(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0018200
(43) 공개일자 2011년02월23일

(51) Int. Cl.
G01N 33/58 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0075868
(22) 출원일자 2009년08월17일
심사청구일자 2009년08월17일

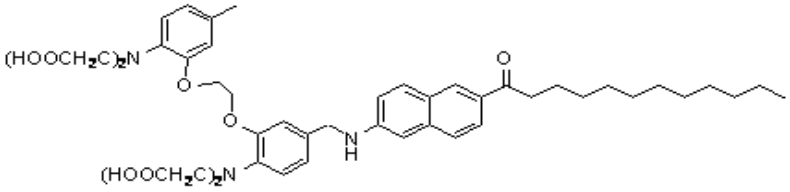
(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
조봉래
서울 송파구 송파동 151 한양아파트 23동 207호
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 칼슘 이온에 대해 선택성을 갖는 이광자 형광 표지자, 이의제조방법 및 이를 이용한 칼슘 이온의 영상화 방법

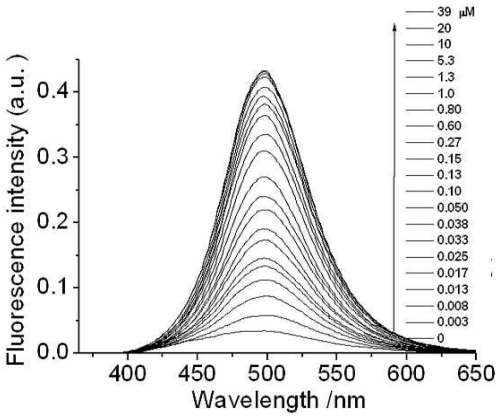
(57) 요 약

본 발명은 세포 및 조직내의 칼슘 이온에 대해 선택성을 갖는 하기 식(1)의 이광자 형광 프로브 및 그 제조 방법과 이를 이용한 칼슘 이온의 영상화 방법에 관한 것으로서, 세포 및 조직 내의 막-근처에 존재하는 칼슘 이온을 효과적으로 영상화할 수 있다.



(1)

대 표 도 - 도2

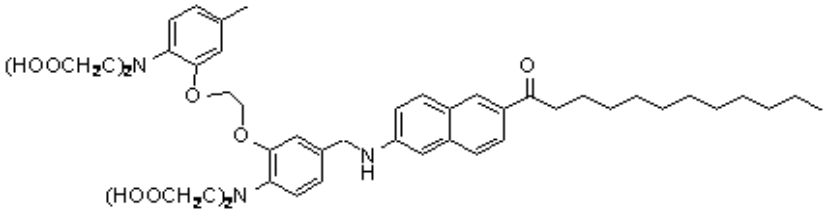


이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 R0A20070002002702007
부처명 한국과학재단
연구관리전문기관
연구사업명 국가지정연구실사업(NRL)
연구과제명 이광자 표지자의 합성과 생체 영상
기여율
주관기관 고려대학교
연구기간 2007년 07월 01일 ~ 2008년 06월 30

특허청구의 범위

청구항 1

세포 및 조직내의 칼슘 이온에 대해 선택성을 갖는 것을 특징으로 하는 하기 화학식(1)의 이광자 형광 표지자:



(1)

청구항 2

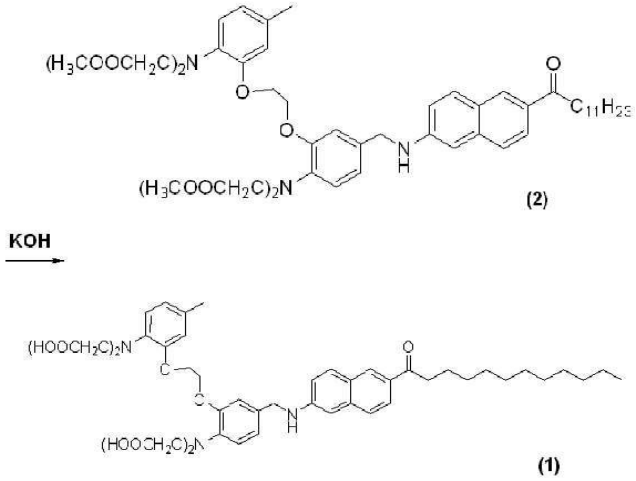
제1항에 있어서, 상기 화학식 (1)의 화합물은 세포막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화하는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 표지자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화학식 (1)의 화합물이 80 내지 160㎛ 깊이의 세포막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화하는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 표지자.

청구항 4

하기 화학식 (2)의 화합물로부터 하기 반응식에 따라 칼슘 이온 선택성을 갖는 하기 화학식 (1)의 이광자 형광 표지자를 제조하는 방법:



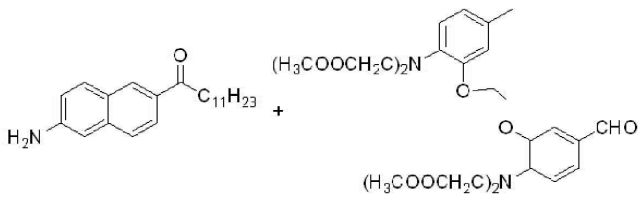
(2)

(1)

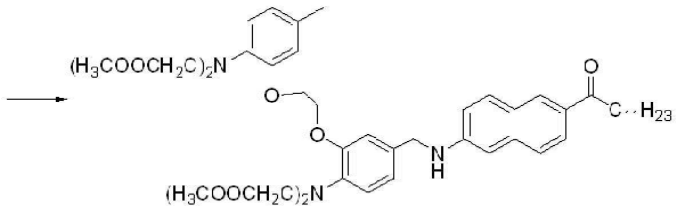
청구항 5

제4항에 있어서,

상기 화학식 (2)의 화합물은 화학식 (3)의 화합물과 화학식 (4)의 화합물을 반응시켜 제조하는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 표지자를 제조하는 방법:



(3) (4)

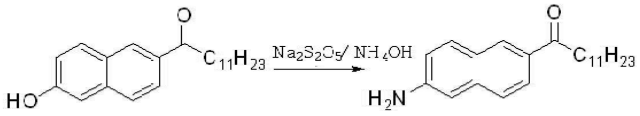


(2)

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 화학식 (3)의 화합물은 하기 화학식 (5)의 화합물로부터 제조되는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 표지자를 제조하는 방법:



(5) (3)

청구항 7

제1항에 따른 이광자 형광 표지자를 이용하여 세포내 칼슘 이온을 영상화하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 칼슘 이온의 영상화가 이광자 여기 형광 인자(Two-photon excited fluorescence, TPEF)의 변화에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 세포내 칼슘 이온을 영상화하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

360-620nm 범위의 파장을 이용하는 것을 특징으로 하는 세포내 칼슘 이온을 영상화하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 칼슘 이온에 대해 선택성을 갖는 이광자 표지자, 이의 제조방법 및 이를 이용한 칼슘 이온의 영상화 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 세포 및 조직 내의 막-근처에 존재하는 칼슘 이온을 선택적으로 검출할 수 있는 이광자 형광 프로브 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 칼슘은 수많은 세포 기능을 조절하는 세포내 신호 전달자로서 다양한 역할을 하는데, 예를 들어, 수정, 세포사멸, 감각신호전달, 근육수축, 운동성, 엑소사이토시스, 및 체액 분비와 같은 여러 가지 세포 과정에서 중요한 역할을 한다.

[0003] 세포내 자유 칼슘 이온의 농도는 여러 가지 칼슘 펌프, 이온 채널 및 칼슘-버퍼링 단백질의 조화된 작용에 의해 유지된다. 효능제(agonist)로 자극되었을 때, 시토졸 칼슘 이온[Ca^{2+}]의 농도는 소포체(ER)와 같은 내부 칼슘 이

온[Ca^{2+}] 축적물로부터의 칼슘 이온[Ca^{2+}]의 방출 또는 세포외 공간으로부터의 칼슘 이온 유입에 의해 급속하게 높아진다.

[0004] 막-근처 칼슘 이온의 농도변화 및 원형질막을 통과하는 칼슘이온의 이동성을 연구하기 위해서, C18-Fura-2 및 Calcium Green C18 이 개발되었다. 그러나 이들 화합물을 일광자 형광 표지자로 사용할 경우 세포의 이미지가 선명하지 않았으며, 500 nm 미만의 짧은 여기 파장 때문에 조직의 영상화는 불가능했다.

