

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2019년 3월 7일 (07.03.2019)

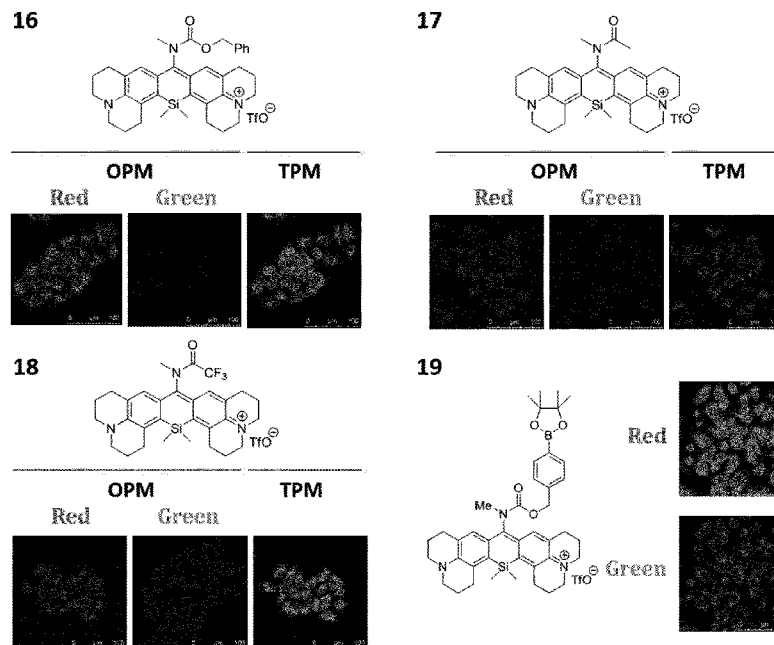


(10) 국제공개번호
WO 2019/045522 A1

- (51) 국제특허분류: *C07F 7/08* (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2018/010154
- (22) 국제출원일: 2018년 8월 31일 (31.08.2018)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2017-0110708 2017년 8월 31일 (31.08.2017) KR
10-2018-0102776 2018년 8월 30일 (30.08.2018) KR
- (71) 출원인: 포항공과대학교 산학협력단 (POSTECH ACADEMY-INDUSTRY FOUNDATION) [KR/KR]; 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동), Gyeongsangbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 안교한 (AHN, Kyo Han); 37673 경상북도 포항시 남구 지곡로 155, 4동 604호, Gyeongsangbuk-do (KR). 류혜근 (RYU, Hye Gun); 42828 대구시 달서구 한실로 30, 903동 1202호, Daegu (KR). 김경환 (KIM, Kyeong Hwan); 38501 경상북도 경산시 대정길 102, Gyeongsangbuk-do (KR). 전용웅 (JUN, Yong Woong); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, 15동 112호, Gyeongsangbuk-do (KR). 성하수방카 (SINGHA, Subhankar); 37673 경상북도 포항시 남구 청암로 77, Gyeongsangbuk-do (KR).
- (74) 대리인: 이명진 (LEE, Myoung-Jin); 06180 서울시 강남구 영동대로85길 28, 6층 (대치동), 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

(54) Title: AMINO-SILA-PYRONIN COMPOUND-BASED ONE- OR TWO-PHOTON ABSORPTION FLUORESCENT SUBSTANCE AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 아미노-실라-파이로닌 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체 및 이의 용도



(57) Abstract: The present invention relates to a silicon-substituted amino-pyrone compound derivative, a cell- or tissue-imaging method using the same, a cancer diagnosis method using the same, and a method for preparation of the same. More specifically, serving as a two-photon absorption fluorescent substance which has longer absorption and emission wavelengths in red or near-infrared regions of 625 nm or greater, compared to conventional one-photon absorption fluorescent substances, the silicon-substituted amino-pyrone compound derivative can minimize the influence of self-fluorescence in a bioimaging study and is thus expected to be suitable for high-resolution imaging in deep tissues. A fluorescent probe developed on the basis of the fluorescent substance platform is expected to find an expanded range of applications in analyzing and imaging specific materials *in vivo*.

[다음 쪽 계속]



WO 2019/045522 A1

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(57) 요약서: 본 발명은 실리콘 치환 아미노-파이로닌 화합물의 유도체, 이를 이용한 세포 또는 조직의 영상화 방법, 이를 이용한 암진단 방법 및 이를 제조하는 방법 등에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 상기 실리콘 치환 아미노-파이로닌 화합물의 유도체는 이광자 흡수 형광체로, 종래 일광자 흡수 형광체에 비해 625 nm 이상의 적색 또는 근적외선 영역에서의 더 긴 흡수 및 방출 파장을 가지고 있어, 생체 영상화 연구에 있어서 자가 형광에 의한 영향을 최소화할 수 있는 바 깊은 조직에서의 고해상도 영상화에 적합할 것으로 기대된다. 상기 형광체 플랫폼을 기반으로 개발된 형광 프로브는 생체 내 특정 물질 분석 및 영상화에 있어 그 활용범위를 확장시킬 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: 아미노-실라-파이로닌 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 아미노-실라-파이로닌 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 자세하게는 상기 형광체의 세포 영상화への 응용에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 형광(fluorescence) 신호를 바탕으로 한 생체 영상화(bioimaging) 기술은 세포 소기관(organelle), 조직(tissue) 등을 시각화할 수 있는 방법으로 널리 활용되고 있으며, 이 중 형광 신호를 발하는 형광 프로브(fluorescent probe)의 개발은 생체 내 특정 물질 분석 및 영상화에 있어 그 활용범위를 확장시키게 된다. 현재 생체 영상화에 활용되고 있는 대부분의 형광 물질 및 프로브는 일광자 흡수(one-photon absorption) 형광체이며, 일광자 광학현미경(one-photon microscopy, OPM)에 의해 생체 영상화가 구현된다.
- [4] 그러나 최근에는 빛 산란의 영향에 민감하지 않으면서, 보다 깊은 조직에 대해서도 해상도 높은 영상화를 가능하게 하는 이광자 광학현미경(two-photon microscopy, TPM)을 이용한 생체 영상화 연구에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다. 이광자 광학현미경 영상화법은 900 nm 파장대에 가까운 근적외선(near infrared, NIR) 영역에서 여기(excitation)가 가능하며, 동시에 높은 조직 투과성과 함께 초점(focal point) 부분만 여기 시킬 수 있기 때문에 생체 조직에 대한 낮은 광-손상(photo-damage)과 형광체에 대한 낮은 광-퇴색(photo-bleaching) 등의 생체 영상화 분야에 있어서 다양한 장점을 가지고 있다.
- [5] 이광자 현미경을 이용한 생체 영상화를 위해서 현재 이용되고 있는 이광자 흡수 형광체로는 대표적으로 아세단(acedan), 나프탈이미드(napthalimide) 유도체 등이 있다. 이들 형광체들은 주로 녹색 영역에서 형광을 발하는데, 이 영역은 생체 내 물질(innate biomolecules)로부터 방출되는 자가 형광(autofluorescence) 영역과 겹치기 때문에 조직 영상화 결과의 신뢰도를 저하시키는 단점을 가지고 있다. 따라서 생체 내 물질에 의한 자가 형광 영역을 벗어난 625 nm 이상의 장파장 영역(적색 또는 근적외선)에서도 강한 형광을 방출하는 새로운 형광체를 개발한다면, 기존의 이광자 흡수 물질이 지니는 한계점을 극복할 수 있을 것으로 기대된다.
- [6] 한편, 형광 프로브는 여기 파장과 방출 파장의 차이(Stokes shift)가 크면 클수록 형광 물질 또는 프로브가 자체적으로 광을 흡수(self-absorption)하여

소광(quenching)시키는 것을 감소시킬 수 있다. 또한, 서로 다른 파장 영역에서 여기시킬 수 있으며 동시에 서로 다른 파장 영역에서 방출을 하는 형광 프로브의 경우에는 비율 기반 형광 신호(ratiometric fluorescence signal)를 얻을 수 있으며, 외부 환경에 따라 형광 세기가 매우 민감하게 감응하는 특성을 극복할 수 있어서 신뢰성 있는 정량적 분석이 가능하다. 따라서, 이와 같은 특성을 가지는 형광 프로브는 생체 내 특정 기질 감지 및 생체 영상화 연구에 매우 유용하다(국내등록특허 10-1662427).

- [7] 따라서, 장파장 영역에서도 강한 형광을 방출하며, 서로 다른 파장 영역에서 흡수 및 방출을 하는 광물리적 특성을 나타내는 형광 프로브의 개발은 기존 한계점을 극복하여 다양한 생체 영상화 분야에 폭넓게 적용할 수 있으며, 신뢰성 높은 생체 영상화 분석 기법을 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

[8]

발명의 상세한 설명 기술적 과제

- [9] 본 발명은 상기와 같은 종래 기술상의 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로, 자가 형광의 간섭을 최소화하여 높은 해상도로 조직 영상화를 구현할 수 있는 새로운 형광체 화합물인, 아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체 및 이의 제조 방법, 이의 용도 등을 제공하는 것을 그 목적으로 한다.
- [10] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

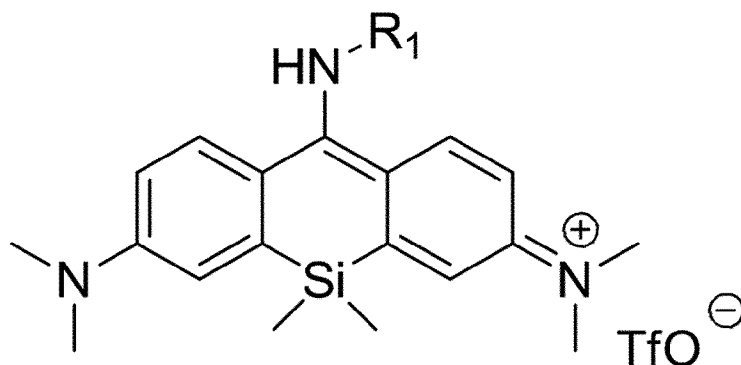
[11]

과제 해결 수단

- [12] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[13] [화학식 1]

[14]



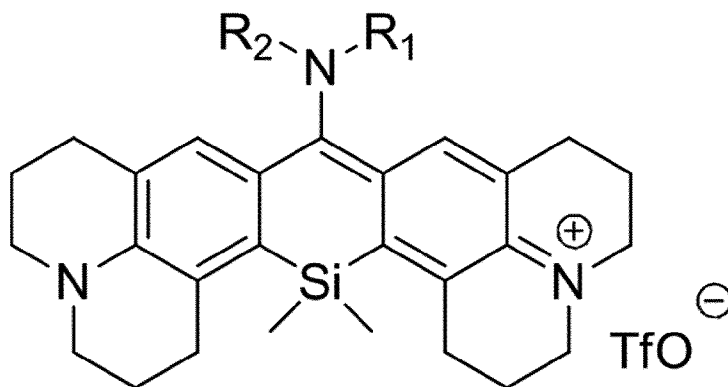
- [15] 상기 화학식 1에서, R₁은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이며,

상기 비치환은 수소 원자가 작용기로 치환된 것을 의미하며, 상기 치환은 수소 원자 대신에 일반적인 작용기가 치환된 것을 의미한다. 이 때 작용기는 메틸기, 에틸기, 페닐기, 알릴기, 프로파질기, 아지도에틸기, 아지도프로필기, 벤질기, 터트-부틸부티레이트기, 아미노부틸기, 히드록시에틸기, 알데하이드기, 카복실기, 카복실릭 에스터기, 하이드록시기, 머캅토기, 아지도기, 아민기, 비닐기, 할로젠기, 시아노기, 아릴기, 니트릴기, 카보네이트기 등이나, 이에 제한되지 않는다.

- [16] 또한, 본 발명은 하기 화학식 3으로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyronin) 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 제공한다.

[17] [화학식 3]

[18]

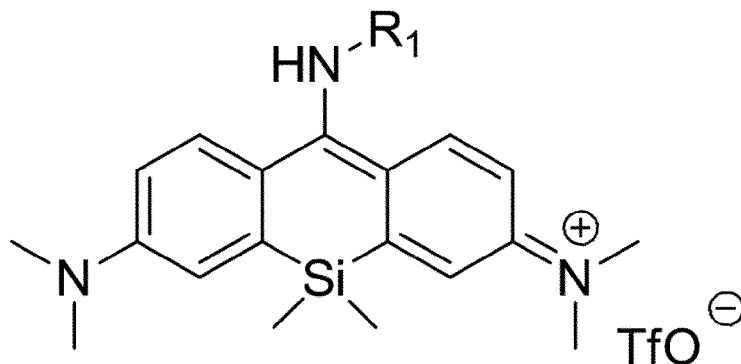


- [19] 상기 화학식 3에서, R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이며, 상기 비치환은 수소 원자가 작용기로 치환된 것을 의미하며, 상기 치환은 수소 원자 대신에 일반적인 작용기가 치환된 것을 의미한다. 이 때 작용기는 메틸기, 에틸기, 페닐기, 알릴기, 프로파질기, 아지도에틸기, 아지도프로필기, 벤질기, 터트-부틸부티레이트기, 아미노부틸기, 히드록시에틸기, 알데하이드기, 카복실기, 카복실릭 에스터기, 하이드록시기, 머캅토기, 아지도기, 아민기, 비닐기, 할로젠기, 시아노기, 아릴기, 니트릴기, 카보네이트기 등이나, 이에 제한되지 않는다.
- [20] 또한, R_2 는 수소, 또는 치환 또는 비치환된 아실기이며, 상기 비치환은 수소 원자가 작용기로 치환된 것을 의미한다. 상기 치환은 작용기가 포함된 것을 의미하며, 작용기는 메틸기, 에틸기, 페닐기, 알릴기, 프로파질기, 아지도에틸기, 아지도프로필기, 벤질기, 터트-부틸부티레이트기, 아미노부틸기, 히드록시에틸기, 알데하이드기, 카복실기, 카복실릭 에스터기, 하이드록시기, 머캅토기, 아지도기, 아민기, 비닐기, 할로젠기, 시아노기, 아릴기, 니트릴기, 카보네이트기 등이나, 이에 제한되지 않는다.
- [21] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 일광자 흡수 형광체 또는 이광자 흡수 형광체일 수 있으나, 형광을 방출할 수 있는 형태라면 이에 제한되지 않는다.

