



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월09일
 (11) 등록번호 10-1875596
 (24) 등록일자 2018년07월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 493/10 (2006.01) *G01N 33/52* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G01N 33/58* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07D 493/10 (2013.01)
G01N 33/52 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0027326

(22) 출원일자 2017년03월02일
 심사청구일자 2017년03월02일

(56) 선행기술조사문헌
 논문(Org. Biomol. Chem., 2014, 12,
 3175-3180)*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

(72) 발명자
이준석
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
홍성철
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김범수

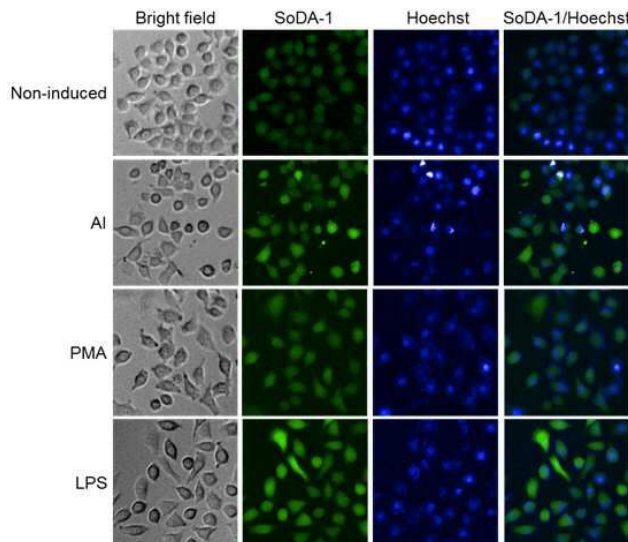
(54) 발명의 명칭 **초산화물을 검출하기 위한 화합물 및 이를 이용한 바이러스 감염을 진단하는 방법**

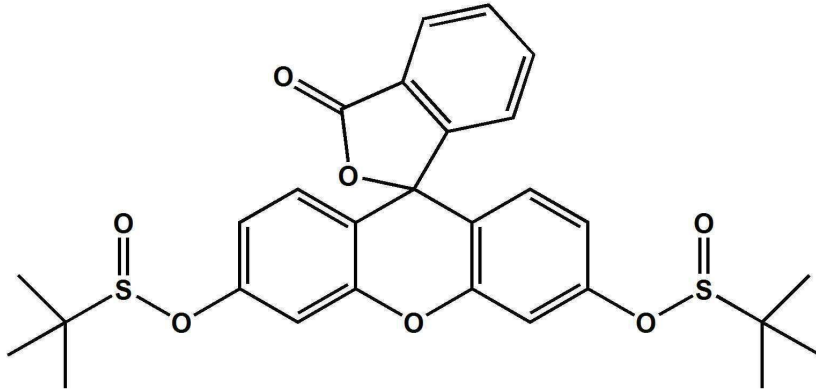
(57) 요약

하기 화학식의 화합물은 초산화물을 검출하는데 효율적으로 사용될 수 있다.

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7





또한, 이를 이용하면 바이러스 감염, 특히 조류독감 바이러스 감염에 의한 초산화물의 증가를 검출하여, 바이러스 감염을 진단하는데 효율적으로 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/56983 (2013.01)

G01N 33/582 (2013.01)

G01N 2333/11 (2013.01)

(72) 발명자

디라제 무라레

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

장세영

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

이석

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

김윤경

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

마무늬 하크

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2N42500

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학기술연구원

연구사업명 창의형 융합연구사업

연구과제명 국가재난형 가축질병 현장진단 기술 개발

기여율 50/100

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2E26632

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국과학기술연구원

연구사업명 Open Research Program

연구과제명 AI 바이러스 감염숙주의 고속 판별 스크리닝 플랫폼 개발

기여율 10/100

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2N50260

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 다중오믹스신기술개발

연구과제명 통합 호르몬 시그니처 기반 임신중독증 진단 kit 개발

기여율 40/100

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2017.03.01 ~ 2017.12.31

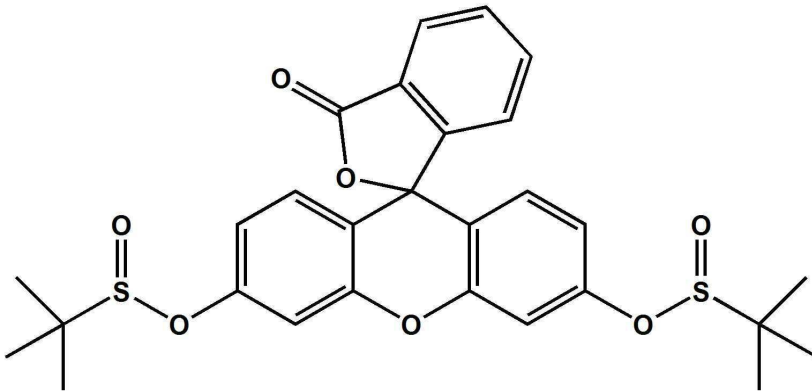
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 2의 화합물:

<화학식 2>



청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1의 화합물을 포함하는 초산화물을 검출하기 위한 조성물.

청구항 5

청구항 1의 화합물을 포함하는 바이러스 감염을 진단하기 위한 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 바이러스는 조류 인플루엔자 바이러스인 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 조류 인플루엔자 바이러스는 H1N1, H5N2, 또는 H9N2 아형인 조성물.

청구항 8

개체로부터 분리한 시료에 청구항 1의 화합물을 접촉시키는 단계; 및

상기 청구항 1의 화합물의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 초산화물을 검출하는 방법.

청구항 9

개체의 바이러스 감염을 진단하기 위하여,

개체로부터 분리한 시료에 청구항 1의 화합물을 접촉시키는 단계; 및

상기 청구항 1의 화합물의 형광을 측정하는 단계를 포함하는 초산화물을 검출하는 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 바이러스는 조류 인플루엔자 바이러스인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 초산화물을 검출하기 위한 화합물 및 이를 이용한 바이러스 감염을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 2009년 돼지에서 기원한 신종 인플루엔자 A(H1N1), 및 조류 독감 등이 인간에게 전염될 수 있는 것이 확인되면서, 바이러스성 전염병에 대한 위협이 심각하게 증대되고 있다. 이에 대한 대응으로서, 종란접종법으로 조류의 조류 독감 바이러스 감염을 예방하거나, 또는 포유 동물에 접종할 수 있는 백신을 제작하기 위한 포유동물 세포 기반의 세포주 개발 등이 진행되고 있다. 그러나 이러한 예방 노력으로도 바이러스의 감염을 완전히 차단하기는 어렵다. 따라서 많은 연구자들은 바이러스에 감염된 동물을 빠르게 진단하는 방법에 초점을 두고 해결책 연구에 몰두하고 있다.

[0003] 면역과 관련된 요소 중 활성 산소는 세포 내에 호흡을 통해서 발생하는 물질로서, 과도하게 축적될 경우 다양한 질환을 야기하지만, 외부에서 들어온 바이러스나 균들에 대항하는데 중요한 역할을 가지고 있다. 특히 초산화물(hyperoxide, superoxide)은 세포 내에서 다른 활성산소의 모태가 되는 물질로, 많은 연구자들이 주목하고 있는 물질이다. 지금까지는 초산화물을 검출하기 위해서 디페닐포스핀 그룹이나 니트로 술폰 벤젠을 사용한 턴-온(turn-on) 방식의 프로브가 주로 사용되었다. 그러나 이와 같은 화합물은 값이 비싸 효율이 좋지 못하고, 세포 투과도가 높지 못하여 새로운 프로브를 개발할 필요성이 있었다. 또한 이를 이용한 바이러스 진단에 관한 방법 또한 알려지지 않았다.