[0005] 특히 살아있는 조직 내부의 막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화하기 위해서는, 이광자 현미경(two-photon microscopy:TPM)의 사용이 매우 중요하다. 여기 소스로서 적외선 근처의 낮은 에너지를 갖는 두 개의 광자를 이용하는 이광자 현미경은 500 μm 이상의 향상된 투과 깊이, 국소적 여기화 및 관찰 시간의 장기화 등 많은 장점을 갖는다. 이에 따라 이광자 현미경의 표지자로 사용할 수 있는 화합물이 보고된 적은 있으나, 본 발명과 같이 막-근처에 존재하는 칼슘에 대해 선택성을 갖는 이광자 표지자는 보고된 적이 없었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

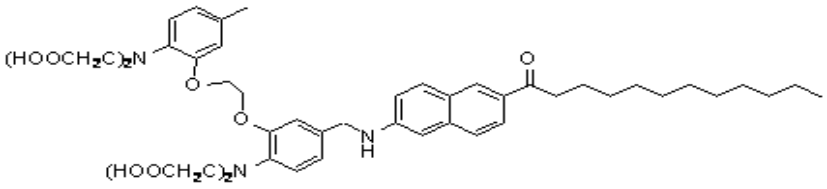
[0006] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 과제는 세포 또는 조직 내부의 막 근처에 존재하는 칼슘 이온[Ca^{2+}]에 대해 선택성을 갖는 이광자 형광 표지자를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 과제는 상기 이광자 형광 표지자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 과제는 상기 이광자 형광 표지자를 이용하여 세포 또는 조직 내의 칼슘 이온을 영상화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

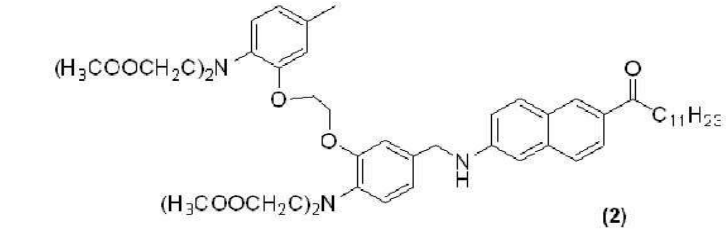
[0009] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위하여, 세포 및 조직내의 칼슘 이온에 대해 선택성을 갖는 것을 특징으로 하는 하기 화학식(1)의 이광자 형광 표지자를 제공한다:

[0010] 

[0011] (1)

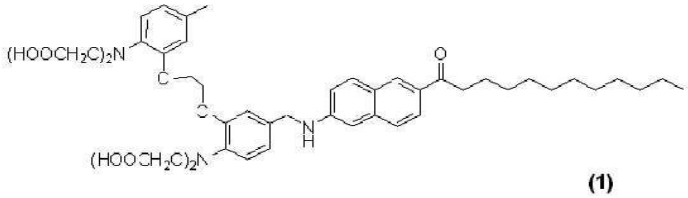
[0012] 본 발명에 따른 상기 화학식 (1)의 화합물은 세포막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화할 수 있다는 것이 특징이며, 구체적으로 80 내지 160 ㎛ 깊이의 세포막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화할 수 있다.

[0013] 또한 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 해결하기 위하여, 하기 화학식 (2)의 화합물로부터 하기 반응식에 따라 칼슘 이온 선택성을 갖는 하기 화학식 (1)의 이광자 형광 표지자를 제조하는 방법을 제공한다



(2)

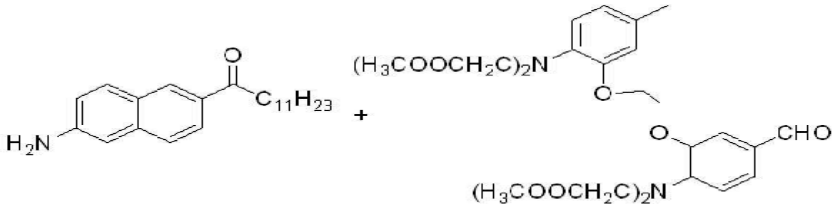
KOH



(1)

[0014]

[0015] 본 발명의 일실시예에 의하면, 상기 화학식 (2)의 화합물은 화학식 (3)의 화합물과 화학식 (4)의 화합물을 반응시켜 제조할 수 있다.



[0016]

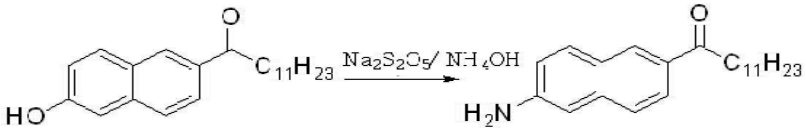
[0017] (3) (4)



[0018]

[0019] (2)

[0020] 또한 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, 상기 화학식 (3)의 화합물은 하기 화학식 (5)의 화합물로부터 제조될 수 있다.



[0021]

[0022] (5) (3)

[0023] 또한 본 발명은 상기 세 번째 기술적 과제를 해결하기 위하여, 상기 화학식 (1)에 따른 이광자 형광 표지자를 이용하여 세포내 칼슘 이온을 영상화하는 방법을 제공한다. 이때 상기 칼슘 이온의 영상화는 이광자 여기 형광인자(Two-photon excited fluorescence, TPEF)의 변화에 의해 수행되며, 일반적으로 360-620nm 범위의 파장을 이용하여 세포내 칼슘 이온을 영상화 할 수 있다.

효 과

[0024] 본 발명에 따른 이광자 형광 표지자(ACaL)는 칼슘 이온에 대해 10배 향상된 TPEF(Two-photon excited

fluorescence)를 나타내며, 해리상수(K_d^{TP})가 (0.045±0.005) μM이고, 생물학적으로 의미가 있는 pH범위에서 pH에 대해 민감하지 않으며, 칼슘 이온과의 착체 형성에 있어, 종래의 표지자인 Calcium-Green 이나 Fura-2 보다 2.5 배 더 강한 TPEF를 방출한다. 또한 본 발명에 따른 이광자 표지자는 현재 사용되는 표지자들 보다 우수할 뿐만 아니라, 다른 금속 이온의 방해를 받지 않고, 약 120 μm 깊이의 살아있는 조직에서 1,500초 이상 동안 살아있는 세포내의 막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 영상화할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명에서는 이광자 발색단으로서 2-디메틸아미노-6-라우릴 나프탈렌(laurdan)과 BAPTA-5-Me를 연결시켰다. BAPTA-5-Me는 종래에 보고된 Fura-2, Fluo-3, Rod-2와 같은 여러 가지 일광자 형광 표지자에서 널리 사용되는 칼슘 이온 킬레이트제로 잘 알려져 있다. 한편 laurdan은 세포막 중의 리피드 래프트를 검출하는데 사용되는 이광자 극성 표지자이다.

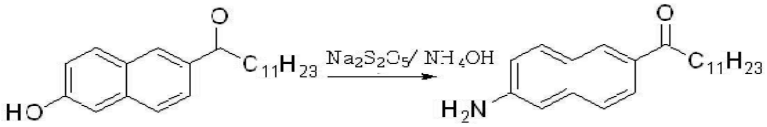
[0026] 본 발명에 따른 이광자 표지자(ACaL)는 막 내부에서 도데카노일기의 배향을 이용하여 원형질막에 지배적으로 존재하는 막 근처 칼슘에 대한 이광자 프로브로 개발되었으며, BAPTA-5-Me는 막 표면 근처에 위차하여 시토플라즘으로부터 배출된 칼슘이온을 포획할 수 있으며, 이에 따라 형광을 발생시키는 것으로 생각된다.

[0027] 본 발명에 따른 이광자 프로브를 이용하여, 1500초 이상 동안, 이광자 현미경에 의해 100 μm 이상의 깊이에서 살아있는 세포와 조직 중의 막 근처에 존재하는 칼슘을 영상화할 수 있었다.

[0028] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 서술된 것이다.

