 기관지, 또는 폐 등에서 얻을 수 있다.

[0062] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 녹농균에 감염된 마우스의 폐에 직접 주사법을 통해 상기 화학식 1의 화합물을 투여할 경우, 마우스의 폐 부위에서 강한 형광을 나타낸다.

[0063] 본 발명의 다른 구체예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물을 마우스에 비강 주사할 경우, 기관지, 폐 등에서 강한 형광이 관찰된다.

[0064] 상기 생체 내 형광 이미지는 소형 동물용 형광 촬영 장치를 이용하여 얻을 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0065] 상기 형광 이미지로부터 형광 강도의 소광을 분석함으로써 녹농균에 대한 항병원성 약물임을 판단할 수 있는 것이다.

[0066] 상기 결과로부터, 본 발명의 상기 화학식 1의 플루오레세인 모노 또는 다이알데하이드는 녹농균에 감염된 생명

체 자체에 투여할 경우 강한 형광을 나타내므로 녹농균의 감염 여부, 감염 정도, 감염 부위 등을 정량 또는 정성 분석할 수 있고, 녹농균에 대한 항병원성 약물을 투여할 경우, 생체 내 형광 강도가 감소함을 형광 이미징을 통해 확인할 수 있어 항병원성 후보 약물을 스크리닝하는데 사용할 수 있다.

- [0067] 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.
- [0068] <실시예 1> 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드의 제조
- [0069] 상기 화학식 1의 플루오레세인 다이알데하이드는 공지된 방법에 따라 합성할 수 있다(W. Wang et al., *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 15949).
- [0070] 구체적으로, 100 mL 플라스크에 플루오레세인(4 g, 12 mmol), 10 mL 클로로폼, 6 mL 메탄올 및 0.06 g의 15-crown-5를 넣었다. 플라스크의 온도를 50 °C로 유지하면서 20 g의 50% 수산화나트륨 용액을 조심스럽게 넣었다. 이 혼합물을 50 °C의 온도에서 5 시간 동안 반응시킨 다음, 반응이 끝나면 냉각시킨 후, 10 M의 H₂SO₄로 용액을 산성화시켰다. 침전물을 모아서 진공상태에서 건조시키고, 실리카겔을 이용한 크로마토그래피를 수행한 결과 (5:95 = EtOAc:DCM), 142 mg의 흰색 입자인 플루오레세인 다이알데하이드를 얻을 수 있었다(수득률 3.0 %).
- [0071] ¹H NMR (CDCl₃, 250 MHz) δ (ppm): 6.66 (2H, d, J = 9.0 Hz), 6.86 (2H, d, J = 9.0 Hz), 7.11 (2H, d, J = 7.5 Hz), 7.70-7.59 (2H, m), 8.99 (2H, d, J = 7.5 Hz), 10.59 (2H, s), 12.06 (2H, s).
- [0072] ¹³C NMR (CDCl₃, 62.5 MHz) δ (ppm): 191.80, 168.69, 164.67, 151.87, 151.67, 136.98, 145.66, 130.53, 126.51, 125.55, 123.69, 115.21, 109.48, 109.00, 80.61).
- [0073] <실시예 2> 농도별 시안화 이온에 대한 생체 내에서의 형광 적정 시험
- [0074] 플루오레세인 다이알데하이드를 이용하여 생체 내 시안화 이온을 검출하기 위해 실험용 마우스 (6 주령 17-20 g 무게의 BALB/c 누드 마우스)를 사용하였다.
- [0075] 마취제 (zoletil50; Virbac, Carros, France) 주사로 마취된 마우스에 50 μl의 0.1 mM 부터 1 M까지 농도의 NaCN 용액을 각각 마우스의 폐 부위에 0.3 mL의 일회용 인슐린 주사기를 이용하여 주사한다. 40 μl 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 직접 폐 부위에 0.3 mL 인슐린 주사기를 이용하여 주입한 후, 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 형광을 관찰하였다.
- [0076] 도 1 은 NaCN 용액이 주입되지 않은 것(a)과 각각 0.1 mM (b), 10 mM (c), 1 M (d) 농도의 NaCN 용액을 폐 주위에 주입한 후 플루오레세인 다이알데하이드를 주입한 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진이다.
- [0077] 도 1 에 나타난 바와 같이, NaCN 용액이 주입되지 않은 것에서는 어떠한 형광도 나타나지 않은 반면, NaCN 용액과 플루오레세인 다이알데하이드가 주입된 마우스는 폐 부위에 강한 형광을 나타내며 주입된 NaCN 용액의 농도에 따라 점차 강한 형광을 나타냈다.
- [0078] 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 쥐의 폐에서 시안화 이온의 *in vivo* 이미지뿐만 아니라 정량적인 분석에도 매우 적합한 것임을 알 수 있다.
- [0079] <실시예 3> 녹농균에 감염된 실험용 마우스 내에서의 항생제 세프트라지딴(Ceftazidime)의 효능 시험
- [0080] 플루오레세인 다이알데하이드를 이용하여 녹농균 감염으로 발생하는 시안화 이온 검출 및 항생제 효능을 확인하기 위해 실험용 마우스 (6 주령 17-20 g 무게의 BALB/c 누드 마우스)를 사용하였다.
- [0081] 녹농균 감염을 위해 5 mL 배지에서 자란 녹농균 (O.D.0.9)에 2.5% tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) 와 50 mL heavy mineral oil (Sigma-Aldrich)을 50°C에서 섞은 후 PBS 완충 용액 (pH 7.4)으로 3 회 세척하여 9×10^7