발명의 내용

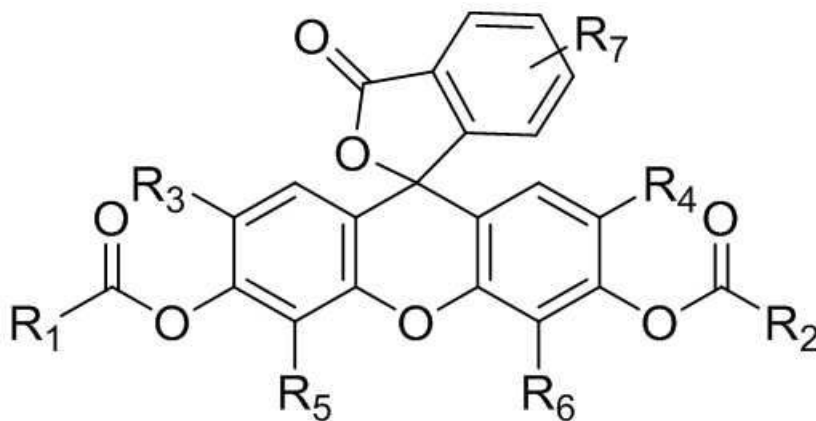
해결하려는 과제

[0004] 이에 본 발명자들은 초산화물 검출을 통한 바이러스 진단을 위해 값싼 원료를 사용하면서도 최종 프로브의 크기를 줄일 수 있도록, 설피네이트 그룹을 퀸처(quencher)로 사용하여 프로브를 디자인하였다. 강한 친핵체 성질을 가진 초산화물이 공격하기 쉽도록 유도하였고, 20분 이내에 강한 형광이 켜지는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 플루오레세인의 밝은 형광과 높은 세포 투과도를 활용하여 조류독감 바이러스에 감염된 세포에서의 형광 증폭 효과 및 형광 이미지 변화를 성공적으로 확인할 수 있었다.

과제의 해결 수단

[0005] 일 양상은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0006] <화학식 1>



[0007]
[0008] 상기 화학식 1 중,

- [0009] R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 수소, 중수소, 할로젠, 니트로, 시아노, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{20} 알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{20} 알키닐기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 알콕시기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{20} 시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{20} 헤테로시클로알킬기, 치환 또는 비치환된 C_3 - C_{20} 시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_2 - C_{20} 헤테로시클로알케닐기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴옥시기, 치환 또는 비치환된 C_6 - C_{20} 아릴티오기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 헤테로아릴기 중에서 선택될 수 있고;
- [0010] R_3 , R_4 , R_5 , 및 R_6 은 각각 독립적으로 수소, 중수소, F, Cl, Br, 또는 I일 수 있고;
- [0011] R_7 는 수소, 치환 또는 비치환된 알킬기, 이소티오시아네이트기($-N=C=S$), 치환 또는 비치환된 아미노기, 또는 $-C(=O)R_a$ 일 수 있다. 여기서 R_a 는 n-히드록시숙신이미드(n-hydroxysuccinimide) 또는 $-(X)_n-NH_2$ (X 는 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 의 알킬기, 치환 또는 비치환된 C_1 - C_{20} 의 알콕시기, C_2 - C_{20} 의 알케닐기, C_2 - C_{20} 의 알키닐기, C_1 - C_{20} 의 헤테로알킬기, C_6 - C_{20} 의 아릴기, C_6 - C_{20} 의 헤테로아릴기, 또는 C_6 - C_{20} 의 헤테로아릴알킬기이고, n 은 0 내지 10의 정수이다)일 수 있다.
- [0012] 상기 화학식 1에서 사용되는 용어 "치환"은 할로젠원자, 할로젠원자로 치환된 C_1 - C_{20} 의 알킬기(예: CCF_3 , $CHCF_2$, CH_2F , CCl_3 등), 히드록시기, 니트로기, 시아노기, 아미노기, 아미디노기, 히드라진, 히드라존, 카르복실기나 그의 염, 술폰산기나 그의 염, 인산이나 그의 염, 또는 C_1 - C_{20} 의 알킬기, C_2 - C_{20} 의 알케닐기, C_2 - C_{20} 의 알키닐기, C_3 - C_{20} 의 시클로알킬기, C_6 - C_{20} 의 아릴기, C_6 - C_{20} 의 헤테로아릴기, C_6 - C_{20} 의 아릴알킬기, 또는 C_6 - C_{20} 의 헤테로아릴알킬기로 치환된 것을 의미한다.
- [0013] 상기 C_1 내지 C_{20} 의 알킬기는 탄소수 1-10의 완전 포화된 분지형 또는 비분지형(또는 직쇄 또는 선형) 탄화수소를 말하며, 그 구체적인 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소부틸, sec-부틸, ter-부틸, 또는 neo-부틸 등을 들 수 있고, 상기 알킬기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.
- [0014] 상기 C_2 내지 C_{20} 의 알케닐기는 직쇄상 또는 분지상의 1개 이상의 탄소-탄소 이중 결합을 갖는 1가의 불포화 탄화수소를 의미한다. 구체적으로 예를 들면, 에틸, n-프로페닐, 이소프로페닐, n-부트-2-에닐, 시클로헥세닐, 또는 n-헥스-3-에닐 등을 포함할 수 있다. 상기 알케닐은 cis 및 trans 이성질체 또는 이들 이성질체의 혼합물을 포함할 수 있고, 상기 알케닐기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환 가능하다.
- [0015] 상기 C_2 내지 C_{20} 의 알키닐기는 직쇄상 또는 분지상의 1개 이상의 탄소-탄소 삼중 결합을 갖는 1가의 불포화 탄화수소를 의미한다. 구체적으로 예를 들면, 에틸, n-프로피닐, n-부트-2-이닐, 또는 n-헥스-3-이닐 등을 포함할 수 있고, 상기 알키닐기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환 가능하다.
- [0016] 상기 C_1 내지 C_{20} 의 알콕시기는 산소원자에 결합된 알킬기를 말하며, 그 구체적인 예로는 메톡시, 에톡시, 프로폭시 등을 들 수 있고, 상기 알콕시기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.
- [0017] 상기 C_3 내지 C_{20} 의 시클로알킬기, 시클로알케닐기, 및 시클로알키닐기는 각각 고리화된 알킬, 알케닐 및 알키닐기를 포함하는 비방향성 탄소고리(non-aromatic carbocycle)를 나타낸다. 상기 시클로알킬기, 시클로알케닐기, 및 시클로알키닐기는 단환 또는 다환을 포함할 수 있다. 상기 다환은 예를 들면, 2개, 3개 또는 4개의 융합된 고리를 갖는 것일 수 있다. 시클로알킬기의 구체적인 예로는 시클로프로필, 시클로부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로헥사디에닐(cyclohexadienyl), 시클로헵타트리에닐, 노르보르닐(norbornyl), 노르카닐(norcarnyl), 아다만틸 등을 포함한다. 상기 시클로알킬기, 시클로알케닐기, 및 시클로알키닐기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.
- [0018] 상기 C_2 내지 C_{20} 의 헤테로시클로알킬기, 및 헤테로시클로알케닐기는 각각 고리화된 알킬, 알케닐 및 알키닐기를 포함하고, N, O, 또는 S로부터 선택된 하나 이상 원자로서 고리를 형성하는 헤테로원자를 포함하는 비방향족 헤테

테로사이클을 의미한다. 헤테로사이클로알킬기 및 헤테로사이클로알케닐기는 단환 혹은 다환 구조, 예를 들면, 2개, 3개 또는 4개의 융합된 고리를 갖는 구조를 포함할 수 있다. 헤테로사이클로알킬기의 구체적인 예는 모르폴리닐, 티오모르폴리닐, 피페라진일, 테트라히드로푸란일, 테트라히드로티엔일, 2,3-디히드로벤조푸릴, 1,3-벤조디옥솔, 벤조-1,4-디옥세인, 피페리디닐, 피롤리디닐, 이소옥사졸리디닐, 이소티아졸리디닐, 피라졸리디닐, 옥사졸리디닐, 티아졸리디닐 등을 포함할 수 있다. 상기 헤테로사이클로알킬기, 및 헤테로사이클로알케닐기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.