[0029] 실시예: 본 발명에 따른 이광자 표지자 (ACaL)의 제조

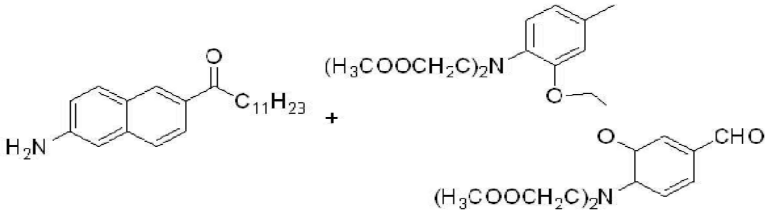
[0030] 실시예 1

[0031] 

[0032] 6-도데카노일-2-하이드록시나프탈렌(8.0 g, 25 mmol), $Na_2S_2O_5$(12g, 61 mmol), 및 NH_4OH(150 ml)를 혼합하여 스틸-밤 반응기에서 140° C 에서 96시간동안 교반했다. 여과하여 생성물을 얻은 후, 물로 세척하고, 헥산/에틸아세테이트(1:1)을 용리액으로 사용하여 플래쉬-칼럼 크로마토그래피로 정제했다. 그 후 MeOH로 재결정화함으로써 추가 정제했다.

[0033] 수율: 3.9 g (75%); m.p. 102℃; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): d 8.30 (d, 1H, J = 2 Hz) 7.92 (dd, 1H, J = 2 Hz, J = 8 Hz), 7.74 (d, 1H, J = 8 Hz), 7.57 (d, 1H, J = 8 Hz), 6.96 (dd, 1H J = 2 Hz, J = 8 Hz), 6.94 (d, 1H, J = 2 Hz), 4.04 (s, 2H), 3.00 (t, 2H, J = 7 Hz), 1.74 (quin, 2H, J = 7 Hz), 1.23 (m, 16H), 0.85 (t, 3Hz, J = 7 Hz) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): d = 200.60, 146.84, 137.70, 131.46, 131.40, 130.11, 126.73, 126.15, 124.97, 118.89, 108.10, 38.67, 32.15, 29.88, 29.87, 29.77, 29.72, 29.59, 29.45, 25.00, 22.94, 14.39 ppm. Anal. Calcd for $C_{22}H_{31}NO$: C, 81.18; H, 9.60; N, 4.30. Found: C, 81.55; H, 9.86; N, 4.05.

[0034] 실시예 2

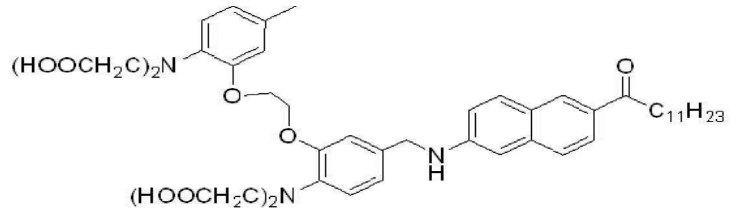
[0035] 

[0036] 

[0037] 상기 실시예 1에서 얻어진 생성물과, 5-메틸-5'-포르밀-BAPTA-테트라메틸 에스테르를 무수 에틸 아세테에트에서 혼합하여 질소 대기하에서 밤새도록 환류시켰다. 용매를 증발시킨 후, 1,2-디클로로에탄(10 mL)과 NaBH(OAc)3 (0.15 g, 0.65 mmol)를 첨가한 다음, 밤새 교반했다. 진공하에서 용매를 제거하고, 생성물은 CHCl3:에틸아세테에트:헥산(2:2:1)를 용리액으로 사용하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피로 정제했다. 붉은 오렌지색 결정이 분리되었다.

[0038] 수율 0.045g (16%) ; mp 98 ℃; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): d 8.30 (d, 1H, *J* = 2 Hz) 7.93 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 7.73 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.60 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.95 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 6.92 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 6.90 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 6.81 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.75 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.70 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 6.68 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 6.67 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 4.36 (s, 2H), 4.26 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 4.26 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 4.16 (s, 4H), 4.12 (s, 4H), 3.59 (s, 6H), 3.53 (s, 6H), 3.04 (t, 2H, *J* = 7 Hz), 2.97 (s, 3H), 1.78 (quin, 2H, *J* = 7 Hz), 1.28 (m, 16H), 0.88 (t, 3Hz, *J* = 7 Hz) ; ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): d = 200.50, 172.26, 172.09, 132.66, 132.35, 130.96, 130.20, 129.81, 126.25, 125.00, 122.01, 121.94, 120.63, 119.33, 118.69, 114.13, 113.47, 104.18, 150.73, 150.35, 148.07, 139.48, 138.72, 138.02, 136.88, 67.03, 66.48, 53.57, 53.49, 51.89, 51.79, 47.89, 38.62, 32.17, 29.88, 29.85, 29.77, 29.72, 29.57, 29.25, 25.02, 22.92, 21.31, 21.22, 14.38 ppm. Anal. Calcd for $C_{50}H_{65}N_3O_{11}$: C, 67.93; H, 7.41; N, 4.75. Found: C, 67.95; H, 7.36; N, 4.72.

[0039] 실시예 3

[0040] 

[0041] 상기 실시예 2로부터 생성된 물질을 포함하는 에탄올 용액을 KOH 용액에 용해시킨 후 밤새 교반했다. 플라스크의 내용물을 부분적으로 증발시켜 에탄올을 제거하고, 묽은 염산으로 중화시켜 pH를 3-4 범위로 조절했다. 그 후 여과시킨 다음 부탄올:아세트산:물(4:1:1)로 재결정화시켰다.

[0042] 수율 0.03g (34 %); mp > 210 ℃ (dec); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): d 8.31 (d, 1H, *J* = 2 Hz) 7.81 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 7.71 (d, 1H, *J* = 8 Hz), 7.51 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.08 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 7.05 (dd,

1H, *J* = 2 Hz, *J* = 8 Hz), 6.94 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.79 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.75 (d, 2H, *J* = 2 Hz), 6.66 (dd, 1H, *J* = 2 Hz, *J* = 9 Hz), 4.36 (s, 2H), 4.31 (t, 2H, *J* = 7Hz), 4.25 (t, 2H, *J* = 7Hz), 4.06 (s, 4H), 4.00 (s, 4H), 3.02 (t, 2H, *J* = 7Hz), 3.22 (s, 3H), 1.70 (quin, 2H, *J* = 7Hz), 1.27 (m, 16H), 0.87 (t, 3Hz, *J* = 7Hz; ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): d = 201.58, 174.80, 174.75, 150.80, 150.66, 138.55, 138.13, 136.46, 133.63, 132.73, 130.51, 130.26, 129.89, 126.10, 125.89, 125.74, 124.04, 121.47, 120.17, 119.43, 118.78, 114.41, 113.02, 104.99, 103.16, 67.27, 67.04, 54.83, 54.52, 49.67, 37.98, 31.90, 29.57, 29.52, 29.49, 29.30, 29.17, 24.96, 22.57, 20.01,19.84, 13.28 ppm. Anal. Calcd for $C_{46}H_{57}N_3O_{11}$: C, 66.73; H, 6.94; N, 5.08. Found: C, 66.52; H, 6.73; N, 5.07.

[0043] 실험예 1 : 흡수 및 형광 스펙트럼 측정

[0044] 본 발명에 따른 이광자 프로브인 상기 화학식 (1)(이하, ACaL)의 화합물에 대하여 Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였으며, 1-cm 표준 석영셀을 구비한 Amico-Bowman 시리즈 2 luminescence spectrometer를 이용하여 형광 스펙트럼을 얻었다. 형광 양자 수율은 Coumarin 307 과 Rhodamine B를 레퍼런스로 사용하여 측정하였다.

[0045] 본 발명에 따른 이광자 형광 표지자의 흡수, 방출 스펙트럼은 1,4-다이옥산 < DMF < EtOH < EtOH/H2O(1/1)의 순서로 용매 극성에 대해 점진적인 적색 이동을 나타내었다. 여러 가지 조건하에서 얻어진 스펙트럼 데이터는 도 1 및 표 1에 기재되어 있는데, 여러 용매 중에서의 ACaL의 광물리적 특성이 요약되어 있다. 이에 따르면 흡수 스펙트럼(13nm) 보다 방출 (54nm) 효과가 더 크게 나타났는데, 이는 본 화합물이 극성 표지자로 사용될 수 있음을 보여준다.

[0046]

표 1

Solvent (E_T^N)[a]	$\lambda_{max}^{(1)}$ [b]	λ_{max}^{fl} [b]	Φ[c]
Dioxane(0.164)	346	433	0.36
DMF (0.386)	356	453	0.059
EtOH (0.654)	359	475	0.11
EtOH/ H_2O (1.00)	356	487	0.096

[0047]

[0048] (a) 괄호 내의 숫자는 용매 극성의 정규화된 실험 변수임. (b) nm 단위의 일광자 흡수 스펙트럼의 $\lambda_{max.}$ [c] 형광 양자 수율, 오차는 ±15 %임.

