

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2025년 1월 16일 (16.01.2025) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호
WO 2025/014216 A1

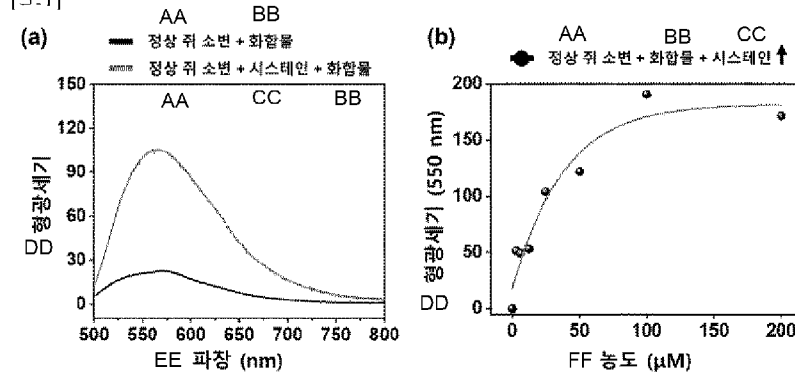
- (51) 국제특허분류:
G01N 33/58 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2024/009652
- (22) 국제출원일: 2024년 7월 8일 (08.07.2024)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2023-0089244 2023년 7월 10일 (10.07.2023) KR
- (71) 출원인: 경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR). 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울특별시 종로구 대학로 101, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 김도경 (KIM, Dokyoung); 02790 서울특별시 성북구 화랑로 214, 106동 802호, Seoul (KR). 민상일

- (MIN, Sang Il); 06361 서울특별시 강남구 일원로 127, 107동 102호, Seoul (KR). 안종민 (AN, Jongmin); 02826 서울특별시 성북구 아리랑로5길 50-8, 101-1102, Seoul (KR). 우혜영 (WOO, Hye Young); 02720 서울특별시 성북구 길음로 33, 815동 504호, Seoul (KR). 박민영 (PARK, Min Young); 03082 서울특별시 종로구 대학로 5길 15-6, 102호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 위병갑 (WIE, Byoung Gap); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: IDENTIFICATION OF ACUTE KIDNEY INJURY AFTER ISCHEMIA-REPERFUSION BY USING CYSTEINE-SENSITIVE FLUORESCENT PROBE, AND APPLICATION THEREOF

(54) 발명의 명칭: 시스테인 감응 형광 프로브를 이용한 허혈재관류 후 급성 신장 손상 확인 및 이의 응용

[도 1]



AA ... Normal rat urine
BB ... Compound
CC ... Cysteine
DD ... Fluorescence intensity
EE ... Wavelength
FF ... Concentration

(57) Abstract: The present invention relates to: a fluorescent probe compound containing a 4-nitro-7-perfluorophenoxybenzo[c][1,2,5]oxadiazole structure for cysteine detection; a composition comprising same for diagnosing delayed graft function due to ischemia-reperfusion injury; and a method for providing information for diagnosing delayed graft function due to ischemia-reperfusion injury using the composition, wherein the compound of the present invention can be easily and conveniently synthesized and can exhibit values of intense fluorescence in urine and kidneys of patients with delayed graft function, which may occur after transplantation of a kidney from a brain-dead person, and thus can be usefully employed for diagnosing the onset of delayed graft function due to ischemia-reperfusion injury by detecting cysteine in cells and animal- and human-derived samples, particularly in urine or kidney tissues.

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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,
ME, 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 4-니트로-7-페플루오로펜옥시벤조[c][1,2,5]옥사디아아졸 구조를 포함하는 시스테인 감지를 위한
형광 프로브 화합물, 이를 포함하는 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단용 조성물 및 이를 이용한 허혈-
재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것으로, 본 발명의 상기 화합물은 쉽고
간편하게 합성될 수 있으며, 뇌사자로부터의 장기이식 후 일어날 수 있는 이식신 기능 지연 환자의 소변 및 신장에서
강한 형광 값을 나타낼 수 있으므로, 세포, 동물 및 인간유래 시료, 특히, 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인 검출을
통한 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 발병 진단 용도로 유용하게 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 시스템인 감응 형광 프로브를 이용한 허혈-재관류 후 급성 신장 손상 확인 및 이의 응용

기술분야

- [1] 본 발명은 시스템인 감응 형광 프로브 화합물을 포함하는 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단용 조성물 및 이를 이용한 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 말기 장기부전증 환자의 이상적 치료방법 중 하나는 장기이식이다. 장기이식의 공여자로는 주로 뇌사 상태의 환자이다. 일반적으로 뇌사 상태 환자의 건강한 신장을 수여자에게로 이식하는 동안 건강한 신장은 허혈-재관류에 노출되게 된다. 허혈이란, 혈관의 막힘 그리고 좁아짐과 같은 현상으로 인해 조직이 손상을 입는 과정이다. 뇌사 상태의 환자로부터 수여자에게 장기이식을 진행할 때에 위의 과정은 피할 수 없는 과정이며, 허혈로 인한 손상을 최소화하기 위해서 신속한 재관류는 현재의 필수적인 치료법이다. 하지만, 신속한 재관류를 진행하더라도 많은 이식환자들은 이식 후 급성신손상(Acute kidney injury, AKI) 및 이식신 기능저하(Delayed graft function, DGF)를 겪게 되고, 이로 인한 좋지 않은 예후를 보이게 된다. 이를 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, I/R injury)라고 하며 허혈-재관류 과정에서의 혈관내피세포 기능저하 및 신장조직의 손상에 의한 것이다. 주된 손상은 허혈 후 재관류 시 유입되는 혈액 속 산소로 인한 증가된 활성산소가 원인일 수 있다. 활성산소란, 반응성 증가된 여러 종류의 산소로 과산화수소, 초과산화물, 하이드로퍼옥실, 그리고 히드록시라디칼 등이 존재한다. 활성산소는 주로 산소를 소비하는 호기성 생물계에서 생성되며, 암을 비롯한 다양한 질병을 일으키는 원인으로 알려져 있다. 활성산소에 저항하기 위해서 세포는 외부로부터 시스템을 가져오면서 내부에서 효소반응을 통해 시스템인의 양을 증가시킨다. 또한, 세포 내부 자체적으로 시스템을 아미노산을 과생산한다. 시스템인은 황을 포함한 아미노산으로 높은 활성산소 레벨에서 산화되어 활성산소의 양을 억제하는 특징이 있다. 이러한 배경을 바탕으로 허혈-재관류를 겪은 공여자의 신장에서는 높은 활성산소를 바탕으로 하는 시스템인의 과생산 과정이 예측된다. 또한 이는 허혈-재관류에 의한 급성 신손상 및 이식 신기능저하에 대해 시스템인이 바이오마커로서의 가능성을 가짐을 보여줄 수 있다.
- [3] 의료현장에서 사용하는 허혈-재관류에 의한 신장 손상의 진단법은 신장 기능 평가에 의존적이다. 즉, 기본적으로는 혈청 크레아틴의 농도, 시스템인C, 소변의 양을 측정하는 것이다. 하지만, 이 방법은 조직학적으로 신손상 정도에 비의존적이기 때문에 허혈-재관류 손상을 특이적으로 예측하는 기법이 될 수 없다. 또한, 대부분 진단 과정은 단일 과정이 아닌 복합과정을 거치기 때문에 시간 및 비용