[0019] 상기 C₆-C₂₀의 아릴기는 단환 또는 다환을 갖는 방향족 탄화수소기를 의미한다. 상기 다환은 융합된 고리 (fused ring)를 갖는 것 (예, 나프탈렌) 및/또는 융합되지 않은 고리를 갖는 것 (예, 비페닐)을 포함할 수 있다. 상기 다환은 예를 들면, 2개, 3개 또는 4개의 고리를 갖는 것일 수 있다. 달리 정의되지 않는다면, 상기 아릴기는 일반적으로 5 내지 10개, 6 내지 15개, 6 내지 12개, 또는 6 내지 10개의 탄소 고리 원자를 갖는 것일 수 있다. 상기 아릴기는 예를 들면, 페닐, 나프탈레닐 (예, 나프탈렌-1-일 및 나프탈렌-2-일), 비페닐, 안트라세닐, 또는 켈안트라레닐 등을 포함할 수 있다. 상기 아릴기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.

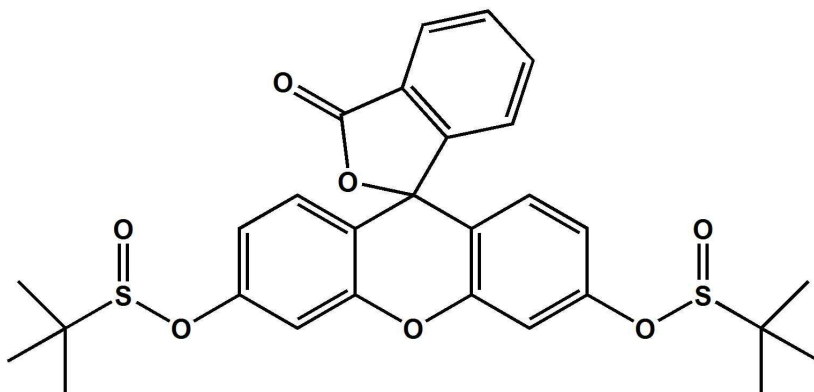
[0020] 상기 C₆₋₂₀의 아릴옥시기는 산소원자에 결합된 아릴기를 의미하며, 구체적인 예로는 페녹시 등을 들 수 있고, 상기 아릴옥시기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.

[0021] 상기 C₆₋₂₀의 아릴티오기는 황원자에 결합된 아릴기를 의미하며, 상기 아릴옥시기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.

[0022] 상기 C₁₋₂₀의 헤테로아릴기는 N, O 및 S로부터 선택된 하나 이상의 헤테로 원자를 고리 구성원으로 갖는 1개의 방향성기를 의미한다. 헤테로아릴기는 단환 혹은 다환 구조를 포함할 수 있다. 상기 다환은 예를 들면, 2개, 3개 또는 4개의 축합 고리를 갖는 것일 수 있다. 달리 정의되지 않는다면, 상기 헤테로아릴기는 일반적으로 3 내지 10개, 3 내지 7개, 또는 3 내지 5개의 고리 원자를 포함한다. 상기 헤테로아릴기는 1개, 2개 또는 3개의 헤테로 원자를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들면, 헤테로아릴기는 예를 들면, 피리디닐, N-옥소피리디닐, 피리미디닐, 피라지닐, 피리다지닐, 트리아지닐, 푸릴 (furyl), 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 티에닐 (thienyl), 이미다졸릴, 푸란일 (furanly), 티아졸릴 (thiazolyl), 인돌릴, 피릴, 옥사졸릴, 벤조푸릴, 벤조티에닐, 벤즈티아졸릴, 이소옥사졸릴, 피라졸릴, 트리아졸릴, 테트라졸릴, 인다졸릴, 1,2,4-티아디아졸릴, 이소티아졸릴, 벤조티에닐, 푸리닐, 벤즈이미다졸릴, 인돌린일 등을 포함할 수 있다. 상기 헤테로아릴기 중 하나 이상의 수소 원자는 상술한 "치환"에서 정의한 바와 같은 치환기로 치환가능하다.

[0023] 상기 화학식 1의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물을 포함한다.

[0024] <화학식 2>



[0025]

[0026] 다른 양상은 화학식 1의 화합물을 포함하는 초산화물을 검출하거나, 바이러스 감염을 진단하기 위한 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 바이러스는 인플루엔자 바이러스, 및 조류 인플루엔자 바이러스를 포함한다. 인플루엔자 바이러스는 표면에 헤마글루티닌(H)과 뉴라미다제(N) 두 개의 항원을 가지고 있으며, H에 15종, N에 9종의 아형을 가지고 있다. 상기 인플루엔자 바이러스는 H1N1, H5N2, 및 H9N2 아형을 포함한다.