CFU/mL 농도의 녹농균을 함유한 아가 비즈를 제조하였다. 감염 방법은 호흡 관으로의 주입 방법으로 마취제 (zoletil50; Virbac, Carros, France) 주사로 마취된 마우스에 혀를 구강 밖으로 빼낸 상태에서 24 G 카테터 (BD, CA, USA) 를 이용하여 50 μ l (4.5×10^6 CFU) 녹농균 아가 비즈를 호흡 관으로 주입하였다 (intratracheal instillation). 감염 후 18 시간 후에 마우스를 다시 마취시킨 다음 40 μ l 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 직접 폐 부위에 0.3 mL 인슐린 주사기를 이용하여 주입한 후, 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 형광을 관찰 하였다. 항생제 효능 시험을 위해서는 200 mg/kg의 세프트지딤을 상기 방법으로 녹농균에 감염 후 18 시간 후에 마우스 꼬리 정맥에 주사한 후, 12 시간 후에 마우스를 다시 마취시킨 다음 40 μ l 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 직접 폐 부위에 0.3 mL 인슐린 주사기를 이용하여 주입한 후, 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 형광을 관찰 하였다.

[0082] 도 2 는 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(a)과 녹농균 감염 후 센서를 주입한 (b) 것과 녹농균 감염 후 200 mg/kg의 세프트지딤을 주입한 (c) 실험용 마우스를 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 촬영한 사진이다. 각각의 사진 중 위의 사진은 형광을 색으로 재구성된 이미지이며, 아래 사진은 이에 상응하는 형광 강도가 흑백 대비로 표현된 사진이다 (Kodak 1D Image Analysis Software; Kodak). (d)는 각각 3 마리의 마우스에서 측정된 형광 강도를 수치화한 그래프이다. 그래프의 오차 막대는 표준 오차를 표현하며 통계적 수치를 위해서 SigmaPlot 2000 프로그램 (Systat Software, San Jose, CA)이 사용되었다.

[0083] 도 2 에 나타난 바와 같이, 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 (a) 마우스는 어떠한 형광도 나타내지 않은 반면, 녹농균 감염 후 센서가 주입된 (b) 마우스는 폐 부위에 강한 형광을 나타냈다. 한편 녹농균 감염 후 세프트지딤이 주입된 (c) 마우스의 폐 부위에는 현저히 적은 ($p = 0.024$) 형광이 관찰되었다.

[0084] 이는 플루오레세인 다이알데하이드가 쥐의 폐에서 녹농균에 의해 발생하는 시안화 이온의 *in vivo* 이미지뿐만 아니라 항생제 효능 시험에도 매우 적합한 것임을 알 수 있다.

[0085] <실시예 4> 녹농균에 감염된 실험용 마우스 내에서의 항생제 시프로플록사신(Ciprofloxacin)의 효능 시험

[0086] 플루오레세인 다이알데하이드를 이용하여 퀴놀론 (Quinolones) 계열의 시프로플록사신 (Ciprofloxacin)의 효능을 확인하기 위해 실험용 마우스 (6 주령 17-20 g 무게의 BALB/c 누드 마우스)를 사용하였다.

[0087] 상기 기술한 방법으로 agar beads에 포집된 (4.5×10^6 CFU) 녹농균 아가 비즈를 호흡 관으로 주입하였다 (intratracheal instillation). 감염 후 18 시간 후에 항생제 효능 시험을 위해서 30 mg/kg의 시프로플록사신을 24 G 카테터 (BD, CA, USA) 를 이용하여 경구 투여하였다. 12 시간 후에 마우스를 다시 마취시킨 다음 40 μ l 1mM 플루오레세인 다이알데하이드를 직접 폐 부위에 0.3 mL 인슐린 주사기를 이용하여 주입한 후, 소형 동물용 형광 촬영 장치(Kodak, Image station IS2000MM)로 형광을 관찰하였다. (d)는 각각 3 마리의 마우스에서 측정된 형광 강도를 수치화한 그래프이다. 각각의 사진 중 위의 사진은 형광을 색으로 재구성된 이미지이며, 아래 사진은 이에 상응하는 형광 강도가 흑백 대비로 표현된 사진이다 (Kodak 1D Image Analysis Software; Kodak). (d)는 각각 3 마리의 마우스에서 측정된 형광 강도를 수치화한 그래프이다. 그래프의 오차 막대는 표준 오차를 표현하며 통계적 수치를 위해서 SigmaPlot 2000 프로그램 (Systat Software, San Jose, CA)이 사용되었다.

