



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0026254  
(43) 공개일자 2011년03월15일

(51) Int. Cl.

C07H 7/06 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0084068

(22) 출원일자 2009년09월07일

심사청구일자 2009년09월07일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

서울대학교산학협력단

서울 관악구 신림동 산 56-1

(72) 발명자

조봉래

서울 송파구 송파동 151 한양아파트 23동 207호

박승범

서울특별시 관악구 낙성대동 서울대 교수아파트  
122-1동 502호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

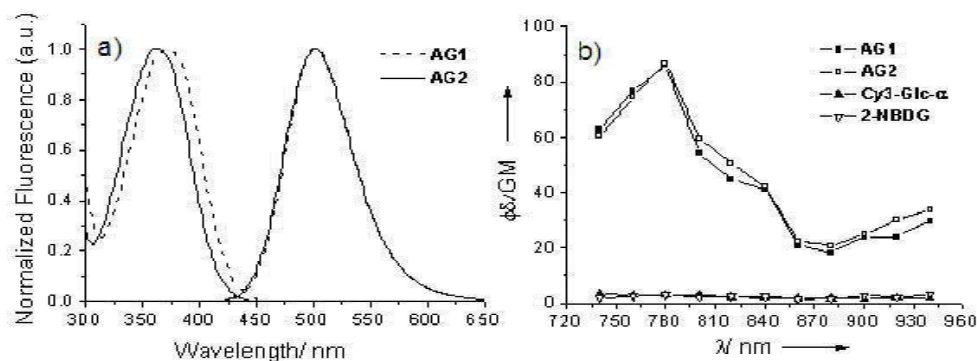
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 이광자 트래이서, 이의 제조방법 및 이를 이용한 항암제 스크리닝 방법

### (57) 요약

본 발명에서는 이광자 트래이서 등의 용도로 유용한 화합물 및 이의 제조방법이 개시되며, 또한 이들 화합물을 이용한 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법, 항암제 스크리닝 방법 및 암 세포 진단방법이 개시된다. 본 발명에서 개시된 이광자 트래이서 등의 용도로 유용한 화합물은 암 세포에 의한 선택적 흡수성, 깊은 투과력을 통한 색선 이미지, 높은 수용성 및 pH 저항성, 낮은 독성 등 우수한 물성을 보이고 있으며, 심부 조직에 위치한 살아 있는 세포에 대해서도 상대적으로 장시간 동안 적용할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**이향연**

서울특별시 관악구 남현동 602-113번지 202호

**박종민**

서울특별시 관악구 봉천7동 1604-18번지 202호

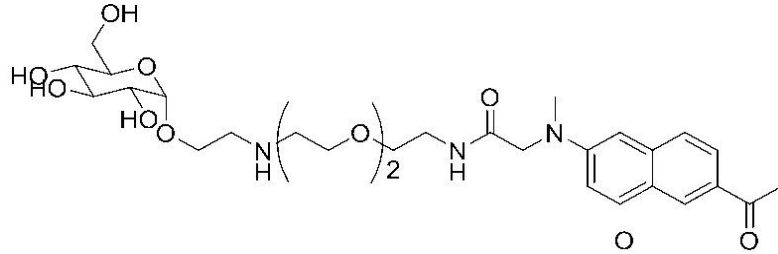
---

## 특허청구의 범위

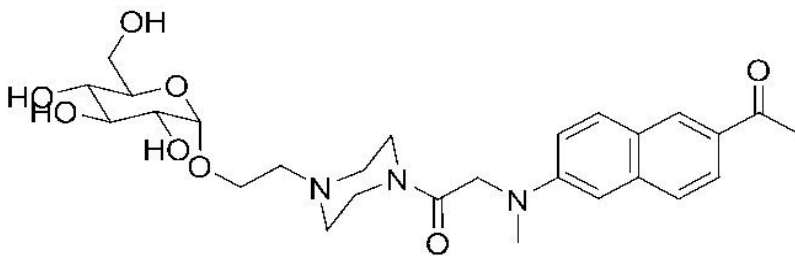
### 청구항 1

하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 가지는 화합물:

[화학식 5]



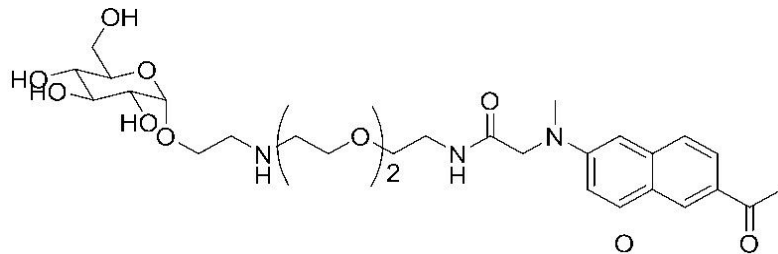
[화학식 6]



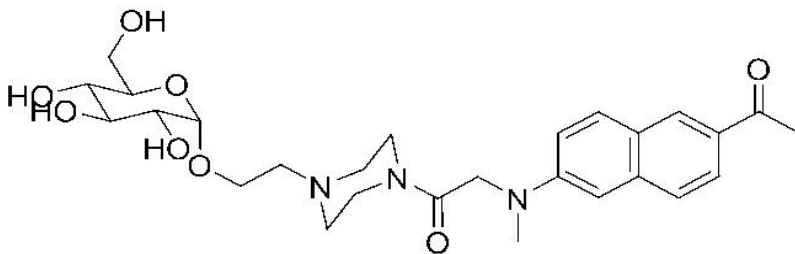
### 청구항 2

하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서:

[화학식 5]



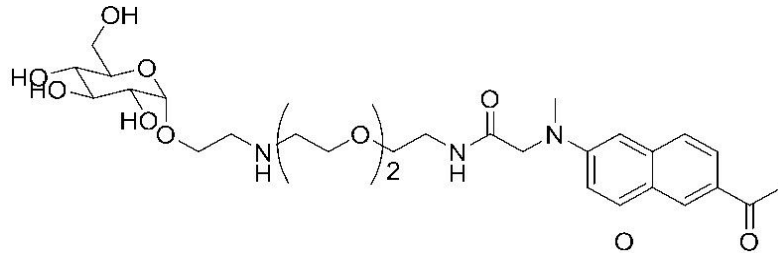
[화학식 6]



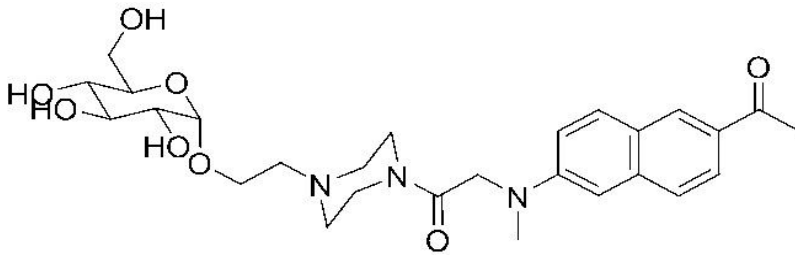
### 청구항 3

하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서를 포함하는 것을 특징으로 하는 TPM 방법을 이용한 항암제 스크리닝용 키트:

[화학식 5]



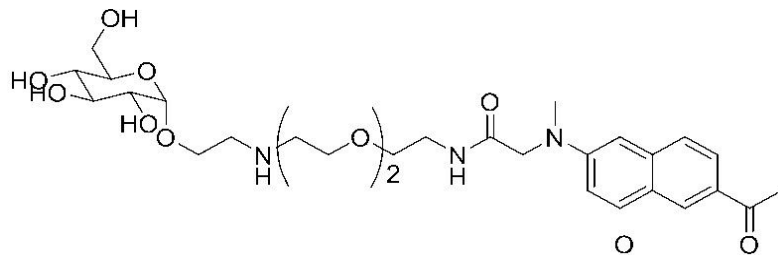
[화학식 6]



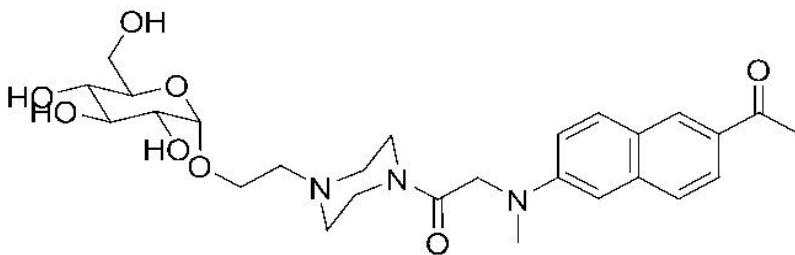
#### 청구항 4

하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서 및 항암제를 체내 또는 체외로 적출된 세포에 투여하고 TPM 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크리닝 방법:

[화학식 5]



[화학식 6]



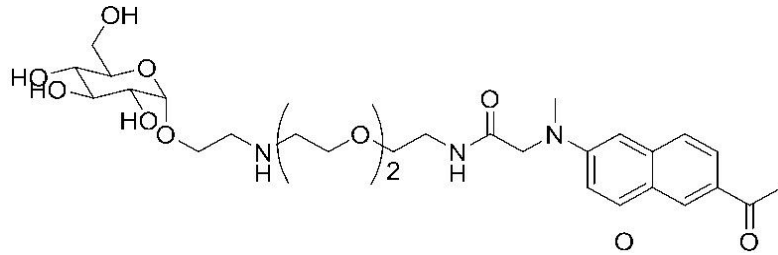
#### 청구항 5

제4항에 있어서, 조직 표면으로부터 깊이가 달리하여 TPM 이미지를 얻음으로써 이루어지는 것을 특징으로 하는 항암제 스크리닝 방법.