- [0028] 용어 "초산화물(hyperoxide, superoxide)"은 $O_2^{\cdot -}$ 로 표시되는 음이온을 포함하는 화합물을 의미한다. 초산화물은 생물학적으로 매우 독성이 강하며, 생물의 체내로 침입한 외부의 병원체 등을 제거하기 위하여 면역학적으로 생성 및 이용된다. 따라서 체내 초산화물의 양을 측정하는 것으로서, 체내로 침입한 병원체의 존재 여부 및 그 수준을 확인할 수 있다. 특히 화학식 1의 화합물은 초산화물과 반응하여 현저한 형광을 나타내는 것을 확인하였으므로, 초산화물을 검출하는데 효과적으로 이용할 수 있다. 또한, 인플루엔자 아형 바이러스들에 감염된 세포에서 초산화물이 현저히 증가함을 관찰하였으므로, 화학식 1의 화합물은 바이러스 등 외부 병원체의 침입 여부를 진단하는데 이용할 수 있다.
- [0029] 상기 조성물은 화학식 1의 화합물 또는 화학식 1의 화합물을 형성하는 염을 안정화시킬 수 있는 버퍼 또는 용매를 더 포함할 수 있다. 상기 버퍼는 트리스 버퍼, 인산 버퍼, 아세테이트 버퍼, 헤페스 버퍼 또는 이들의 조합일 수 있으며, pH는 약 7 내지 9일 수 있다. 상기 용매는 유기 용매일 수 있으며, 아세토니트릴, 테트로하이드로퓨란, 디메틸 술폭시드, 메탄올, 디옥산, 아세톤, 및 이들의 조합들을 포함한다.
- [0030] 다른 양상은 화학식 1의 화합물을 포함하는 초산화물을 검출하기 위한 조성물을 포함하는 키트를 제공한다.
- [0031] 또한 상기 키트는 하나 이상의 반응 시약을 갖는 포장단위를 포함하는 키트 형태를 제공할 수 있다. 또한 상기 키트는 하나 이상의 하기의 품목을 포함할 수 있다: 완충액, 사용설명서, 및 양성 또는 음성 대조군. 상기 키트는 본 명세서에 기술된 방법을 수행하기 위해 적절한 비율로 함께 혼합된 반응 시약들의 용기들을 포함할 수 있다. 반응 시약 용기들은 바람직하게는 상기 방법을 수행할 때 측정하는 단계를 생략할 수 있도록 단위 수량의 반응 시약을 포함할 수 있다.
- [0032] 다른 양상은 화학식 1의 화합물을 이용하여 초산화물을 검출하는 방법 또는 바이러스 감염을 진단하는 방법을 제공한다.
- [0033] 상기 방법은 개체로부터 분리한 시료에 화학식 1의 화합물을 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 개체는 인간을 포함하는 포유동물을 포함한다. 상기 시료는 개체로부터 분리된 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 대변, 타액, 눈물, 척수액, 세포, 조직 또는 그 조합일 수 있다.
- [0034] 상기 방법은 상기 화학식 1의 화합물의 형광을 측정하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 화합물의 형광을 측정하는 단계는 상기 화합물에 광을 조사하여 화합물의 여기(excitation)를 유도하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 화합물의 여기를 위해 400 nm 내지 550 nm 파장의 광, 또는 480 nm 파장의 광이 조사될 수 있다. 상기 광은 형광 여기를 위한 광원에서 방출되는 것이면, 어떠한 것이든 이용할 수 있다. 상기 광원은 레이저 광원일 수 있다. 상기 화합물의 여기 이후 방출되는 형광을 측정하는 단계는 상업적으로 이용가능한 임의의 광 측정 장비를 이용하여 수행될 수 있다. 상기 방출되는 형광은 480 nm 내지 580 nm 파장의 광, 또는 520 nm 파장의 광일 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 일 양상에 따른 화합물은 초산화물을 검출하는데 효율적으로 사용될 수 있다.
- [0036] 다른 양상에 따른 화합물은 조류독감 바이러스를 포함하는 바이러스 감염을 진단하는데 효율적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 활성산소군(200 μ M)이 처리된 화학식 2의 화합물(1 μ M, 1% DMSO in pH 7.4 PBS buffer)의 시간별 형광 세기의 변화를 나타낸다.
- 도 2a는 10 μ M의 화학식 2의 화합물에 여러 농도의 초산화물을 처리한 경우의 형광 세기의 변화를 나타낸다.
- 도 2b는 초산화물의 농도에 따른 형광 세기의 배수차(fold change)를 나타낸다.
- 도 3은 다른 농도의 화합물을 200 μ M 초산화물에 처리한 후 시간별로 형광 세기를 관찰한 결과를 나타낸다.
- 도 4a는 초산화물을 처리한 화학식 2의 화합물의 액상 크로마토그래피의 머무름 시간이 변화하는 것을 나타낸다.
- 도 4b는 화학식 2의 화합물에 초산화물을 첨가하고 20분 후 관찰한 결과, 육안으로 확인할 수 있는 형광이 발생하는 것을 나타낸다.

도 5는 화학식 2의 화합물이 초산화물과 반응한 이후 형광 프로브의 흡광 및 형광 스펙트럼을 나타낸다.

도 6은 다양한 아형의 조류독감에 감염된 MDCK 세포에 1 μM 농도의 화합물을 처리하고 시간에 따라 형광 세기를 관찰한 것을 나타낸다.

도 7은 바이러스가 감염되지 않은 MDCK 세포, 바이러스가 감염된 세포 (AI) 및 세포 내에 PMA 또는 LPS를 처리한 세포의 10배 확대 형광 이미지이다.

도 8a는 유세포분리기(FACS)를 이용하여 세포를 분리한 결과이고, 도 8b는 분리된 세포를 활용한 웨스턴블롯 실험 결과에 대한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

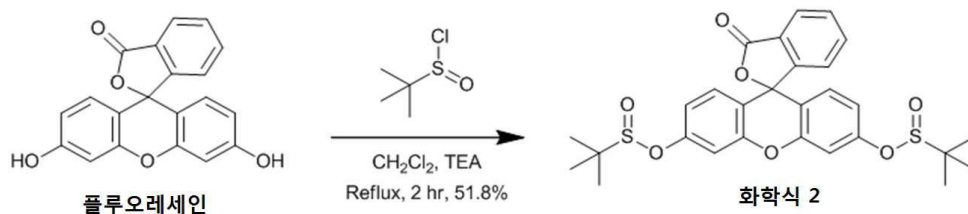
[0038] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 하기의 실시예 및 비교 실험에서 사용된 실험 장치, 분석 장비는 다음과 같다. FT-NMR 분석을 위한 기기로는 Bruker 사의 Avance 400을 사용하였고, LC/MS에는 Thermo 사의 Dionex ultimate 3000 / Velos pro를 사용하여, 이온 트랩 질량 분석 (ion-trap mass spectrometer: ITMS) 방식으로 측정되었다. 유세포 분리는 BD 사의 BD FACSAria™ cell sorter를 사용하였다. 형광 이미지는 Perkin Elmer 사의 Operetta® high content Imaging system 장비를 사용하였다. 시약은 별다른 언급이 없는 한 Aldrich사의 시약을 사용하였고, 특별한 정제 없이 사용하였다. 유기 화합물의 분리 및 정제를 위한 칼럼 크로마토그래피는 실리카겔(silica gel)로 Merck사의 kieselgel 60 (230-400 mesh)을 사용하였고, 박층 크로마토그래피 (TLC)는 실리카겔 60 GF254 (0.25 mm, Merck)가 도포되어 있는 유리판을 사용하고, TLC 상의 화합물은 254 nm 및 365 nm의 자외선을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블롯에 사용된 항체 중 1차 항체는 abcam 사의 anti-influenza A M1 antibody를 사용하였다. 이는 바이러스 입자 중 M1 단백질을 표지하는 항체이다. 2차 항체는 Life technology 사의 Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG 항체를 사용하였다.

[0040] **실시예 1. 화합물의 제조**

[0041] 8 mL의 무수 염화메틸(Methylene chloride, anhydrous)에 100 mg (0.3 mmol)의 플루오레세인(fluorescein)(no acid)를 넣고 현탁액(suspension) 상태로 만든 후 30분간 상온에서 질소환경으로 만들어주었다. 상기 현탁액에 3 당량의 트리에틸아민(Triethylamine: TEA, 125.4 mL, 0.9 mmol)과 tert-부틸설피닐 클로라이드(111 mL, 0.9 mmol)를 주입하였다. 2시간 동안 환류시키면서 반응 정도를 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography: TLC)로 확인하였다. 반응이 더 이상 진행되지 않으면, 상온에서 용매를 제거하고, 정상 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 수득하였다. 실험에 사용된 실리카겔은 Merck 사의 silica gel 60 이며, 용매 조건은 헥세인(hexane):아세트산에틸(ethyl acetate) = 3:1 로 수행하였다. 최종 화합물의 수율은 51.8% 이고, 연노란색 과우더이다. 상기한 바와 같이, 하기 반응식 1에 따라 화학식 2의 화합물을 합성하였다.

[0042] <반응식 1>



[0043] 상기 최종 화합물의 NMR 분석 결과 및 질량 분석 결과는 아래와 같다.