소모가 크며 의사의 경험적 판단이 기준이 된다. 따라서, 시간 및 비용의 소모를 줄이며 의사의 객관적 판단을 돕는 새로운 진단법은 극복해야할 필수적인 과제이다.

- [4] 인체의 장기 중 신장은 내인성 황화수소 생성을 조절하는 데 중요한 역할을 한다. 황화수소는 시스타티오닌- γ -리아제(CSE)를 통해 조직 IRI에 대한 항산화 물질로서 생성된다. 또한, CSE mRNA 발현이 허혈 및 재관류 직후에 증가하는 것으로 보고됨에 따라 IRI에서 CSE를 통한 시스테인의 증가가 예측된다. 시스테인은 글루타티온의 필수 기질이며 항산화 방어 시스템에서 중요한 역할을 하며 항산화제와 관련된 다양한 메커니즘에 관여하기 때문에 질병에 대한 바이오마커로 인식된다. 하지만, 티올 그룹의 중요성에도 불구하고, 생체 내 티올 그룹을 감지하는 것에 기존의 방법은 여러 장애물이 있다. 티올 그룹을 측정하는 방법은 질량 분석법, HPLC, 전압전류법, 모세관 전기 영동법 등이 알려져 있으나, 그 분석 과정이 복잡할 뿐 아니라, 많은 시간과 비용이 소모된다는 단점이 있다. 또한, 실시간으로 생체 내에서 관찰하는 것이 불가능하다.

- [5] 형광 분자 프로브 분야는 생체 내의 다양한 분자, 분자의 활성, 단백질, 단백질의 활성 등을 시각적으로 관찰하기에 편리하여 많은 개발이 이뤄지고 있고 많은 연구들에서 활용하고 있는 분야이다. 특히, 생체 내 대사물질을 높은 민감도와 특이도를 가지고 검출하기에 뛰어난 활용도를 보인다. 덧붙여 실시간으로 대사물질 및 단백질 등을 관찰하기 용이하여, 그 중요성이 향후 더욱 부가되는 추세이다. 현재까지 개발된 형광 분자 프로브 중에 티올 그룹 중 하나인 시스테인을 선택적으로 감지하는 형광 분자 프로브는 그 개발이 어려웠다. 또한 그 구조는 구조적으로도 매우 복잡하였다. 시스테인을 선택적으로 감지하기 어려운 이유는 호모시스테인과의 구조적 유사성(호모시스테인 탄소개수 - 시스테인 탄소개수 = 1, 탄소 개수의 하나 차이)으로 인한 문제가 가장 크다. 시스테인과 호모시스테인을 구별하기 위해선, 높은 친전자핵(Electrophilic)과 친핵체가 공격하기 쉬운 작은 스테릭 밀도를 가진 구조가 전제되어야 했다. 또한 형광을 유발하기 위하여, Intramolecular charge transfer(ICT), Forster resonance energy transfer(FRET), Photoinduced proton transfer(PET), Excited state intramolecular proton transfer(ESIPT) 등과 같은 원리를 사용한 형광 분자 프로브들이 개발되어 왔다. 통상적으로, 생체 대사물질을 검출하기 위한 형광 분자 프로브는 형광-꺼짐, 형광-꺼짐, 그리고 형광-변화 시스템으로 디자인된다. 이중 형광-꺼짐 시스템의 형광 분자 프로브는 형광-꺼짐의 시스템보다 생체 내에서 낮은 오류 잠재력을 가지고 높은 해상도와 민감도를 가진다는 것이 특징이다. 또한, 형광-꺼짐 시스템은 형광-변화 시스템보다 높은 해상도로 생체 내에서의 실시간 영상화에서 안정적으로 영상화를 도와줄 수 있다. 이러한 이유로, 형광-꺼짐 시스템을 가진 시스테인 감지 형광 프로브의 개발은 그 중요성에도 불구하고 여전히 매우 도전적 과제로 남아있으며, 이를 개발하는 것은 다양한 질병을 진단하고 나아가 극복하는데 중요한 과제이다.

- [6] 이에, 본 발명자들은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 형광 프로브를 개발하여 소변 내의 시스테인을 검출하여 뇌사자로부터의 장기이식으로 인한 IRI에 의한 DGF를 예측하였고자 하였고, 이를 세포, 동물, 인간유래물(소변)에서 검증함으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 제조 가능한 시스테인 감응 형광 프로브 화합물을 이용하여, 소변 또는 신장조직 내 시스테인 검출을 통한 허혈-재관류 손상(IRI)에 의한 이식신 기능 지연(DGF)을 예측하기 위한 조성물 및 진단 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [8] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [9] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물을 제공한다:
- [10] [화학식 1]
- [11] 
- [12] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [13] 일 구현예에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kidney injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것일 수 있고, 바람직하게는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것일 수 있다.
- [14] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것일 수 있다.
- [15] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것일 수 있다.
- [16] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것일 수 있다.
- [17] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내 시스테인의 티올기(-SH)가 상기 화합물의 분자 내 탄소를 공격하여 에테르결합(ether linkage)이 깨어지고 시스테인과 결합한 뒤 스마일 재배열(Smile-rearrangement) 후 형광을 나타내는 것일 수 있다.
- [18] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내의 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.