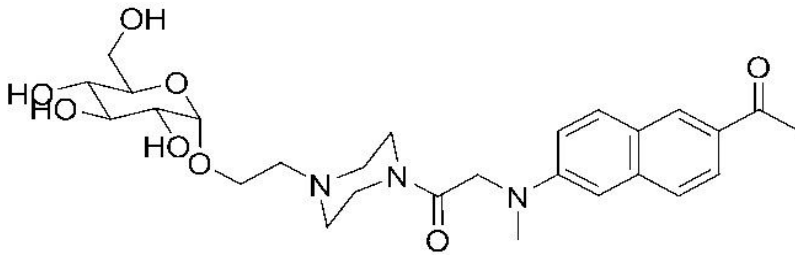
#### 청구항 6

하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서를 포함하는 것을 특징으로 하는 TPM을 이용한 세포 내 글루코스 흡수 시각화용 키트:

[화학식 5]



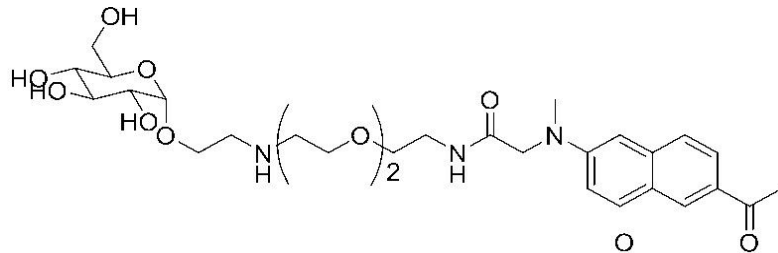
[화학식 6]



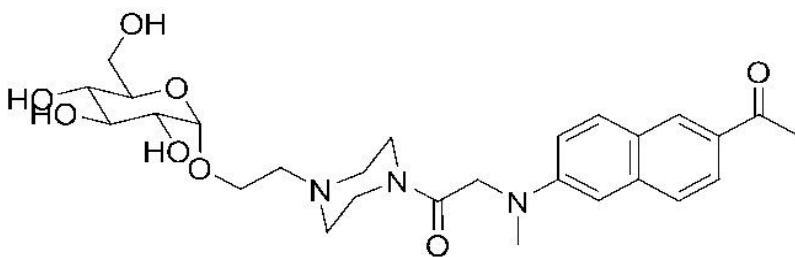
#### 청구항 7

체내 또는 체외로 적출된 세포 내 글루코스 흡수를 시각화하는 방법으로서, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서를 이용하는 것을 특징으로 하는 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법:

[화학식 5]



[화학식 6]



#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 세포는 75-150  $\mu\text{m}$  깊이의 심부 조직인 것이며, 상기 시각화는 3,000 초 이상 동안 수행할 수 있는 것을 특징으로 하는 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법.

#### 청구항 9

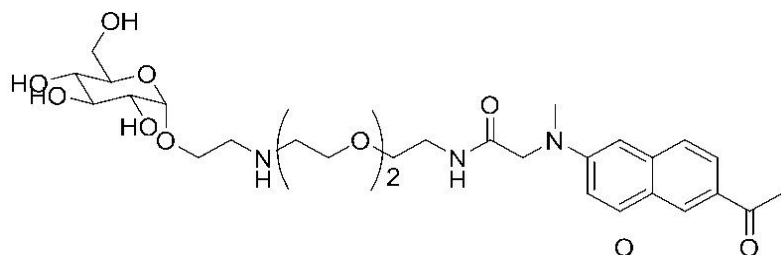
제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 화학식 5 또는 화학식 6의 화합물의 농도를 100  $\mu\text{M}$  이하로 사용하는 것을 특징으로 하는 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법.

#### 청구항 10

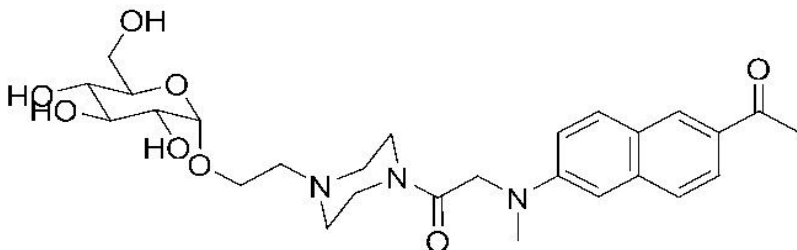
하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서를 포함하는 것을 특징으로 하는 TPM 방법을

이용한 암 세포 진단용 키트:

[화학식 5]



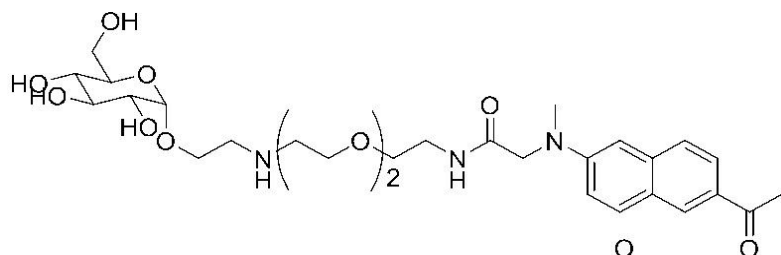
[화학식 6]



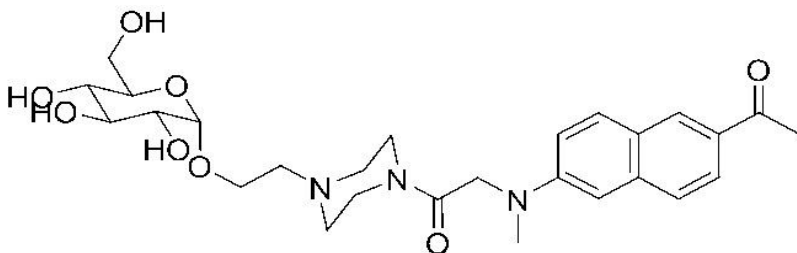
## 청구항 11

체내 또는 체외로 적출된 세포가 암 세포인지 여부를 진단하는 방법으로서, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트래이서를 사용하고 TPM 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 암 세포 진단방법:

[화학식 5]



[화학식 6]



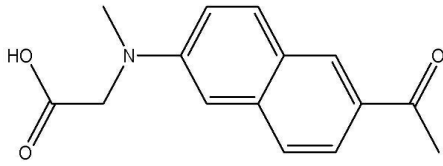
## 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 암 세포는 초기 단계의 암 세포임을 특징으로 하는 체외 적출 암 세포 진단방법.

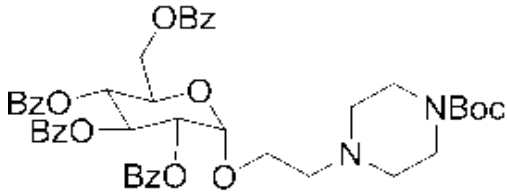
## 청구항 13

화학식 5의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 제조방법은 하기 화학식 1 화합물과 화학식 3 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화학식 5 화합물의 제조방법:

[화학식 1]



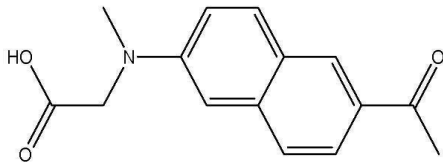
[화학식 3]



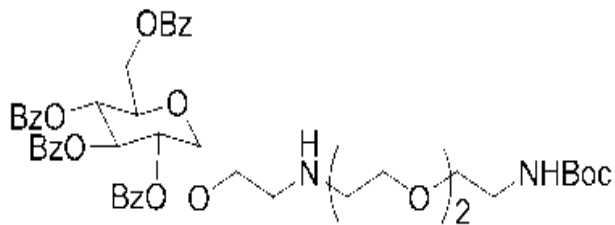
#### 청구항 14

화학식 6의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 제조방법은 하기 화학식 1 화합물과 화학식 4 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화학식 5 화합물의 제조방법:

[화학식 1]



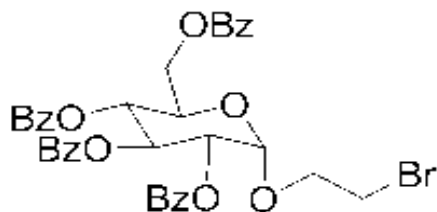
[화학식 4]



#### 청구항 15

제14항에 있어서, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물과 N-Boc-피페라진을 반응시켜 수득하는 것을 특징으로 하는 화학식 5 화합물의 제조방법:

[화학식 2]



명세서

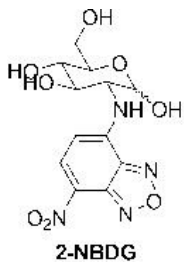
발명의 상세한 설명

기술분야

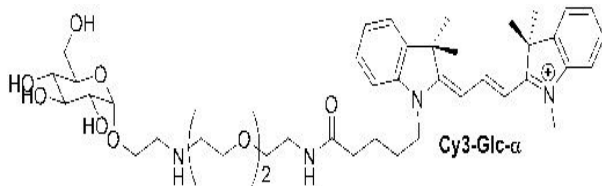
[0001] 본 발명은 이광자 트레이서 등의 용도로 유용한 화합물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 내 글루코스 흡수 시각화 방법, 암 세포 진단 방법 및 항암제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0002] 글루코스는 세포 성장에 필수적인 주요 에너지 소스이다. 빠르게 성장하는 암 세포는 높은 당분해 속도를 보인다. 따라서, 이러한 세포에서의 글루코스 흡수의 속도는 더욱 빠르는데, 이는 주로 글루코스 트랜스포터 (GLUTs) 의 과발현 또는 강화된 세포 내 전위(translocation) 및 종양(tumor) 내 미토콘드리아 계열 헥소카나아제의 증가된 활성 때문이다. 생체 시스템에서 글루코스의 대사작용을 모니터링하기 위하여 다양한 트레이서(추적자), 예를 들어, [ $^{18}\text{F}$ ]-2-플루오로-2-디옥시글루코스 ( $^{18}\text{F}$  FDG), 2-[*N*-(7-니트로벤즈-2-옥사-1,3-디아졸-4-일)아미노]-2-디옥시-D-글루코스 (2NBDG), 및 IR 염료 800CW-2DG 가 개발되었다. FDG는 양전자 발산 토포그래피(positron emission topography, PET)를 이용하여 글루코스 대사작용의 생체 내(*in vivo*) 분석에 널리 사용되는 반면, 2-NBDG 및 IR 염료 800CW-2DG는 글루코스 트랜스포터를 포함하는 세포 대사 작용을 연구하기 위하여 또한 종양 이미징 연구에 사용되는 형광 프로브(fluorescent probes)이다.



[0003] 최근, 본 발명자는 신규한 형광 프로브인 Cy3-연결 O-1-글리코실화 글루코스 (Cy3-Glc- $\alpha$ )를 개발하였는데, 이 물질은 글루코스가 결핍된 상태(starvation)를 만들지 않고도 사용될 수 있고 더욱 밝은 이미지를 만들어 내며 항암제의 스크리닝에 적용될 수 있다는 점에서 2-NBDG보다 우수한 글루코스 프로브이다.



[0005] 일광자 현미경(One-Photon Microscopy, OPM)에서 프로브는 단파장광( $\sim 350\text{--}550\text{ nm}$ )에 의해 여기되고, 이러한 점은 조직 이미징에 적용함에 있어서 제한이 되는데, 이는 내재적인 문제점 예를 들어 얇은 침투 두께( $<80\text{ }\mu\text{m}$ ), 세포의 자기 형광성 autofluorescence)에 의한 간섭, 광표백(photobleaching) 및 광손상(photodamage)에 기인한다. 이러한 문제를 극복하기 위하여, 2개의 근적외선 광자를 여기에 사용하는 이광자 현미경(Two-Photon Microscopy, TPM)을 사용하는 것이 중요하다. TPM은 OPM에 비하여 여러 가지 장점을 지니는데, 여기에는 높은 침투 두께( $>500\text{ }\mu\text{m}$ ), 국부화된(localized) 여기 및 증가된 관찰 시간이 포함된다. 특히, TPM에 의해 제공되는 추가 침투 깊이는 조직 이미징 연구에 필수적인 요소인데, 이는 예를 들어 손상된 세포와 같은, 조직 표면 샘플 제작(surface preparation)으로부터 기인하는 제작 중 발생하는 표면의 상처(artifacts)이 조직 내부로  $70\text{ }\mu\text{m}$  이상 확장되기 때문이다. 그러나, 살아있는 세포 및 조직에 의해 흡수되는 글루코스의 흡수를 TP 트레이서를 이용하여 시각화하는 시도는 현재까지 보고된 바 없다.