- [22] 본 발명의 다른 구체예에 있어서, 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 바람직하게는 625 nm 이상의 장파장 영역 또는 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 형광체이나, 세포 또는 조직을 영상화할 수 있는 영역이라면 이에 제한되지 않는다.
- [23] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 세포 또는 조직에 처리하고 관측하는 단계를 포함하는 세포 또는 조직의 영상화 방법을 제공한다.
- [24] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 관측하는 단계는 일광자 형광 현미경 또는 이광자 형광 현미경을 이용하는 것을 특징으로 한다.
- [25] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 진단용 조성물을 제공한다.
- [26] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 체내 또는 조직에 투여하여, 진단용 형광 영상을 획득하는 방법을 제공한다.
- [27] 또한, 본 발명은 상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 진단 용도를 제공한다.
- [28] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 진단은 바람직하게는 암, 결핵 등의 질병을 진단하는 것으로서, 본 발명의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 단독으로, 또는 특정 질병의 마커를 결합시킨 본 발명의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 이용하여 진단하는 것으로서, 상기 질병에는 제한이 없다.
- [29] 또한, 본 발명은 (a)
3,7-비스(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,c]실린-10(5H)-온에
트리플루오로메탄설폰산 무수물을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b)
상기 혼합물에 아민을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는
아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물의 제조 방법을 제공한다.

[30] [화학식 1]

[31]



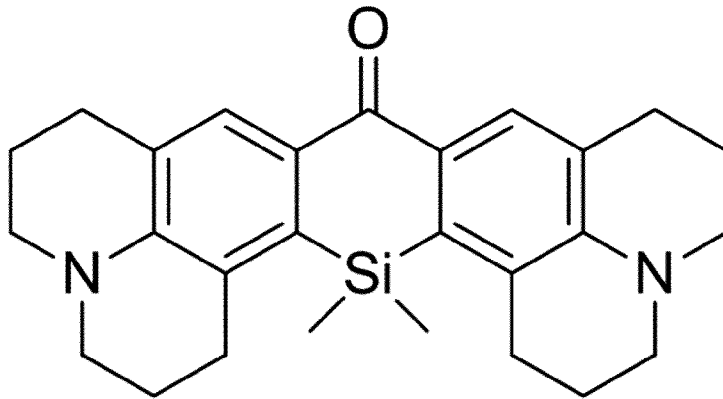
- [32] 상기 화학식 1에서, R_1 은 바람직하게는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이나, 첨가되는 아민(amine) 화합물에 의하여 치환될 수 있는 구조라면 이에 제한되지 않는다. 상기 아민 화합물은 암모니아의 수소 원자를

탄화수소기로 치환한 형태의 화합물을 총칭한다.

- [33] 또한, 본 발명은 (a) 하기 화학식 22로 표시되는 화합물에 트리플루오로메탄설폰산 무수물을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물에 아민을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 2로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyrone) 화합물의 제조 방법을 제공한다.

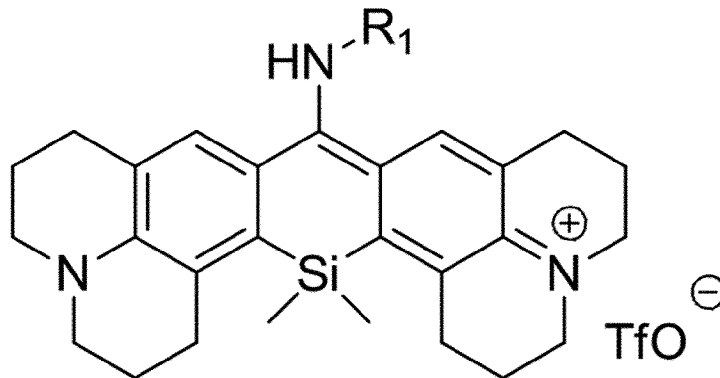
[34] [화학식 22]

[35]



[36] [화학식 2]

[37]

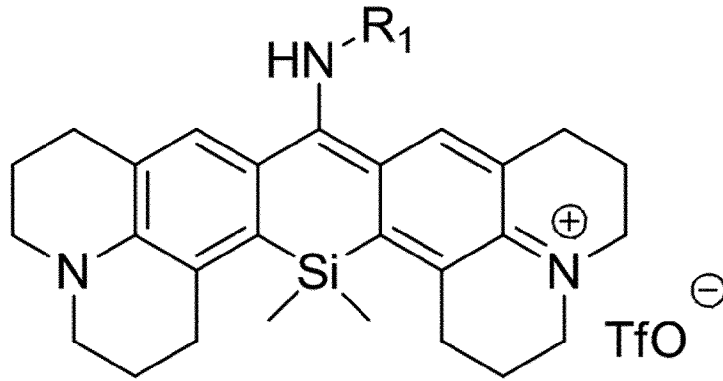


- [38] 상기 화학식 2에서, R₁은 바람직하게는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이나, 첨가되는 아민(amine) 화합물에 의하여 치환될 수 있는 구조라면 이에 제한되지 않는다.

- [39] 또한, 본 발명은 (a) 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 디이소프로필에틸아민 및 피리딘을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물에 아실화 반응을 위한 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 3으로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyrone) 화합물의 제조 방법을 제공한다. 상기 아실화(acylation) 반응을 위한 화합물이란 아실기를 제공하는 모든 화합물을 총칭하며, 예를 들어, 할로젠화 아실, 카르복시산 무수물 등이나, 아실기를 제공할 수 있는 화합물이라면 이에 제한되지 않는다.

[40] [화학식 2]

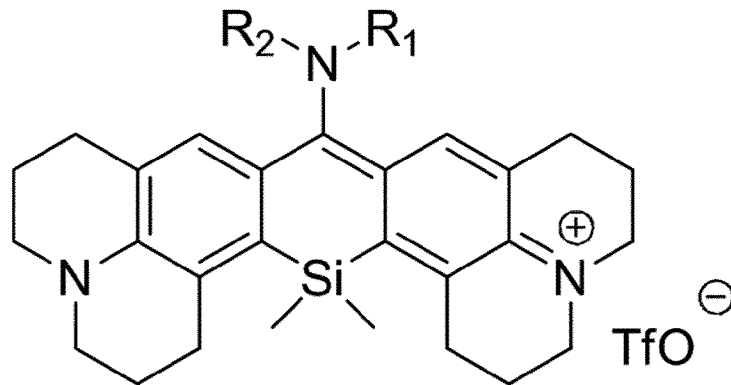
[41]



[42]

[화학식 3]

[43]



[44]

상기 화학식 2 및 3에서, R_1 은 바람직하게는 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이나, 이에 제한되지 않으며, 상기 화학식 3에서, R_2 는 바람직하게는 치환 또는 비치환된 아실기이나, 이에 제한되지 않는다.

[45]

발명의 효과

[46]

본 발명의 아미노-실라-파이로닌 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체는 구조적으로는 단순하나 적색 또는 근적외선 영역에서의 흡수 및 방출 파장을 가지고 있어 현재 널리 사용되고 있는 시아닌(cyanine) 계 형광체에 비해서 화학적 및 광 안정성이 뛰어나며, 생체 영상화 연구에 있어서 자가 형광에 의한 영향을 최소화할 수 있어 검사에 대한 신뢰성을 현저히 높일 수 있다. 또한, 본 발명의 형광체가 가진 이광자 흡수 특성을 이용하면 깊은 조직에서의 고해상도 영상화에도 사용가능하다. 따라서, 본 발명의 형광체 플랫폼은 이를 기반으로 하여 다양한 특성을 가지는 형광 프로브의 개발이 가능하며, 이를 이용하여 단독으로 또는 특정 질환의 마커에 대한 표적을 결합시켜, 암 세포뿐만 아니라 다양한 질환을 영상화하여 진단하는데 사용 가능할 뿐만 아니라, 이를 통하여 검사 정확성도 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 이에 한정되지 않고 생체 내 특정 물질의 분석 및 영상화에 있어서 그 활용 범위를 다양하게 적용가능할 것으로 기대된다.

[47]

도면의 간단한 설명

- [48] 도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따른 에탄올, 디옥산, 디클로로메탄, 아세트니트릴, 및 인산염완충용액에서 화학식 4 내지 화학식 12로 표시되는 화합물들의 최대 흡수파장 및 최대 방출파장 값을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [49] 도 1b는 본 발명의 일 실시예에 따른 에탄올, 아세트니트릴, 및 인산염완충용액에서 화학식 13 내지 화학식 20으로 표시되는 화합물들의 최대 흡수파장 및 최대 방출파장 값을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [50] 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 4 내지 화학식 12로 표시되는 화합물들을 세포에 처리한 후에 일광자 및 이광자 현미경을 이용하여 세포로부터 획득된 형광 영상을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [51] 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 13 내지 화학식 15로 표시되는 화합물들을 세포에 처리한 후에 일광자 및 이광자 현미경을 이용하여 세포로부터 획득된 형광 영상을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.
- [52] 도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른 화학식 16 내지 화학식 19로 표시되는 화합물들을 세포에 처리한 후에 일광자 및 이광자 현미경을 이용하여 세포로부터 획득된 형광 영상을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

[53]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [54] 본 발명자들은 세포 또는 조직의 자가 형광의 간섭을 최소화하여 높은 신뢰성 및 높은 해상도를 가지는 세포 및/또는 조직의 영상화를 구현할 수 있는 새로운 형광체를 개발하고자 예의 연구한 결과, 본 발명을 완성하였다. 상기 형광체는 625 nm 이상의 장파장 영역 및 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 형광체이며 아민기에 서로 다른 치환기를 도입함에 따라서 서로 다른 영역에서 흡수 및 방출을 하는 다양한 유도체로 변환시킬 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 비유타 기반 생체 영상화에 적합한 장점을 가진다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에서는 세포 또는 동물 모델의 조직에 본 발명의 화합물을 처리한 결과 종래의 이광자 흡수 형광체와 비교하여 큰 흡수 단면 값을 나타내며, 세포에 대하여 우수한 형광 영상을 제공할 수 있음을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 화합물 또는 이의 화학적으로 허용가능한 염을 이용하여 세포 또는 조직을 영상화하는 방법을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는 진단용 조성물을 제공할 수 있다.
- [56]
- [57] 본 명세서에 있어서, “세포(cell) 또는 조직(tissue)”이란 인간 또는 비-인간을 포함하는 포유류의 세포 또는 조직일 수 있고, 상기 비-인간 포유류는 바람직하게는 마우스, 랫트, 개, 고양이, 말, 소, 양, 염소, 돼지, 토끼 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

- [58] 본 명세서에 있어서, “유기용매(organic solvent)”란 유기물질로 이루어진 다른 물질을 용해시키는 물질을 총칭하며, 바람직하게는 에탄올, 메탄올, 톨루엔, 에틸렌, 페톨, 벤젠, 크실렌, 디클로로메탄, 헥산, 메틸 아세테이트, 에틸 아세테이트, 테트라클로로에틸렌 등이나, 본 명세서의 화합물, 디이소프로필에틸아민 및 피리딘, 2,6-루티딘, 디이소프로필에틸아민 등을 용해시킬 수 있는 용매라면 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 명세서에 있어서, “화합물(compound)”이란 2개 이상의 다른 원소들이 일정 비율로 구성된 순물질을 의미하는데, 탄소와 수소의 포함여부에 따라 유기화합물과 무기화합물, 원소의 결합방식에 따라 이온화합물과 분자화합물로 분류될 수 있으며, 상기 화합물은 바람직하게는 화학식 1 내지 26으로 표시되는 화합물들 중의 하나이다.
- [60] 본 명세서에 있어서, “약학적으로 허용가능한 염(Pharmaceutical acceptable salt)”이란, 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 본 발명의 화합물들의 이로온 효능을 떨어뜨리지 않는 본 발명의 화합물들의 어떠한 유기 또는 무기 부가염을 의미한다. 이들 염은 유리산(free acid)으로 무기산과 유기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 질산, 황산, 과염소산, 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 젖산, 말레산, 푸마린산, 글루콘산, 메탄설폰산, 글리콘산, 숙신산, 타타르산, 갈락투론산, 엠본산, 글루탐산, 아스파르트산, 옥살산, (D) 또는 (L) 말산, 말레산, 메테인설폰산, 에테인설폰산, 4-톨루엔설폰산, 살리실산, 시트르산, 벤조산, 말론산 등을 사용할 수 있다. 또한, 이들 염은 알칼리 금속염(나트륨염, 칼륨염 등) 및 알칼리 토금속염(칼슘염, 마그네슘염 등) 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 산부가염으로는 아세테이트, 아스파테이트, 벤즈에이트, 베실레이트, 바이카보네이트/카보네이트, 바이설페이트/설페이트, 보레이트, 캄실레이트, 시트레이트, 에디실레이트, 에실레이트, 포메이트, 푸마레이트, 글루셉테이트, 글루코네이트, 글루큐로네이트, 헥사플루오로포스페이트, 하이벤제이트, 하이드로클로라이드/클로라이드, 하이드로브로마이드/브로마이드, 하이드로요오디드/요오디드, 이세티오네이트, 락테이트, 말레이트, 말리에이트, 말로네이트, 메실레이트, 메틸설페이트, 나프틸레이트, 2-나프실레이트, 니코티네이트, 나이트레이트, 오로테이트, 옥살레이트, 팔미테이트, 파모에이트, 포스페이트/수소 포스페이트/이수소 포스페이트, 사카레이트, 스테아레이트, 석시네이트, 타르트레이트, 토실레이트, 트리플루오로아세테이트, 알루미늄, 알기닌, 벤자틴, 칼슘, 콜린, 디에틸아민, 디올아민, 글라이신, 라이신, 마그네슘, 메글루민, 올아민, 칼륨, 나트륨, 트로메타민, 아연염 등이 포함될 수 있으나, 본 발명의 화합물들의 효능에 영향을 미치지 않으며 부과될 수 있는 염이라면 이에 제한되지 않는다.
- [61]
- [62] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나