- [19] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물이 처리되기 전의 시료보다 처리 후의 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하가 발병된 것으로 판정할 수 있는 것일 수 있다.
- [20] 일 구현예에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것일 수 있고, 바람직하게는 소변 또는 신장조직인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [21] 본 발명에 따른 4-니트로-7-퍼플루오로펜옥시벤조[c][1,2,5]옥사다디아졸 화합물(화합물 1)은 쉽게 제조할 수 있고, 상기 화합물 1을 이용하여 소변 내, 그리고 신장 내의 시스테인을 영상화할 수 있다. 특히, 본 발명에 따른 상기 화합물 1을 이용하여 세포 수준, IRI 동물모델의 소변 및 신장의 영상화 분석, 더 나아가 뇌사 기증자로부터의 소변을 분석함으로써 IRI에 의한 DGF를 조기 예측 및 진단이 가능한 효과가 있다.
- [22] 본 발명의 화합물 1을 이용한 IRI에 의한 DGF 진단용 조성물 및 진단 방법 기술은 세포, 동물, 그리고 인간유래물(소변 및 신장조직)에서 검증됨에 따라, 결과에 대한 신뢰도가 높으며 충분한 임상적 가치를 가지며, 즉각적인 사업화가 가능함을 제시함에 부족함이 없고, 향후 기술의 사업화 전망이 분명하다고 할 수 있다. 또한, 본 발명의 화합물 1은 분자 진단 분야에서 접근하기 어려운 대사물질에 초점을 맞추었기 때문에 기존의 분자 진단법, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(Polymerase chain reaction; PCR) 및 웨스턴 블랏(Western blot)으로는 검출하기 힘든 대사물질을 빠른 시간 내에 검출할 수 있음에 높은 기술 혁신성이 부여된다.

도면의 간단한 설명

- [23] 도 1은 정상 쥐 소변에서 시스테인을 추가했을 때, 화합물 1의 형광 변화를 스펙트럼으로 확인한 결과이다. 형광 스펙트럼은 488 nm 여기 파장으로부터 획득하였다.
- [24] 도 2는 시스테인 및 시스테인의 억제제를 처리한 정상 쥐 신장에서 화합물 1의 형광 변화를 형광 조직 영상화 시스템으로 측정(a) 및 광점 효율값(b)을 확인한 결과이다.
- [25] 도 3은 저산소조건상의 HK-1 세포 수준에서 화합물 1의 형광 영상화 결과를 공초점 현미경으로 확인한 결과(a) 및 형광강도를 정량화한 결과(b)이다.
- [26] 도 4는 허혈-재관류 동물모델로부터의 신장을 화합물 1로 처리하여 형광 조직 영상화 시스템으로 측정(a) 및 광점 효율값(b)을 확인한 결과와 이광자 여기 형광 현미경(c)으로 확인한 결과이다.
- [27] 도 5는 허혈-재관류 동물모델의 소변과 뇌사자로부터의 장기이식 후 환자의 소변을 화합물 1로 처리하여 형광 강도를 측정한 결과이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [28] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [29] 본 발명자들은 간단하여 대량 합성이 가능한 합성법으로 시스테인 감응 형광 프로브 화합물을 개발하여, 소변 내의 시스테인을 검출하여 뇌사자로부터의 장기이식으로 인한 IRI에 의한 DGF를 예측하였고자 한 결과, DGF 환자군의 소변에서 높은 형광-켜짐 신호가 관찰됨을 확인하였으며, 이를 통해 소변 내의 시스테인의 DGF의 새로운 바이오마커로서의 가능성 및 본 형광 프로브 화합물의 IRI에 의한 DGF의 기준지표로서의 적용 가능성을 확인하고, 이를 세포, 동물, 인간 유래물(소변)에서 검증함으로써, 본 발명을 완성하였다(실시예 1 내지 6 참조).
- [30] 일 측면에서, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물에 관한 것이다:
- [31] [화학식1]
- 
- [32] 본 발명의 실시예에서는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 4-니트로-7-퍼플루오로펜옥시벤조[c][1,2,5]옥사다리아졸로 동정하였고, 본 명세서에서는 이를 '화합물 1'로 표기하였다(실시예 1 참조).
- [33] 일 구현예에 있어서, 상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kidney injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것일 수 있고, 바람직하게는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것일 수 있다.
- [34] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것일 수 있다.
- [35] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것일 수 있다.
- [36] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 호모시스테인, 글루타치온, 및 황화수소로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상이 포함된 시료와 반응하였을 때보다, 시스테인이 포함된 시료와 반응하였을 때 더 높은 세기의 형광 신호를 발하는 것일 수 있다. 상기 생체 분자들은 호모시스테인, 글루타치온, 황화수소, 아스파르트산, 글루타민, 라이신, 아르기닌, 아데노신 삼인산, 당(Sucrose), 암모늄(Ammonium), HSA(Human serum albumin), PbCl₂, MgCl₂, FeCl₃, Hg(NO₃)₂, CdCl₂, ZnCl₂, NiCl₂, CoCl₂, NaCl, AuCl₃, AgCl, CuCl₂, 및 KCl으로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [37] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내 시스테인의 티올기(-SH)가 상기 화합물의 분자 내 탄소를 공격하여 에테르결합(ether linkage)이 깨어지고 시스테인과 결합한 뒤 스마일 재배열(Smile-rearrangement) 후 형광을 나타내는 것일 수 있다.

- [38] 일 구현예에 있어서, 상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내의 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.
- [39] 본 발명의 상기 "형광-켜짐(fluorescence turn-on)" 특성은 검출하고자 하는 대상 물질의 비존재(부재) 하에서는 형광을 발하지 않으며, 육안으로 식별하지 못하지만, 검출 대상 물질이 존재할 경우 검출 대상 물질과 반응하여 형광을 발하는 특성을 의미한다.
- [40] 본 발명의 일 예에 따른 화합물 1과 같은 "형광-켜짐" 기준 시스템의 경우, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질이 존재하지 않을 시 형광이 존재하지 않거나, 육안으로 식별하지 못할 정도의 약한 형광만이 존재하다가, 검출 대상 물질의 존재에 의해 명확한 형광(최소 10배 이상의 형광세기 증가)이 발생하게 되므로, 생체 내 조직, 생체에서 분리된 조직 또는 기타 시료에서 검출 대상 물질의 검출 여부를 시각적으로 명확히 판별할 수 있다.
- [41] 본 발명의 상기 화합물이 나타내는 형광 켜짐은 시스테인과 접촉하기 전에는 형광을 발하지 않고, 시스테인과 접촉하여 형광을 발하는 것을 의미할 수 있다. 이에, 상기 화합물을 시스테인 감응성 형광 프로브로 사용될 수 있으며, 소변 또는 신장조직 내 시스테인 검출을 통한 IRI에 의한 DGF 진단을 위해 사용될 수 있다.
- [42] 본 발명에서, 용어 '프로브'는 '센서'라고도 하며 생체 내/외 표적을 검출하거나, 영상화할 수 있는 것으로 정의된다. 일반적으로 영상화제, 조영제, 방사성 의약품 등의 용어로 대체하여 사용되고 있다.
- [43] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 화합물은 전자를 당기는 이산화질소(NO_2) 그룹과 이의 파라(-para) 위치에 전자를 당기는 펜타플루오로페놀이 존재하여 형광이 보이지 않지만, 시스테인과 결합하여 파라 위치에 전자를 주는 시스테인의 아민기(NH_2)가 도입되었을 때, 550 nm 근방에서 형광-켜짐 현상이 관찰되고, 전자가 부족한 방향족 고리 화합물이 존재하였을 때, 호모시스테인 그리고 글루타치온 등의 티올의 간섭을 받지 않고 시스테인에서만 형광-켜짐 현상이 일어나는 것일 수 있다.
- [44] 본 발명의 일 실시예에서는 상기 화합물 1이 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 반응하여 형광-켜짐 현상이 일어나며(실시예 2 내지 4), 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어남을 확인하여 허혈-재관류 환자 유래 소변 또는 신장조직 내에 시스테인이 정상군보다 많이 존재할 수 있다는 것을 확인하였다(실시예 5 내지 6). 이러한 결과를 통해, 상기 화합물 1은 소변 또는 신장조직 내 시스테인 형광 검출을 통해 IRI에 의한 DGF를 조기에 진단할 수 있는 가능성을 확인하였다.
- [45] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재, 특징, 질병의 진행 경과, 치료 시 질환의 치료 효과 등을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 진단은 시스테인을 소변 또는 신장조직에서 검출함으로써 신장 손상 또는 신기능 저하,