## 발명의 내용

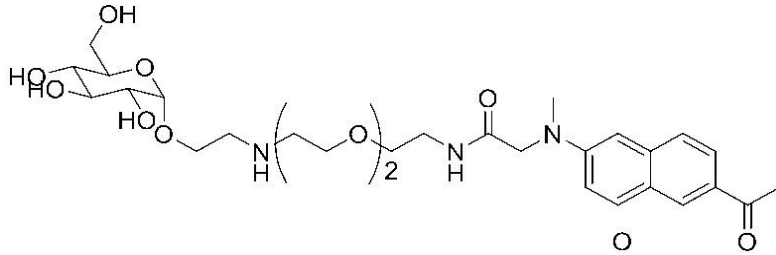
### 해결 하고자하는 과제

[0007] 따라서, 본 발명에서는 살아있는 세포에 대해서도 TPM을 이용하여 글루코스 흡수를 시각화 또는 정량화하기에 유용한 화합물, 이의 제조방법 및 이를 이용한 세포 내 글루코스 흡수 시각화 방법, 암 세포 진단 방법 및 항암제 스크리닝 방법을 개시하고자 한다.

### 과제 해결수단

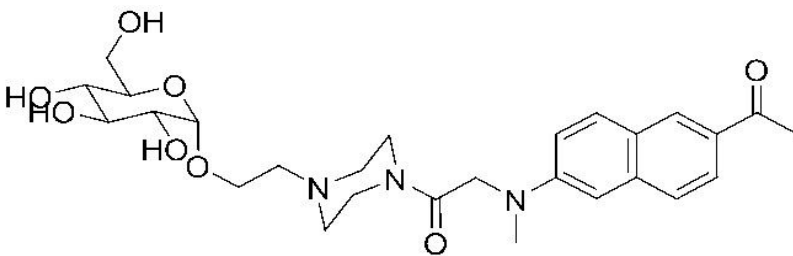
[0008] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면에 따르면 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 가지는 화합물이 개시된다.

[0009] [화학식 5]



[0010]

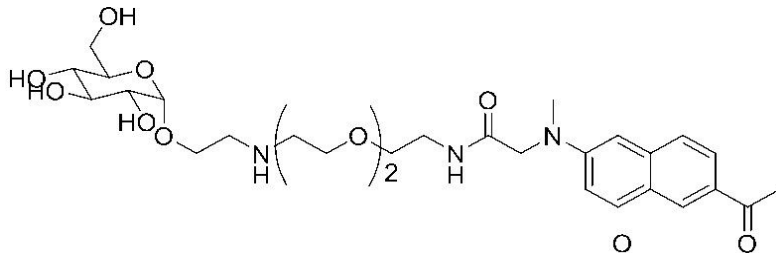
[0011] [화학식 6]



[0012]

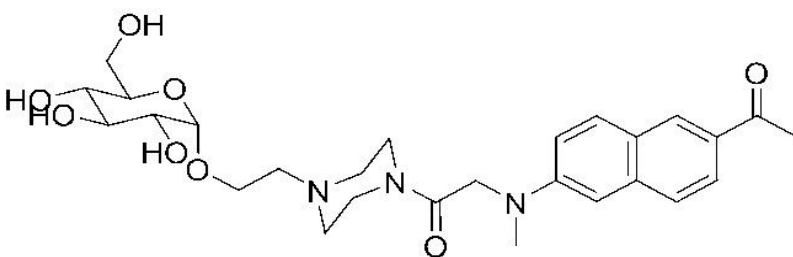
[0013] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트래이서가 개시된다.

[0014] [화학식 5]



[0015]

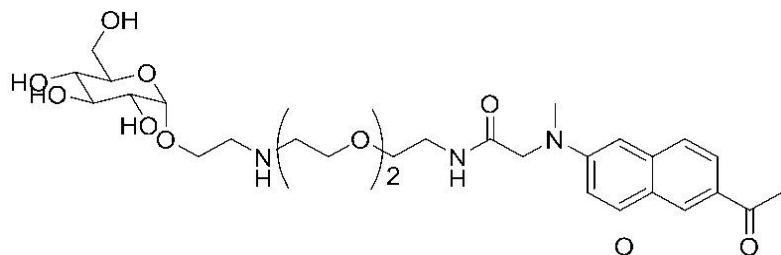
[0016] [화학식 6]



[0017]

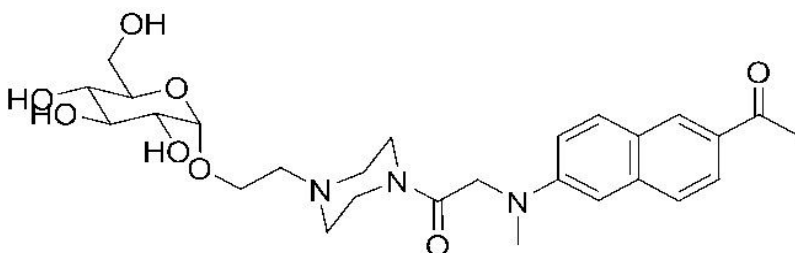
[0018] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트래이서 및 항암제를 체내 또는 체외로 적출된 조직에 투여하고 TPM 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 항암제 스크리닝 방법 및 이를 위한 키트가 개시된다.

[0019] [화학식 5]



[0020]

[0021] [화학식 6]

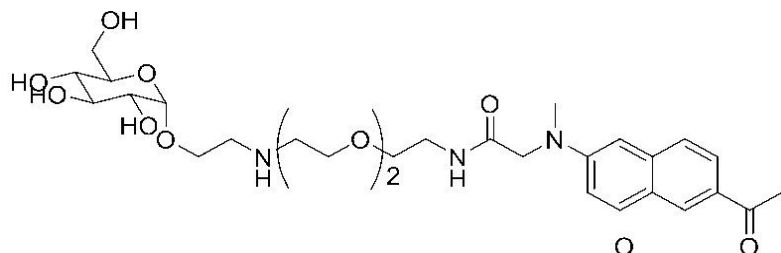


[0022]

[0023] 일 구현예에 따르면, 조직 표면으로부터 깊이를 달리하여 TPM 이미지를 얻음으로써 항암제를 스크리닝할 수 있다.

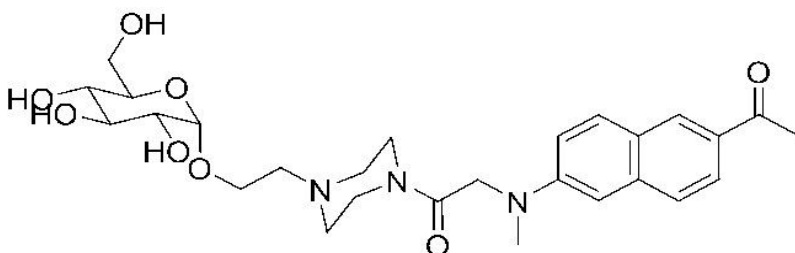
[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 체내 또는 체외로 적출된 세포 내 글루코스 흡수를 시각화 또는 정량화하는 방법으로서, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트레이서를 이용하는 것을 특징으로 하는 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법 및 이를 위한 키트가 개시된다.

[0025] [화학식 5]



[0026]

[0027] [화학식 6]



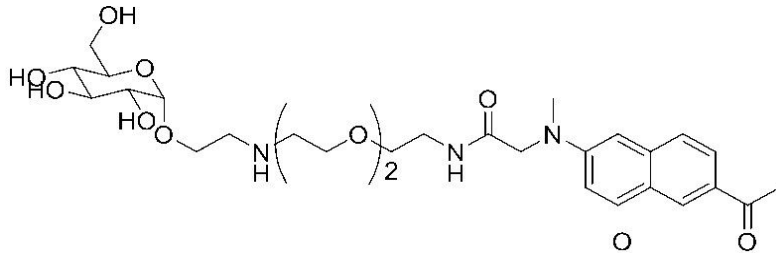
[0028]

[0029] 일 구현예에 따르면, 상기 세포는 75-150  $\mu\text{m}$  깊이의 심부 조직인 것이며, 상기 시각화 또는 정량화는 3,000 초 이상 동안 이루어진 글루코스 흡수에 대해서도 수행할 수 있다.

[0030] 다른 구현예에 따르면, 상기 화학식 5 또는 화학식 6의 화합물의 농도가 100  $\mu\text{m}$ 보다 큰 경우에는 세포 사멸이 발생할 수도 있으므로, 상기 농도를 100  $\mu\text{m}$  이하로 사용하는 것이 바람직하다.

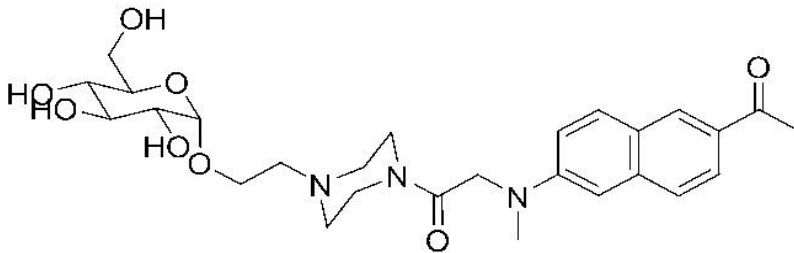
[0031] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 체내 또는 체외로 적출된 세포가 암 세포인지 여부를 진단하는 방법으로서, 하기 화학식 5 또는 화학식 6의 구조를 포함하는 이광자 트래이서를 사용하고 TPM 방법을 이용하는 것을 특징으로 하는 암 세포 진단방법 및 이를 위한 키트가 개시된다.

[0032] [화학식 5]



[0033]

[0034] [화학식 6]

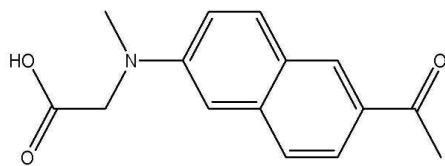


[0035]

[0036] 일 구현예에 따르면, 상기 암 세포는 초기 단계의 암 세포도 진단할 수 있다.

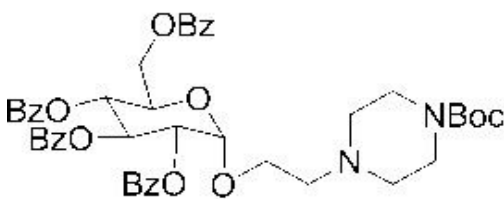
[0037] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 화학식 5의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 제조방법은 하기 화학식 1 화합물과 화학식 3 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화학식 5 화합물의 제조방법이 개시된다.