하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[63]

[64] [실시예]

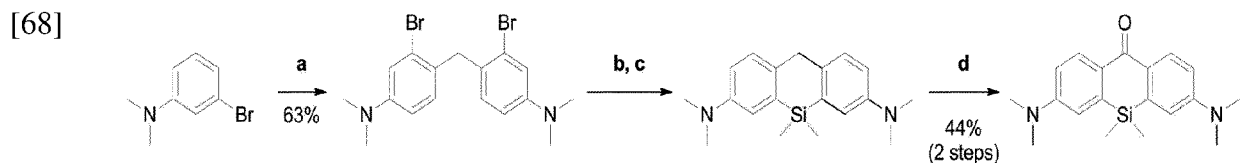
[65] 실시예 1: 3,7-비스(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-10(5H)-온(3,7-bis(dimethylamino)-5,5-dimethyldibenzo[b,e]silin-10(5H)-one)의 제조

[66] 하기 반응식 1의 방법으로

3,7-비스(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-10(5H)-온을 제조하였다.

자세하게는, “Lukinavicius, G. et al., Nat. Chem., 2013, 5, 132-139 및 Nagano, T. et al., ACS Chem. Biol., 2011, 6, 600-608”의 방법에 따라 제조하였다.

[67] [반응식 1]



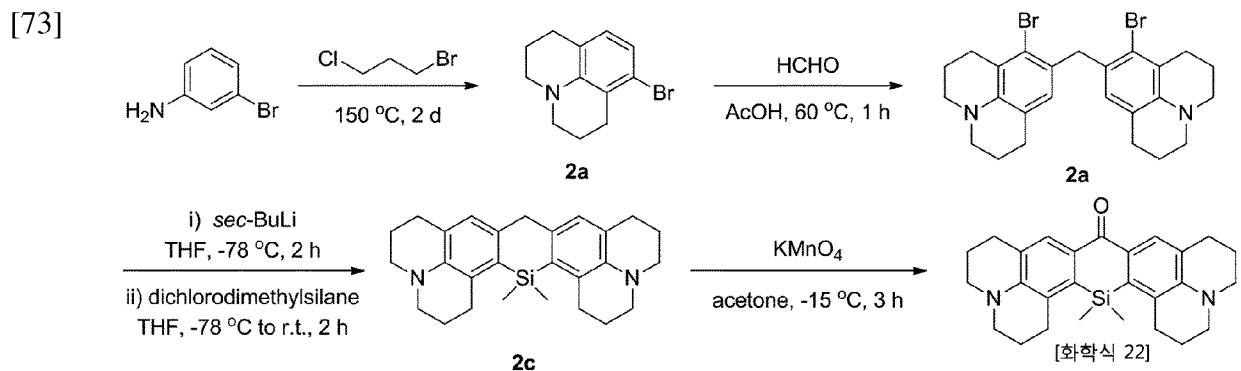
(a) HCHO, AcOH, 60 °C, 30 min (b) *sec*-BuLi, THF, -78 °C (c) Me₂SiCl₂, -78 °C to rt (d) KMnO₄, acetone, -15 °C

[69]

[70] 실시예 2: 화학식 22로 표시되는 화합물의 제조

[71] 하기 반응식 2의 방법으로 화학식 22로 표시되는 화합물(화합물 22)을 제조하였다.

[72] [반응식 2]



[74]

[75] **2.1. 화합물 2a의 제조**

[76] 상기 화합물

2a(8-브로모-1,2,3,5,6,7-헥사하이드로피리도[3,2,1-ij]퀴놀린(8-bromo-1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinoline))를 “Alexey N. et al., ACS Chem. Biol, 2018, 13, 475-480”의 방법에 따라 제조하였다.

[77]

[78] **2.2. 화합물 2b의 제조**

[79] 상기 화합물
2b(비스(8-브로모-1,2,3,5,6,7-헥사하이드로피리도[3,2,1-ij]퀴놀린-9-일)메테인
(bis(8-bromo-1,2,3,5,6,7-hexahydropyrido[3,2,1-ij]quinolin-9-yl)methane))를 “Alexey
N. et al., ACS Chem. Biol, 2018, 13, 475-480”의 방법에 따라 제조하였다.

[80]

[81] **2.3. 화합물 2c의 제조**

[82] 상기 화합물 2c를 제조하기 위하여, 실시예 2.2와 동일한 방법으로 획득된 최종
생성물(200 mg, 0.39 mmol)을 무수 테트라히드로푸란(tetra hydro furan, THF) 15
mL을 이용하여 용해시킨 후에, -78 °C에서 0.84 mL의 2차-부틸리튬(1.4 M)을
첨가하였다. 그리고 2차-부틸리튬이 첨가된 혼합물을 2 시간 동안 교반시킨 후에
디메틸디클로로실레인(0.7 mmol) 85 μ L를 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 3
시간 동안 교반시킨 후, 1 N의 염화수소를 이용하여 반응을 중지시켰다. 이 후,
포화 탄산수소나트륨을 이용하여 중화시킨 후 디클로로메탄(2×10 mL)과
증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다.
그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 완전히 제거한 후, 별도의 정제과정 없이
다음 단계에서 사용하였다.

[83]

[84] **2.4. 화합물 22의 제조**

[85] 상기 화합물 22를 제조하기 위하여, 실시예 2.3과 동일한 방법으로 획득된 최종
생성물(160 mg, 0.39 mmol)을 아세톤 15 mL을 이용하여 용해시킨 후에, 0 °C에서
185 mg의 과망간산칼륨(1.17 mmol)을 30분 동안 조금씩 첨가하였다. 그리고 3
시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄을 이용하여 희석시켜 준 후에
디클로로메탄과 셀라이트를 혼합하여 첨가시킨 후에 40 mbar의 감압조건에서
용매를 제거하였다. 그리고 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을
통과하는 판 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 노란색 고체
화합물 22(33 mg, 20 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % EtOAc/ CH_2
 Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 22를 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR
(CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 8.07 (m, 2H), 3.29 (d, 8H), 2.9 (m 8H), 2.03 (m, 8H), 0.59
(m, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 143.3, 135.9, 129.6, 128.4, 123.9,
122.6, 50.4, 49.9, 28.7, 28.1, 21.8, 21.5, 0.1.”로 확인되었다.

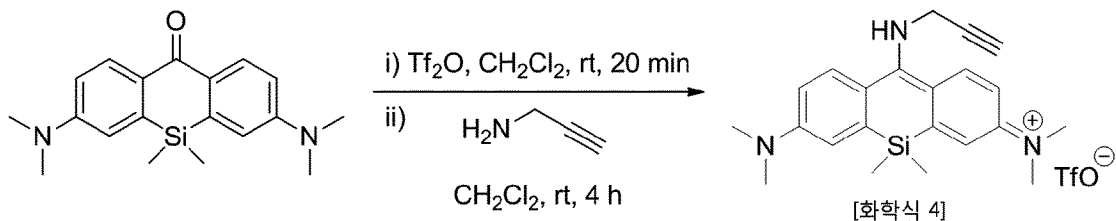
[86]

[87] 실시예 3: 화학식 4로 표시되는 화합물의 제조

[88] 하기 반응식 3의 방법으로 화학식 4로 표시되는 화합물(화합물 4)을
제조하였다.

[89] [반응식 3]

[90]



[91] 상기 화합물 4를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 프로파질 아민(propargyl amine) 0.2 mL을 첨가하였다. 그리고 다시 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 4(110 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 4를 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 7.81 (d, 1H), 7.50 (d, 1H), 6.95 (d 1H), 6.91-6.70 (m, 3H), 4.51(d, 2H), 3.02(d, 12 H), 2.31 (t, 1H), 0.46 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 168.5, 149.9, 149.5, 139.5, 136.5, 135.7, 129.4, 128.2, 127.3, 116.0, 114.6, 113.8, 111.4, 83.1, 70.6, 60.0, 43.5, 40.5, 40.2, 14.2, 0.0, -2.3.”로 확인되었다.

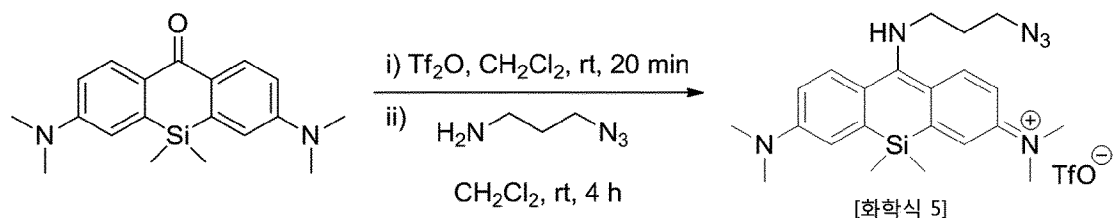
[92]

[93] 실시예 4: 화학식 5로 표시되는 화합물의 제조

[94] 하기 반응식 4의 방법으로 화학식 5로 표시되는 화합물(화합물 5)을 제조하였다.

[95] [반응식 4]

[96]



[97] 상기 화합물 5를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 아지도프로필 아민(azidopropyl amine) 310 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를

제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 5(121 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 5를 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CDCl₃, 300MHz, 298K, δ: 7.81 (d, 1H), 7.38 (d, 1H), 6.98 (d, 1H), 6.87 (d, 1H), 6.83 (dd, 1H), 6.75 (dd, 1H), 3.90 (t, 2H), 3.46 (t, 2H), 3.04 (d, 6.07), 2.08 (q, 2H)), 0.49 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 500MHz, 298K, δ: 166.7, 150.0, 149.5, 139.7, 136.4, 136.0, 129.7, 128.0, 127.6, 115.9, 114.9, 113.9, 111.3, 50.8, 49.7, 40.6, 40.3, 31.1, -2.3.”로 확인되었다.

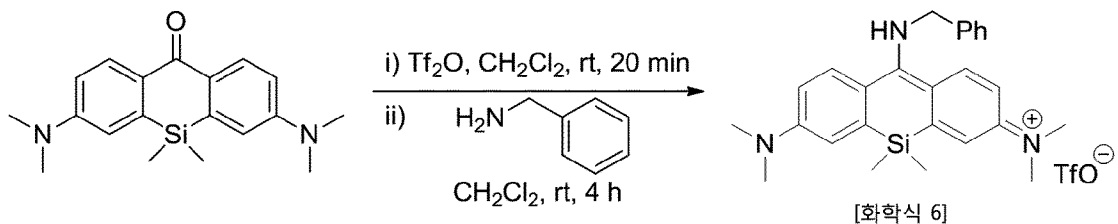
[98]

[99] 실시예 5: 화학식 6으로 표시되는 화합물의 제조

[100] 하기 반응식 5의 방법으로 화학식 6로 표시되는 화합물(화합물 6)을 제조하였다.

[101] [반응식 5]

[102]



[103] 상기 화합물 6을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μL를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 벤질 아민(benzyl amine) 332 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2 × 10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 6(122 mg, 70 %)을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 6을 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CDCl₃, 300MHz, 298K, δ: 7.96 (d, 1H), 7.40-7.18 (m, 9H), 6.95 (d, 1H), 6.84 (d, 1H), 6.81 (dd, 1H), 6.65 (dd, 1H), 5.04 (s, 2H), (2.99, 12H), 0.47 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 500MHz, 298K, δ: 167.9, 150.2, 149.8, 141.2, 139.9, 136.3, 135.5, 129.7, 128.6 (d), 128.5, 127.6, 127.3, 127.0, 126.8, 126.6, 116.1, 114.9, 113.9, 111.4, 56.8, 40.6, 40.3, -2.2.”로 확인되었다.