[0044]

[0045] ¹H NMR spectroscopy: (400 MHz, CDCl₃) 8.02(d, ³J_{(H,H)}}=7.2Hz, 1H), 7.71-7.62(2H,m), 7.16-7.11(3H,m), 6.90-6.85(2H,m), 6.81-6.78(2H,m), 3.69(1H,s), 1.35(18H,s);

[0046] ¹³C NMR spectroscopy: (400 MHz, CDCl₃) 169.07, 156.17, 152.89, 151.81, 135.37, 130.11, 129.50, 126.08, 125.23, 123.87, 116.34, 115.94, 115.74, 108.46, 108.10, 81.64, 77.35, 67.05, 59.08, 21.63;

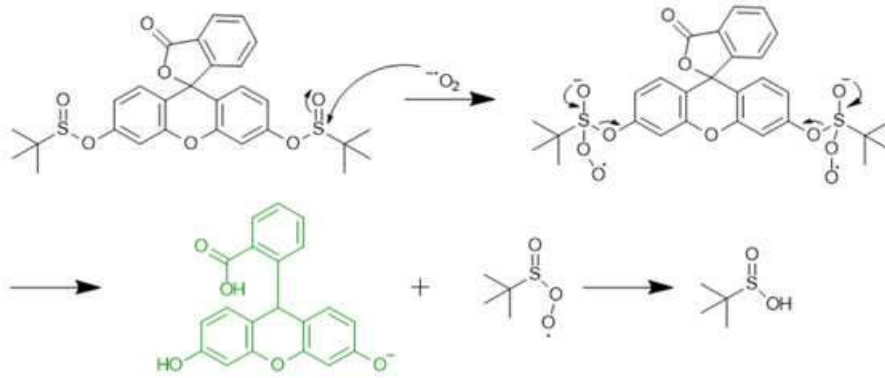
[0047] ESI-MS: $[M+H]^+$ 541.13 (cal.), 541.13 (exp.).

[0048] 실시예 2. 화학식 2의 화합물을 이용한 초산화물의 검출

[0049] (1) 화학식 2의 화합물의 초산화물 또는 다른 활성산소종에 의한 형광 증폭 비교

[0050] 초산화물($O_2^{\cdot -}$) 용액을 만들기 위해 KO_2 를 사용하여 pH 7.4 PBS 버퍼에 녹여 200 μM 의 용액으로 준비하였다. 또한 초산화물에 대한 대조군으로 이용하기 위해 과산화수소(H_2O_2), *tert*-부틸 하이드로퍼옥사이드(*t*-BuOOH), 차아염소산나트륨(Sodium hypochlorite: NaOCl), 소듐 니트로프루시드(sodium nitroprusside), 시스테인(cysteine), 메르카пто메탄올(mercaptomethanol), 글루타티온(glutathione)을 각각 pH 7.4 PBS 버퍼에 녹여 200 μM 의 용액으로 준비하였다. 추가로 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical : $\cdot OH$)을 생성하기 위해 5당량의 Fe^{2+} 이온을 처리한 H_2O_2 용액을 준비하였다. 또한 일중항 산소(Singlet oxygen: 1O_2) 을 생성하기 위해 H_2O_2 과 NaOCl 용액을 1:1로 섞어서 준비하였다. 화학식 2의 화합물 파우더는 10 mM의 DMSO 용액으로 만들어 냉동보관한 뒤, 실험이 사용되기 직전에 녹여 사용하였다. 화학식 2의 화합물은 1 μM , 1% DMSO 수용액이 되도록, 각 활성산소군에 처리하고 시간에 따른 형광 증폭 변화를 관찰하였다. 화학식 2의 화합물은 초산화물과 아래 반응식 2와 같은 반응을 거치고, 생성된 플루오레세인이 형광을 나타낸다.

[0051] <반응식 2>



[0052]

[0053] 그 결과, 도 1과 같이 다른 활성 산소 종에 비해 초산화물에 처리된 화학식 2의 화합물의 형광 세기가 현저히 높게 관찰되었다.

[0054] (2) 초산화물의 농도에 따른 화학식 2의 화합물의 형광 세기 증폭 및 탐지 한계 확인

[0055] 상기 실시예 2.(1)과 같은 방법으로, 10 μM 의 화학식 2의 화합물에 초산화물의 농도를 달리하여 처리하고, 농도에 따른 형광 세기 증폭 및 초산화물의 탐지 한계를 계산하였다.

[0056] 도 2a와 같이, 초산화물(KO_2)의 주입 농도가 높아질수록 형광의 세기가 밝아짐을 확인할 수 있었다. 초산화물에 대한 정량은 할 수 없으나, KO_2 의 주입 농도에 따른 선형성을 확인하기 위하여 선형식에 피팅을 수행하였다. 그 결과 도 2b와 같이 높은 선형성을 보였으며, 이를 통한 탐지 한계값은 30.4 μM 로 나타났다.

[0057] (3) 화학식 2의 화합물의 농도에 따른 초산화물과의 반응 속도 확인

[0058] 상기 실시예 2.(1)과 같은 방법으로, 각기 다른 농도의 화학식 2의 화합물을 200 μM 의 초산화물에 처리하고, 시간에 따라 형광 세기를 관찰하였다.

[0059] 도 3과 같이, 고농도의 초산화물이 처리되었을 때 15분 내로 형광이 완전히 밝아짐을 관찰할 수 있었고, 이를 통해서 단시간에 화학식 2의 화합물이 초산화물을 감지함을 확인할 수 있었다.

[0060] (4) 화학식 2의 화합물과 초산화물의 결합 확인

[0061] 화학식 2의 화합물과 초산화물의 결합 여부를 확인하기 위해, 화학식 2의 화합물에 KO_2 를 주입한 이후의 역상 크로마토그래피의 머무름 시간을 관찰하였다. 먼저 초산화물을 처리하기 전의 화합물을 LC-MS로 확인하여 머무름 시간 및 매스 값을 확인하였다. 이후 100 μM 농도의 KO_2 를 처리하여 20분간 둔 뒤, 이와 반응한 화합물을 LC-

MS로 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 4a와 같이 254 nm 대역의 흡광이 나타나는 시간이 약 10분 정도에서 약 6분 50초 정도로 상당히 변화하여, 화학식 2의 화합물과 초산화물의 결합을 확인할 수 있었다.

[0063] **(5) 화학식 2의 화합물에 초산화물을 첨가한 경우의 형광 변화의 육안 확인**

[0064] 1% DMSO 수용액 중 10 μM의 화학식 2의 화합물에 pH 7.4 PBS 버퍼 중 100 μM의 KO₂를 처리한 뒤, 20분간 두어 충분히 초산화물을 발생시킨 후 관찰하였다. 그 결과 도 4b와 같이 육안으로도 확인할 수 있을 정도의 형광이 발생하는 것을 확인하였다.

[0065] **(6) 초산화물과 반응한 이후 형광 프로브의 흡광 및 형광 스펙트럼**

[0066] 1% DMSO 수용액 중 10 μM의 화학식 2의 화합물에 pH 7.4 PBS 버퍼 중 100 μM의 KO₂를 처리한 뒤 20분간 두어 충분히 초산화물을 발생시킨 후 관찰하였다. 도 4b와 같이 육안으로도 확인할 수 있을 정도의 형광이 발생하는 것을 확인하였다. 형광이 밝아진 물질을 Molecular Device사의 Flexstation 3 장비를 사용하여 형광 및 흡광을 측정하였다.

[0067] 그 결과 도 5에 표기한 바와 같이 490 nm 대역에서 최대 흡광, 520 nm 대역에서 최대 형광이 관찰되었으며, 이는 플루오레세인의 알려진 광학적 특성과 동일하다. 이를 통해서 화학식 2의 화합물의 치환기가 초산화물에 의해 분리되고, 플루오레세인 형광단만이 남은 것을 확인할 수 있었다.