[0038] [화학식 1]



[0039]

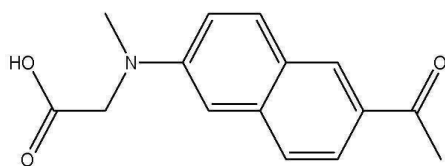
[0040] [화학식 3]



[0041]

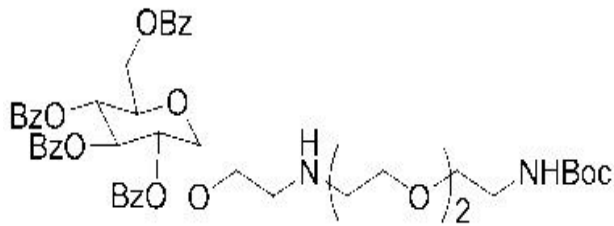
[0042] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 화학식 6의 화합물을 제조하는 방법으로서, 상기 제조방법은 하기 화학식 1 화합물과 화학식 4 화합물을 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화학식 5 화합물의 제조방법이 개시된다.

[0043] [화학식 1]



[0044]

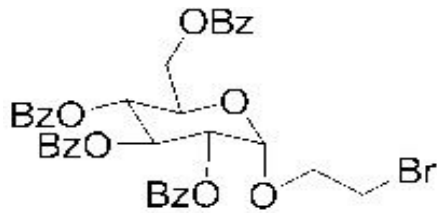
[0045] [화학식 4]



[0046]

[0047] 일 구현예에 따르면, 상기 화학식 4의 화합물은 하기 화학식 2의 화합물과 N-Boc-피페라진을 반응시켜 수득할 수 있다.

[0048] [화학식 2]



[0049]

### 효 과

[0050] 본 발명에서 개시하는 이광자 트레이서 등의 용도로 유용한 화합물은 암 세포에 의한 선택적 흡수성, 깊은 투과력을 통한 색전 이미지, 높은 수용성 및 pH 저항성, 낮은 독성 등 우수한 물성을 보이고 있으며, 심부 조직에 위치한 살아있는 세포에 대해서도 상대적으로 장시간 적용할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명에 개시된 제조방법은 본 발명의 화합물의 제조 수율, 선택도 및 순도가 높고 단순한 공정에 의해 이루어질 수 있다는 장점이 있다.

[0052] 또한, 본 발명에 개시된 세포 내 글루코스 흡수의 시각화 방법, 항암제 스크리닝 방법 및 암 세포 진단방법은 정확성, 재현성 및 독성 등 위험도 측면에 우수하며, 심부 조직에 위치한 살아있는 세포에 대해서도 상대적으로 장시간 적용할 수 있다.

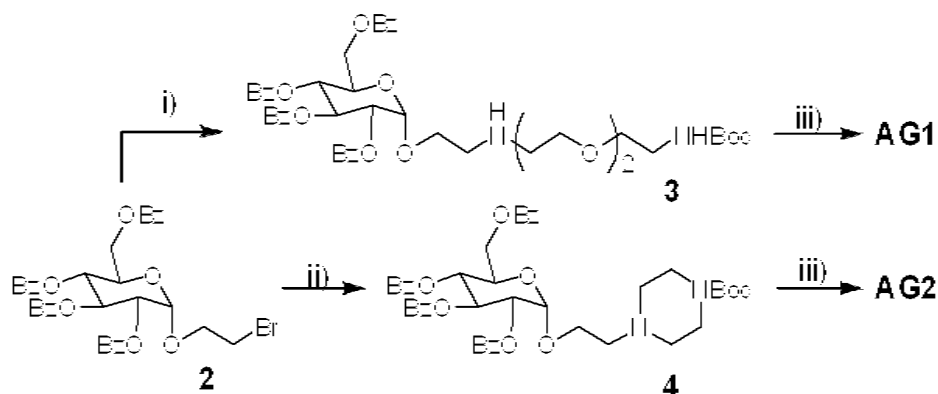
### 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0053] 글루코스 흡수를 시각화하기 위한 TP 트레이서의 요건 중에는 세포 및 조직을 염색(staining)하기 위한 충분한 수용해성, 암 세포에 의한 우세한 흡수성, 밝은 TPM 이미지를 위한 넓은 TP 단면적, pH 저항성 및 높은 광안정성이 포함된다.

[0054] 본 발명의 전략은 플루오로포어(fluorophore) 2-아세틸-6-디메틸아미노나프탈렌(아세단)을 이용하여 α-D-글루코스를 3,6-디옥사옥탄-1,8-디아민(AG1) 또는 피페라진(AG2) 연결를 통하여 연결하는 것인데, 이는 트레이서가 글루코스에 특이적인 메커니즘에 의해 세포 내로 전달되도록 하기 위함이다. 아세단은 극성에 민감한 플루오로포어로서 세포막, 금속 이온 및 산성 소포(acidic vesicles)를 위한 TP 프로브의 개발에 성공적으로 채용되고 있다. 본 발명에서는 이러한 트레이서들이 암 세포 및 살아있는 조직의 글루코스 흡수를 75-150 μm 깊이로 3,000초 이상 동안 시각화하는 것을 용이하게 하며, 항암제를 스크리닝하는데 사용될 수 있다는 점을 개시한다.

[0055] AG1 및 AG2의 제조방법을 반응식 1에 나타내었다. 6-아세틸-2-[-N-메틸-N-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌 (1), 화합물 2, 및 화합물 3을 종래 방법에 의해 제조하였다. 화합물 2와 N-Boc-피페라진과 반응하여 수율 70%로 화합물 4를 제조하였다. AG1 및 AG2는 각각 화합물 3 및 화합물 4를 화합물 1과 반응시켜 각각 수율 26% 및 86%로 제조하였다.

# 반응식 1



반응식 1: (i) *N*-Boc-3,6-디옥사옥탄-1,8-디아민, Et<sub>3</sub>N, DMF, 50 °C. (ii) *N*-Boc-피페라진, Et<sub>3</sub>N, DMF, 50 °C. (iii) (a) NaOMe, MeOH; (b) 50% TFA/DCM; (c) 1, EDC, DIPEA, DMF.

AG1 및 AG2의 형광 스펙트럼은 용매의 극성( $E_T^N$ )이 증가함에 따라서 다음과 같은 순서의 점진적인 배소크로믹 시프트(bathochromic shift)를 보여준다: 1,4-디옥산 < DMF < EtOH < H<sub>2</sub>O. 용매의 극성이 증가함에 따라서 큰 배소크로믹 시프트를 보여준다는 것은 이러한 분자들이 극성 프로브로서 유용하다는 것을 보여준다. 더욱이 이들은 생체적으로 관련된 pH 범위에서 pH 민감성을 보여준다. 이광자 여기 형광(TPEF) 방법에 의해 결정된 AG1의 TP 활성화(action) 스펙트럼은 780 nm에서 약 90 GM의  $\Phi\delta$  수치를 보여주는데, 이는 Cy3-Glc- $\alpha$  및 2-NBDG에 대해 관찰된 수치보다 훨씬 크다. 따라서, the TPM images of the samples stained with AG1 및 AG2에 의해서 염색된 샘플의 TPM 이미지는 Cy3-Glc- $\alpha$  및 2-NBDG에 의해 염색된 샘플의 이미지에 비하여 훨씬 밝게 나타난다(도 1 참조).

표 1

| Cpd               | $\lambda_{\max}^{(1)}/\lambda_{\max}^{\text{fl}}$ [b] | $\Phi$ [c]        | $\lambda_{\max}^{(2)}$ [d] | $\delta_{\max}$ [e] | $\Phi\delta_{\max}$ [f] |
|-------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|----------------------------|---------------------|-------------------------|
| AG1               | 373/501                                               | 0.90              | 780                        | 95                  | 86                      |
| AG2               | 375/501                                               | 0.56              | 780                        | 155                 | 88                      |
| Cy3-Glc- $\alpha$ | 545/555                                               | 0.01              | nd <sup>[g]</sup>          | nd <sup>[g,h]</sup> | nd <sup>[g,h]</sup>     |
| 2-NBDG            | 465/540 <sup>[i]</sup>                                | nd <sup>[g]</sup> | nd <sup>[g]</sup>          | nd <sup>[g,h]</sup> | nd <sup>[g,h]</sup>     |

표 1: AG1, AG2, Cy3-Glc- $\alpha$  및 2-NBDG의 광물리적(photophysical) 데이터

[a] 모든 측정은 PBS 버퍼 내에서 이루어졌음. [b] 1-광자 흡수 및 발산 스펙트럼의  $\lambda_{\max}$  (nm). [c] 형광 양자 효율(fluorescence quantum yield),  $\pm 15\%$ . [d] 이광자 흡수 및 발산 스펙트럼의  $\lambda_{\max}$  (nm). [e] 피크 이광자 단면적( $10^{50}$  cm<sup>4</sup>/광자(GM),  $\pm 15\%$ ). [f] 이광자 활성화 단면적(GM). [g] 분석하지 않음(not determined). [h] 이광자 여기 형광 세기(excited fluorescence intensity)가 너무 약해서 단면적의 정확한 측정이 어려움. [i] *The Handbooks-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10<sup>th</sup> ed. R. P. Haugland, Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, 2005

