



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0118412
(43) 공개일자 2009년11월18일

(51) Int. Cl.

C09B 17/04 (2006.01) C09B 29/22 (2006.01)
C09B 29/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0044176

(22) 출원일자 2008년05월13일

심사청구일자 2008년05월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

조봉래

서울 송파구 송파동 한양아파트 23동 207호

(74) 대리인

현중철

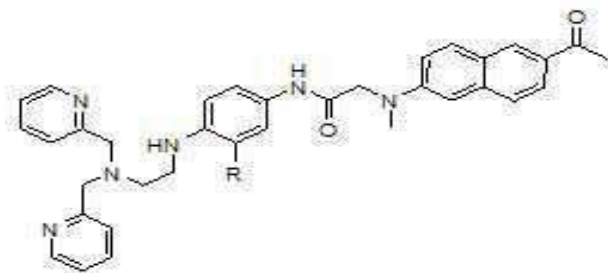
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 자유 아연이온의 실시간 모니터링 방법

(57) 요약

세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법이 제공된다.

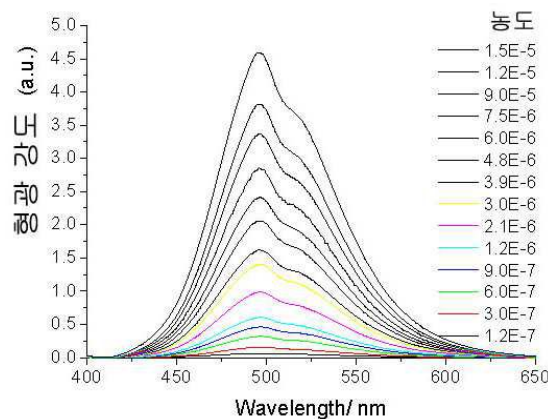
본 발명에 따른 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료는 하기 식 1의 구조를 가지며,



(1)

상기 식에서, R은 H 또는 OCH₃이다. 본 발명에 따른 이광자 염료는 Zn²⁺에 대하여 높은 선택성을 가지며, 표면으로부터 보다 깊이 위치하는 세포질 내의 자유 Zn²⁺에 대하여 매우 효과적이고 장시간의 모니터링을 가능하게 한다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 ROA20070002002702007

부처명 한국과학재단

연구사업명 국가지정연구실사업(NRL)

연구과제명 이광자 표지자의 합성과 생체 영상

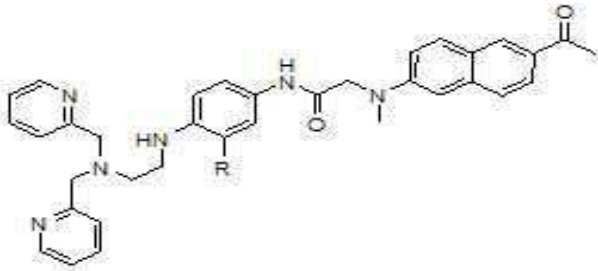
주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2007년 07월 01일 ~ 2008년 06월 30일

특허청구의 범위

청구항 1

하기 식 1의 구조를 갖는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료:

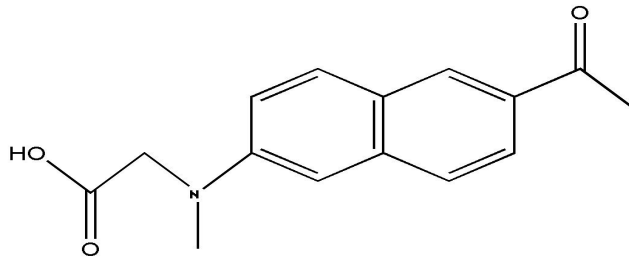


(1)

(상기 식에서, R은 H 또는 OCH₃임)

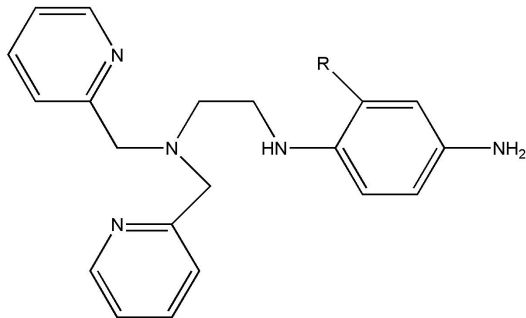
청구항 2

(a) 하기 식 2의 화합물을 유기용매에 혼입한 후 교반하여 제 1 혼합물을 수득하는 단계;