바람직하게는 IRI에 의한 DGF를 진단하는 것을 의미하나, 이에 제한되지 않는다.

- [46] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 화합물을 정맥투여 하였을 때, 4시간 후 IRI 동물모델의 소변 및 신장 내에서 형광-켜짐 현상이 일어남에 따라 상기 동물모델의 소변 및 신장에서 시스테인을 검출하는 것일 수 있으나, 투여 방법 및 순환시간에 대한 것은 특정한 시점이 아닌 것으로 위 조건으로 한정되지는 않는다.
- [47] 일 구현예에 있어서, 본 발명의 조성물은 상기 화합물 외에 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액 중에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있으며, 용매, 버퍼 용액 또는 이들의 혼합물에 전술한 화합물을 첨가하고, 여기에 산 및/또는 염기를 첨가하여 준비될 수 있다. 또한 상기 조성물은 당해 기술분야에서 사용할 수 있는 다른 첨가제를 추가적으로 포함할 수 있다. 상기 조성물이 포함하는 용매, 산, 염기, 및 버퍼 용액의 함량은 요구되는 성능에 따라 적절히 조절될 수 있다. 상기 용매는 물, THF, 메탄올, 에탄올, HI 수용액, *N,N*-디메틸포름아미드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또는 상기 조성물은 생체 시료와 혼합될 수 있다.
- [48] 상기 생체 시료는 인간, 동물(설치류, 포유류 등)로부터 분리된 세포, 조직, 체액(침 등), 혈액, 척수액, 뇌척수액, 혈청, 혈장, 뇨 또는 변 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 뇨(소변), 신장세포 또는 신장조직일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 당해 기술분야에서 생물학적 시료로 사용할 수 있는 것이라면 모두 가능하다.
- [49] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 본 발명의 상기 화합물은 소변 및 신장조직 내 시스테인 감지가 가능할 뿐 아니라, 시스테인이 소변 또는 신장조직 내 많이 축적된 질병들에 대한 조기 진단 예측용 소재로서의 활용가치가 높다.
- [50] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [51] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 화합물, 신장 손상, 신기능 저하 및 진단에 대한 설명은 전술한 바와 같다.
- [52] 일 구현예에 있어서, 상기 시료는 생물학적 시료인 것일 수 있고, 바람직하게는 소변 또는 신장조직인 것일 수 있다.
- [53] 일 구현예에 있어서, 상기 방법은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계(단계 1); 상기 단계 1에서 처리된 시료에 여기광원을 조사하는 단계(단계 2); 및 방출되는 형광 변화를 측정하는 단계(단계 3);를 포함하는 것일 수 있다.
- [54] 본 발명에 따른 진단을 위한 정보를 제공하는 방법에 있어서, 상기 단계 3은 측정 대상 시료의 형광 발광 세기가 화합물이 처리되기 전의 형광 발광 세기에 비해 증가된 것을 확인할 수 있는 방법을 포함한다.
- [55] 보다 구체적으로 상기 단계 3은 본 발명에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물이 시료 내 시스테인과 선택적으로 반응함에 따른 흡수 및 형광 방출 스펙트럼의 변화가 나타나는 것을 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 시료 내 시

스테인 존재 시 형광-켜짐 및 형광 세기가 증가하는 것일 수 있고, 본 발명에 따른 화합물을 시료에 처리한 후에 처리되기 전의 시료보다 형광 발광 및 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하, 바람직하게는, 허혈-재관류 손상에 의한 이식신 기능 지연이 발병된 것으로 판정할 수 있는 것으로 판단할 수 있다.

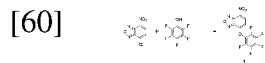
- [56] 상기 단계 3의 여기광원은 450 내지 500nm, 바람직하게는 480 내지 490 nm의 여기파장의 광원일 수 있고, 488 nm인 것이 가장 바람직한 것일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

- [57] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

- [58] 실시예 1. 소변 내 시스테인 검출용 화합물의 합성 및 구조 분석

- [59] 본 발명자들은 시스테인을 생체 내 유래물인 소변에서 신속하게 측정하기 위하여, 본 발명의 형광 프로브 화합물을 개발하고자, 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)에 전자가 부족한 방향족 고리 화합물인 펜타플루오로페놀기(pentafluorophenol)를 도입하여 친핵체 공격을 수월히 하도록 분자 구조를 설계하였으며, 하기 반응식에 따라 상기 화합물 1을 합성하였다:



- [61] **(1) 4-니트로-7-페플루오로펜옥시벤조[c][1,2,5]옥사다리아졸의 합성**

- [62] 구체적으로, 합성 출발 물질인 4-클로로-7-니트로벤조퓨란(4-chloro-7-nitrobenzofurazan)(20 mg, 0.1 mol, TCI, A55921G)과 펜타플루오로페놀(Pentafluorophenol)(55.2 mg, 0.3 mol, TCI, 771-61-9)을 질소로 산소를 제거한 3 mL의 *N,N*-다이메틸포름아마이드(*N,N*-dimethylformamide; DMF)에 녹이고 25°C에서 교반하였다(분당 회전수: 300 rpm). 이후, 상기 교반된 용액에 30 μ L의 *N,N*-다이소프로필에틸아민(*N,N*-diisopropylethylamine; DIPEA)과 20.7 mg의 탄산 칼륨(Potassium carbonate; K_2CO_3)을 추가해주고 실리콘 오일 용기 상에서 온도를 60°C 까지 올려주었다. 온도가 60°C에 도달하면 10분간 교반해준 뒤 온도를 다시 25°C로 낮춰주고, 물을 30 mL 첨가하여 반응을 종결하였다. 유기층을 추출하기 위해서 분별 깔때기를 이용하여 에틸아세테이트(Ethylacetate; EtOAc)와 물을 1:1로 혼합하여 섞어주었고, 이 과정을 통해 유기층만을 따로 획득할 수 있었다. 이후, 유기층을 무수황산나트륨(Na_2SO_4 , 2 g)으로 건조하고, 회전농축기(Evaporator)를 이용하여 37 °C 및 20 내지 500 mmHg의 조건으로 농축하였다. 이렇게 얻은 진한 갈색 고체화합물은 실리카겔(silica gel, Merck-silica gel 60, 230-400 mesh)을 이용한 컬럼 크로마토그래피(직경 6 cm, 높이 15 cm) 방법을 이용하여 분리(전개액: Et OAc/Hexane=10/90)하여 진한 노란색 고체 화합물(화합물 1, 12.5 mg, 35.9%)을 얻었다.

- [63] 합성이 성공적으로 수행되었는지 확인하기 위해 핵자기공명 분석(NMR, Nuclear Magnetic Resonance)을 수행하였다. 분석을 통해 화합물 1이 성공적으로 합성되었음을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과는 다음과 같다:
- [64] ¹H-NMR(CDCl₃, 500 MHz); δ 8.52(d, 1H, J=8.0 Hz), 6.85(d, 1H, J=8.0 Hz). ¹⁹F-NMR(CDCl₃ containing hexafluoro-benzene, 471 MHz); δ -155.9(s, 2F), -158.1(d, 1F), -162.8(d, 2F).
- [65] 이를 통해, 상기 화합물 1을 '4-니트로-7-퍼플루오로페노옥시벤조[c][1,2,5]옥사다리아졸 (4-nitro-7-(perfluorophenoxy)benzo[c][1,2,5]oxadiazole)'로 동정하였다.
- [66] 실시예 2. 정상 쥐 소변 내에서 화합물 1의 형광 방출 특성 확인
- [67] 상기 실시예 1에서 제조한 화합물 1의 형광 방출 특성을 확인하기 위해서, 정상 쥐 소변 내에서 시스테인과 반응 후 형광 방출 그래프를 측정하였다.
- [68] 구체적으로, 화합물 1은 10 mM로 DMSO 용액에 녹여 사용하였으며, 최종 사용되는 용매 조건에서 DMSO의 양이 각 용기별 동일하도록 통제되었다(1% 이하). 화합물 1과 소변 내 시스테인의 반응을 확인하기 위해, 전처리를 하지 않은 쥐의 소변(198 µL)에 시스테인을 농도별(3.125 - 200 µM)로 처리한 뒤 화합물 1(100 µM)을 처리하여 37°C 교반기에서 40분 교반 후 형광 스펙트럼을 측정하였다(여기 파장: 488 nm). 방출 스펙트럼을 분석하기 위해서 형광 측정장비(Spectro- fluorophotometer; SHIMADZU CORP. RF-6000, Japan)를 사용하였으며, 형광 측정에 사용되는 유리 큐벳은 사면이 1 cm 두께를 가진 표준 석영 셀(Internal volume=0.1 cm, Hellma Analytics, Jena, Germany)을 이용하였다.
- [69] 도 1(a)는 정상 쥐의 소변에 화합물 1(100 µM) 처리, 그리고 정상 쥐의 소변에 시스테인(100 µM) 처리 후 화합물 1(100 µM) 처리한 뒤 40분간 37°C 교반기에서 교반하여 488 nm 여기 후 얻은 결과이다. 도 1(b)에 따르면, 정상 쥐의 소변에 시스테인을 처리하였을 때의 형광 변화는 시스테인의 농도의존적으로 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 도 1(a)에서 형광 방출 스펙트럼은 550 nm 이상 600 nm 이하에서 가장 높은 형광 값을 보였다.
- [70] 실시예 3. 화합물 1의 정상 쥐 신장조직 영상화 확인
- [71] 본 발명자들은 화합물 1이 정상 쥐의 신장 내에서 시스테인 결합 후 영상화가 가능한지 확인하기 위해서 조직 형광 영상화 시스템을 이용하여 그 결과를 측정하였고, 이를 도 2에 나타내었다.
- [72] 구체적으로, 화합물 1이 정상 쥐의 신장 내 시스테인에 결합하는지의 여부를 확인하기 위하여, 정상 쥐의 신장에 시스테인 억제제인 *N*-에틸말레이마이드(*N*-ethylmaleimide; NEM)(500 µM)를 사용하였다. 또한, 시스테인의 농도를 높여주기 위해 시스테인을 추가로 넣어주었다. 시스테인 및 NEM을 신장 내로 넣기 위해, 신장을 시스테인 또한 NEM이 포함된 용액에 넣어 삼투현상을 유도시켰다.
- [73] 도 2(a)는 상기 전처리 과정을 거친 정상 쥐 신장을 화합물 1로 영상화한 결과이다. 도 2(a)에 따르면, 시스테인을 전처리한 군에서 높은 형광 강도가 보였으며,

NEM 및 시스테인을 순차적으로 처리한 그룹에서는 낮은 형광 강도를 가짐을 영상화로 확인하였고, 이는 화합물 1이 신장 내에서 시스테인과 반응할 수 있다는 것을 나타낸다. 이의 결과는 광자 효율성 분석을 통해 도 2(b)에 나타내었고, 유의적 결과를 확인하기 위한 통계방법은 다음과 같다; The error bar represents mean $\pm$ S.D(n=3) with one-way ANOVA, Turkey's multiple comparisons tests; ** $p < 0.01$.

[74] 실시예 4. 저산소조건의 신장조직에서 화합물 1의 형광 반응 테스트

[75] 본 발명자들은 저산소조건(1.0% O₂)에서 증가된 시스테인을 화합물 1이 영상화할 수 있는지 세포 수준에서 확인하고자 하였고, 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다.