[104]

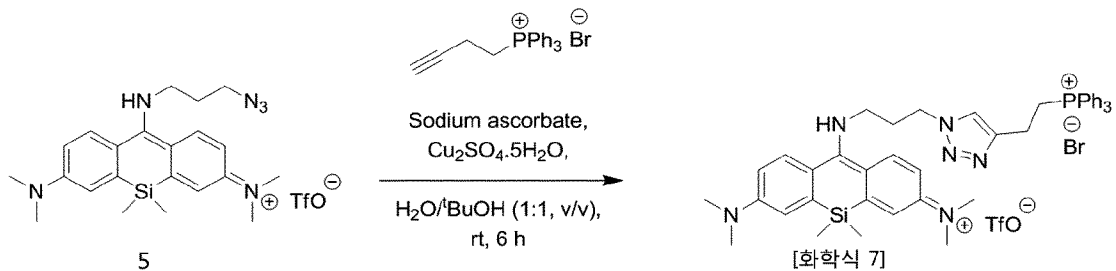
[105] 실시예 6: 화학식 7로 표시되는 화합물의 제조

[106] 하기 반응식 6의 방법으로 화학식 7로 표시되는 화합물(화합물 7, 모노((2-(1-(3-((7-(디메틸아미노)-3-(디메틸이미니오)-5,5-디메틸-3,5-디히드로디

벤조[b,e]실린-10-일)아미노)프로필)-1H-1,2,3-트리아졸-4-일)에틸)트리페닐포스포늄)모노브로마이드 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[107] [반응식 6]

[108]



[109] 상기 화합물 7을 제조하기 위하여, 실시예 4와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(56 mg, 0.1 mmol)과 부트-3-인-1-트리페닐포스늄 브로마이드를 삼차 부탄올 3 mL 및 증류수 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 아스코르브산 나트륨(1 M) 100 μ L와 황산구리(0.01 mmol) 2.5 mg을 첨가하고 6 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 7(52 mg, 54 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 1 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 7을 NMR로 관찰한 결과 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 8.47 (s, 1H), 8.44 (d, 1H), 7.81 (m, 9H), 7.68 (q, 6H), 7.46 (d, 1H), 7.26 (s, 1H), 6.86 (d, 1H), 6.75 (s, 2H), 4.38 (t, 2H), 4.05 (t, 2H), 3.99 (q, 2H), 3.13 (t, 2H), 3.07 (d, 12H), 2.66 (t, 2H), 0.43 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 173.6, 151.9, 151.7, 144.3, 144.2, 142.3, 139.1, 135.4, 135.3, 133.9, 133.8, 131.5, 131.0, 130.7, 124.9, 124.2, 119.9, 118.1, 117.4, 116.4, 115.2, 113.3, 111.9, 47.6, 47.2, 40.1 (d), 29.8, 23.0, 22.6, 19.4 (d), -1.9.”로 확인되었다.

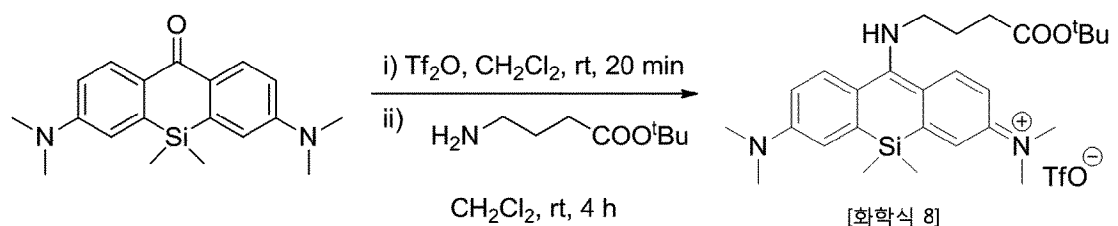
[110]

[111] 실시예 7: 화학식 8로 표시되는 화합물의 제조

[112] 하기 반응식 7의 방법으로 화학식 8로 표시되는 화합물(화합물 8, N-(10-((4-(tert-부톡시)-4-옥소부틸)아미노)-7-(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-3(5H)-일리덴)-N-메틸메탄암모늄 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[113] [반응식 7]

[114]



- [115] 상기 화합물 8을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 터트-부틸 4-아미노부타노에이트(*tert*-butyl 4-aminobutanoate) 493 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 8(121 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 8을 NMR로 관찰한 결과 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 8.08 (d, 1H), 7.60 (d, 1H), 6.92 (m, 4H), 4.06 (t, 2H), 3.12 (d, 12H), 2.34 (t, 2H), 2.21 (t, 2H), 1.33 (s, 9H), 0.48 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 173.3, 172.9, 151.9, 151.7, 142.4, 138.8, 132.1, 129.3, 125.0, 119.3, 116.2, 115.2, 113.6, 111.5, 81.2, 50.2, 40.0, 39.9, 32.7, 27.9, 24.2, -0.0, -2.0.”로 확인되었다.

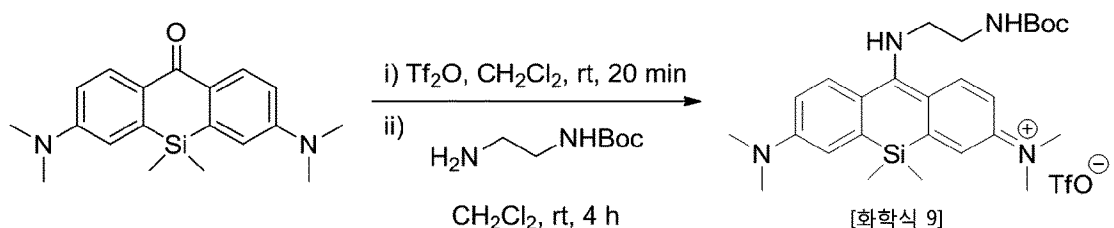
[116]

[117] 실시예 8: 화학식 9로 표시되는 화합물의 제조

- [118] 하기 반응식 8의 방법으로 화학식 9로 표시되는 화합물(화합물 9, N-(10-((2-((터트-부톡시카르보닐)아미노)에틸)아미노)-7-(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-3(5H)-일리덴)-N-메틸메탄암모늄 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[119] [반응식 8]

[120]



- [121] 상기 화합물 9를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 터트-부틸(2-아미노에틸)카바메이트(*tert*-butyl(2-aminoethyl)carbamate) 496.6 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 9(134 mg,

70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 9를 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CDCl₃, 300MHz, 298K, δ: 7.93 (d, 1H), 7.63 (d, 1H), 6.90 (d, 1H), 6.85 (d, 2H), 6.79 (dd, 1H), 4.14 (t, 2H), 3.66 (q, 4H), 3.14 (d, 12H), 1.36 (s, 9H), 0.48 (s, 6H).”로 확인되었다.

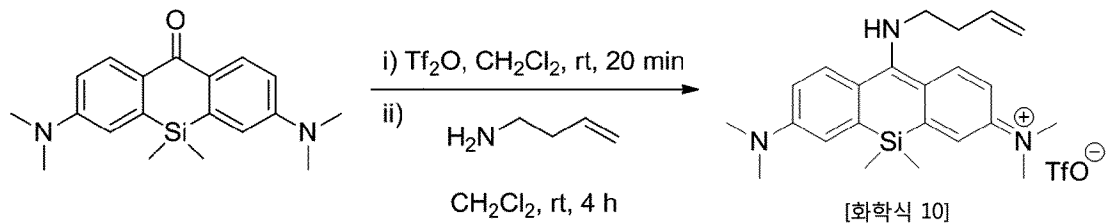
[122]

[123] 실시예 9: 화학식 10으로 표시되는 화합물의 제조

[124] 하기 반응식 9의 방법으로 화학식 10으로 표시되는 화합물(화합물 10, N-(10-(부트-3-엔-1-일아미노)-7-(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-3(5H)-일리텐)-N-메틸메탄암모늄 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[125] [반응식 9]

[126]



[127] 상기 화합물 10을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설포산 무수물(0.62 mmol) 104 μL를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 부트-3-엔-1-아민(but-3-en-1-amine) 220 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2 × 10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 10(114.5 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 10을 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CDCl₃, 300MHz, 298K, δ: 8.06 (d, 1H), 7.51 (d, 1H), 6.92 (s, 1H), 6.83 (d, 2H), 6.74 (d, 1H), 5.66 (m, 1H), 5.07 (m, 2H), 4.07 (t, 2H), 3.13 (d, 12H), 2.67 (q, 2H), 0.47 (s, 6H). ¹³C NMR (CDCl₃, 500MHz, 298K, δ: 173.72, 151.8, 151.6, 142.4, 138.7, 133.3, 131.6, 129.4, 125.1, 123.8, 122.0, 119.7, 119.4, 118.4, 116.3, 115.1, 113.5, 111.2, 49.7, 39.9, 33.1, 0.0, -2.2.”로 확인되었다.

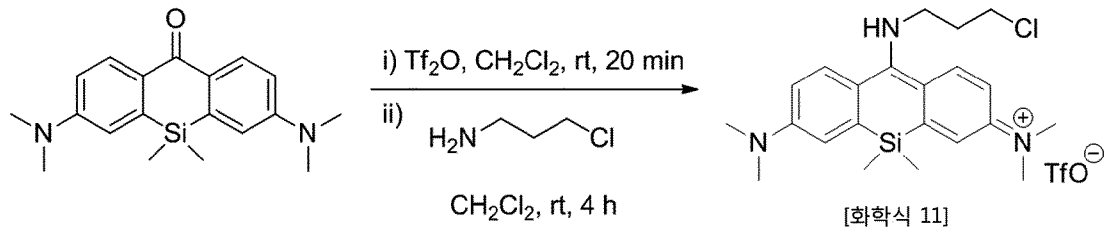
[128]

[129] 실시예 10: 화학식 11로 표시되는 화합물의 제조

[130] 하기 반응식 10의 방법으로 화학식 11로 표시되는 화합물(화합물 11, N-(10-((3-클로로프로필)아미노)-7-(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-3(5H)-일리텐)-N-메틸메탄암모늄 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[131] [반응식 10]

[132]



[133] 상기 화합물 11을 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의 3-클로로프로판-1-아민(3-chloropropan-1-amine) 290 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 11(119 mg, 70 %)을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 11을 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 7.87 (d, 1H), 7.41 (d, 1H), 6.95 (d, 1H), 6.84 (m, 2H), 6.73 (dd, 1H), 3.99 (t, 2H), 3.69 (t, 2H), 3.04 (d, 12H), 2.29 (m, 2H), 0.48 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 168.2, 150.3, 149.9, 140.3, 136.5, 134.5, 130.1, 128.4, 126.4, 116.0, 115.0, 113.9, 111.3, 50.2, 43.3, 40.5, 40.3, 34.1, -2.3.”로 확인되었다.

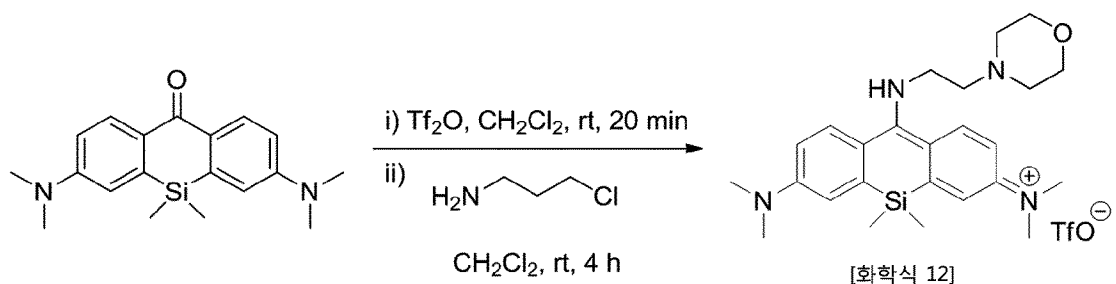
[134]

[135] 실시예 11: 화학식 12로 표시되는 화합물의 제조

[136] 하기 반응식 11의 방법으로 화학식 12로 표시되는 화합물(화합물 12, N-(7-(디메틸아미노)-5,5-디메틸-10-((2-모르폴리노에틸)아미노)디벤조[b,e]실린-3(5H)-일리텐)-N-메틸메탄암모늄 트리플루오로메탄설포네이트)을 제조하였다.

[137] [반응식 11]

[138]



[139] 상기 화합물 12를 제조하기 위하여, 실시예 1과 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(100 mg, 0.31 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 104 μ L를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 3.1 mmol의

2-모르폴리노에탄아민(2-morpholinoethanamine) 403 mg을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 12(127 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 12를 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 8.51 (d, 1H), 7.63 (d, 1H), 6.91 (m, 2H), 6.78 (d, 1H), 6.72 (dd, 1H), 4.18 (t, 2H), 3.56 (t, 4H), 3.10 (d, 12H), 2.41 (s, 4H), 0.47 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 500MHz, 298K, δ : 173.8, 151.9, 151.5, 142.1, 138.6, 131.3, 131.0, 125.6, 121.0, 116.3, 115.0, 113.5, 111.3, 66.8, 57.0, 53.6, 47.0, 40.1, -1.9.”로 확인되었다.