[0068] **실시예 3. 숙주세포의 바이러스 감염 여부 관찰**

[0069] **(1) 화학식 2의 화합물을 이용한 숙주세포의 바이러스 감염 여부 관찰**

[0070] MDCK(Madin-Darby canine kidney) 세포를 96-웰 플레이트에 1.5 x 10⁴ cells/well 농도로 37℃에서 24시간 동안 배양시켰다. 이때 DMEM(Dulbecco's minimum essential medium)에 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)과 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 배지를 사용하였다. H1N1, H5N2, 및 H9N2 (EID50/mL = 10^{7.625}) 아형의 조류독감 바이러스는 혈청이 없는 배지(serum-free media)에 분주하고 1/10 농도부터 절반씩 희석시켜 MDCK 세포가 배양되고 있는 각 웰에 처리 후, 37도에서 24시간 동안 배양시켰다.

[0071] 화학식 2의 화합물 파우더는 10 mM의 DMSO 용액으로 만들어 냉동보관하였다가, 실험이 사용되기 직전에 DMSO에 녹여 사용하였다. 화학식 2의 화합물은 1 μM, 1% DMSO 수용액이 되도록 세포에 처리한 뒤, 30분간 배양하여 형광 세기 및 이미지를 관찰하였다. 이 때 형광 세기는 Molecular Device사의 Flexstation 3 장비를 사용하여 조절하고, 형광 이미지는 Perkin Elmer 사의 Operetta High-Content Imaging System을 사용하여 얻었다. 형광은 480 nm에서 여기하고, 520 nm에서 방출되는 값을 측정하였다. 이미지에 사용한 필터는 FITC 필터로 480/40 nm의 레이저를 사용하였으며, 527/30 nm 대역의 파장을 이미지화하였다.

[0072] 그 결과 도 6a와 같이, 3종의 조류독감 아형 바이러스에 감염된 MDCK 세포에서 모두에서 대조군과 현저히 차이는 형광 증폭이 관찰되었으며, 이러한 수치는 15분 이내에 확연히 구별되는 것으로 확인하였다. 또한 감염 바이러스의 농도에 따라 형광이 밝아지는 것을 확인하였는데, 도 6b와 같이 바이러스 입자를 점차 희석해서 주입함에 따라 세포에서 관찰되는 형광의 세기가 약화되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0073] **(2) 화학식 2의 화합물을 이용한 세포 내 초산화물 증가 여부 관찰 및 바이러스 감염과 화합물 형광 증가 사이의 메커니즘 규명**

[0074] 도 7은 바이러스가 감염되지 않은 MDCK 세포(non-induced)와 바이러스가 감염된 세포 (AI) 및 세포 내에 초산화물의 발생을 유도하는 것으로 알려진 화합물인 포볼 12-미리스테이트 13-아세트산(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate: PMA), 또는 리포폴리사카라이드(Lipopolysaccharide: LPS)가 처리된 세포의 10배 확대 형광 이미지가 다. bright field (도 7의 1행) 이미지에서 바이러스에 감염된 세포 및 감염되지 않는 세포 모두의 모습이 보이지만, FITC 필터 (527/30 nm)를 통해본 형광 이미지(도 7의 2-4행)에서는 바이러스에 감염된 세포 및 PMA, LPS가 처리된 형광 세기가 현저히 강하게 나타나는 것이 관찰되었다. 이를 통해서 바이러스의 감염이 세포 내에 초산화물 증가를 유발하고, 화학식 2에 기재된 화합물에 의해 검출되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 핵을 염색하는 것으로 알려진 Hoechst 염색과 오버랩 이미지를 비교해보았을 때(도 7의 4열), 화합물이 핵을 비롯한 특정 소기관으로 편재되지 않고 세포질 내에 고르게 분포 되어있는 것을 확인하였다. 이를 통해 화합물이 세포 내의 모든 위치에서 초산화물과 반응이 가능하고, 다른 세포 소기관 특이적인 화합물에 비해 높은 반응성을 가질 수

있음을 확인하였다.

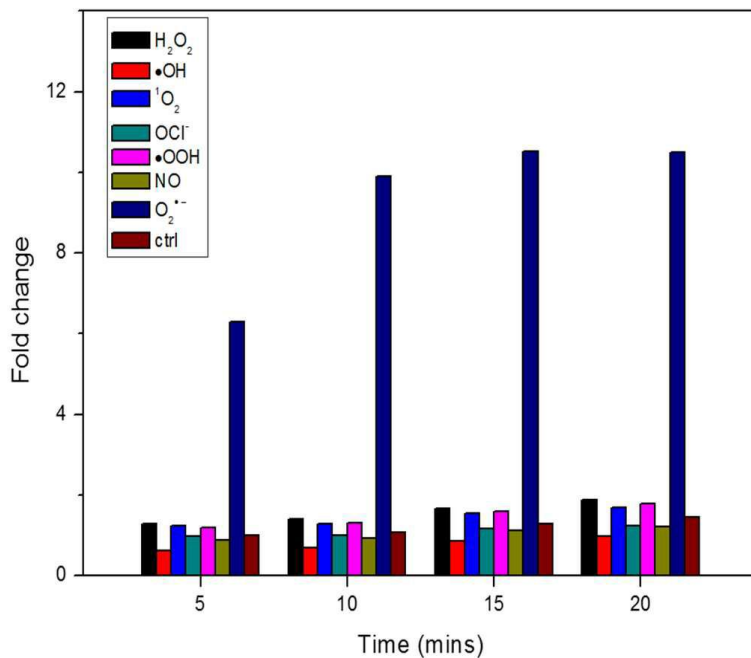
[0075] (3) 화학식 2로 표기된 화합물을 활용한 유세포 분리기 기반의 바이러스 감염 세포의 식별 및 분리

[0076] 바이러스 입자 중 H1N1이 50% 감염되는 희석 농도 (1/640)로 감염시킨 MDCK 세포에 100 nM 농도의 화학식 2로 표기된 화합물을 처리한 뒤, 30분간 배양하였다. 이후 상층액을 제거한 뒤 유세포분리기를 통해 분리하였다.