- [0062] 세포 흡수 실험을 위한 이들 프로브의 최적의 농도는 6, 12.5, 25, 50 및 100  $\mu\text{M}$ 의 AG1 및 AG2으로 30분 처리한 A549 세포의 TPM 이미지를 비교함으로써 결정하였다. 프로브 농도가 50  $\mu\text{M}$ 까지 증가함에 따라서 TPM 이미지는 더욱 밝게 나타났으나, 100  $\mu\text{M}$  농도에서는 세포 사멸(cell death)이 다소 관찰되었다(도면 참조). 또한, 세포를 AG1으로 처리했을 때보다 AG2로 처리했을 때에 더욱 높은 흡수율 및 더 밝은 TPM 이미지를 얻을 수 있었다(도면 참조). 또한, 세포 생존(viability)에 대해 AG2가 미치는 영향은 CCK8 키트를 이용하여 관찰하였으며, AG2는 무시할 만큼의 독성을 보여 살아있는 세포의 이미지화에 사용될 수 있음을 보여주었다(도면 참조). 따라서, AG2 50  $\mu\text{M}$ 를 추가 세포 흡수 실험의 최적 농도로 사용하였다.
- [0063] 50  $\mu\text{M}$  AG2로 처리한 A549 배양 세포의 유사색깔(pseudocolored) TPM 이미지에서는 각각 461(파랑) 및 497(빨강)에서 최고 이광자 발산을 나타내는 짙은 점(intense spots) 및 균일한 영역을 보여주었다(도면 2A 및 2B). 짙은 점의 TPEF 스펙트럼은 비대칭이었고, 445(녹색) 및 488(오렌지색)에서 최고 발산을 갖는 2개의 가우스 함수에 맞춰질 수 있었다. 반면, 균일한 영역의 TPEF 스펙트럼은 497 nm에서 최고 발산을 갖는 단일의 가우스 함수(핑크색)에 맞춰질 수 있었다. 잘려진 가우스 함수(오렌지색)의 장파장 밴드가 단일 가우스 함수(핑크색)의 밴드와 유사하다는 점을 주목할 만하다. 이 결과는 프로브들이 서로 다른 극성을 갖는 2개의 영역에 위치한다는 것을 보여주며, 위 2개의 영역은 각각 세포질의 액상 부분(cytosol)로 보이는 극성이 강한 영역과 세포막과 연관된 것으로 보이는(membrane-associated) 극성이 약한 영역이다. 또한, 잘려진 가우스 함수에서 단파장 밴드(녹색)는 < 520 nm의 파장에서 기준선(baseline)까지 감소한다. 이와 같이 520-620 nm에서 수집된 TPM 이미지는 짙은 점이 없이 균일한 반면(도면 참조), 360-460 nm에서 수집된 TMP 이미지는 짙은 점을 명확히 보여준다(도면 참조). 비슷한 결과가 아세탄-유래 TP 프로브에서도  $\text{Mg}^{2+}$  (AMg1) 및  $\text{Ca}^{2+}$  (ACa1)에 대해서 보고되었다. 따라서, 시토솔 AG2(cytosolic AG2)를 520-620 nm의 검출 위도우를 이용하여 막-결합(membrane-bound) 프로브로부터 간섭을 최소화하며 선택적으로 검출할 수 있다. 더욱이, AG2 및 MitoTracker로 함께 염색된 A549 세포의 TPM 이미지(즉 널리 알려진 미토콘드리아에 대한 일광자 형광(OPF) 프로브)는 OPM 이미지와 잘 중첩되었으며(merged, 도 2 참조), 이는 프로브가 미토콘드리아에 광범위하게 존재한다는 것을 보여준다.
- [0064] AG2가 암 세포에 의해 선택적으로 흡수되는지 여부를 확인하기 위하여, A549 (폐 암종 세포주), HeLa (경부 암 세포주), HEK293 (인간 태생 신장 293 세포주), NIH/3T3 (쥐 섬유아세포 세포주) 세포들에 의한 AG2 흡수율을 비교하였다. AG2 흡수율은 A549 및 HeLa 세포에서 가장 높았고, 그 다음이 HEK293 및 NIH/3T3 세포임을 확인하였다(도면 3B). 이러한 결과는 Cy3-Glc-a의 경우와 비슷하며, 이는 글루코스 대사가 증가한 암 세포에 의해 AG2가 선택적으로 흡수됨을 확인해주고 있다. 세포 흡수 실험은 세포 흡수를 위한 배양액에서 AG2가 D-글루코스와 효과적으로 결정한다는 것을 보여주며, 10 mM 또는 50 mM D-글루코스를 포함하는 배양액으로 접종된 A549 세포에서 AG2의 형광 세기는 글루코스가 없는 배양액의 경우와 비교하여 각각 약 16%와 74%로 감소하였으며, L-글루코스가 포함된 배양액(50 mM)에서는 영향을 받지 않았다(도면 참조). 또한, AG2 흡수는 55 mM D,L알라닌이 존재하는지 여부에 영향을 받지 않았는데, 이는 삼투압이 AG2 흡수에 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다. 이러한 결과는 AG2가 글루코스에 수동 확산이 아닌 특이적인 수송 시스템에 의해 세포로 흡수되는 글루코스 유사체(analogue)라는 것을 보여준다. 따라서, AG2는 세포를 글루코스 고갈 상태에 적용시키지 않고도 TPM에 의해 살아있는 세포 내 글루코스 흡수를 시각화하기 위해 사용될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 프로브의 유용성을 확인하기 위하여, A549 세포에 의해 AG2가 흡수되는 데에 택솔(taxol)이 미치는 영향을 분석하였다. 항암제는 세포의 대사를 억제하여 암 세포 내 글루코스 흡수를 감소시키는 것으로 확인되었다. 항암제로 세포를 1, 3, 6, 12, 24 시간 동안 배양시키고 나서, PBS(phosphate buffered saline)으로 세척하고, AG2로 처리한 후에 이미지를 촬영하였다. AG2의 세포 내 흡수는 배양시간이 증가함에 따라서 감소하였다(도 4 참조). 택솔의 농도가 49 nM, 490 nM, 9.8  $\mu\text{M}$ 인 경우에도 AG2의 함량에 의존적인 AG2 흡수가 관찰되었다(표 2). 다른 종류의 항암제인 콤브레타스타틴(combretastatin) 역시 유사한 경향으로 AG2 흡수를 억제하였다(표 2). 따라서, AG2 역시 TPM 방법에 의해 살아있는 세포 내에서 항암제를 스크리닝하는데 사용될 수 있다.

표 2

|                            | After 6 h | After 12 h |
|----------------------------|-----------|------------|
| Taxol (9.8 $\mu$ M)        | 69.5 %    | 50.7 %     |
| Taxol (490 nM)             | 89.6 %    | 69.5 %     |
| Taxol (49 nM)              | 96.7 %    | 81.8 %     |
| Combretastatin (2 $\mu$ M) | 70.2 %    | 53.2 %     |

표 2: 다양한 농도의 항암제 존재 하에서, A549에 의한 함량-의존적인 AG2 흡수량

본 발명에서는 추가적으로 결장암 진단을 위한 조직 이미지화에서 AG2의 유용성을 분석하였으며, 이를 위하여 결장암 환자로부터 적출해 낸 정상 세포 및 암 세포 슬라이스를 이용하였다. 정상 세포의 밝은 영역 이미지는 조직 표면의 분비기관(glands)의 존재를 명확하게 나타내고 있다. 반면, 암 조직은 대부분 무정형으로 나타났으며, 정형적인 구조를 가지지 않는 것으로 확인되었다 (도 5A 및 기타 도면 참조). 조직은 인공 뇌척수액 (artificial cerebrospinal fluid, ACSF)으로 4 시간 동안 37 °C에서 탁솔이 없는 경우와 있는 경우에 대해(50  $\mu$ M) 배양시키고 나서, 100  $\mu$ m 깊이에서 TPEF의 변화를 따라가면서 TPM으로 AG2 흡수를 모니터링하였다.

그 결과 암 조직에서의 AG2 흡수가 정상 조직에서보다 훨씬 많았으며, 탁솔로 4 시간 동안 미리 처리한 암 세포가 처리하지 않은 세포보다 훨씬 느린 AG2 흡수 경향을 보임을 확인하였다(도 5A 및 5B 참조). 결장 절제 생검 (colonoscopic biopsy) 직후 얻은 암 세포 및 정상 세포로부터 비슷한 결과를 확인하였으며, 이는 ACSF에서 조직 슬라이스를 4 시간 동안 배양하더라도 상대적인 흡수율에 크게 영향을 미치지 않는다는 것을 보여준다(도면 참조). 또한 3,000 시간 이상 거의 감소 없이 흡수되는 것을 모니터링할 수 있었다.

이러한 결과는 결장암을 진단하기 위한 심부 조직에서의 이미지화에 AG2가 유용하다는 것뿐만 아니라, 인-비보 (in-vivo) 이미지화에 대한 활용가능성, 높은 광안정성 및 낮은 독성을 강하게 뒷받침하고 있다.

결장암은 장샘(intestinal glands)의 점막으로부터 유래하여 조직의 내부로 확대된다고 알려져 있다. 본 발명에서는 조직 표면으로부터 상이한 깊이에서의 TPM 이미지를 얻었다. TPEF 세기는 조직 표면에서 상이한 정도의 염료(dye) 흡수로 인하여 얇은 깊이에 분산되어 있는 것으로 나타났다(도면의 밝은 영역의 이미지 참조). 반면, 조직 표면으로부터 75  $\mu$ m 깊이에서는 신뢰성 있는 결과를 얻을 수 있었다. 조직 단면으로부터 4,000 초 동안 얻은 TPM 이미지는 75, 100, 125, 150  $\mu$ m에서 AG2가 분산되어 있음을 보여주고 있으며, 각 이미지는 주어진 표면에만 분산되어 있음을 보여준다(도면 참조).

배양 과정에서 조직 내 AG2의 제한된 침투로 인하여 150  $\mu$ m까지 TPM 이미지를 얻을 수 있다는 점을 주목할 만 하며, 조직을 더 오랜 시간 동안 배양하였을 때 더욱 깊은 곳에서는 TPM 이미지를 얻을 수 없었다. 조직 표면에서 흡수가 가장 효율적으로 이루어졌고, 이미지화 깊이가 증가함에 따라서 흡수량은 감소하였으며, 깊이가 > 150  $\mu$ m인 곳에서는 무시할 만한 정도로 확인되었다.

추가로, 흡수 속도는 세포에서의 흡수 속도에 비하여 훨씬 낮았으며, 이는 노후(aged) 조직에서 더욱 많이 발견되는 세포 외 기질로 인한 것으로 보인다. 75-150  $\mu$ m의 깊이 영역에서 측정된 TPEF 세기 합계는 암 조직에서 가장 높았으며, 탁솔로 처리한 암 조직, 정상 조직의 순으로 확인되었다(도면 참조). 이러한 결과는 암 조직에 의한 선택적인 AG2 흡수를 다시 한번 명확히 보여주고 있고, 특히 결장 암의 진단에서 AG2의 유용성을 확인해주고 있다.

본 발명의 TP 트레이서 등의 용도로 유용한 화합물은 넓은 범위의 생체 pH(4-10)에서 pH에 독립적인 물성을 보였으며, 다양한 깊이에 다양한 항암제를 처리한 암 조직 및 정상 조직의 흡수 속도를 비교함으로써 초기 단계의 암 세포를 진단할 수 있으며, 환자에 최적화된 항암 치료법을 개발하는데 유용하게 활용될 수도 있다.

이하, 본 발명을 설명하기 위하여 실시예를 제시하였으며, 다만 하기 실시예에 의해서 본 발명의 내용과 범위가 축소되어 해석될 수 없다.

[0076] 실시예:본 발명에 따른 이광자 트레이서의 제조

[0077] 6-아세틸-2-[N-메틸-N-(카르복실메틸)아미노]나프탈렌 (화합물 1), (2-브로모에틸)-2,3,4,6-테트라-O-벤조일- $\alpha$ -D-글루코시드(화합물 2) 및 [2-(N-Boc-3,6-다이옥사옥탄-1,8-디아미노에틸)]-2,3,4,6-테트라-O-벤조일- $\alpha$ -D-글루코시드(화합물 3)을 중래 방법에 의해 제조하였다. 이하 화합물 AG1, AG2, 및 화합물 4의 합성을 설명한다.