[0088] 도 3 에 나타난 바와 같이, 녹농균 감염 후 시프로플록사신이 주입된 (c) 마우스의 폐 부위에는 녹농균이 감염된 마우스와 비교하여 현저히 적은 ($p = 0.023$) 형광이 관찰되었다.

[0089] 이는 플루오레세인 다이알데하이드를 이용한 항생제 효능 시험 방법이 항생제의 종류나 투여 방식에 관계없이 항생제 효능 시험에도 매우 적합한 것임을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

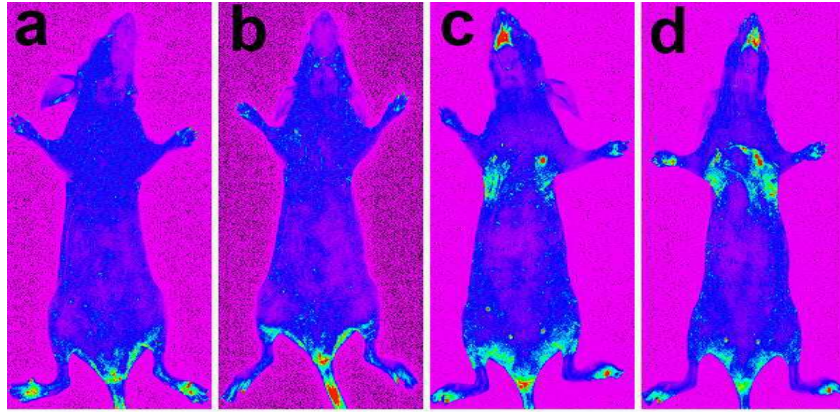
[0090] 도 1은 NaCN 용액이 주입되지 않은 것 (a), 0.1 mM 농도의 NaCN 용액이 주입된 것 (b), 10 mM 농도의 NaCN 용액이 주입된 것 (c)과 1 M 농도의 NaCN 용액이 주입된 (d) 후 각각 본 발명의 플루오레세인 다이알데하이드가 주입된 마우스의 형광 이미지이다.

[0091] 도 2는 본 발명의 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것(a), 녹농균 감염 후 플루오레세인 다이알데하이드를 주입한 것 (b)과 녹농균 감염 후 세프트지딤을 주입한 (c) 실험용 마우스의 형광 이미지이며, (d)는 각각 3 마리의 마우스에서 측정된 형광 강도를 수치화한 그래프이다.

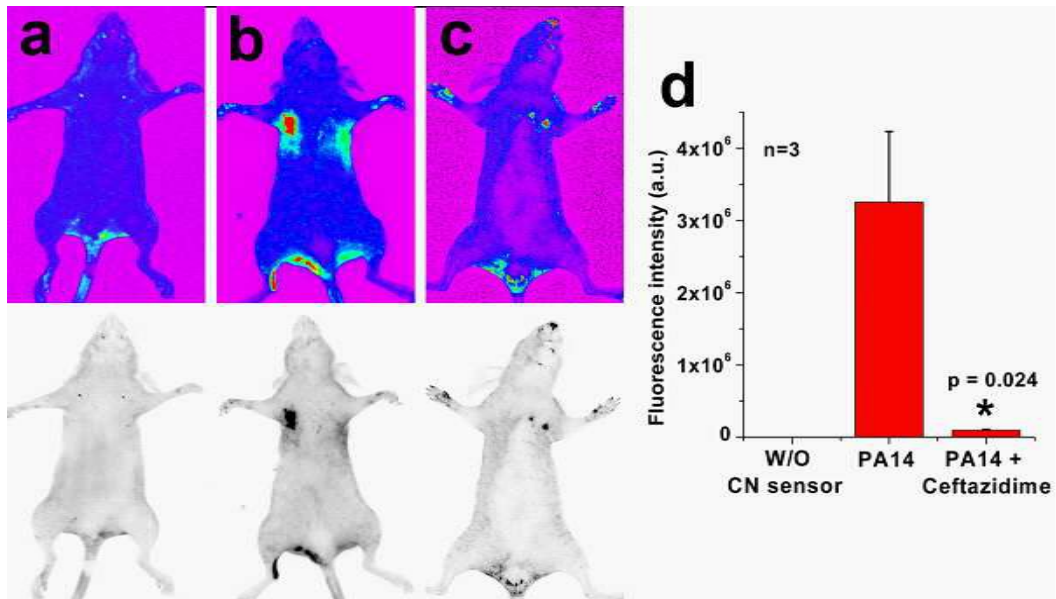
[0092] 도 3는 본 발명의 플루오레세인 다이알데하이드가 주입되지 않은 것 (a), 녹농균 감염 후 플루오레세인 다이알데하이드를 주입한 것 (b)과 녹농균 감염 후 시프로플록사신을 주입한 실험용 마우스 (c)의 형광 이미지이며, (d)는 각각 3 마리의 마우스에서 측정된 형광 강도를 수치화한 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