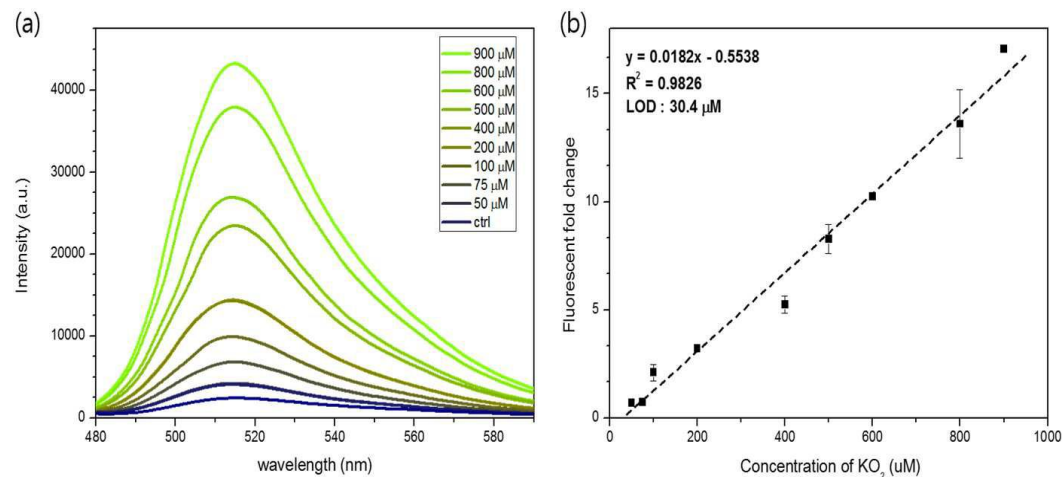
[0077] 도 8a에 표시된 것과 같이 형광이 밝은 부분(상단, positive, P3)과 약한 부분 (하단, negative, P4)으로 나누어 세포를 분리하였고, 얻어진 세포를 웨스턴 블롯 방법을 통해 이미지화하였다. 웨스턴 블롯에 사용된 항체 중 1차 항체는 abcam 사의 anti-influenza A M1 antibody를 사용하였다. 이는 바이러스 입자 중 M1 단백질을 표지하는 항체이다. 2차 항체는 Life technology 사의 Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG 항체를 사용하였다. 그 결과를 도 8b에 표시하였다. P3로 표시된 부분이 강한 형광을 나타내는 세포군이고, P4가 상대적으로 형광을 나타내지 않는 세포군이다. 26 kDa 부근에서 바이러스 입자의 표적 단백질인 M1 단백질이 관찰되는데, P3군에서만 표적 단백질의 밴드가 강하게 확인되었다. 이를 통해서 화합물의 형광 켜짐 현상을 통해 세포의 감염 여부를 구별하여 분리하였고, 바이러스의 특정 단백질을 표지하는 항체를 사용하여 식별할 수 있었다.