[0049] 실험예 2: 칼슘 이온에 대한 ACaL의 결합 효과

[0050] 본 발명에 따른 이광자 형광 표지자를 포함하는 3-(*N*-모포리노)프로판설폰산 (MOPS) 버퍼 용액(30 mM, 100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH 7.2)에 칼슘 이온[Ca^{2+}]을 첨가하면, 금속 이온 농도의 작용에 따라 형광 강도가 현저히 증가하는데, 금속과 착체를 형성함으로써 광유발된 전자 전이 과정(Photo-indued electron transfer: PeT)이 진행되지 않기 때문인 것으로 예상된다.(도 3) 또한 이광자 과정에서도 거의 유사한 결과가 관찰되었다(도 3). 일광자 과정인지 이광자 과정인지를 결정하는 이광자 형광 표지자의 형광 강화 인자(Fluorescence enhancement factor) [(F F_{min})/F_{min}]는 본 발명에 따른 ACaL에 대하여 39 μM 칼슘 이온[Ca^{2+}]의 존재하에 각각 12와 10이었다. (표 2 및 도 3) 이 값은 Calcium-Green에 대해 보고된 14와 유사한 값이다. 더욱이 칼슘 이온 결합에 대해 기울기가 1인 선형 Hill plot은 본 발명에 따른 이광자 형광 표지자(ACaL)와 칼슘이온이 1:1로 착물을 형성한다는 것을 보여주었다. (도 4)

[0051] 실험예 3: 칼슘 이온 검출 성능 평가

[0052] 본 발명에 따른 이광자 형광 프로브는 Zn^{2+} 과 Mn^{2+}에 대해서는 큰 반응성을 나타내지 않았으며, 특히, Mg^{2+}에 대해서는 더욱 반응성이 약했고, Fe^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ba^{2+} 및 Sr^{2+}에 대해서는 아무런 반응도 나타내지 않았다.(도 5) 세포내에서 Mn^{2+}의 자유이온 농도는 무시할 만하기 때문에, 본 발명에 따른 표지자는 킬레이트화될 수 있는 Zn^{2+}의 농도가 $K_d^{TP}(Ca^{2+})$ 보다 훨씬 낮은 곳에 존재하는 세포내 Ca^{2+} 농도를 감지할 수 있다. 또한 pH > 6.5에서는 pH에 따라 달라지지 않았다 (도 6).

[0053] 막 근처에 존재하는 칼슘 이온을 검출할 수 있는지를 평가하기 위하여, 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린 (DPPC)/40 mol % 콜레스테롤(CHL), 1,2-디올레오일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린 (DOPC) 및 DOPC/스핀고미에린/CHL (1:1:1, raft mixture)로 조성된 소포체 중에서 K_d^{OP} 값을 결정했다.

[0054] 세포막이 liquid-ordered (l_o) 도메인과 liquid-disordered (l_d) 도메인으로 구성되어 있고, DPPC/CHL, DOPC, 및 래프트 혼합물이 l_o 과 l_d 도메인의 좋은 모델이라는 사실은 잘 알려져 있다. 소포체에서 측정된 K_d^{OP} 값은 각각 0.082±0.008, 0.11±0.02, and 0.097±0.010 μM이었다. (표 2 및 도 7a~7c).

[0055] 이 값은 MOPS 버퍼용액에서 측정된 값보다 2배 이상 큰 값으로서, DOPC 중의 Calcium Green C_{18} 에 대해 보고된 값인 K_d^{OP} = (0.062±0.007) μM에 비교할 만한 값이다.

[0056] 종래 ACa2에 대한 값보다 ACaL의 K_d^{OP} 값이 더 큰 것은 라우릴기에 의한 것일 수 있는데, BAPTA 근처에 소수성 환경을 유발함으로써 ACaL-Ca^{2+} 착체를 안정화시키는 것으로 생각된다.

[0057] ACaL-Ca^{2+} 착체의 방출 스펙트럼은 DPPC/CHL 및 DOPC에서 각각 435 및 462 nm에서 최대 파장을 나타내는 반면, 래프트 혼합물에서는 최대 파장 (l_{max})이 439 nm(with a shoulder)에서 나타난다. 이는 각각 중심이 432 및 468 nm 인 2개의 가우스 함수로 맞춰질 수 있다. (도 8)

[0058] 이는 ACaL-Ca^{2+} 착체로부터의 방출 스펙트럼이 래프트 혼합물에서 l_o 도메인과 l_d 도메인 모두를 반영할 수 있음을 보여준다. 따라서 소포체에서 측정된 K_d^{OP}값은 MOPS 버퍼용액에서 측정된 것과 비교할 때 세포막에서의 결합 능력을 더욱 잘 반영할 수 있다. 즉 본 발명에 따른 ACaL은 마이크로몰 이하의 농도에서도 세포막 근처 칼슘 이온[Ca^{2+}]를 검출할 수 있음을 보여주었다.

[0059] 실험예 4: 이광자 작용 스펙트럼

[0060] 버퍼용액 중에서의 칼슘 이온과 ACaL 착체의 이광자(TP) 작용 스펙트럼은 Calcium-Green-Ca^{2+} 및 Fura-2-Ca^{2+}에 대한 값보다 2.5 배 이상 큰 값인 780 nm에서의 90 GM의 Fd 값을 나타냈다. (도 9 및 표 2). C18-Fura-2 및 Calcium Green C18의 TP 작용 크로스섹션(Fd)은 Calcium-Green-Ca^{2+} and Fura-2-Ca^{2+}의 값과 비슷할 것으로 예상되며, 본 발명에 따른 ACaL로 착색된 샘플에 대한 TPM 이미지는 종래의 표지자로 착색된 것들보다 훨씬 밝았다.

[0061] 하기 표 2에는 ACaL, Calcium-green 및 Fura-2에 대한 광물리학적 데이터가 기재되어 있다.

표 2

compd	$\lambda_{max}^{(1)}/\lambda_{max}^{n}$ [b]	Φ [c]	K_d^{OP}/K_d^{TP} [d]	$\lambda_{max}^{(2)}$ [e]	$\Phi\delta$ [f]
ACaL	369/500	0.0037		nd [g]	nd [g,h]
ACaL+Ca^{2+}	372/502	0.043	0.045 [i]/0.041	780	90
Calcium Green C_{18} + Ca^{2+}	494/523 [j]	0.75 [j]	0.17 [j]/nd [g]	800 [k]	37 [k]
C_{18}-Fura-2 + Ca^{2+}	335/505 [l]	0.49 [l]	0.14 [l]/nd [g]	780 [m]	36 [m]

[0062]

[0063] 도 10에는 ACaL로 표지된 ROS 세포의 가상(pseudo) 염색된 TPM 이미지가 나타나있다. 각각 (a) 360-620 nm, (c) 360-460 nm, (d) 500-620 nm 에서 얻어진 결과이며, 그래프 (b)에서 적색 곡선은 원형질막으로부터의 이광자 여기된 형광 스팩트럼 (적색 곡선)을 나타내며, 하늘색과 분홍색 곡선은 dissected Gaussian 함수를 나타낸다.

[0064] 상기 도면에 따르면, 5M ACaL로 표지된 배양된 ROS 세포[쥐의 골아세포 유사 골육종 세포(ROS 17/2.8)]의 가상 염색 TPM 이미지로서, 원형질막 중의 칼슘이온 분포를 명확히 보여준다.

[0065] 원형질막(적색 곡선)으로부터의 TPEF 스팩트럼은 비대칭이었으며, 각각 435 nm (청색 곡선) 및 475 nm (녹색 곡선)에서 최대 파장을 갖는 2개의 가우스 함수에 맞춰질 수 있었다. (도 10b). 또한 스팩트럼은 dissected 가우스 함수의 최대 파장과 마찬가지로 래프트 혼합물에서 측정된값과도 매우 유사했다. (도 8) 따라서 TPM 이미지는 원형질막 중의 l_o 및 l_d 도메인과 연관된 ACaL-Ca^{2+} 착체에 기인한 것으로 보여진다.

[0066] 더 나아가, 360-460 및 500-620 nm 범위에서 수집된 TPM 이미지는 밝기를 제외하고는 거의 같았다(도 10c 및 도 10d). 이것은 칼슘 이온이 두 도메인 모두에서 균일하게 분포한다는 것을 보여준다. 따라서 본 발명자는 360-620 nm 범위를 검출 윈도우를 사용함으로써 TPM에 의해 ACaL을 이용하여 막 근처에 존재하는 칼슘 이온(Ca^{2+})을 검출했다.