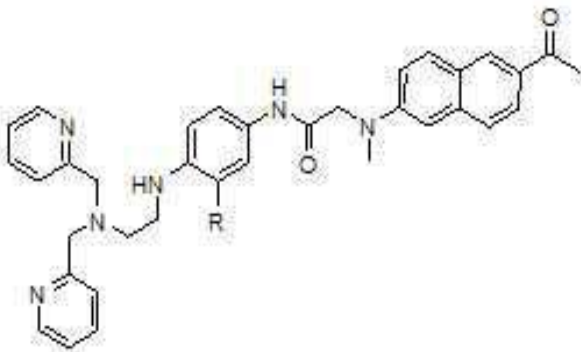


(2)

(b) 상기 수득된 제 1 혼합물에 하기 식 3의 화합물을 첨가, 반응시켜 식 4의 화합물을 합성하는 단계를 포함하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법:



(3)



(4)

(상기 식에서 R은 수소 또는 OCH₃임)

청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 (b)단계 후 상기 (b)단계의 결과물로부터 상기 식 (4)의 화합물을 분리하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 (a) 단계의 상기 유기용매는 1,3-히드록시벤조트리아졸 및 1,3-디시클로헥실 카르보다이미드를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법.

청구항 5

제 3항에 있어서,

상기 분리는 추출 공정에 의하여 수행되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법.

청구항 6

제 1항에 따른 이광자 염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입한 후 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 이광자 여기 형광 영상은 상기 관찰대상의 표면으로부터 80 내지 150 μ m의 깊이 이내에 존재하는 세포질로부터 방출되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 이광자 형광 영상의 관찰 단계는 1000초 이상 진행되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 살아있는 세포를 보다 깊이 장시간 탐지할 수 있는 세포질 내 자유 아연 이온 이온의 실시간 영상에 적합한 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 아연은 효소 및 단백질의 필수 요소로서, 뇌에서는 세포질 내 자유 아연 이온(Zn^{2+})의 수 밀리몰(millimole)이 시냅스 소포 내에 저장되어 있고, 시냅스 구동에 따라 방출되어, 호흡 신경전달을 조절하는 것으로 알려져 있다. 아연의 생물학적 역할을 이해하기 위하여, 키톨린(TSQ, Zinquin, 및 TFLZn) 및 형광체(FluZn-3, Znpyr, ZnAF 등)로부터 유도된 다양한 형광 탐침 물질이 개발되어 왔다.

<3> 하지만 이들의 대부분은 상당히 짧은 여기 파장을 요구하거나, pH에 민감하 다는 한계가 있었다. 표면 조성 물질(surface preparation artifact)의 간섭없이 표면으로부터 일정 깊이(특히 >80 μ m) 이상의 살아있는 조직 내부

에서 생물학적 활성을 시각화하기 위해서는, 낮은 여기 에너지를 갖는 이광자를 활용하는 이광자 현미경(TPM)이 매우 효과적이다. 특히 여기를 위해서 2개의 근적외선 광자들을 채용하는 TPM은 일광자 현미경에 비해서 여러 가지 장점들을 제공할 수 있는데, 구체적으로 증가된 투과 깊이, 국소화된 여기, 및 관측 시간의 증가 등이 바로 그것이다. 하지만 이와 같은 장점을 모두 가지며 Zn^{2+} 를 효과적으로 모니터링할 수 있는 이광자 염료는 현재 거의 개시되지 않고 있는 실정이다. Zn^{2+} 에 대한 몇 가지 pH-저항성을 갖는 센싱 물질(sensor)이 보고되고 있지만, 이 또한 세포질에 적용하기 위해서는 이러한 물질은 미소 주입되어야 하는 문제가 있고, 또한 낮은 수용도에 기인하여 에탄올과 같은 공용매를 상당량 사용하여야하는 문제가 있다.

<4> 따라서, 아연 이온에 대하여 효과적인 이광자 염료로서 세포를 염색시키기 위하여 충분한 수용해도, 아연 이온에 대한 높은 선택도, 상당한 이광자 단면적(two photon cross section), pH-저항성, 및 높은 광안정성 등과 같은 특성을 모두 만족하는 세포질 내의 자유 아연 이온 모니터링용 이광자 염료는 현재 전무한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<5> 따라서, 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 기술적 과제는 생체 내, 특히 세포질 내에 존재하는 자유 아연 이온을 보다 효과적이고 선택적으로 모니터링할 수 있는 이광자 염료를 제공하는 데 있다.