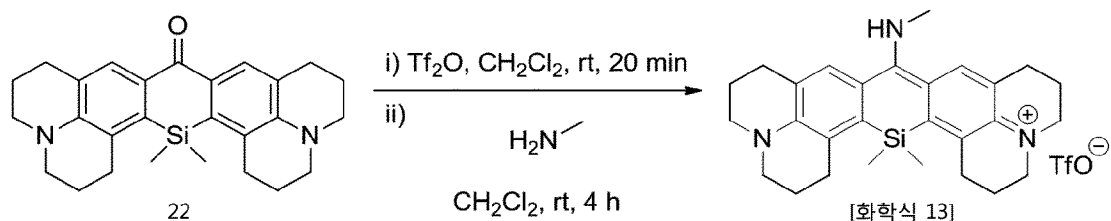
[140]

[141] 실시예 12: 화학식 13으로 표시되는 화합물의 제조

[142] 하기 반응식 12의 방법으로 화학식 13으로 표시되는 화합물(화합물 13)을 제조하였다.

[143] [반응식 12]

[144]



[145] 상기 화합물 13을 제조하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(70 mg, 0.165 mmol)을 무수 디클로로메탄 3 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.62 mmol) 57 μL 를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 2 M의 테트라히드로퓨란 용액으로 용해시킨 1.66 mmol의 메틸 아민(methyl amine) 0.83 mL을 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 주황색 고체 화합물 13(68.3 mg, 70 %)을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 13을 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 7.32 (s, 2H), 3.47 (d, 3H), 3.33 (s, 8H), 2.83 (s, 8H), 2.03 (d, 8H), 0.56 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K): δ 175.1, 146.6, 129.4, 127.0, 124.7, 122.2, 119.6, 50.7, 50.1, 37.9, 29.9, 29.4, 28.0, 26.7, 21.5, 21.2, 0.2, 0.1, -0.1, -0.3.”로 확인되었다.

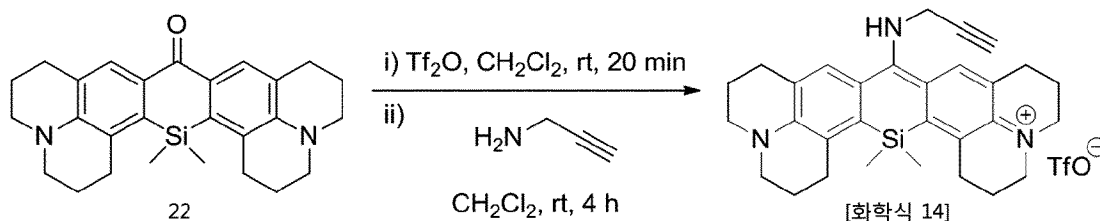
[146]

[147] 실시예 13: 화학식 14로 표시되는 화합물의 제조

[148] 하기 반응식 13의 방법으로 화학식 14로 표시되는 화합물(화학식 14)을 제조하였다.

[149] [반응식 13]

[150]



[151] 상기 화합물 14를 제조하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(35 mg, 0.082 mmol)을 무수 디클로로메탄 2 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.16 mmol) 27 μL 를 첨가하고 20 분 동안 교반시킨 후에 0.82 mmol의 프로파질 아민(propargyl amine) 52.5 μL 를 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 적색 고체 화합물 14(35.3 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 14를 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 7.58 (s, 2H), 4.37 (d, 2H), 3.36 (d, 8H), 2.84 (t, 8H), 2.53 (s, 1H), 2.02 (q, 10H), 0.56 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K): δ 175.4, 147.0, 128.6, 126.5, 123.0, 122.1, 119.6, 78.4, 74.5, 50.8, 50.2, 39.9, 29.9, 29.4, 27.9, 21.5, 21.1, 0.2, -0.1.”로 확인되었다.

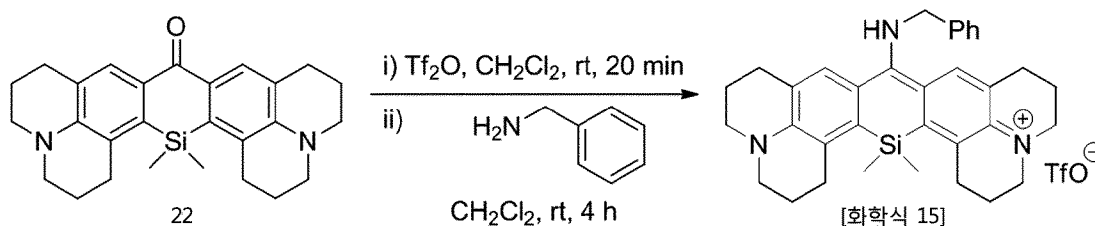
[152]

[153] 실시예 14: 화학식 15로 표시되는 화합물의 제조

[154] 하기 반응식 14의 방법으로 화학식 15로 표시되는 화합물(화학식 15)을 제조하였다.

[155] [반응식 14]

[156]



[157] 상기 화합물 15를 제조하기 위하여, 실시예 2와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물(20 mg, 0.047 mmol)을 무수 디클로로메탄 2 mL을 이용하여 용해시킨 후에 상온에서 트리플루오로메탄설폰산 무수물(0.093 mmol) 16 μL 를 첨가하고

20 분 동안 교반시킨 후에 0.47 mmol의 벤질 아민(benzyl amine) 51 μ L를 첨가하였다. 그리고 다시 상온에서 4 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 최종적으로 적색 고체 화합물 15(22 mg, 70 %)를 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 3 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 제조된 화합물 15를 NMR로 관찰한 결과 ^1H NMR (CDCl_3 , 300MHz, 298K, δ : 7.39 (m, 7H), 4.91 (s, 2H), 3.35 (q, 8H), 2.85 (t, 8H), 2.00 (m, 8H), 0.56 (s, 6H). ^{13}C NMR (CDCl_3 , 75 MHz, 298 K): δ 176.1, 146.8, 137.3, 129.2, 128.1, 127.7, 126.3, 122.9, 118.7, 53.7, 50.7, 50.2, 29.9, 29.4, 27.9, 21.5, 21.1, 0.2, -0.1.”로 확인되었다.

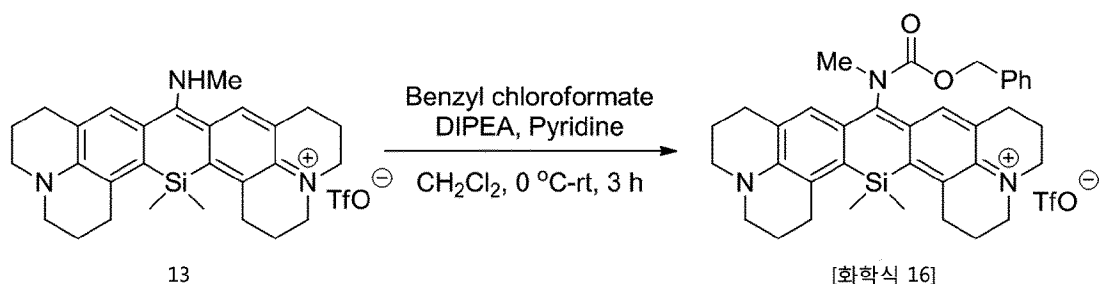
[158]

[159] 실시예 15: 화학식 16으로 표시되는 화합물의 제조

[160] 하기 반응식 15의 방법으로 화학식 16으로 표시되는 화합물(화합물 16)을 제조하였다.

[161] [반응식 15]

[162]



[163] 상기 화합물 16을 제조하기 위하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물 화합물 13(30 mg, 0.05 mmol)을 무수 디클로로메탄 5 mL을 이용하여 용해시킨 후에 0 °C에서 0.25 mmol의 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine, DIPEA) 44 μ L와 0.5 mmol의 벤질 클로로포르메이트(benzyl chloroformate) 71 μ L를 첨가하고 상온에서 3 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 녹색 고체 화합물을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 5 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 녹색 고체 화합물은 다시 HPLC(high performance liquid chromatography)로 정제하여 최종적으로 화합물 16(4 mg, 11 %)을 획득하였다. 제조된 화합물 16을 NMR로 관찰한 결과 ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz, 298 K): δ 7.25-7.21 (m, 3H), 7.10-7.05 (m, 4H), 5.04 (s, 2H), 3.61-3.57 (m, 8H), 3.22 (s, 3H), 2.96-2.94 (m, 4H), 2.72-2.68 (m, 2H), 2.62-2.58 (m, 2H), 2.06-2.05 (m, 4H), 1.97-1.96 (m, 4H), 0.67 (d, $J = 6.0$ Hz, 6H); ^{13}C NMR

(CD₃OD, 125 MHz, 298 K): *d* 161.0, 160.5, 157.2, 157.1, 152.0, 142.9, 142.7, 138.3, 137.9, 135.2, 133.4, 129.9, 129.7, 129.6, 129.5, 129.2, 128.9, 126.6, 125.9, 125.7, 69.2, 68.8, 53.1, 52.5, 40.0, 39.8, 33.2, 30.9, 30.6, 30.1, 28.9, 28.8, 26.2, 22.1, 21.9, 14.6, -0.7, -0.8.”로 확인되었다.

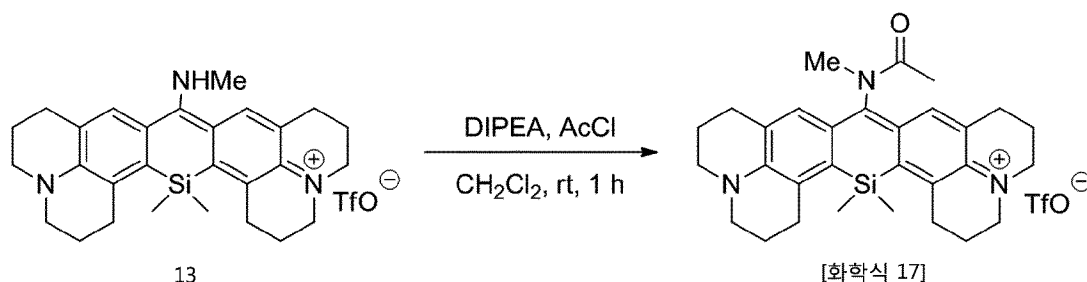
[164]

[165] 실시예 16: 화학식 17로 표시되는 화합물의 제조

[166] 하기 반응식 16의 방법으로 화학식 17로 표시되는 화합물(화합물 17)을 제조하였다.

[167] [반응식 16]

[168]



[169] 상기 화합물 17을 제조하기 위하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물 화합물 13(30 mg, 0.05 mmol)을 무수 디클로로메탄 5 mL을 이용하여 용해시킨 후에 0 °C에서 0.75 mmol의 2,6-루티딘(2,6-lutidine) 87 μ L를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 0.5 mmol의 염화아세트(acyl chloride) 36 μ L를 첨가하고 상온에서 12 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2 $\times$ 10 mL)과 증류수를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 녹색 고체 화합물을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 5 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 녹색 고체 화합물은 다시 HPLC(high performance liquid chromatography)로 정제하여 최종적으로 화합물 17(5 mg, 15 %)을 획득하였다. 제조된 화합물 17을 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz, 298 K): *d* 7.10 (s, 2H), 3.63-3.60 (m, 8H), 3.22 (s, 3H), 2.98-2.95 (m, 4H), 2.79-2.77 (m, 4H), 2.09-2.06 (m, 4H), 2.03-2.00 (m, 4H), 1.83 (s, 3H), 0.68 (s, 6H); ¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz, 298 K): *d* 173.0, 160.2, 152.2, 142.6, 134.7, 134.0, 127.2, 125.4, 53.2, 53.1, 52.6, 39.1, 30.1, 28.9, 22.0, 21.9, -0.8.”로 확인되었다.

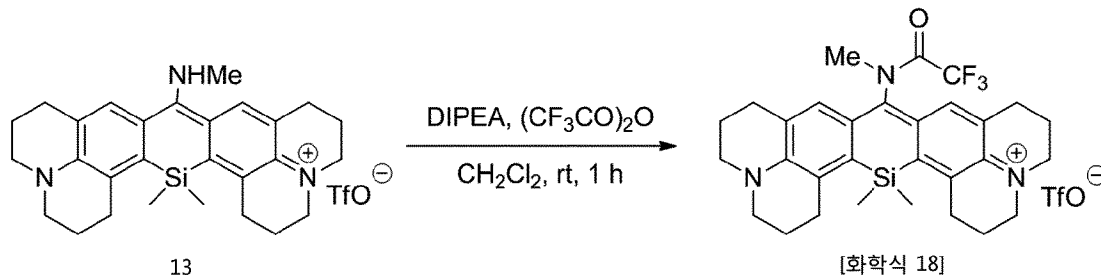
[170]

[171] 실시예 17: 화학식 18로 표시되는 화합물의 제조

[172] 하기 반응식 17의 방법으로 화학식 18로 표시되는 화합물(화합물 18)을 제조하였다.