[0067] 본 발명에 따른 표지자의 유용성을 보여주기 위하여, 본 발명자는 파라티로이드 호르몬을 첨가한 후 ACal-표지된 ROS 세포의 TPEF 강도를 관찰했다. 파라티로이드(parathyroid) 호르몬(PTH)은 세포를 자극하여 세포내에 축적된 칼슘으로부터 자유 칼슘이온 [Ca^{2+}]을 방출시킨다.

[0068] 칼슘이온 [Ca^{2+}]은 기저에 재축적 되기 때문에, 과량의 칼슘이온 [Ca^{2+}]은 PMCA 통해 세포로부터 배출 및/또는 SERCA를 통한 소포체(ER)로 이동되어야 한다. 따라서 막 근처의 칼슘이온 [Ca^{2+}] 농도는 PTH로 처리하면 증가한 후 시간에 따라 감소할 것으로 예상된다.

[0069] 실제로, 세포막에서의 TPEF 강도는 PTH(100 nM), 첨가후 50-100 초 후에 증가하기 시작해서, 400-500초 후에 최대에 도달하며, 약 1,200 초 정도 후에는 기저 수준으로 감소했다.

[0070] 소포체(ER)에 의해 형성된 세포내 축적물로 칼슘이온 [Ca^{2+}]의 재유입을 방해하는 억제기능을 하는 탑시가진(thapsigargin) (5 μM)으로 10분 동안 세포를 처리한 후에 PTH를 첨가했을 때는 TPEF 강도는 더욱 증가했으며, 감소율은 더 천천히 진행되었다. (도 11d).

[0071] 또한 TPEF 강도는 에틸렌글리콜 테트라아세트산(EGTA)로 처리할 경우 감소했는데, 이는 EGTA가 칼슘이온을 효과적으로 제거할 수 있는 막 투과성 칼슘이온 킬레이트이기 때문이다. (도 12).

[0072] 도 11에 나타난 TPM 이미지는 외부에서 1.2 mM Ca^{2+}를 첨가한 후 Calcium Green C18에 의해 얻어진 OPM 영상보다 훨씬 선명하고 밝다는 사실은 주목할 만하다. 따라서 본 발명에 따른 ACaL은 종래의 프로브보다 훨씬 우수하며, 1,500초 이상, 살아 있는 세포 중의 막 근처에 존재하는 칼슘이온을 검출할 수 있음이 명백하다.

[0073] 한편 본 발명자는 조직 이미지에서 본 발명에 따른 표지자의 유용성을 추가로 연구했다. 37 ℃에서 30분 동안 10 μM ACaL로 배양된 신선한 쥐 해마상 슬라이스의 일부에서 TPM이미지를 얻었다. 밝은 부분으로 나타난 이미지는 dentate gyrus 뿐만 아니라 CA1 and CA3 영역을 나타낸다.(도 13d)

[0074] 더 높은 배율로 얻어진 TPM 이미지는 살아있는 조직의 120 μm 깊이에 있는 세포막에서 칼슘이온의 분포를 분명히 나타낸다. (도 13b).

[0075] 영상화 용액에 EGTA를 첨가했을 때, TPEF 강도는 감소했다(도 13c). 이러한 사실은 ACaL이 TPM을 사용하여 살아있는 조직의 120 μm 깊이에 있는 막 칼슘이온을 검출할 수 있다는 것을 보여준다.

[0076] 결론적으로, 본 발명은 칼슘 이온에 대해 10배 향상된 TPEF를 나타내며, 해리상수(K_d^{TP})가 (0.041 ± 0.005)μM이고, 생물학적으로 의미 있는 pH 범위에서 pH에 대해 민감하지 않으며, 칼슘이온과의 착체 형성에 있어, Calcium-Green 이나 Fura-2 보다 2.5 배 더 강한 TPEF를 방출하는 이광자 표지자 (ACaL)를 제공한다. 본 발명에 따른 이광자 표지자는 현재 사용되는 표지자보다 우수할 뿐만 아니라, 다른 금속 이온의 방해를 받지 않고, 120 μm 깊이에서 살아있는 조직에서 1,500 초 이상 동안 살아있는 세포 중의 막 근처 칼슘이온을 영상화할 수 있다.

[0077] 해리상수 (dissociation constant, K_d)의 측정방법

[0078] 다양한 농도의 [Ca^{2+}]를 함유하는 일련의 용액들을, 2가지 종류의 용액들 (10mM K_2EGTA를 포함하는 용액 A 및 10mM CaEGTA를 포함하는 용액 B)을 다양한 비율로 혼합함으로써 제조하였다. 용액 A 및 용액 B는 모두 1μM ACa1, 100mM KCl, 30mM MOPS를 포함함으로써 pH 7.2로 조정되었다.

[0079] 본 발명에 따른 이광자 표지자-Ca^{2+}에 대한 K_d를 측정하기 위해서, 형광 스펙트럼을 20℃에서 2.0mL의 용액 A (0 μM 유리 Ca^{2+})로 기록하였다. 이어서 상기 용액 203μL를 폐기하고 이를 203μL의 용액 B로 치환한 다음 (39μM 유리 Ca^{2+}), 스펙트럼을 기록하였다. 이러한 작업에 의해서, 표지자 또는 총 EGTA의 농도 변화 없이, CaEGTA 농도를 1.00mM로, $[Ca^{2+}]_{유리}$의 농도를 약 0.017μM로 조절할 수 있었다. $[Ca^{2+}]_{유리}$는 하기 식 (1)를 사용하여 Ca^{2+} (150.5 nM)에 대한 EGTA의 K_d로부터 계산되었다.

$$[Ca^{2+}]_{free} = K_d^{EGTA} \times \frac{[CaEGTA]}{[K_2EGTA]} \quad (1)$$

[0080]

[0081] 또한, 223, 251, 285, 327, 421, 479, 667, 420, 350, 412, 905, 1028, 926, 및 992 μL의 용액 A를 연속적으로 폐기하고 각각을 동일 부피의 용액 B로 치환함으로써, 0.038, 0.065, 0.101, 0.150, 0.230, 0.350, 0.601, 0.800, 1.00, 1.30, 2.50, 5.30, 10.0, 및 20.0 μM의 유리 Ca^{2+}에 대한 반복값들을 얻었다.

[0082] 만약, 본 발명에 따른 이광자 표지자와 Ca^{2+} 이온들 사이에 1:1 금속-리간드 복합체가 형성되는 경우에, 그 평형상태는 하기 수학식과 같이 표현될 수 있으며, 여기에서 L 및 M은 각각 본 발명에 따른 이광자 표지자 및 Ca^{2+} 이온들을 나타낸다.

[0083] 총 표지자 및 금속 이온 농도는 각각 $[L]_0 = [L] + [LM]$ 및 $[M]_0 = [M] + [LM]$로 정의되며, $[L]_0$ 및 $[M]_0$의 값이 주어지는 경우에 K_d는 하기 수학식 (2) 또는 수학식 (3)로 표현될 수 있다:

$$[LM]^2 - ([L]_0 + [M]_0 + K_d)[LM] + [L]_0[M]_0 = 0$$

[0084]

$$[LM] = \frac{([L]_0 + [M]_0 + K_d) - \sqrt{([L]_0 + [M]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[M]_0}}{2} \quad (2)$$

[0085]

$$(F-F_{min})=\left(\frac{([L]_0+[M]_0+K_d)-\sqrt{([L]_0+[M]_0+K_d)^2-4[L]_0[M]_0}}{2[L]_0}\right)(F_{max}-F_{min})$$

[0086] (3)

[0087] 상기 식에서, F는 측정된 형광 강도이고, F_{min}은 최소 형광 강도이며, F_{max}는 최대 형광 강도이다. 수학식 5에 따른 적정 곡선에 가장 잘 부합되는 K_d 수치를 상용 엑셀 프로그램을 사용하여 계산하였다 (J. R. Long, R. S. Drago, *J. Chem. Ed.* **1982**, *59*, 1037; K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193).

[0088] 또한, 이광자 과정에 대한 K_d 수치를 결정하기 위해서, 780 nm의 파장 및 1230 mW의 출력으로 고정되고 (초점 평면에서 대략 10 mW의 평균 출력에 해당), 모드-락된 티타늄-사파이어 레이저 광원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)에 의해서 여기되는 DM IRE2 Microscope (Leica)를 사용하여 TPEF 스펙트럼을 얻었다. TPEF 적정 곡선을 얻었으며, 이를 상기 수학식 (3)에 피팅시켰다.