[76] 도 3(a)는 인간 신장조직 세포(HK-2)에 저산소조건을 각각 1시간(1h) 및 5시간(5h) 주었을 때의 형광변화를 공초점현미경으로 확인한 결과이다. 이때, 형광변화를 관찰하기 위해 화합물 1을 37°C에서 15분간 5 μ M로 처리해주었다. 그 결과, 1시간의 저산소조건보다 5시간의 저산소조건에서 더 높은 형광 강도 및 영상화 결과를 보여주었다. 형광강도에 대한 결과는 도 3(b)에 나타내었다. 유의적 결과를 확인하기 위한 통계방법은 다음과 같다; The error bar represents mean $\pm$ S.E.M. with one-way ANOVA, Turkey's multiple comparisons tests; ** $p < 0.001$ (A vs B), *** $p < 0.001$ (C vs D). The dot plots represent Jitter points.

[77] 실시예 5. 허혈-재관류 동물 모델의 신장조직에서 화합물 1의 형광 반응테스트

[78] 본 발명자들은 화합물 1이 허혈-재관류 설치류 모델의 신장조직을 영상화할 수 있는지 확인하기 위해, 형광 조직 영상화 시스템 분석 및 이광자 여기 형광 현미경 분석을 수행하였다.

[79] 본 실험에 앞서, 생쥐(C57BL/6, 구입처: 오리엔트 바이오)들은 7~9주 된 마우스들이었으며, 무작위로 세 그룹으로 나누었다: 정상군(대조 그룹, n=9), 20분 동안의 허혈-재관류군(n=16), 그리고 45분 동안의 허혈-재관류군(n=16). 또한, 생쥐의 허혈-재관류 모델은 다음과 같이 확립하였다: 호흡 마취 후 복부 중간의 개복술을 통해 좌측 신장 혈관경을 해부하여 실험 그룹별로 지정된 시간 동안 비외상성의 혈관 클램프로 폐쇄하였다. 폐쇄 동안 복부 절개 부위는 체온과 수분 손실을 최소화하기 위해 닫았다. 클램프를 제거한 후, 왼쪽 신장의 재관류가 시각적으로 확인되었고 오른쪽 신장을 절개하였다. 절제한 복부는 4-0 비크릴 봉합사를 사용하여 봉합하였다.

[80] 상기 방법으로 정상 쥐 및 허혈-재관류 쥐로부터 각각 얻어진 신장 조직에 대하여 형광 조직 영상화 시스템 분석 및 이광자 여기 형광 현미경 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 4에 명시하였다.

[81] 도 4(a)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상 쥐의 신장조직 및 허혈-재관류 쥐 모델의 신장조직에 각각 100 μ M로 처리하고 2시간 교반하였을 때, 허혈-재관류 쥐 모델의 신장조직에서 높은 형광강도가 보이는 것을 확인하였고, 이를 광자 효율성 분석을 통하여 통계적 유의성을 도출하였다(도 4b). 또한, 이광자 여기 형광현

미경 분석결과 허혈-재관류 쥐 모델에서 높은 형광 강도를 보였으며, 이는 60 μm 의 깊이에서도 확인되었다(도 4c).

- [82] 이러한 결과를 바탕으로, 허혈-재관류 모델 유래 신장조직 내에 시스테인이 정상군보다 많이 존재할 수 있다는 것을 확인하였고, 본 발명의 화합물 1을 이용하여 허혈-재관류로 인한 손상을 진단 가능함을 명시할 수 있다.
- [83] 실시예 6. 허혈-재관류 동물 모델 및 뇌사자로부터 장기이식을 받은 환자 유래 소변에서 화합물 1의 형광 반응테스트
- [84] 본 발명자들은 허혈-재관류 설치류 모델의 소변 및 뇌사자로부터 장기이식을 받은 후 허혈-재관류 손상(IRI)에 의한 급성 신장 손상 및 이식신 기능 지연(DGF) 증상을 갖는 환자의 소변에서 시스테인의 증가가 일어났는지 확인하기 위해서, 화합물 1을 이용하여 형광강도 분석을 수행하였다. 또한, 그 결과를 도 5에 명시하였다.
- [85] 도 5(a)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상 쥐의 소변, 허혈-재관류 쥐 모델의 소변에 각각 100 μM 로 처리하고 37°C에서 40분 교반하였을 때, 허혈-재관류 쥐 모델의 소변에서 높은 형광 강도를 보였으며, 이는 허혈의 시간에 따른 증가 경향성을 보여주었다. 또한, 이의 통계적 유의성은 다음과 같다: The error bar represents mean $\pm$ S.E.M. with one-way ANOVA, Turkey's multiple comparisons tests; * $p < 0.05$.
- [86] 또한, 도 5(b)의 결과에 따르면, 화합물 1을 정상군과 뇌사자로부터의 장기 이식을 받은 환자(수여자)의 소변에 각각 100 μM 로 처리하고 37°C에서 40분 교반하였을 때, 뇌사자로부터 장기이식을 받은 환자의 소변에서 정상군의 소변보다 높은 형광 강도를 보이는 것을 확인하였고, 이의 통계적 유의성을 도출하였다: The error bar represents mean $\pm$ S.E.M. with unpaired t-test; * $p < 0.05$.
- [87] 따라서, 정상군 대비 IRI에 의한 DGF 환자군에서 형광-켜짐 현상이 일어남에 따라 상기 환자군의 소변 내에 시스테인이 존재할 수 있고, 본 발명의 화합물 1을 이용하여 이를 검출할 수 있으며, 이를 통해 IRI에 의한 DGF를 소변으로 진단 가능함을 확인하였다.
- [88] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술 분야의 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.

청구범위

[청구항 1] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단용 조성물:

[화학식 1]



[청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kidney injury, AKI) 또는 이식신 기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것인, 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 허혈-재관류 손상(Ischemia-reperfusion injury, IRI)에 의한 것인, 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 뇌사자로부터의 장기이식 후 허혈-재관류 손상에 의한 이식신기능 지연의 발병을 예측할 수 있는 것인, 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 시스테인과 접촉하여 형광을 방출하는 것인, 조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 화합물은 소변 또는 신장조직 내에서 시스테인과 선택적으로 반응하고, 다른 생체 분자들과는 반응하지 않는 것인, 조성물.

[청구항 7] 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 수화물, 이의 용매화물 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 시료에 처리하는 단계를 포함하는, 신장 손상 또는 신기능 저하 진단을 위한 정보를 제공하는 방법:

[화학식 1]



[청구항 8] 제7항에 있어서,
상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 급성 신장 손상(Acute kidney injury, AKI) 또는 이식신기능 지연(Delayed graft function, DGF)인 것인, 방법.

[청구항 9] 제7항에 있어서,
상기 신장 손상 또는 신기능 저하는 허혈 재관류 손상에 의한 것인, 방법.