도면

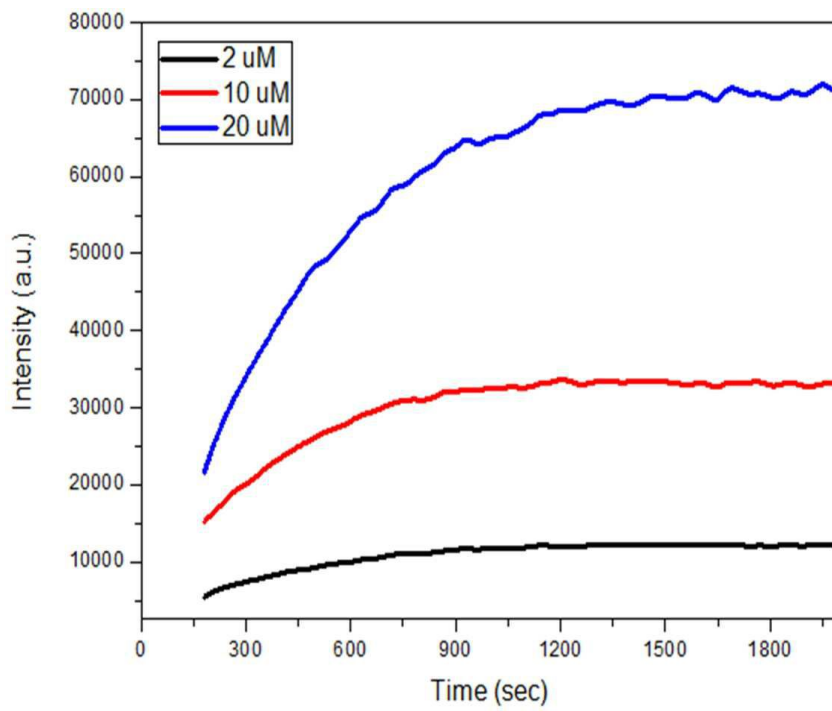
도면1



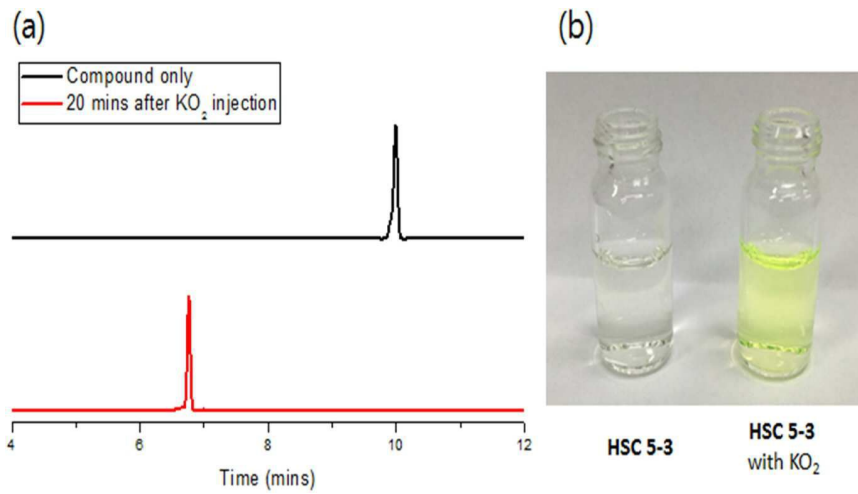
도면2



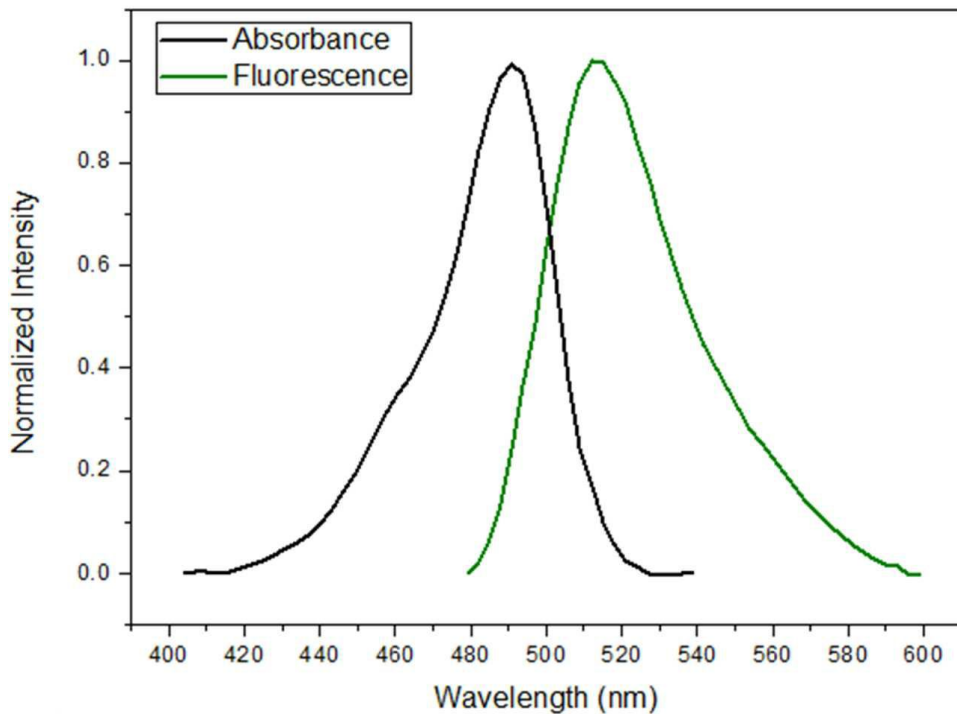
도면3



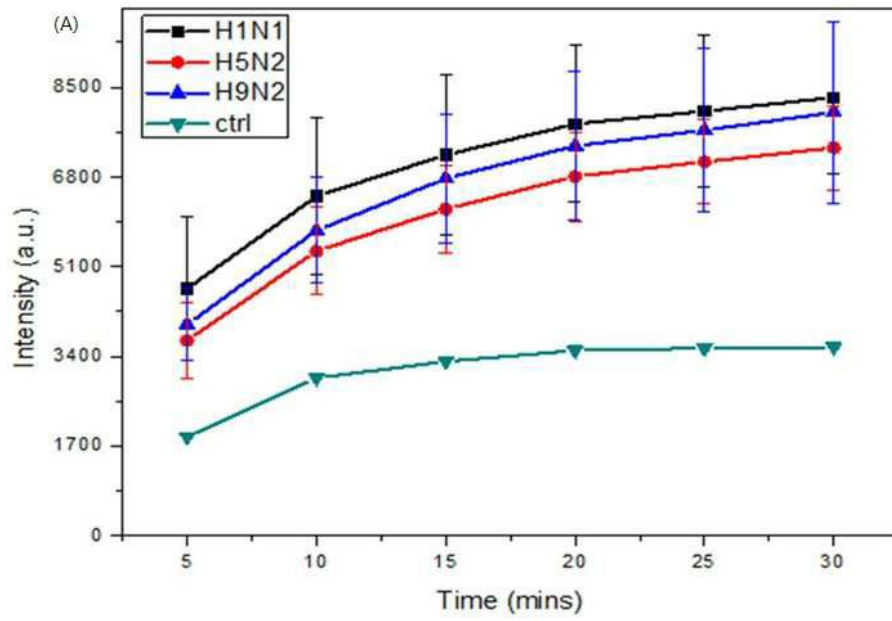
도면4



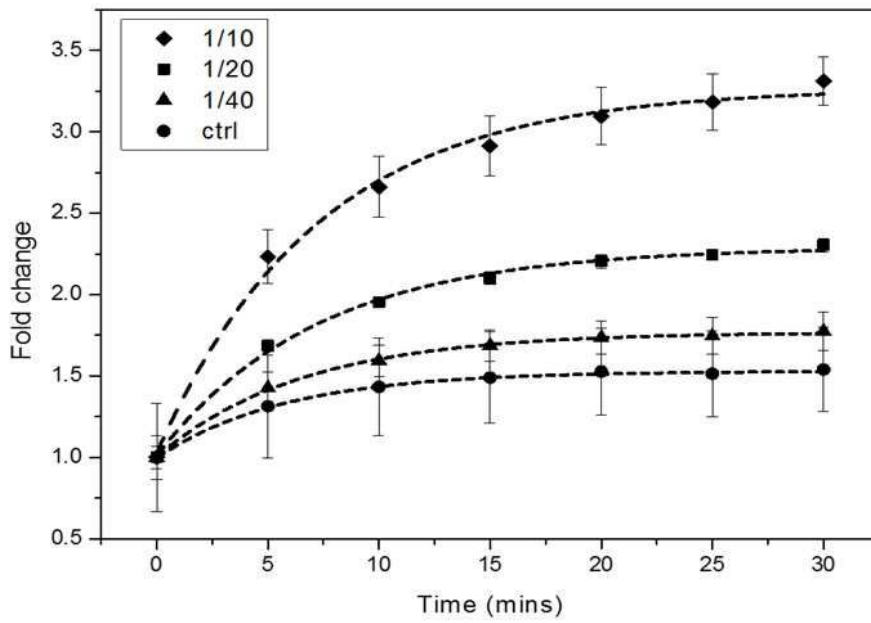
도면5



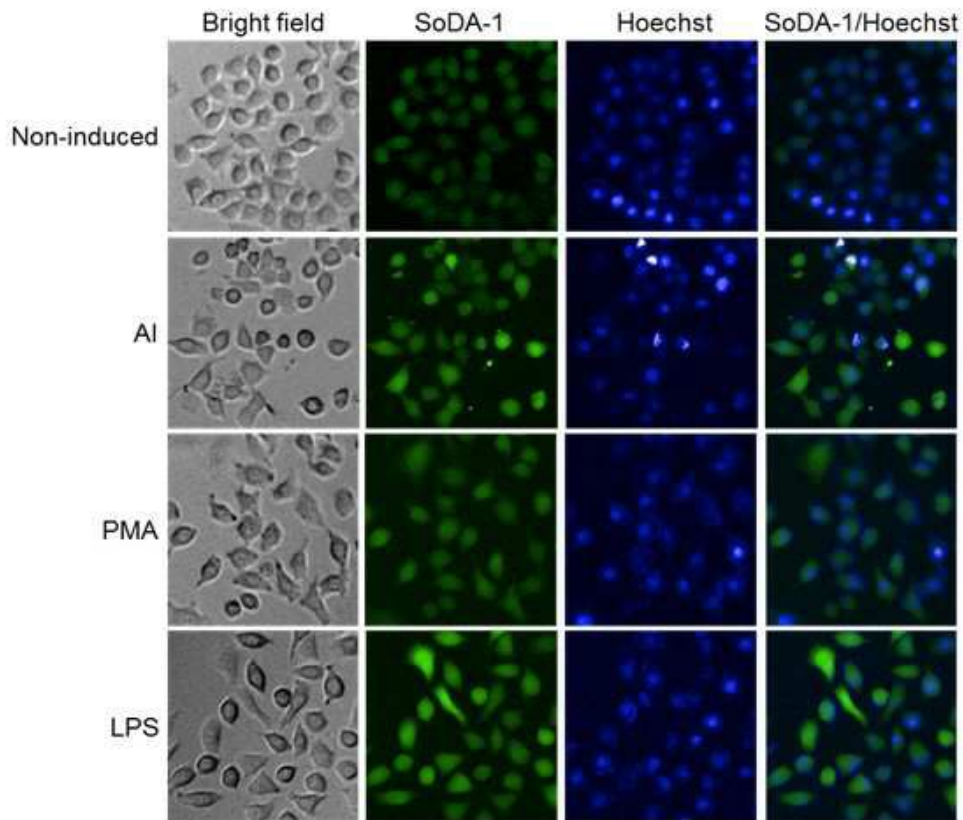
도면6



(B)

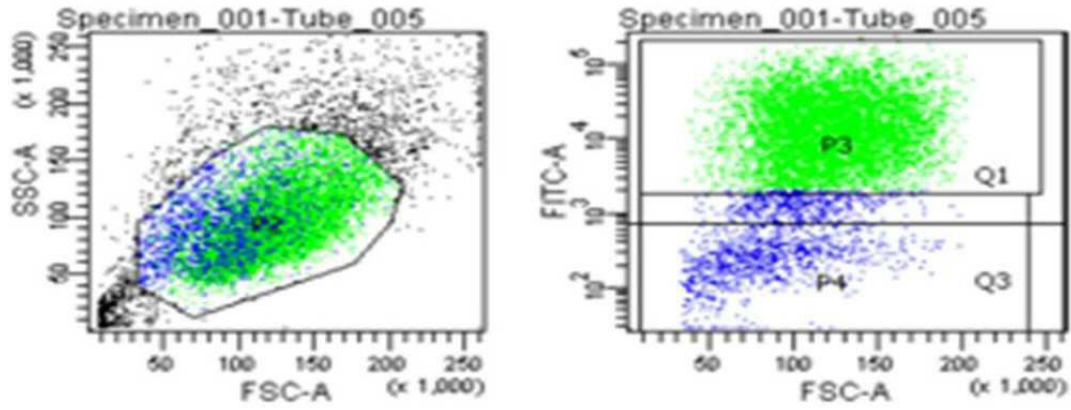


도면7



도면8

(a)



(b)