도면의 간단한 설명

[0089] 도 1은 이광자 형광 프로브의 흡수, 방출 스펙트럼은 1,4-다이옥산, DMF, EtOH, EtOH/H2O에서의 흡수 스택트럼 (1a) 및 방출 스팩트럼(1b)를 나타낸 그래프이다.

[0090] 도 2는 자유 칼슘이온 Ca^{2+} (0-39 μM)의 존재하에 MOPS 버퍼 중의 2 μM ACaL의 일광자 형광 스택트럼을 나타낸 그래프이다.

[0091] 도 3은 자유 칼슘이온 Ca^{2+} (0-39 μM)의 존재하에 (30 mM MOPS, 100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH 7.2) 중의 ACaL의 이광자 방출 스택트럼을 나타낸 그래프이다.

[0092] 도 4는 자유 칼슘이온 Ca^{2+} (0-39 μM)과 본 발명에 따른 ACaL 착체의 Hill plot이다.

[0093] 도 5는 2 mM 의 Mg^{2+}; 100 μM for Zn^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+} (empty bars) 및 이에 100 μM of Ca^{2+} (filled bars)을 첨가한 경우에, 1 μM ACaL의 상대적 형광 강도를 나타낸 그래프이다.

[0094] 도 6은 30 mM MOPS 및 100 mM KCl 중에서의 자유 칼슘 이온[Ca^{2+}] 0.0 및 39 μM의 존재하에 1 μM ACaL의 일광자 형광 강도에 대한 pH 반응성을 나타낸 그래프이다.

[0095] 도 7a, 7b, 7c 는 각각 DOPC, DPPC 및 DOPC/sphingomyelin/cholesterol (1:1:1, raft mixture) 중에서의 자유 칼슘 이온과 ACaL의 착체에 대한 일광자 형광 적정 곡선이다.

[0096] 도 8은 DPPC/cholesterol(녹색 곡선), DOPC(적색 곡선) 및 DOPC/sphingomyelin/cholesterol (1:1:1, raft mixture, 청색 곡선)로 조성된 소포체 중의 39 μM 칼슘 이온 존재하의 ACaL의 형광 스팩트럼을 나타낸 그래프이다.

[0097] 도 9는 39 μM 자유 칼슘 이온[Ca^{2+}] 존재하의 MOPS 버퍼 중에서 ACaL (●), Fura-2 (■) 및 Calcium-Green (□)의 이광자 작용 스팩트럼을 나타낸 그래프이다.

[0098] 도 10은 ACaL로 표지된 ROS 세포의 가상(pseudo) 염색된 TPM 이미지로서, 각각 (a) 360-620 nm, (c) 360-460 nm, (d) 500-620 nm 에서 얻어진 결과이며, 그래프 (b)에서 적색 곡선은 원형질막으로부터의 이광자 여기된 형광 스팩트럼(적색 곡선)을 나타내며, 하늘색과 분홍색 곡선은 dissected Gaussian 함수를 나타낸다. 이때, 여기 파장은 780nm 이었으며, 세포는 반복 실험(n=5) 결과 중의 대표 이미지를 나타내었다.(Scale bar, 30 μM)

[0099] 도 11은 thapsigargin 의 부재 (a) 및 (5 μM) 존재(b) 하에 ACaL (5 μM)로 표지된 ROS 세포의 가상 염색된 TPM 이미지이다.

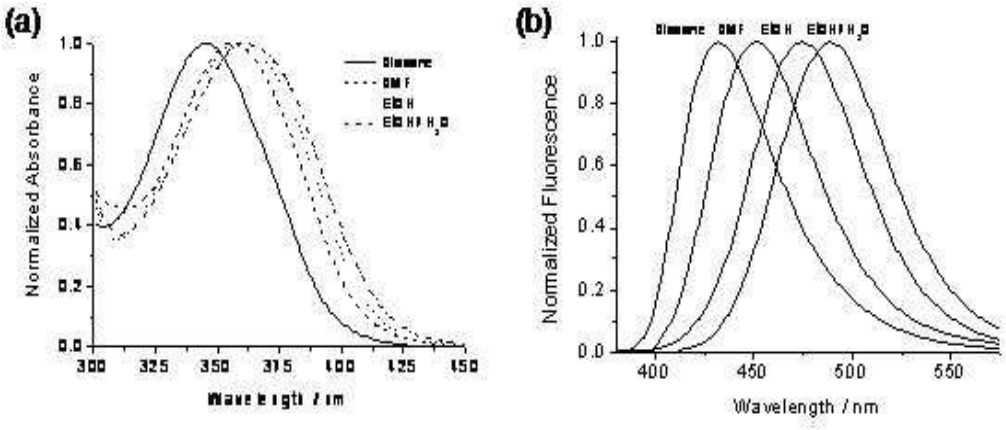
[0100] PTH (100 nM)로 자극된 후에 샘플 a (c) 와 b (b)에 대한 각각 지정 위치에서의 TPEF의 시간 경로이다. 이 영상들은 360-620 nm에서, 1.6 sec 간격으로, 780 nm의 여기 파장을 사용하여 수집되었다(Scale bar, 30 μM)

[0101] 도 12(a)는 ACaL (5 μM)로 표지된 ROS 세포의 가상 염색된 TPM 이미지이고, 12(b)는 EGTA (3 mM)로 처리된 후의 동일 세포의 TPM이미지이다. 이 영상들은 360-620 nm에서, 780 nm의 여기 파장을 사용하여 5회 반복 실험을 통해 대표도를 얻었다(Scale bar, 30 μM)

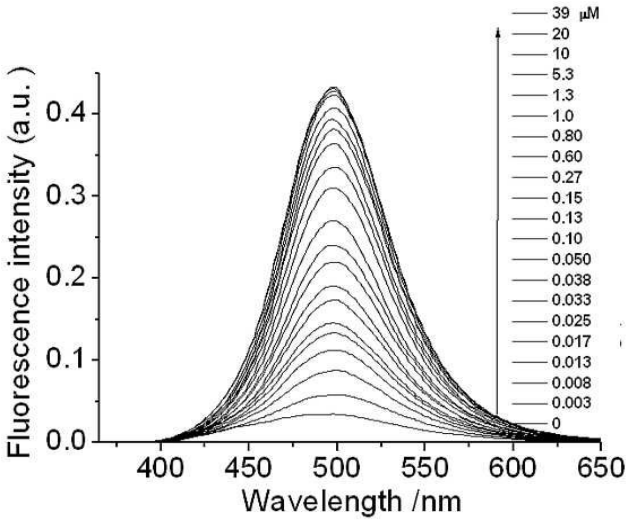
[0102] 도 13은 10 μM ACaL로 표지된 신선한 래트 해마상 슬라이스의 영상이다. (a)는 10배 확대한 경우의 dentate gyrus (DG) 뿐만 아니라 CA1 및 CA3 영역을 보여주는 밝은 영역 이미지. 백색 점으로 이루어진 선이 피라미드성 뉴우론 층을 나타낸다. (b)는 10배 확대한 경우의 120 μm 이하의 깊이에서의 적색 표지된 영역의 TPM 이미지이고, (c)는 (b)에 200 μM EGTA를 첨가한 후에 동일 부위의 TPM 이미지이다. 이들 영상은 fs 펄스, 780 nm 여기 파장을 적용하여, 360-620 nm범위에서 얻어졌으며, 스캐일 바는 각각 300 (a) 및 30 (b, c) μM)였다.