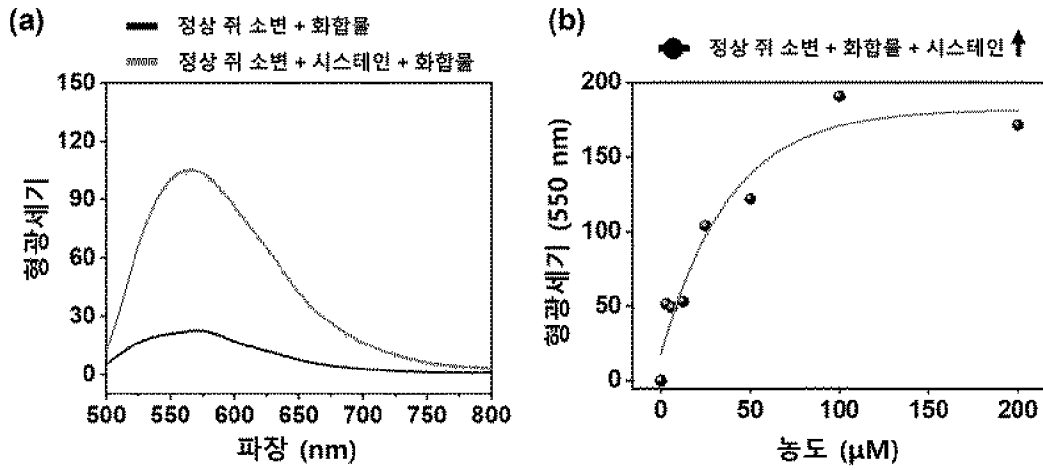
[청구항 10] 제7항에 있어서,
상기 화합물이 처리되기 전의 시료보다 처리 후의 시료에서 형광 발광 또는 형광 세기의 증가가 확인된 경우, 신장 손상 또는 신기능 저하가 발병된 것으로 판정할 수 있는 것인, 방법.

[청구항 11] 제7항에 있어서,
상기 시료는 생물학적 시료인 것인, 방법.

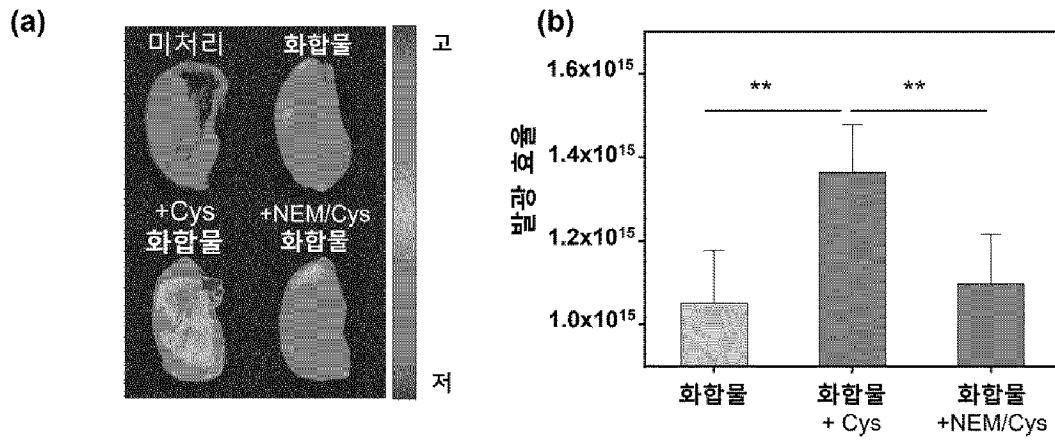
[청구항 12] 제11항에 있어서,

상기 시료는 소변 또는 신장조직인 것인, 방법.

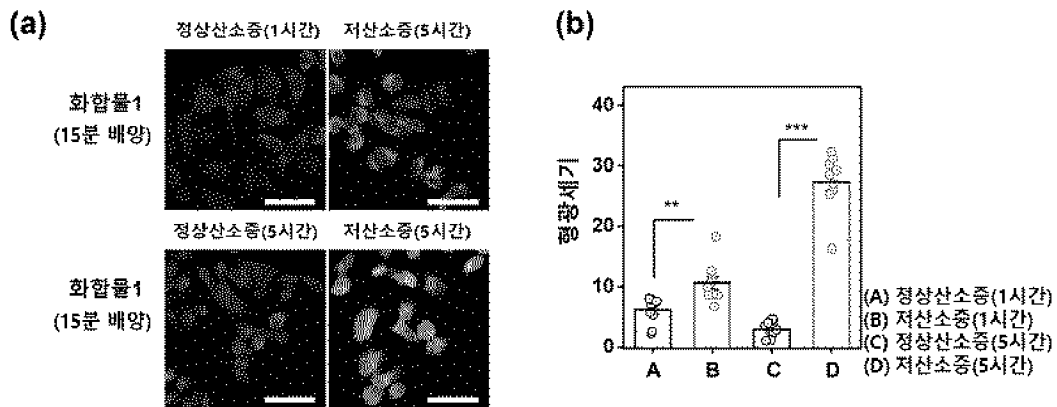
[도1]



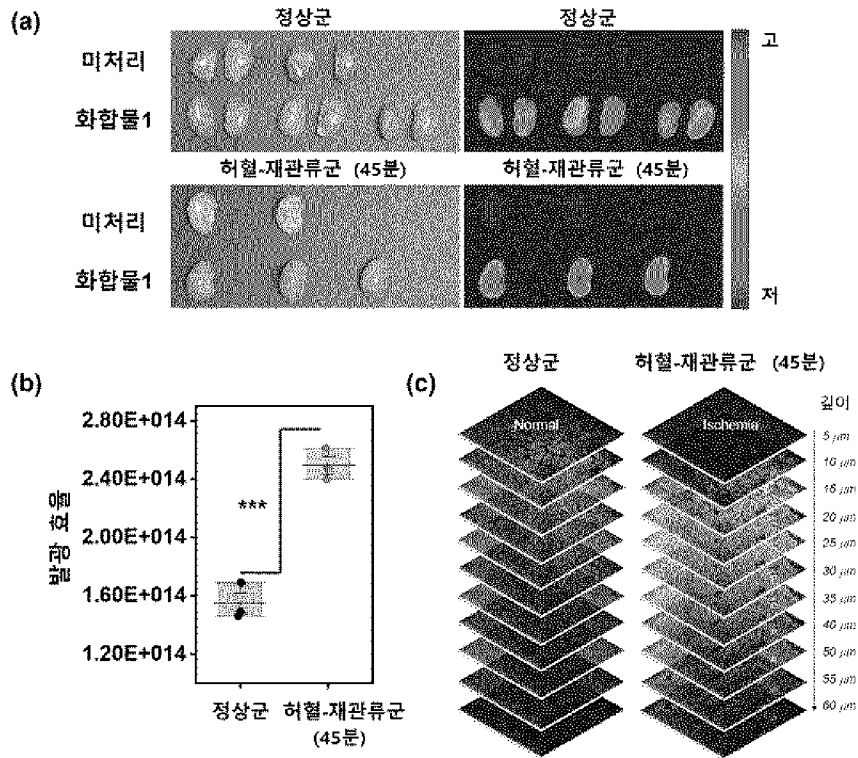
[도2]