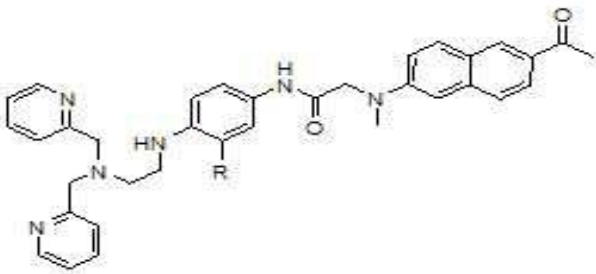
<6> 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 이광자 염료의 제조방법을 제공하는 데 있다.

<7> 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 세 번째 기술적 과제는 상기 이광자 염료를 이용한 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법을 제공하는 것이다

과제 해결수단

<8> 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 해결하기 위하여, 화학식 1의 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료를 제공한다:

화학식 1



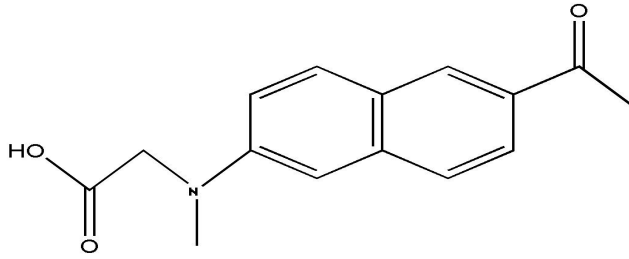
<9>

<10> 상기 식 1에서 R은 수소 또는 OCH₃이다.

<11> 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은

<12> (a) 하기 화학식 2의 화합물을 유기용매에 혼입한 후 교반하여 제 1 혼합물을 수득하는 단계; 및

화학식 2

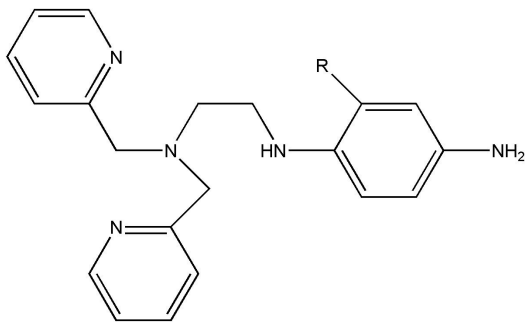


<14>

<15>

(b) 상기 수득된 제 1 혼합물에 하기 화학식 3의 화합물을 첨가, 반응시켜 상기 화학식 1의 화합물을 합성하는 단계를 포함하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법을 제공한다.

화학식 3



<16>

<17>

본 발명에 따른 이광자 염료의 제조방법은 상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여, 상기 (b)단계 후 상기 (b)단계의 결과물로부터 상기 화학식 1의 혼합물을 분리하는 단계를 더 포함하며, 상기 분리는 추출 공정에 의하여 수행된다. 또한 본 발명의 일 실시예에서 상기 유기용매는 1,3-히드록시벤조트리아졸 및 1,3-디시클로헥실 카르보디이미드를 포함한다.

<18>

상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 상기 화학식 1의 이광자 염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입한 후 방출되는 이광자 여기 형광(TPEF) 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법을 제공한다. 상기 이광자 여기 형상 영상은 상기 관찰대상의 표면으로부터 80 내지 150 μ m의 깊이 이내에 존재하는 세포질로부터 방출된다. 또한 상기 이광자 형광 영상의 관찰 단계는 1000초 이상 진행되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 자유 아연 이온의 실시간 모니터링 방법.

효 과

<19>

본 발명에 따른 두 이광자 염료는 Zn^{2+} 에 대하여 24 내지 52배의 TPEF 증가 효과를 가지며, 각각 1.1 ± 0.1 및 0.50 ± 0.04 nM의 해리 상수(K_d^{TP})를 갖는다. 또한 생물학적으로 연관된 pH 범위에서 pH 조건에 영향을 받지 않으며, 종래의 Zn^{2+} 를 검출하기 위한 이광자 염료인 TSQ 및 FluZin-3 등에 비하여 4 내지 24배 이상의 증가된 강도의 TPEF를 발생시킨다. 또한 본 발명에 따른 이광자 염료는 1000초 이상의 시간범위에서 세포 내의 자유 Zn^{2+} 를 선택적인 검출할 수 있는데, 이는 종래의 어떠한 이광자 염료보다 우수한 특성이다. 더 나아가, 본 발명에 따른 이광자 염료는 멤브레인-결합 이광자 염료 또는 다른 금속 이온에 의한 간섭이나 방해를 받지 않고, 매우 효과적으로 세포 내의 자유 아연 이온만을 영상화하여, 모니터링할 수 있게 한다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<20>