도면

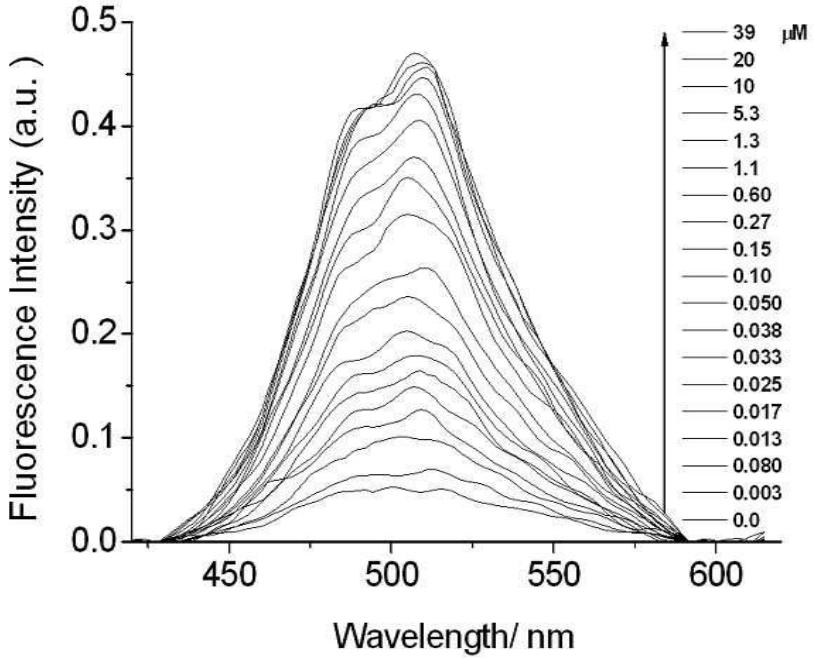
도면1



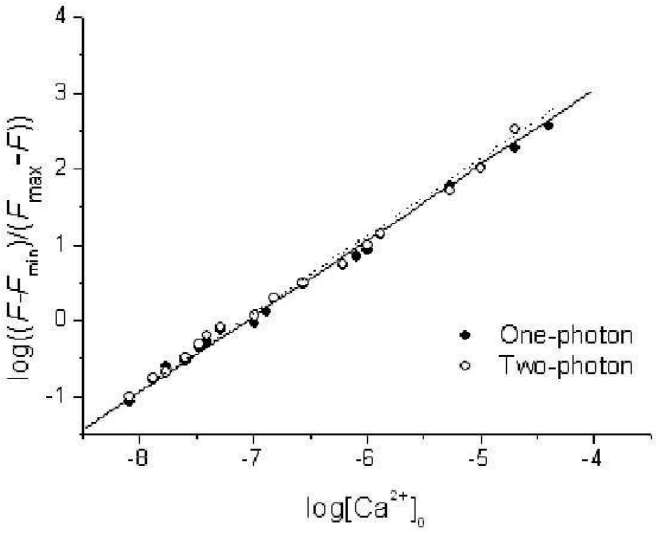
도면2



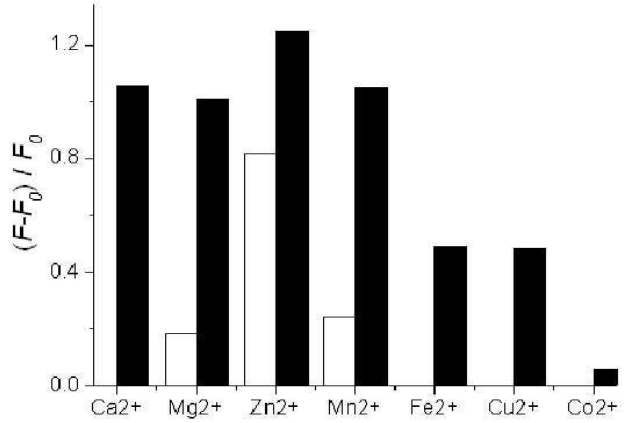
도면3


Fluorescence Intensity (a.u.)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
450
500
550
600
Wavelength/ nm
39 μM
20
10
5.3
1.3
1.1
0.60
0.27
0.15
0.10
0.050
0.038
0.033
0.025
0.017
0.013
0.080
0.003
0.0

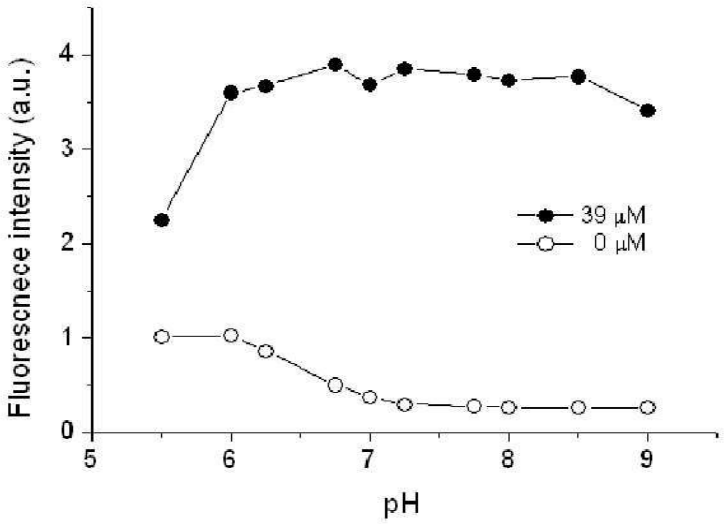
도면4


log((F-Fmin)/(Fmax-F))
4
3
2
1
0
-1
-8
-7
-6
-5
-4
log[Ca2+]0
One-photon
Two-photon

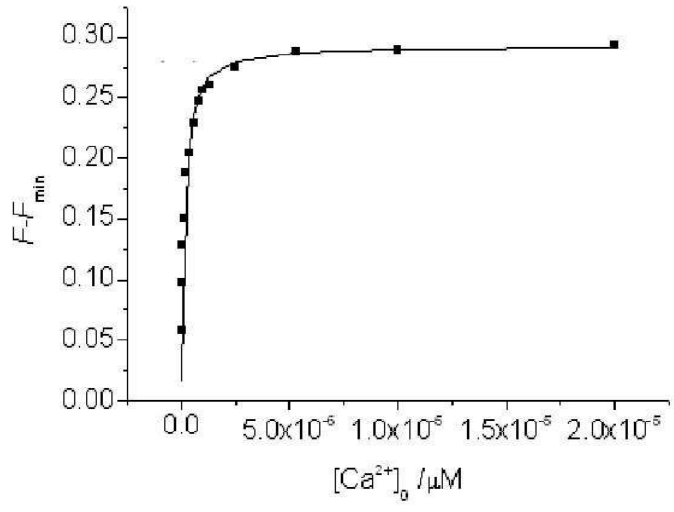
도면5


1.2
0.8
0.4
0.0
(F-F0) / F0
Ca2+
Mg2+
Zn2+
Mn2+
Fe2+
Cu2+
Co2+

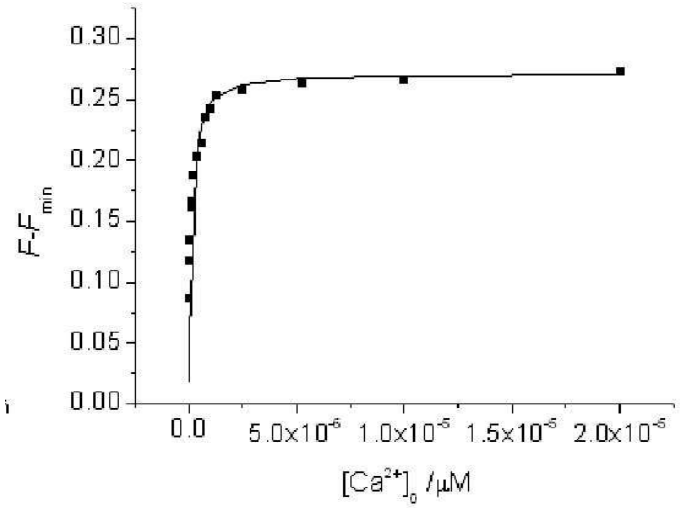
도면6


Fluorescnece intensity (a.u.)
4
3
2
1
0
5
6
7
8
9
pH
39 μM
0 μM

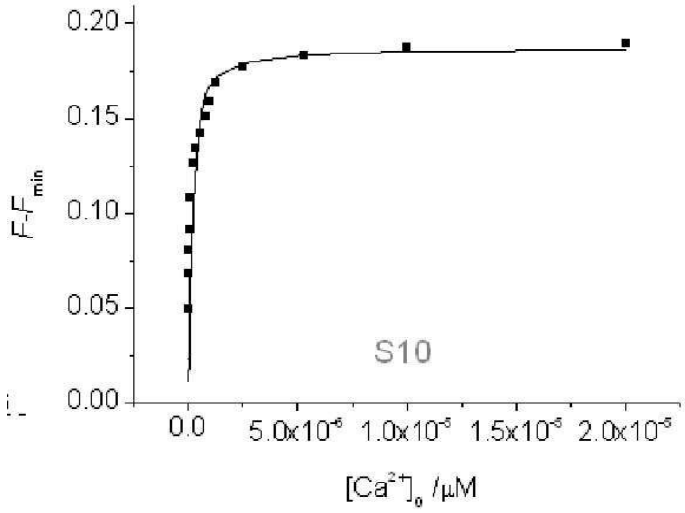
도면7a


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
F-F_min
0.0
5.0x10^-6
1.0x10^-5
1.5x10^-5
2.0x10^-5
[Ca2+]0 /μM