[0078] 실시예 1

[0079] AG1의 합성

[0080] 화합물 3의 디벤조일화를 하기 위해 MeOH(1 mM)에 화합물(130 mg, 0.17 mmol)이 있는 용액에 메톡사이드 나트륨(0.5 M in MeOH, 1.1 mL, 0.56 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응이 완결된 후, 상기 반응 혼합물은 메탄올릭 HCl로 중화하고, 감압농축시켰다. Boc 그룹의 디프로텍션(deprotection)을 하기 위하여, 디클로로메탄의 50 % TFA를 이전 반응의 결과 잔유물에 첨가하였다. 그 결과 완전히 디프로텍트된 화합물을 질소로 정제하면서 농축하여, DMF (1 mL)에 재용해시키고, TEA (0.58 mL, 0.42 mmol)로 약간 염기화시키고, 아마이드 결합을 위해 DMF (500  $\mu$ L)에 1 (36 mg, 0.14 mmol) 과 EDC (40 mg, 0.21 mmol)를 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 상온에서 교반하고 반응 완성을 HPLC 분석에 의해 모니터링하였다.

[0081] 분석용 HPLC 용출(용리) 프로토콜은 1분 동안 95% 용제(용리액) A (0.1 % TFA를 함유하는 탈이온 수)와 용제(용리액) B (0.1% TFA를 함유하는 HPLC-급 아세토니트릴)로 시작하고, 선형 구배에 따라 4, 10, 10, and 5 분 동안 용리액 A의 농도는 각각 60, 50, 5, 0%가 되었다. 용출은 5분 동안 0% 용제 A로 계속되며 재생을 위해 10분 간 95% 용제 A로 되돌아 갔다. 제조용-HPLC(pre-HPLC)에 의한 정제로 22 mg (26 %)의 AG1(정제 시간:11분)를 얻었다. 바람직한 생성물은  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR, MALDI-TOF MS, 및 HRMS에 의해 확인하였다.

[0082]  $^1\text{H}$ NMR(300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.40 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.86 (s, 1H), 7.66 (d,  $J=8.7\text{Hz}$ , 1H), 7.18(dd,  $J=6.6, 2.4\text{Hz}$ , 1H), 6.97(d,  $J=2.1\text{Hz}$ , 1H), 4.82(d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.10(s, 2H), 4.00-3.93(m, 1H), 3.81(dd,  $J=11.7, 2.0\text{Hz}$ , 1H), 3.70-3.58(m, 5H), 3.57-3.47(m, 8H), 3.45-3.35(m, 3H), 3.32-3.27(m, 3H), 3.25-3.22(m, 2H), 3.15-3.12(m, 2H), 2.64(s, 3H);

[0083]  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  198.94, 171.66, 149.45, 137.66, 130.84, 130.64, 130.49, 126.16, 125.68, 123.94, 116.04, 105.69, 98.84, 73.53, 72.89, 71.83, 70.14, 69.97, 69.84, 69.20, 65.36, 62.26, 61.23, 56.32, 46.92, 46.87, 38.80, 38.70, 25.08; HRMS(FAB $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{29}\text{H}_{44}\text{N}_3\text{O}_{10}[\text{M}+\text{H}]^+$ :594.3021; found:594.3020.

[0084] 실시예 2

[0085] 화합물 4의 합성([2-(N-Boc-피페라지닐)]-2,3,4,6-테트라-O-벤조일- $\alpha$ -D-글루코시드)

[0086] 화합물 2로부터 화합물 3을 합성하는 공정과 유사한 공정으로 화합물 4를 제조하였다. 2 mL 무수 DMF에 2 (230 mg, 0.327 mmol)가 있는 용액에 N-Boc-피페라진 (183 mg, 0.981 mmol)과 TEA (182  $\mu$ L, 1.308 mmol) 첨가하여, 반응 혼합물을 50°C에서 교반하였다. TLC에 의해 반응의 완성을 관찰한 후, 상기 반응에 의한 결과물인 용액을  $\text{ddH}_2\text{O}$ 로 희석하고, 에틸아세테이트로 추출하였다. 상기 결합된 유기층을 식염수로 세척하고 무수  $\text{MgSO}_4$ 로 건조시켰다. 여과액을 감압 분위기에서 농축하고 실리카-겔 플레시 칼럼 크로마토그래피(n-헥산 : 에틸 아세테이트 = 2 : 1 점차적으로 1 : 2로 변함)로 정제하여 노란색 오일 형상의 바람직한 생성물 4(185 mg, 70%)를 얻었다.

[0087]  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.05-7.86 (m, 8H), 7.57-7.28 (m, 12H), 6.18 (t,  $J=10\text{Hz}$ , 1H), 5.68 (t,  $J=9.5\text{Hz}$ , 1H), 5.43 (d,  $J=3.5\text{Hz}$ , 1H), 5.29 (dd,  $J=10.0, 3.5\text{Hz}$ , 1H), 4.63-4.59 (m, 1H), 4.49-4.45 (m, 2H), 3.89 (ddd,  $J=11.0, 5.5, 5.0\text{Hz}$ , 1H), 3.67 (ddd,  $J=11.0, 6.0, 5.0\text{Hz}$ , 1H), 3.23 (bs, 4H), 2.65-2.58 (m, 2H), 2.35 (bs, 4H), 1.44 (s, 9H);

[0088]  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.62, 166.30, 166.16, 165.78, 155.11, 133.99, 133.92, 133.64, 130.33, 130.20, 130.16, 130.13, 129.62, 129.44, 129.34, 128.97, 128.90, 128.78, 96.38, 96.32, 80.01, 72.42, 70.88, 70.00, 68.73, 66.73, 63.51, 57.92, 53.87, 28.91; LC/MS calcd for  $\text{C}_{45}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_{12}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 809; found: 809.

[0089] 실시예 3

[0090] AG2의 합성

[0091] AG2는 AG1의 합성에 사용된 공정과 비슷한 공정에 의해 제조된다. 생성물(crude)은 제조용-HPLC에 의해 정제하여 13 mg (86 %)의 AG2를 얻을 수 있다.

[0092]  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.41 (s, 1H), 7.89-7.83 (m, 2H), 7.64 (d,  $J=8.0\text{Hz}$ , 1H), 7.21(dd,  $J=9.3, 2.3\text{Hz}$ , 1H), 6.98(s, 1H), 4.92(d,  $J=3.6\text{Hz}$ , 1H), 4.54(s, 2H), 4.18-4.07(m, 2H), 3.88-3.83(m, 3H), 3.71-3.43(m, 10H), 3.35-3.32(m, 2H), 3.17(s, 4H), 2.65(s, 3H);

[0093]  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  198.96, 168.82, 149.77, 137.84, 130.54, 130.47, 125.98, 125.38, 123.76, 115.87, 105.28, 98.93, 73.49, 73.10, 71.72, 70.01, 61.23, 60.47, 56.01, 52.92, 38.41, 25.01; HRMS(FAB $^+$ ) calcd for  $\text{C}_{27}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 532.2653; found, 532.2652

[0094] 실험예

[0095] 실험예 1 : 분광 측정

[0096] Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 분광광도계를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였으며, 1-cm 표준 석영 셀을 구비한 Amico-Bowman 시리즈 2 형광 분광계를 이용하여 형광 스펙트럼을 얻었다. 형광 양자 수율은 Coumarin 307 과 Rhodamine B를 레퍼런스로 사용하여 측정하였다. 여러 조건하에서 얻어진 스펙트럼 데이터를 본 발명의 도6 및 표 3에 나타내었다.

표 3

| Solvent ( $E_T^N$ ) <sup>[a]</sup> | $\lambda_{\text{max}}^{(1)}$ [b] |     | $\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ [b] |     | $\Phi$ <sup>[c]</sup> |      |
|------------------------------------|----------------------------------|-----|----------------------------------------|-----|-----------------------|------|
|                                    | AG1                              | AG2 | AG1                                    | AG2 | AG1                   | AG2  |
| Dioxane (0.164)                    | 360                              | 362 | 434                                    | 425 | 0.59                  | 0.72 |
| DMF (0.386)                        | 366                              | 369 | 451                                    | 449 | 1.00                  | 1.00 |
| EtOH (0.654)                       | 364                              | 370 | 479                                    | 480 | 1.00                  | 0.97 |
| H <sub>2</sub> O (1.00)            | 373                              | 375 | 501                                    | 501 | 0.90                  | 0.56 |

[0097]

[0098] 표 3: 다양한 용매에서의 AG1, AG2의 광물리학적 특성

[0099] [a] 괄호 안의 숫자는 용매 극성의 표준화된 실험적 변수이다. [b]일광자 흡수 및 방출 스펙트럼의  $\lambda_{\text{max}}$ 의 단위는 nm이다. [c] 형광 양자 수율,  $\pm 15\%$ .

[0100] 실험예 2 : 이광자 단면적의 측정

[0101] 선행기술에 기술된 바와 같이 이광자 단면적( $\delta$ )을 펨토초(fs) 형광 측정 기술을 이용하여 측정하였다. AG1,

AG2, Cy3-Glc- $\alpha$ , 및 2-NBDG를  $5.0 \times 10^{-6}$  M 농도의 30 mM PBC 완충용액 (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4)에 용해시킨 후, 이광자-유도 형광 강도를 740-940nm의 영역대에서 측정하는데, 이때 이광자 특성이 잘 알려진 플루오레세인( $8.0 \times 10^{-5}$  M, pH = 11)을 기준염료로 하였다. 기준염료와 샘플 염료의 이광자 유도 형광 스펙트럼의 강도는 같은 여기 파장에서 결정되었다.

[0102] 상기 TPA 단면적은 식 1에 의해 계산하였고, 여기서 하첨자 s와 r은 샘플과 기준염료를 의미한다.

$$\delta = \frac{S\Phi_{sc}}{S\Phi_{rc}} \delta \quad (1)$$

[0104] CCD 디텍터에 의해 수집된 신호의 강도를 S로 하였고, 형광 양자 효율을  $\Phi$ 로 하였다.  $\Phi$ 는 실험장비의 전체 형광 수집효율을 의미한다. 용액 내 분자의 수밀도는 c로 표시하였다.  $\delta$ 는 기준염료의 이광자 단면적을 의미한다.

### [0105] 실험예 3 : 이광자 형광 현미경 분석

[0106] 탐침자-표지된 세포와 조직의 이광자 형광 현미경 영상을  $a \times 100$  (NA = 1.30 OIL) 대물렌즈를 구비한 스펙트럼 공초점 현미경(Leica TCS SP2)과  $a \times 20$  (NA = 0.30 DRY) 대물 렌즈를 구비한 다광자 현미경(Leica TCS SP2)을 사용하여 얻었다.