[173] [반응식 17]

[174]



[175] 상기 화합물 18을 제조하기 위하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물 화합물 13(30 mg, 0.05 mmol)을 무수 디클로로메탄 10 mL을 이용하여 용해시킨 후에 0 °C에서 0.25 mmol의 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine, DIPEA) 44 μ L 를 첨가하고 10 분 동안 교반시킨 후에 0.15 mmol의 트리플루오로아세트산 무수물(trifluoroacetic anhydride) 21 μ L를 첨가하고 상온에서 3 시간 동안 교반시킨 후에 디클로로메탄(2×10 mL)과 1 N의 염화수소를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 녹색 고체 화합물을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 5 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 녹색 고체 화합물은 다시 HPLC(high performance liquid chromatography)로 정제하여 최종적으로 화합물 18(7 mg, 21 %)을 획득하였다. 제조된 화합물 18을 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CD_3OD , 500 MHz, 298 K): δ 7.08 (s, 2H), 3.64-3.62 (m, 8H), 3.40 (s, 3H), 2.98-2.96 (m, 4H), 2.80-2.76 (m, 4H), 2.09-2.06 (m, 4H), 2.01-1.99 (m, 4H), 0.69 (d, J = 15.0 Hz, 6H); ^{13}C NMR (CD_3OD , 125 MHz, 298 K): δ 156.5, 152.2, 142.2, 134.6, 134.2, 134.0, 133.9, 127.1, 127.1, 125.5, 123.6, 57.6, 53.3, 53.2, 52.6, 41.6, 30.9, 30.1, 28.9, 28.8, 22.0, 21.9, -0.7, -1.0.”로 확인되었다.

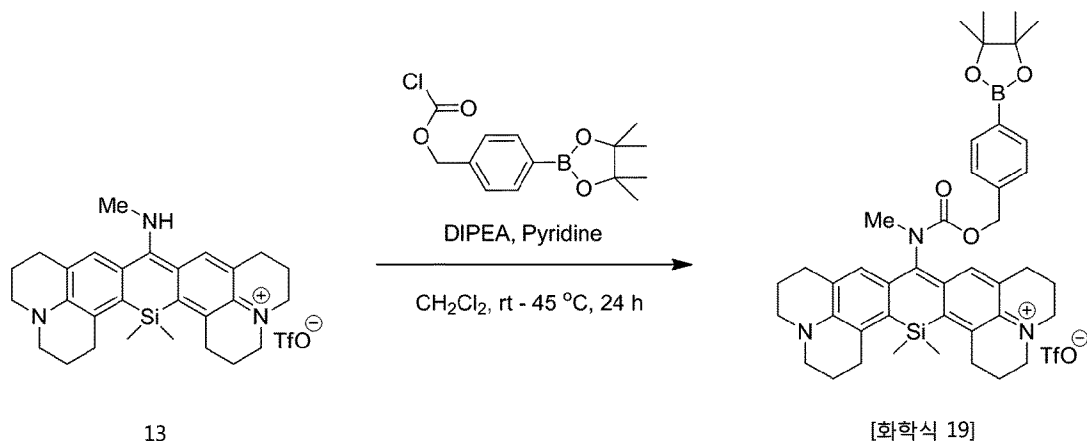
[176]

[177] 실시예 18: 화학식 19로 표시되는 화합물의 제조

[178] 하기 반응식 18의 방법으로 화학식 19로 표시되는 화합물(화합물 19)을 제조하였다.

[179] [반응식 18]

[180]



[181] 상기 화합물 19를 제조하기 위하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물 화합물 13(30 mg, 0.05 mmol)을 무수 디클로로메탄 5 mL을 이용하여 용해시킨 후에 0.25 mmol의 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine, DIPEA) 44 μ L와 0.5 mmol의 피리딘 40 μ L를 첨가하고 상온에서 10 분 동안 교반시킨 후에 0.5 mmol의 4-(피나콜보로네이트)-벤질클로로포르메이트를 첨가하고 45 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 교반시켜 혼합하였다. 그리고 혼합된 용액을 디클로로메탄(2×10 mL)과 1 N의 염화수소를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 녹색 고체 화합물을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 5 % MeOH/ CH_2Cl_2 를 사용하였다. 그리고 녹색 고체 화합물은 다시 HPLC(high performance liquid chromatography)로 정제하여 최종적으로 화합물 19(3 mg, 8 %)를 획득하였다. 제조된 화합물 19를 NMR로 관찰한 결과 “ ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz, 298 K): δ 7.62 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.05 (d, J = 10.5 Hz, 2H), 7.00 (s, 2H), 5.09 (s, 2H), 3.64-3.42 (m, 8H), 3.22 (s, 3H), 2.91-2.85 (m, 4H), 2.65 (br, 2H), 2.55 (br, 2H), 2.11-2.0 (br, m, 8H), 1.33 (s, 12H), 0.64 (s, 6H); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz, 298 K): δ 155.2, 150.9, 144.3, 141.8, 141.4, 135.3, 133.4, 132.6, 126.3, 125.6, 125.5, 124.4, 122.8, 84.0, 65.5, 52.4, 51.8, 51.7, 41.1, 29.9, 28.9, 28.2, 28.0, 25.1, 21.0, 20.9, 20.7, 1.2, 0.2, -0.7, -1.1.”로 확인되었다.

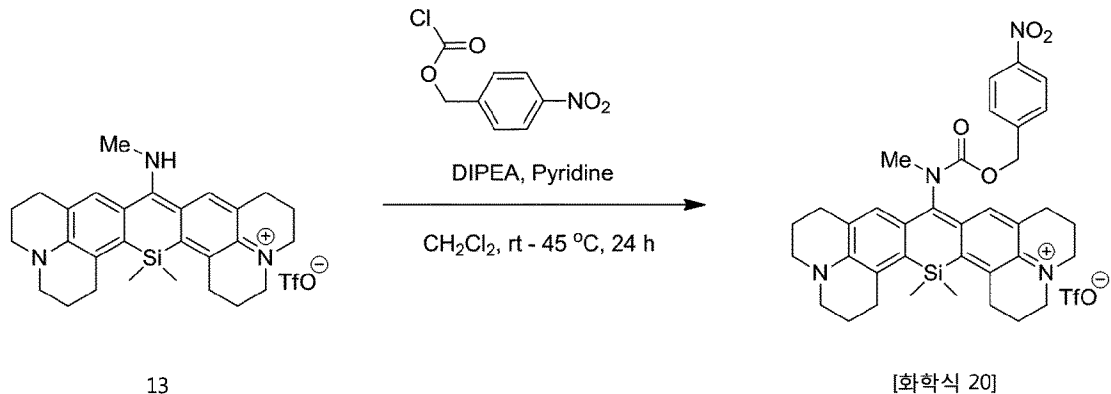
[182]

[183] 실시예 19: 화학식 20으로 표시되는 화합물의 제조

[184] 하기 반응식 19의 방법으로 화학식 20으로 표시되는 화합물(화합물 20)을 제조하였다.

[185] [반응식 19]

[186]



[187] 상기 화합물 20을 제조하기 위하여, 실시예 12와 동일한 방법으로 획득된 최종 생성물 화합물 13(30 mg, 0.05 mmol)을 무수 디클로로메탄 5 mL을 이용하여 용해시킨 후에 0.25 mmol의 디이소프로필에틸아민(Diisopropylethylamine, DIPEA) 44 μ L와 0.5 mmol의 피리딘 40 μ L를 첨가하고 상온에서 10 분 동안 교반시킨 후에 0.5 mmol의 4-니트로벤질클로로포르메이트 108 mg을 첨가하고 45 °C에서 24 시간 동안 교반시켜 혼합하였다. 그리고 혼합된 용액을 디클로로메탄(2 $\times$ 10 mL)과 1 N의 염화수소를 이용하여 추출하고, 유기층을 무수황산나트륨으로 건조시켰다. 그리고 40 mbar의 감압조건에서 용매를 제거한 후, 실리카겔(Merck-silicagel 60, 230-400 mesh)을 통과하는 관 크로마토그래피를 이용하여 정제하여 녹색 고체 화합물을 획득하였다. 정제 시에는 전개액으로 5 % MeOH/CH₂Cl₂를 사용하였다. 그리고 녹색 고체 화합물은 다시 HPLC(high performance liquid chromatography)로 정제하여 최종적으로 화합물 20(5 mg, 12 %)을 획득하였다. 제조된 화합물 20을 NMR로 관찰한 결과 “¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz, 298 K): δ 8.32 (d, J = 14.5 Hz, 2H), 7.30 (d, J = 15 Hz, 2H), 7.09 (s, 2H), 5.18 (s, 2H), 3.62-3.55 (m, 8H), 3.24 (s, 3H), 2.98-2.94 (m, 4H), 2.77-2.66 (m, 2H), 2.63-2.53 (m, 2H), 2.09-1.93 (br, m, 8H), 0.67 (d, J = 14.0 Hz, 6H).”로 확인되었다.

[188]

[189] 실시예 20: 아미노-실라-파이로닌 화합물의 광물리적 특성 확인

[190] 상기 실시예 3 내지 19와 동일한 방법으로 제조된 화합물 4 내지 20, 즉, 아미노-실라-파이로닌 화합물의 흡수 특성 및 형광 방출 특성을 확인하기 위하여, 5 μ M 농도의 화합물 4 내지 화합물 12 중 어느 하나를 포함하는 에탄올, 디옥산, 디클로로메탄, 아세토니트릴, 및 1 % DMSO를 포함하는 인산염완충용액을 통과 길이 1 cm의 석영 셀에 채워 HP8453 자외선/가시광선 분광광도계를 이용하여 자외선/가시광선(UV/Vis) 흡수 스펙트럼을 측정하고, 최대 흡수파장 값을 도 1a에 나타내었다. 또한, 10 μ M 농도의 화합물 13 내지 화합물 21 중 어느 하나를 포함하는 에탄올, 아세토니트릴, 및 1 % DMSO를 포함하는 인산염완충용액을 1 cm의 석영 셀에 채워 동일한 방법으로 자외선/가시광선(UV/Vis) 흡수 스펙트럼을 측정하고, 최대 흡수파장 값을 도

1b에 나타내었다.

[191]

[192] 실시예 21: 세포를 이용한 현미경 영상화 확인

[193] 상기 실시예 3 내지 11과 동일한 방법으로 제조된 화합물 4 내지 12를 세포의 영상화에 사용가능한지 확인하기 위하여, 화합물들을 HeLa 세포에 처리한 후에 일광자 또는 이광자 현미경을 이용하여 영상을 획득하였다. 보다 자세하게는, HeLa 세포를 10 % 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1 %의 항생제가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM) 배지에 접종하고, 5 % CO₂-95 % air 및 37 °C의 조건으로 60 mm 배양 접시에 2 × 10⁶ 세포의 밀도(density)로 배양하였다. 그리고 배양된 세포에 10 μM의 화합물 4 내지 화합물 12를 각각 처리하고 30분간 반응시킨 후에 배양액을 제거하고, 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 3회 세척하여 배양액을 깨끗이 제거하였다. 그리고 4 % 포르말데히드(formaldehyde) 용액을 넣어주어 세포를 고정시키고 일광자 현미경 또는 이광자 현미경(TCS SP5 II, Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 2a에 나타내었다.

[194] 도 2a에 나타난 바와 같이, 화합물 4 내지 화합물 12 중 어느 하나의 화합물을 처리한 세포를 일광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 488 nm 여기 파장으로 498-800 nm의 채널에서 형광이 관찰되었으며, 이광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 900 nm의 여기 파장으로 청색 채널(430-480 nm), 녹색 채널(500-550 nm), 황색 채널(565-605 nm), 및 적색 채널(625-675 nm)에서 형광이 관찰되는 것을 확인하였다.

[195]

[196] 실시예 22: 세포를 이용한 현미경 영상화 확인

[197] 상기 실시예 12 내지 18과 동일한 방법으로 제조된 화합물 13 내지 19를 세포의 영상화에 사용가능한지 확인하기 위하여, 화합물들을 A549 세포에 처리한 후에 일광자 또는 이광자 현미경을 이용하여 영상을 획득하였다. 보다 자세하게는, A549 세포를 10 % 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS) 및 1 %의 항생제가 첨가된 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM) 배지에 접종하고, 5 % CO₂-95 % air 및 37 °C의 조건으로 60 mm 배양 접시에 2 × 10⁶ 세포의 밀도(density)로 배양하였다. 그리고 배양된 세포에 1 μM의 화합물 13 내지 화합물 15, 또는 10 μM의 화합물 16 내지 19를 각각 처리하고 30 분간 반응시킨 후에 배양액을 제거하고, 인산염완충용액(phosphate buffered saline, PBS)을 이용하여 3회 세척하여 배양액을 깨끗이 제거하였다. 그리고 4 % 포르말데히드(formaldehyde) 용액을 넣어주어 세포를 고정시키고 일광자 현미경 또는 이광자 현미경(TCS SP5 II, Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다. 그 결과는 도 2b 및 도 2c에 나타내었다.

[198] 도 2b에 나타난 바와 같이, 화합물 13 내지 화합물 15 중 어느 하나의 화합물을 처리한 세포를 일광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 488 nm 여기 파장으로

500-800 nm의 채널에서 형광이 관찰되었으며, 이광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 900 nm의 여기 파장으로 500-800 nm 채널에서 형광이 관찰되는 것을 확인하였다.