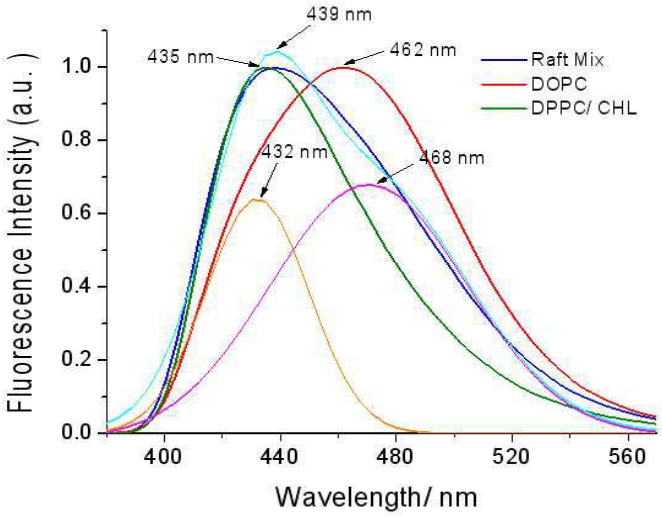
도면7b


0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
F-F_min
0.0
5.0x10^-6
1.0x10^-5
1.5x10^-5
2.0x10^-5
[Ca2+]0 /μM

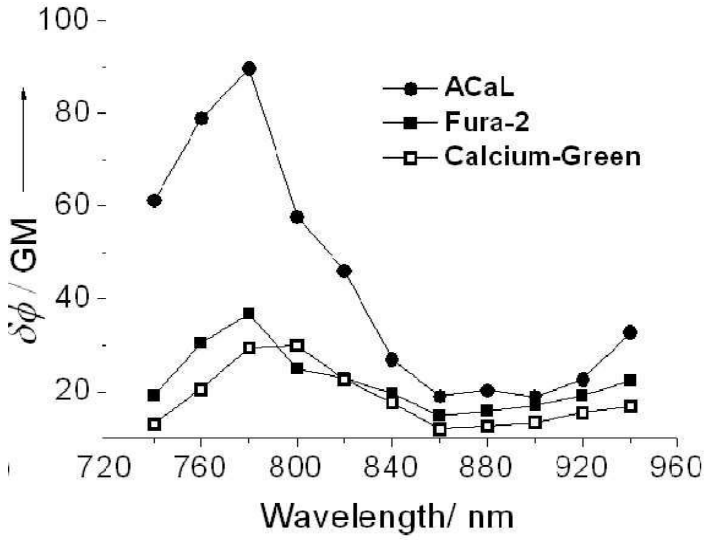
도면7c


0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
F-F min
S10
0.0
5.0x10-6
1.0x10-5
1.5x10-5
2.0x10-5
[Ca2+]0 /μM

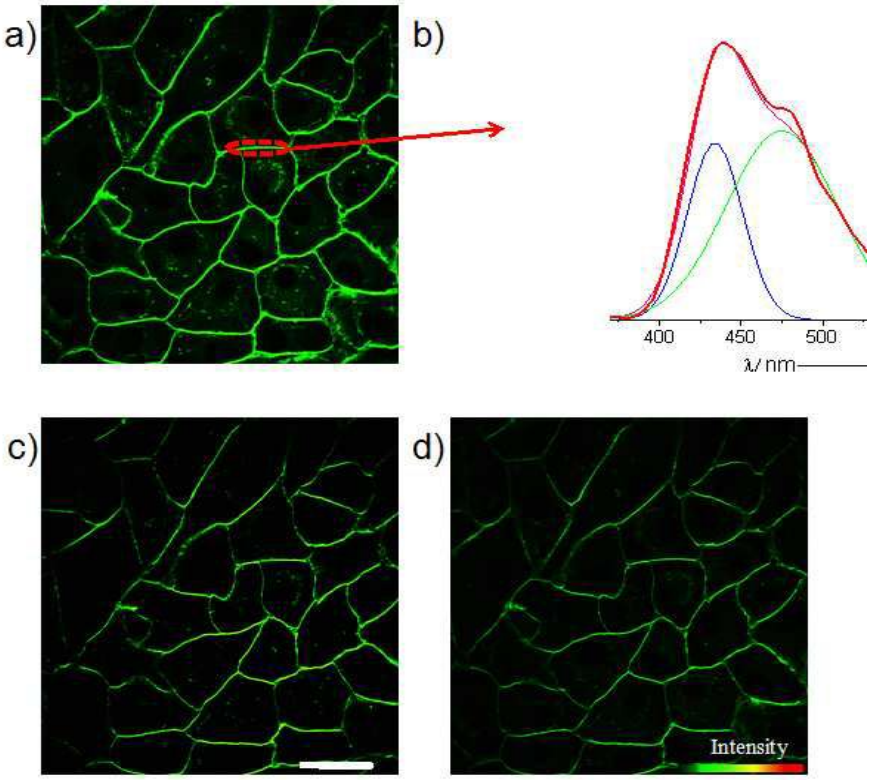
도면8


439 nm
435 nm
462 nm
Raft Mix
DOPC
DPPC/ CHL
432 nm
468 nm
Fluorescence Intensity (a.u.)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
440
480
520
560
Wavelength/ nm

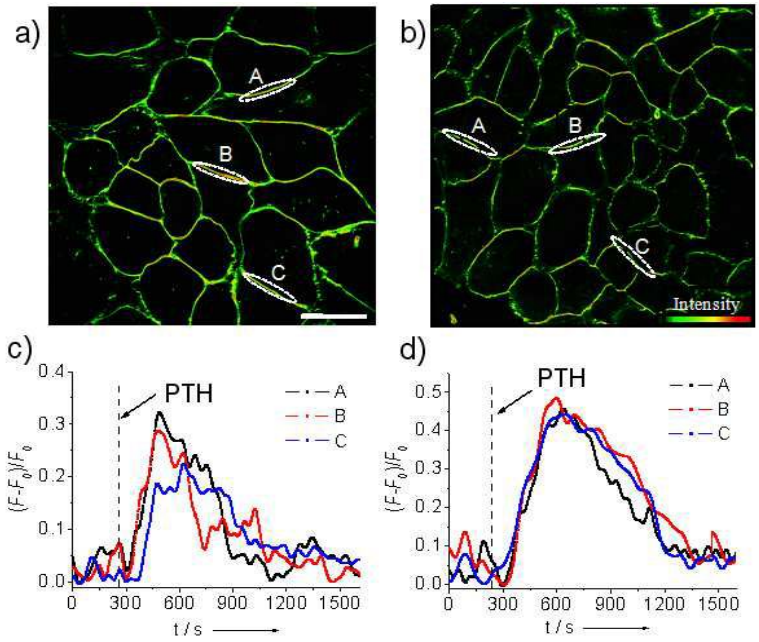
도면9


100
80
60
40
20
δφ / GM
ACaL
Fura-2
Calcium-Green
720
760
800
840
880
920
960
Wavelength/ nm

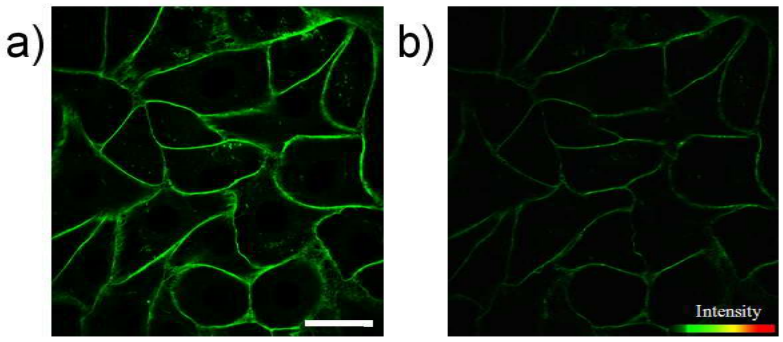
도면10


a)
b)
400
450
500
λ/ nm
c)
d)
Intensity

도면11



도면12



도면13