[0107] 이광자 형광 현미경 이미지는 파장 780 nm 및 출력 1230 mW(초점 면상에 약 10 mW의 평균 전력에 대응되는)로 셋팅된 모드-락 티타늄-사파이어 레이저 원(mode-locked titanium-sapphire laser source)(Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)으로 탐침자를 여기시켜 DM IRE2 현미경 (Leica)으로 얻었다.

[0108] 360-460 nm 및 520-620 nm 범위에서 영상을 얻기 위하여, 내부 PMT는 400 Hz 스캔 속도에서 8 비트 언사인된  $512 \times 512$  픽셀(pixel)에서 신호를 수집하는데 사용되었다.

### [0109] 실험예 4 : 세포 배양 및 영상화

[0110] A549 인체 폐 암종 세포, HeLa 인체 자궁경부 암종 세포, NIH/3T3 쥐 섬유아 세포, HEK292 인간 태아 신장 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 얻었다. A549 세포는 열-비활성화된 10% FBS (WelGene), 페니실린 (100units/mL), 및 스트렙토마이신(100ug/mL)로 보충된 RPMI 1640(WelGene)에서 배양되었다.

[0111] NIH/3T3 세포, HeLa 세포, and HEK293 세포는 열-비활성화된 10% FBS (WelGene), 페니실린 (100units/mL), 및 스트렙토마이신(100ug/mL)로 보충된 DMEM(WelGene)에서 배양되었다. 모든 세포들은 37 °C에서 5%  $\text{CO}_2$  와 95% 공기의 습윤 분위기에서 유지하였다. 영상을 얻기 이틀 전부터, 상기 세포들을 탈착하고  $10^4/\text{mm}^2$  세포를 유리-바닥 접시(MatTek)에 평면 배양시켰다.

[0112] 라벨링을 위하여 성장배지를 제거하고 혈청(serum)없는 RPMI1640 (D-glucose가 없는)(United Search Partners, Austin, TX, USA) 으로 대체하였다.

[0113] 상기 세포들을 37°C에서 10분 동안 요구되는 농도의 추적자(tracker)로 처리 및 배양하였다.

[0114] 이후, 상기 세포들을 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline (PBS; Gibco))로 세 번 세정하고 영상(image)화 하였다.

[0115] 단위 세포당 AG1과 AG2의 상대적인 흡수(relative uptake)를 비교하기 위해, 40-60 세포들 사이에서 무작위로 선택된 관심 영역으로 부터의 TPEF 강도를 광전자 증배관(photomultiplier tube (PMT))으로 측정하고 히스토그램(Histogram, 데이터 분석용 프로그램)으로 측정된 디지털화 하였다.

[0116] 상기 조직에서 상대적 흡수는 같은 방법으로 측정되나 다른 깊이에서 얻은 조직 샘플의 TPM 영상은 제외하였다.

[0117] 탁솔과 콤프레타스타틴의 AG2 흡수에 대한 영향은 함암제의 DMSO 용액(10 mM)의 적절한 양을 세포와 조직에 부

가하여 결정할 수 있다.

[0118] 상기 실험의 모든 경우에 있어서 DMSO의 함량은 1%로 유지되었다.

[0119] 실험예 5 : 흡수 실험을 위한 AG1과 AG2의 최적 농도 결정

[0120] 흡수 실험을 위한 최적 농도를 결정하기 위해 6, 12.5, 25, 50 및 100  $\mu$ M의 AG1과 AG2로 30분간 표지된 A549 세포의 TPM 영상을 비교하였다. 트레이서 농도가 50  $\mu$ M까지 증가함에 따라 영상이 밝아졌으나, 농도가 그 이상이 되면 세포 사멸이 관찰되었다.(도 S2)

[0121] 또한, AG1로 처리하였을 때보다 AG2로 처리하여 표지시켰을 경우 흡수율이 더 높았고(600 VS 800s) TPM 영상도 더 밝았다(도 S3). 따라서, 50  $\mu$ M의 AG2를 흡수 실험에 사용하였다.

[0122] 상기 배양 조건에서 상기 트레이서가 A549 세포 생존에 영향을 미치지 않다는 것을 확인하기 위하여, CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 사용하였으며, 그 결과를 도 S4에 나타내었다.

[0123] 실험예 6 : 공동 위치화(Colocalization) 실험

[0124] 세포 내에 광범위하게(predominantly) 존재하는 AG2의 위치를 결정하기 위해, AG2와 미토 추적자(Mito Tracker)로 공염색(co-staining)된 A549 세포로 공동 위치화 실험을 수행하였다. 여기서 미토 추적자는 본 발명이 속하는 분야에서 잘 알려진 미토콘드리아(mitochondria)에 사용되는 일광자 형광 표지자(one-photon fluorescent probe, OPF)이다.

[0125] OPM 영상과 TPM 영상은 중첩(merge)이 잘되었으며, 이는 탐침자가 미토콘드리아 내에서 광범위하게 위치함을 나타낸다.(도 S5)

[0126] 실험예 7 : 흡수 경로 비교 실험

[0127] AG2의 세포내 흡수 경로와 D-글루코스의 흡수 경로의 관련성을 확인하기 위하여, 흡수 경로 비교 실험을 하였다.

[0128] 상기 실험을 위해, 0, 10 및 50 mM D-글루코스, 그리고 50 mM L-글루코스 존재 하에 10 분 동안 AG2(50  $\mu$ M)로 A549 세포를 배양시키고 TPM으로 상대적인 AG2 흡수를 측정하였다.

[0129] 또한, 삼투압이 흡수에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하기 위하여, 55 mM D,L-알라닌 존재 하에 같은 실험을 수행하였다. 실험 결과를 도 S6에 나타내었다.

[0130] 실험예 8 : 인간 암 조직 슬라이스의 제조 및 TPM 영상

[0131] 대장암 환자로부터 정상 조직과 대장암 조직을 대장내시경 검사를 통하여 얻었다.

[0132] 정상 조직, 암 조직 그리고 50  $\mu$ M 탁솔을 함유하는 암조직을 37°C에서 4시간동안 95% 산소와 5% 이산화탄소로 이루어진 공기를 주입하여 거품이 발생하는 인공 수액(artificial cerebrospinal fluid (ACSF))에서 배양하였다. 상기 조직들을 인공수액으로 3번 세정하고, 유리 바닥 접시(MatTek)로 이동시킨 후 50  $\mu$ M AG2를 가하여 TPM으로 관찰하였다.(도 S4)

[0133] 인공수액에서의 배양에 의해 흡수가 영향을 받는지를 알아보기 위해, 대장 내시경을 통해 즉시 획득한 정상 조직과 대장암 조직을 사용하여 동일한 실험을 하였으며, 상기 실험 결과는 인공수액에서 4 시간 배양한 조직을 사용하여 얻은 결과와 유사하였고, 이는 상기 배양이 상대적 흡수에 영향을 미치지 않다는 것을 나타낸다.(도 S8)

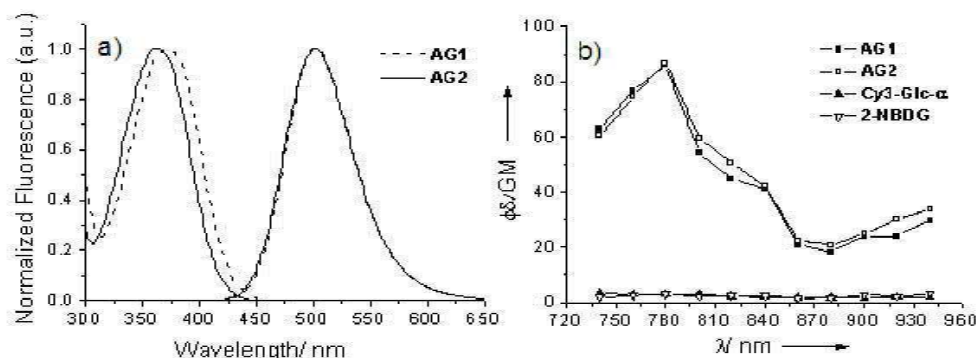
### 도면의 간단한 설명

[0134] 도 1: (a) PBS 버퍼(137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.4) 내 AG1 및 AG2의 1-광자 흡수(absorption) 및 발산(emission) 스펙트럼, (b) PBS 버퍼 내 AG1, AG2, Cy3Glc a, 및 2-NBDG의 이광자 활성 스펙트럼.