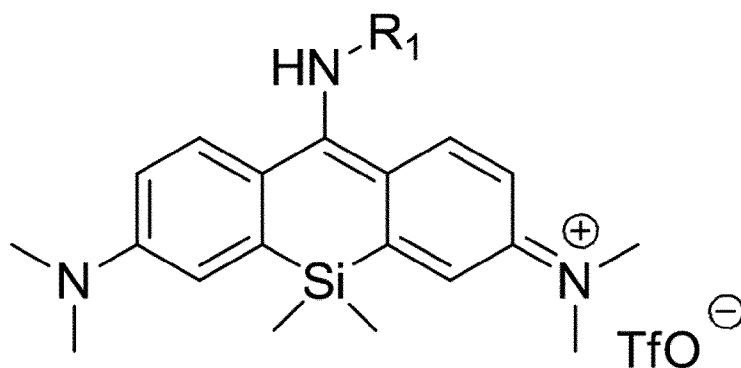
[199] 또한, 도 2c에 나타난 바와 같이, 화합물 16 내지 화합물 19 중 어느 하나의 화합물을 처리한 세포를 일광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 488 nm 및 633 nm의 여기 파장으로 각각 적색 채널(650-800 nm)과 녹색 채널(500-630 nm)에서 형광이 관찰되는 것을 확인하였고, 이광자 형광 현미경으로 관찰한 결과 900 nm의 여기 파장으로 황색 채널(565-605 nm) 및 적색 채널(625-675 nm)에서 형광이 관찰되는 것을 확인하였다.

[200]

[201] 상기 결과들을 통하여, 세포를 이용한 실험에서도 하기 화학식 1 또는 화학식 3을 기반으로 하는 다양한 화합물 4 내지 화합물 20, 모든 화합물이 세포 내에서 안정적으로 유사한 형광 방출 특성을 나타내는 것을 확인하였으며, 이를 통하여, 본 발명의 화합물 4 내지 화합물 20을 생체 영상화에 적용 가능하다는 것을 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, 본 발명의 화합물들은 모두 일광자 및/또는 이광자 흡수 형광체로 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물 또는 하기 화학식 3으로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyronin) 화합물 구조를 기반으로 하여 R기를 변화시키는 것만으로도 다양한 형광 방출 화합물을 제조할 수 있다는 것을 확인하였으며, 이를 통하여 하기 화학식 1 또는 3의 구조를 기반으로 하여 제한 없이 다양한 형질을 가지는 형광 프로브를 제조할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

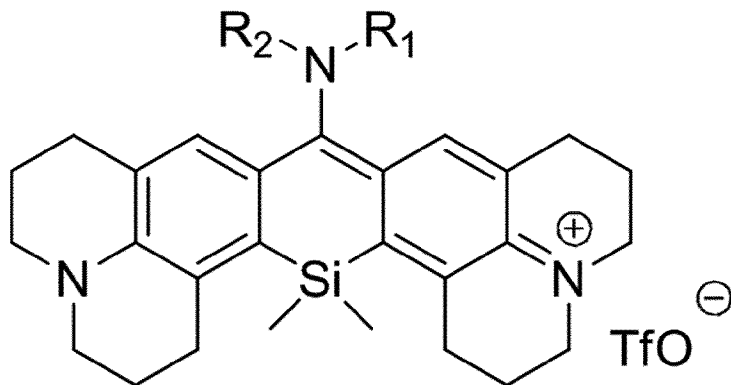
[202] [화학식 1]

[203]



[204] [화학식 3]

[205]



[206] 또한, 화합물 16의 경우에는 적색 채널에서 형광 신호가 관찰되고, 화합물 13의 경우에는 황색 채널에서 형광 신호가 관찰되는 것을 확인하였다. 이를 통하여, 화합물 16은 화합물 13에서 파생된 화합물이기 때문에, 분자내 상호교환 반응으로 2차 아민 형태의 화합물 13의 형태가 전환된다면, 스토크스 이동(stokes shift)을 통하여 두 개의 형광이 동시에 방출될 수 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 이를 이용하여 하나의 감지계가 기질을 검출할 때, 기질의 농도에 따라 그 비율이 점차 변해가는 비율 기준(ratiometric) 형광 프로브로 응용이 가능하며, 이를 통하여 본 발명의 화합물들을 비율 기반 생체 영상화에 사용 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 각각의 구조의 변화에 따라 서로 다른 형광이 관측되므로, 동시에 다양한 기질을 검출하는데 사용가능할 뿐만 아니라, 화학식 1 또는 3으로 표시되는 화합물의 일부 구조들을 변화시킴으로써 더욱 다양한 형질을 가지는 형광 프로브를 제조할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[207]

[208] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

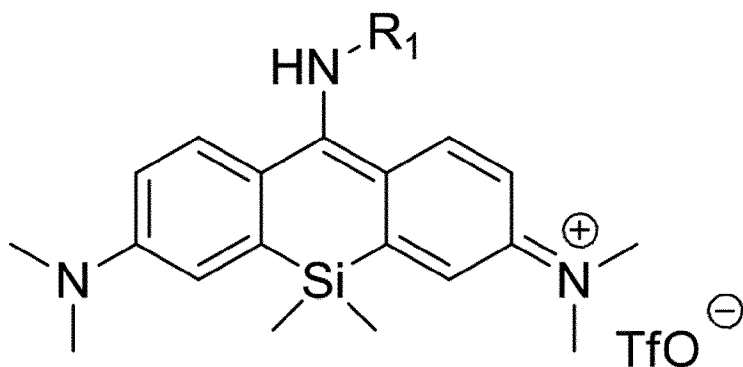
[209]

산업상 이용가능성

[210] 본 발명의 아미노-실라-파이로닌 화합물 기반 일광자 또는 이광자 흡수 형광체는 이를 기반으로 하여 다양한 특성을 가지는 형광 프로브의 개발이 가능하며, 단독으로 또는 특정 질환의 마커에 대한 표적을 결합시켜 다양한 질환을 영상화하여 진단하는데 사용 가능할 뿐만 아니라, 생체 내 특정 물질의 분석 및 영상화에 있어서 다양하게 적용가능하다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:
[화학식 1]



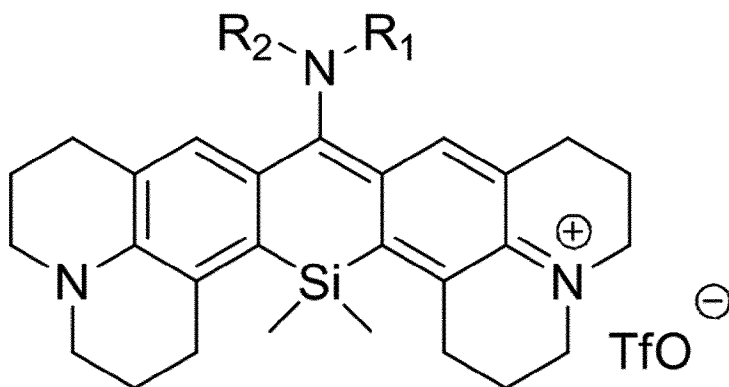
상기 화학식 1에서,

R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이다.

- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 일광자 흡수 형광체 또는 이광자 흡수 형광체인 것을 특징으로 하는, 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 625 nm 이상의 장파장 영역 또는 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 형광체인 것을 특징으로 하는, 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.

- [청구항 4] 하기 화학식 3으로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyronin) 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염:
[화학식 3]

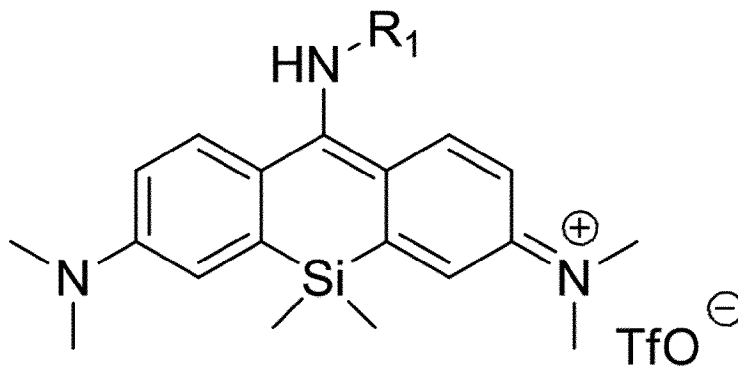


상기 화학식 3에서,

R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이며,

R_2 는 수소, 또는 치환 또는 비치환된 아실기이다.

- [청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 일광자 흡수 형광체 또는 이광자 흡수 형광체인 것을 특징으로 하는, 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 6] 제 4 항에 있어서,
상기 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염은 625 nm 이상의 장파장 영역 또는 근적외선 영역에서 형광을 방출하는 형광체인 것을 특징으로 하는, 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염.
- [청구항 7] 제 1 항 또는 제 4 항의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 세포 또는 조직에 처리하고 관측하는 단계를 포함하는, 세포 또는 조직의 영상화(imaging) 방법.
- [청구항 8] 제 7 항에 있어서,
상기 관측하는 단계는 일광자 형광 현미경 또는 이광자 형광 현미경을 이용하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [청구항 9] 제 1 항 또는 제 4 항의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 진단용 조성물.
- [청구항 10] (a) 3,7-비스(디메틸아미노)-5,5-디메틸디벤조[b,e]실린-10(5H)-온에 트리플루오로메탄설폰산 무수물을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
(b) 상기 혼합물에 아민을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 아미노-실라-파이로닌(Amino Si-pyronin) 화합물의 제조 방법:
[화학식 1]

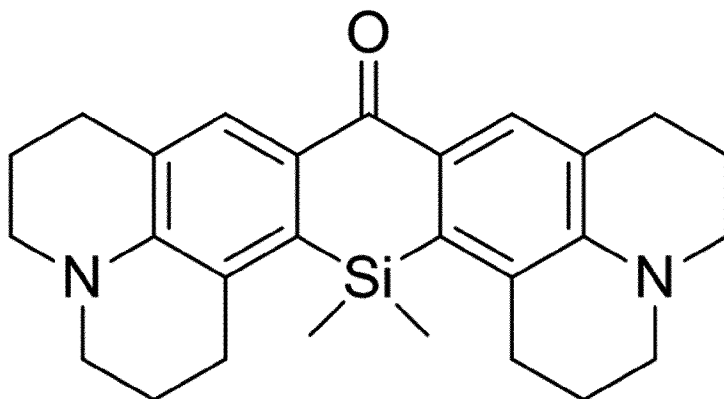


상기 화학식 1에서,

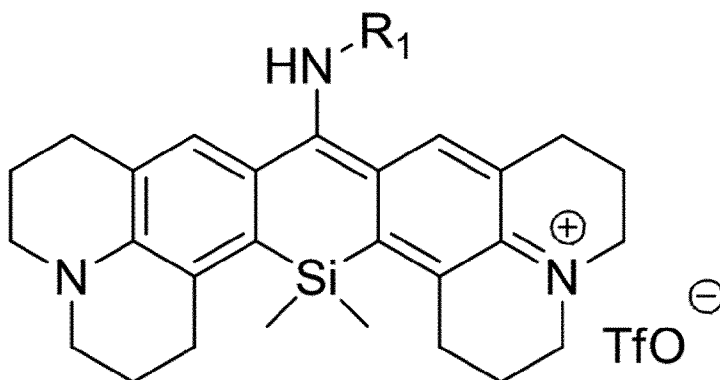
R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이다.

- [청구항 11] (a) 하기 화학식 22로 표시되는 화합물에 트리플루오로메탄설폰산 무수물을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
(b) 상기 혼합물에 아민을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 2로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyronin) 화합물의 제조 방법:

[화학식 22]



[화학식 2]



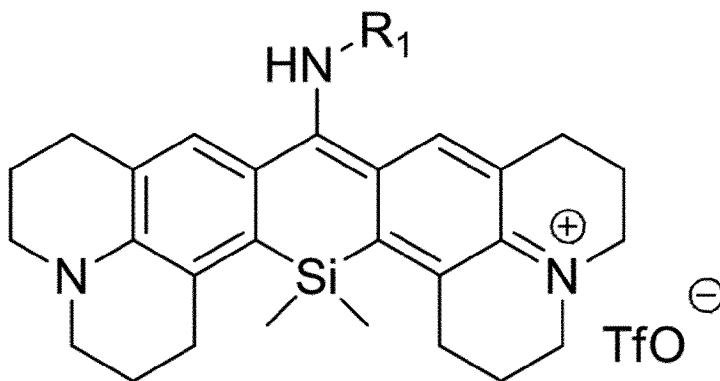
상기 화학식 2에서,

R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이다.

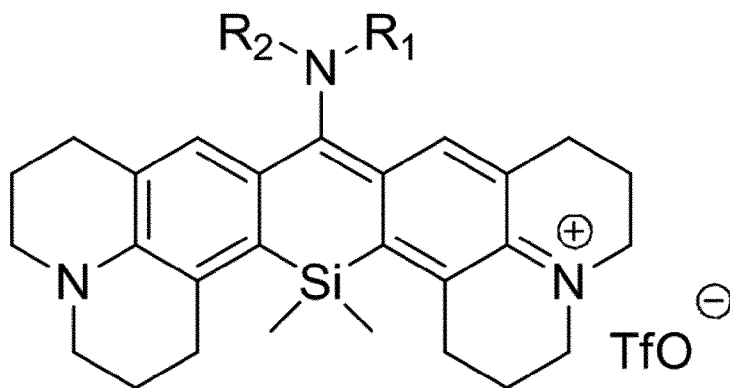
[청구항 12]

(a) 하기 화학식 2로 표시되는 화합물에 디이소프로필에틸아민 및 피리딘을 첨가하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
 (b) 상기 혼합물에 아실화 반응을 위한 화합물을 첨가하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 3으로 표시되는 줄로리딘 기반 아미노-실라 파이로닌(julolidine-based amino-Si-pyrone) 화합물의 제조 방법:

[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식 2 및 3에서,

R_1 은 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 18의 알킬기이며,

상기 화학식 3에서,

R_2 는 치환 또는 비치환된 아실기이다.