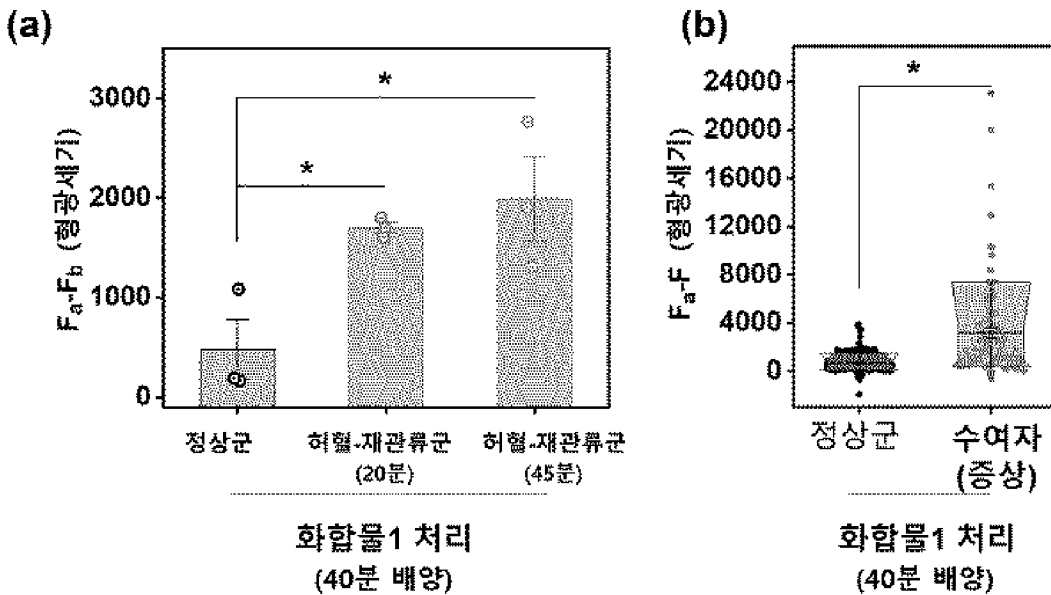
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009652

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/58(2006.01);

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)

G01N 33/58(2006.01); A61K 49/00(2006.01); C07D 271/08(2006.01); C07D 491/048(2006.01); G01N 21/64(2006.01);
G01N 33/52(2006.01); G01N 33/68(2006.01)

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: 시스테인(cysteine), 형광 프로브(fluorescent probe), 신장 손상(kidney injury), 허혈
재관류 손상(ischemia reperfusion injury, IRI), 펜타플루오로페놀(Pentafluorophenol), 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로펜옥시
(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다리아졸(oxadiazole)**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KR 10-2023-0019546 A (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY et al.) 09 February 2023 (2023-02-09) See paragraphs [0001]-[0112].	1,5-7,10-12
Y		2-4,8,9
Y	WOO, Hye Young et al. Visualization of ischemia reperfusion injury of kidney and prediction of early allograft dysfunction after kidney transplantation using cysteine probe. Korean Journal of Transplantation. 17 November 2022 (online publication date), vol. 36, p. S19. See page S19.	2-4,8,9
A	KR 10-2021-0098874 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION et al.) 11 August 2021 (2021-08-11) See paragraphs [0041], [0081] and [0082].	1-12

☒ 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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

04 November 2024

Date of mailing of the international search report

04 November 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2216789 B1 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY) 16 February 2021 (2021-02-16) See abstract.	1-12
A	KR 10-1799897 B1 (HANKUK UNIVERSITY OF FOREIGN STUDIES RESEARCH & BUSINESS FOUNDATION) 21 November 2017 (2017-11-21) See entire document.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2024/009652

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2023-0019546	A	09 February 2023	KR	10-2650187	B1	20 March 2024
				US	11884638	B2	30 January 2024
				US	2023-0105273	A1	06 April 2023
KR	10-2021-0098874	A	11 August 2021	KR	10-2490530	B1	19 January 2023
KR	10-2216789	B1	16 February 2021	None			
KR	10-1799897	B1	21 November 2017	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/58(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/58(2006.01); A61K 49/00(2006.01); C07D 271/08(2006.01); C07D 491/048(2006.01); G01N 21/64(2006.01); G01N 33/52(2006.01); G01N 33/68(2006.01) 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: 시스테인(cysteine), 형광 프로브(fluorescent probe), 신장 손상(kidney injury), 허혈 재관류 손상(ischemia reperfusion injury, IRI), 펜타플루오로페놀(Pentafluorophenol), 4-니트로(nitro)-7-펄플루오로페녹시(perfluorophenoxy)벤조(benzo)[c][1,2,5]옥사다이아졸(oxadiazole)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	KR 10-2023-0019546 A (경희대학교 산학협력단 등) 2023.02.09 단락 [0001]-[0112]	1,5-7,10-12
Y		2-4,8,9
Y	WOO, HYE YOUNG 등, "Visualization of ischemia reperfusion injury of kidney and prediction of early allograft dysfunction after kidney transplantation using cysteine probe", Korean Journal Transplantation, 2022년 11월 17일(온라인 공개일), 36권, 페이지 S19 페이지 S19	2-4,8,9
A	KR 10-2021-0098874 A (서울대학교산학협력단 등) 2021.08.11 단락 [0041], [0081], [0082]	1-12
A	KR 10-2216789 B1 (경희대학교 산학협력단) 2021.02.16 요약	1-12
☒ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년11월04일(04.11.2024)	국제조사보고서 발송일 2024년11월04일(04.11.2024)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1799897 B1 (한국외국어대학교 연구산학협력단) 2017.11.21 전체 문헌	1-12

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2023-0019546 A	2023/02/09	KR 10-2650187 B1	2024/03/20
		US 11884638 B2	2024/01/30
		US 2023-0105273 A1	2023/04/06
KR 10-2021-0098874 A	2021/08/11	KR 10-2490530 B1	2023/01/19
KR 10-2216789 B1	2021/02/16	없음	
KR 10-1799897 B1	2017/11/21	없음	