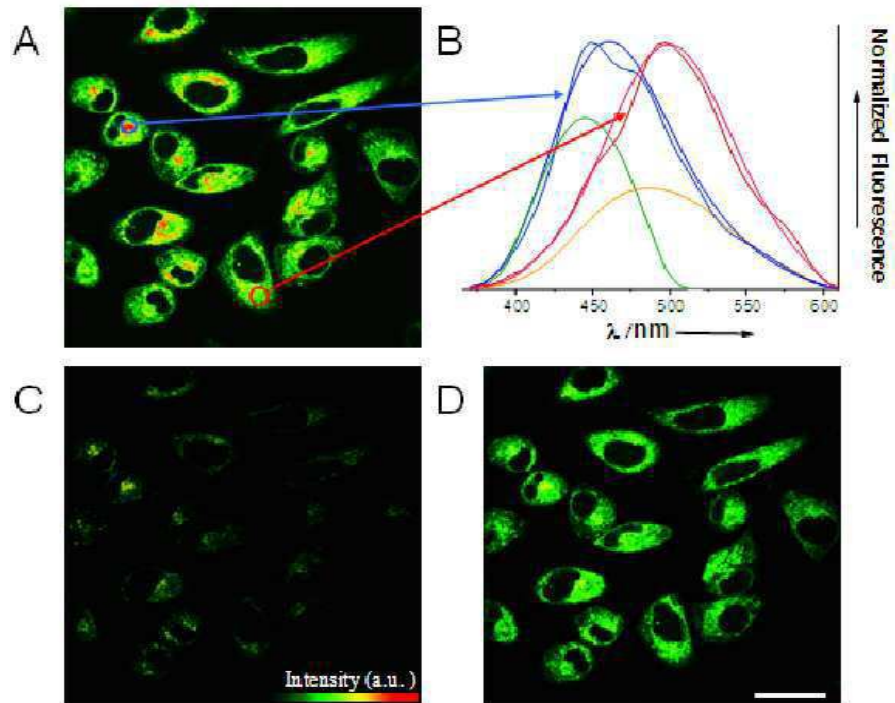
- [0135] 도면 2: 50  $\mu\text{M}$  AG2로 10 분간 배양된 A549 세포의 유사색깔 TMP 이미지, (A) 360-620 nm, (C) 360-460 nm 및 (D) 520-620 nm에서 수집됨. (B) AG2로 라벨링된 A549 세포의 소수성(파랑) 및 친수성(빨강) 영역에 대한 이광자 여기 형광 스펙트럼. 하늘색과 핑크색의 커브는 각각 파랑과 빨강 밴드에 대한 절단된 가우스 함수를 나타냄. 여기 파장은 780 nm. 각 이미지는 반복된 실험에서 얻어진(n=5) 이미지를 대표해서 제시함. 스케일 바, 30  $\mu\text{M}$ .
- [0136] 도면 3: (A) A549 세포에 의한 상대적인 AG1 및 AG2 흡수량. (B) 암 세포(A549, HeLa) 및 정상 세포(HEK293, NIH/3T3)에 의한 상대적인 AG2 흡수량. 4060 세포로부터의 TPEF 세기는 포토멀티플라이어 튜브(PMT)를 이용하여 결정하였음. 적어도 5회의 독립적인 실험값을 평균하여 나타내었음. (C) AG2 흡수 후에 A549 세포의 이미지(a, e), HeLa 세포의 이미지(b, f), HEK293 세포의 이미지(c, g), NIH/3T3 세포의 이미지(d, h), a-d는 밝은 영역(bright field) 이미지이고, e-j는 TPM 이미지이다. 세포는 AG1 또는 AG2에 의해 배양되었음(50  $^{\circ}\text{C}$ , 10 분). TPM 이미지는 520-620 nm 영역에서 fs 펄스를 780 nm에서 여기시키고 나서 TPEF를 수집하여 얻었음. 나타낸 이미지는 반복된 실험(n=5)에서 얻어진 이미지를 대표적으로 나타냄. 스케일 바, 30  $\mu\text{m}$ .
- [0137] 도 4: (A) 탁솔(9.8  $\mu\text{M}$ )을 0, 3, 6, 12, 24 시간 동안 처리하고 나서 A549 세포에 의한 상대적인 AG2 흡수량. 4060 세포로부터의 TPEF 세기는 포토멀티플라이어 튜브(PMT)를 이용하여 결정하였음. 데이터는 최소한 5회의 독립적인 실험의 평균값임. (B) 탁솔을 0 h (a, f), 3 h (b, g), 6 h (c, h), 12 h (d, i), 24 h (e, j) 동안 처리하고 난 후의 A549 세포 이미지. a-e는 밝은 영역의 이미지이고, f-j는 TPM 이미지임. 각 이미지는 정해진 시간 동안 탁솔로 세포를 처리하고 나서 얻어졌으며, 그리고 나서 AG2로 10 분 동안 배양하였다. TPM 이미지는 fs 펄스를 780 nm에서 여기시키고 나서 520-620 nm의  $\sigma$ 영역에서 TPEF 스펙트럼을 수집하여 얻어졌음. 나타낸 이미지는 반복 실험에서(n=5) 얻어진 이미지를 대표적으로 나타냄. 스케일 바, 30  $^{\circ}\text{C}$ .
- [0138] 도 5: (A) 정상 조직(a, b, c), 암 조직(d, e, f), 탁솔로 처리된 암 조직(g, h, i)의 이미지. 정상 조직은 ACSF로 4 시간 동안 배양됨. 암 조직은 탁솔이 있는 경우와 없는 경우로 나누어 ACSF에서 4 시간 동안 배양하고 나서(50  $^{\circ}\text{C}$ ), AG2 흡수량을 모니터링함. a, d, g는 밝은 영역 이미지이고; b, e, h는 4,000 초 동안 AG2로 배양하고 나서 얻은 유사색깔(pseudocolored) TPM 이미지이며; c, f, i는 4 시간 동안 AG2로 배양하고 나서 얻은 유사색깔 TPM 이미지임. fs 펄스를 780 nm에서 여기시키고 나서 TPEF 스펙트럼을 520-620 nm 영역에서 수집하여 100  $\mu\text{m}$  깊이에서 TPM 이미지를 얻었다. (B) 시간이 흐름에 따라 100  $\mu\text{m}$  깊이의 정상 조직, 암 조직, 탁솔로 처리한 암 조직(50  $\mu\text{M}$ )에 의해 AG2가 흡수되는 경향. (C) 정상 조직, 암 조직, 탁솔(50  $\mu\text{M}$ )로 4,000 초 동안 처리한 암 조직이 흡수한 AG2 흡수 상대량. 컬럼은 정상 조직을 기준으로 하였을 때 조직 표면으로부터 75, 100, 125, 150  $\mu\text{m}$  깊이에서 PMT에 의해 측정된 TPEF 세기의 합계를 나타냄. 데이터는 3회의 독립적인 실험 결과의 평균값임.
- [0139] 도 6: Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 분광광도계를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였으며, 1-cm 표준 석영 셀을 구비한 Amico-Bowman 시리즈 2 형광 분광계를 이용하여 형광 스펙트럼을 얻었음. 형광 양자 수율은 Coumarin 307 과 Rhodamine B를 레퍼런스로 사용하여 측정하였고, 여러 조건하에서 얻어진 스펙트럼 데이터를 본 발명의 도6 및 표 3에 나타내었음.

## 도면

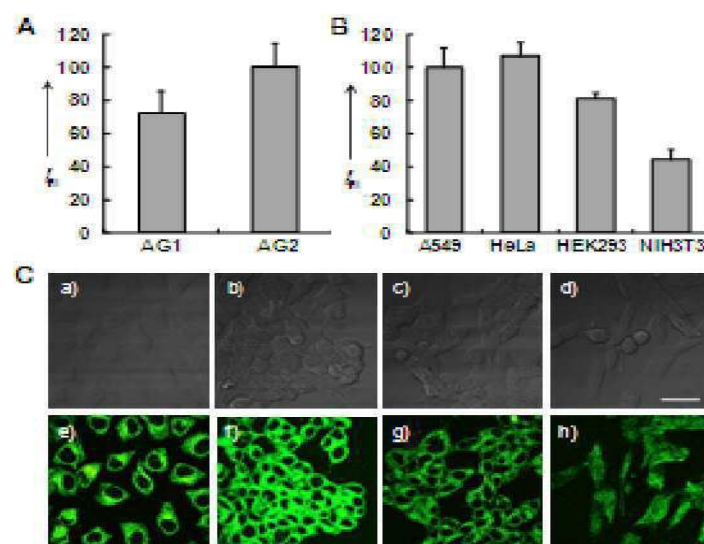
### 도면1



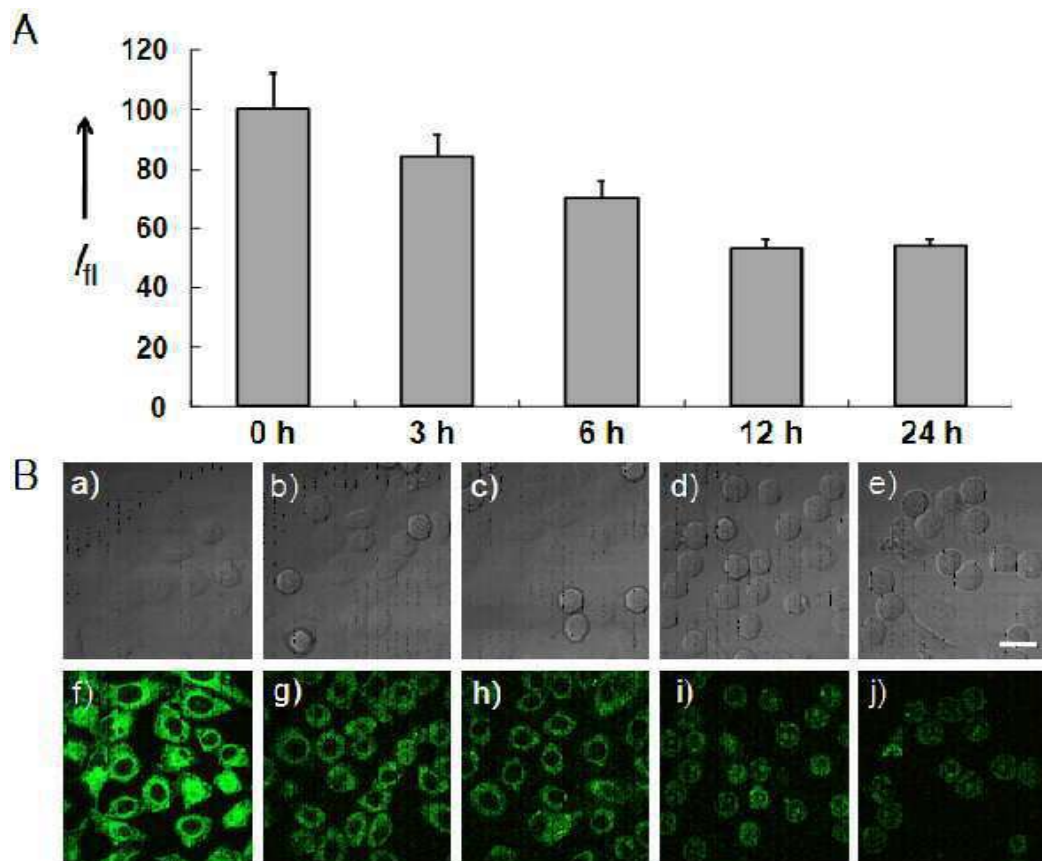
도면2



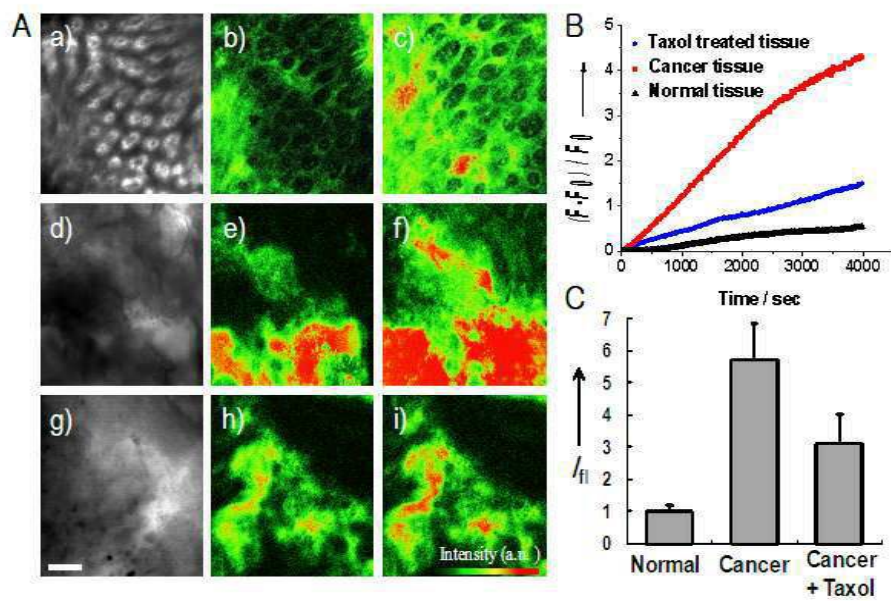
도면3



도면4



도면5



도면6