[청구항 13] 제 1 항 또는 제 4 항의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염을 체내 또는 조직에 투여하여, 진단용 형광 영상을 획득하는 방법.

[청구항 14] 제 1 항 또는 제 4 항의 화합물 또는 이들의 약학적으로 허용가능한 염의 진단 용도.

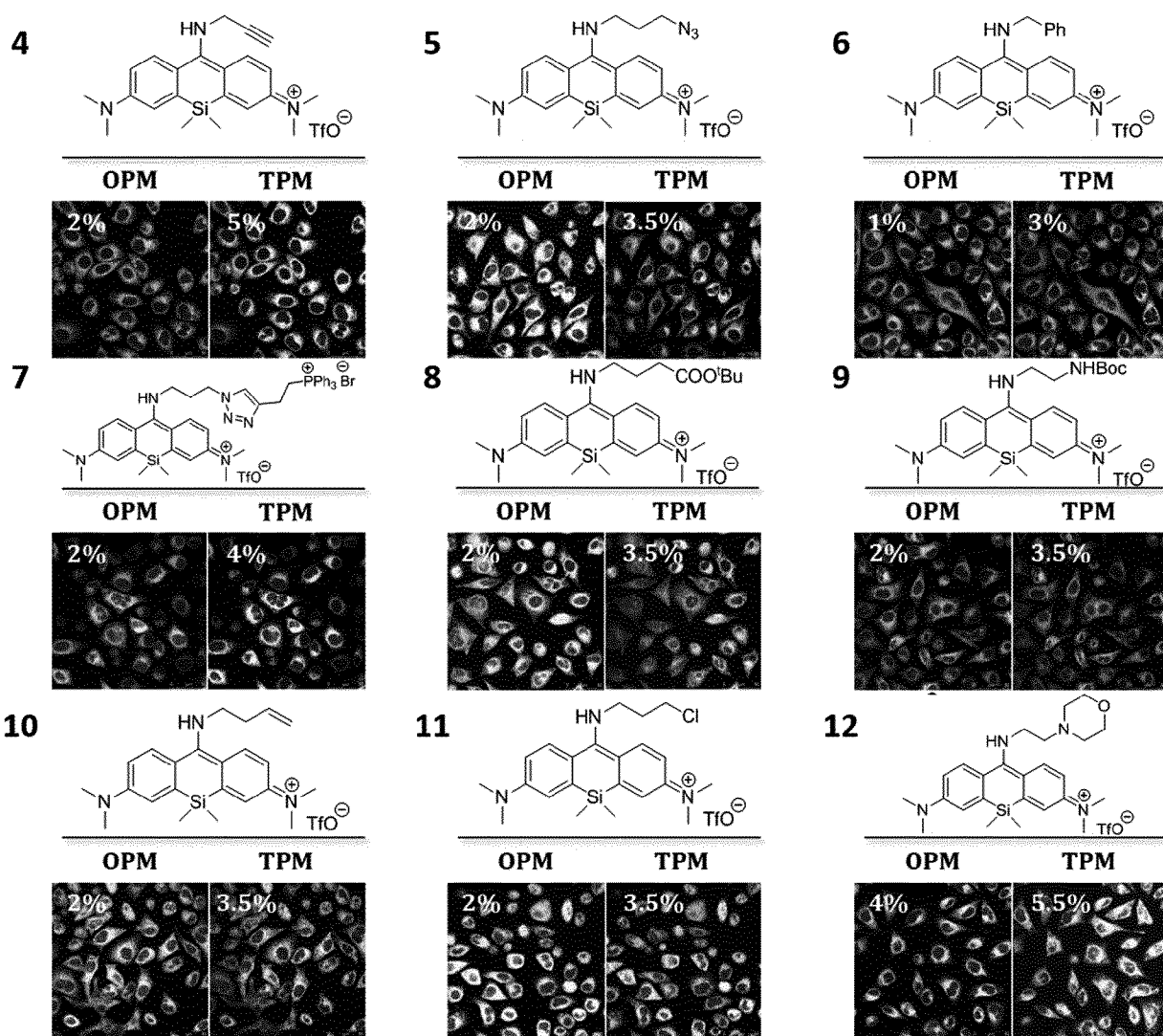
[도 1a]

화합물	4 (Abs) Abs Emi	5 (Abs) Abs Emi	6 (Abs) Abs Emi	7 (Abs) Abs Emi	8 (Abs) Abs Emi	9 (Abs) Abs Emi	10 (Abs) Abs Emi	11 (Abs) Abs Emi	12 (Abs) Abs Emi
Ethanol	(322) 478 610	(319) 468 602	(322) 472 602	(321) 470 596	(319) 465 598	(322) 467 595	(319) 465 593	(321) 465 594	(321) 461 595
Dioxane	(318) 468 540	(319) 457 582	(319) 441 564	(319) 453 573	-	-	-	-	-
Dichloromethane	(322) 478 625	(389) 477 607	(322) 475 603	(322) 473 591	-	-	-	-	-
Acetonitrile	(320) 422 616	(320) 467 602	(320) 476 601	(319) 476 606	-	-	-	-	-
PBS buffer	473 628	460 615	469 623	468 615	-	-	-	-	-

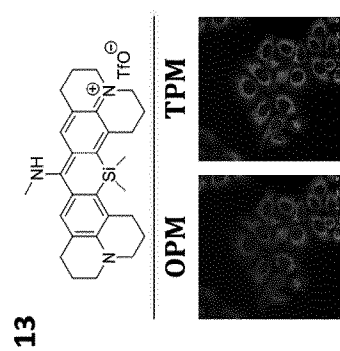
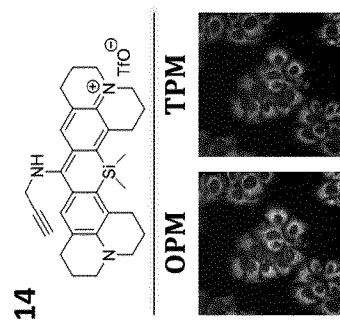
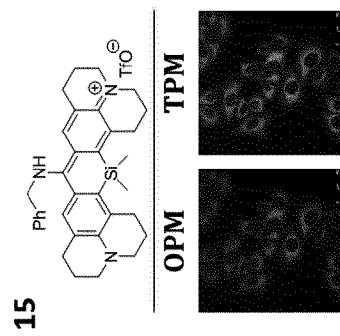
[도 1b]

Compound	13 Abs Emi	14 Abs Emi	15 Abs Emi	16 Abs Emi	17 Abs Emi	18 Abs Emi	19 Abs Emi	20 Abs Emi
Ethanol	487 628	510 644	502 632	669 688	702 717	705 717	-	-
Acetonitrile	488 640	515 654	506 642	669 688	700 714	700 713	-	-
PBS buffer	481 655	509 662	501 656	669 685	702 715	703 714	704 712	703 712

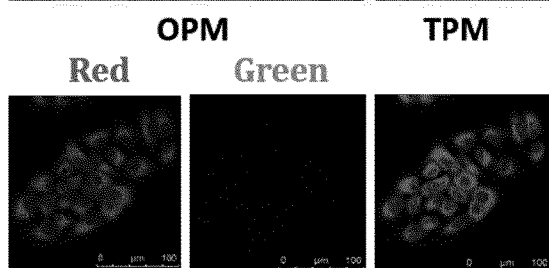
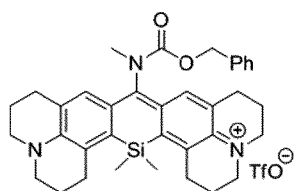
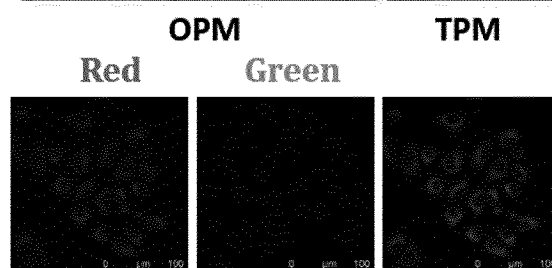
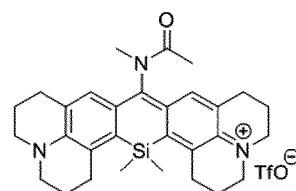
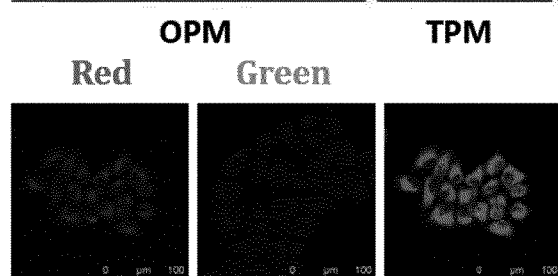
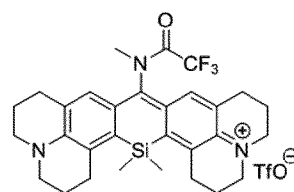
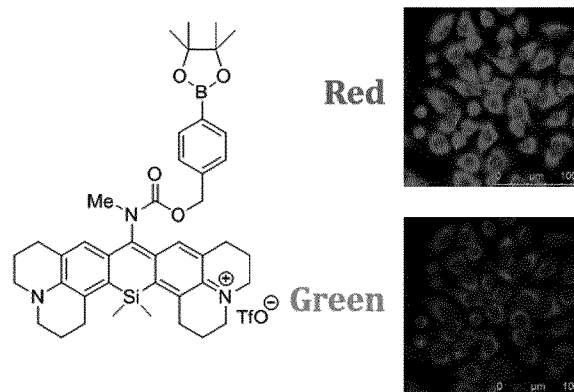
[도2a]



[도2b]



[도2c]

16**17****18****19**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010154

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07F 7/08(2006.01)i, A61K 49/00(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)

C07F 7/08; C07D 491/00; C09B 56/00; G01N 21/64; A61K 49/00

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) & Keywords: Amino Si-pyronin, trifluoromethanesulfonic acid anhydride, two-photon, phosphor, long wavelength area, near-infrared area

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BUTKEVICH, A. N. et al., "Cell-Permeant Large Stokes Shift Dyes for Transfection-Free Multicolor Nanoscopy", J. Am. Chem. Soc., 28 August 2017, vol. 139, pages 12378-12381 See abstract; pages 12378-12380; figures 1-2; table 1.	1-12,14
Y	HORVATH, P. et al., "Small-Molecule Fluorophores with Large Stokes Shifts: 9-Iminopyronin Analogues as Clickable Tags", J. Org. Chem., 08 December 2014, vol. 80, no. 3, pages 1299-1311 See abstract; formula 1; page 1300.	1-12,14
A	MUDD, G. et al., "A General Synthetic Route to Isomerically Pure Functionalized Rhodamine Dyes", Methods Appl. Fluoresc., 14 October 2015, vol. 3, pages 1-6 See the entire document.	1-12,14
A	WO 2015-097262 A1 (PARIS SCIENCES ET LETTRES-QUARTIER LATIN) 02 July 2015 See the entire document.	1-12,14
A	WO 2016-109733 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 07 July 2016 See the entire document.	1-12,14



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

02 JANUARY 2019 (02.01.2019)

Date of mailing of the international search report

02 JANUARY 2019 (02.01.2019)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2018/010154

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 13 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2018/010154

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
WO 2015-097262 A1	02/07/2015	EP 2889299 A1	01/07/2015
WO 2016-109733 A1	07/07/2016	US 2018-0244643 A1	30/08/2018

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07F 7/08(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07F 7/08; C07D 491/00; C09B 56/00; G01N 21/64; A61K 49/00

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) & 키워드: 아미노-실라-파이로닌, 트리플루오로메탄설폰산 무수물, 이광자, 형광체, 장파장 영역, 근적외선 영역

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	BUTKEVICH, A. N. 등, "Cell-Permeant Large Stokes Shift Dyes for Transfection-Free Multicolor Nanoscopy", J. Am. Chem. Soc., 2017.08.28, 제139권, 페이지 12378-12381 초록; 페이지 12378-12380; 도면 1-2; 표 1 참조.	1-12,14
Y	HORVATH, P. 등, "Small-Molecule Fluorophores with Large Stokes Shifts: 9-Iminopyronin Analogues as Clickable Tags", J. Org. Chem., 2014.12.08, 제80권, 제3호, 페이지 1299-1311 초록; 도식 1; 페이지 1300 참조.	1-12,14
A	MUDD, G. 등, "A general synthetic route to isomerically pure functionalized rhodamine dyes", Methods Appl. Fluoresc., 2015.10.14, 제3권, 페이지 1-6 전체 문헌 참조.	1-12,14
A	WO 2015-097262 A1 (PARIS SCIENCES ET LETTRES - QUARTIER LATIN) 2015.07.02 전체 문헌 참조.	1-12,14
A	WO 2016-109733 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 2016.07.07 전체 문헌 참조.	1-12,14

☐ 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

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2019년 01월 02일 (02.01.2019)

국제조사보고서 발송일

2019년 01월 02일 (02.01.2019)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

남의호

전화번호 +82-42-481-5580



제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 13
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 해당합니다(PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

WO 2015-097262 A1

2015/07/02

EP 2889299 A1

2015/07/01

WO 2016-109733 A1

2016/07/07

US 2018-0244643 A1

2018/08/30