본 발명은 상기 화학식 1의 구조를 갖는 화합물을 세포질 내 자유 아연 모니터링용 이광자 염료로 제공한다. 본 발명에 따른 이광자 염료는 상기 형광부위(발광단)으로 아세틸-6-(디메틸아미노)나프탈렌(아세단), 아연 이온의 킬레이트기로서 N,N-디-(2-피콜릴)에틸렌디아민(DPEN)의 유도체가 결합한 구조를 갖는다. 특히 본 발명은 상기 구조의 이광자 염료를 자유 아연 이온의 이광자 염료로 사용하는 경우 세포질 내의 자유 아연 이온을 장시간 영상화하는 것이 가능하고, 더 나아가 특히 오프적화 또는 광블리칭과 같은 문제 없이 80 μ m이상의 깊

이에서도 자유 아연의 영상화를 가능하게 한다.

<21> 이하 본 발명에 따른 세포질 내 자유 아연 이온의 이광자 염료의 제조방법을 살펴보고, 상기 이광자 염료가 갖는 우수한 특성은 하기 실험예를 통하여 설명한다.

<22> 실시예 1

<23> N-(4-(2-(비스((피리딘-2-일)메틸)아미노)에틸아미노)-3-메톡시페닐)

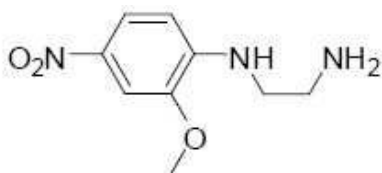
<24> -2-(N-(2-아세틸나프탈렌-6-일)-N-메틸아미노)아세트아미드의 합성

<25> 실시예 1-1

<26> N-(2-메톡시-4-니트로페닐)에틸렌디아민의 합성

<27> 2-클로로-5-니트로아니졸(3.0g, 16.0mmol) 및 에틸렌디아민(7.7g, 8.6mL, 0.13mol)을 물(180mL)에 혼합시킨 후, 110℃의 온도에서 72시간 교반하였다. 교반 후 얻어진 혼합물을 에틸 아세테이트를 이용, 추출한 후, MgSO₄를 이용, 건조시키고, 진공조건에서 여과, 농축시켰다. 이후 클로로포름/메탄올(5:1)을 용리액으로 하는 플래쉬 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 상기 농축 후 얻어진 미정제 생성물을 정제하였고, 에탄올로부터 재결정화를 통하여 추가 정제하였다. 이로써 하기 화학식 4의 화합물을 얻었다.

화학식 4



<28>

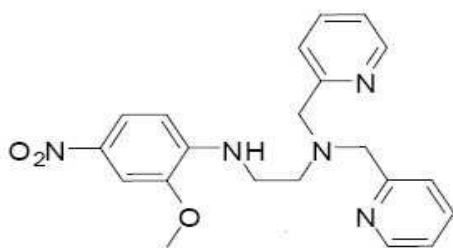
<29> 수득 2.0 g (60 %); mp 183 ° C; IR (KBr): 3440, 2960, 2890 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.91 (dd, 1H, J = 8.9, J = 2.1 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 2.1 Hz), 6.52 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 5.41 (br s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.31 (t, 2H, J = 5.4 Hz), 3.03 (t, 2H, J = 5.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 171.8, 145.4, 144.4, 120.1, 106.6, 104.9, 56.2, 43.4, 39.1 ppm; Anal. Calcd for C₉H₁₃N₃O₃: C, 51.73; H, 6.51; N, 19.44. Found: C, 51.38; H, 6.20; N, 19.29.

<30> 실시예 1-2

<31> N-(2-메톡시-4-니트로페닐)-N',N'-[비스(2-피리딜메틸)]에틸렌디아민의 합성

<32> 상기 실험예 1-1의 화합물, 2-(클로로메틸)피리딘 히드로클로라이드(2.9g, 17.5mmol), KI(0.52g, 3.0mmol) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(20g, 27mL, 0.16 mol)을 아세트니트릴(50mL)에 혼합시킨 후 질소 조건 하에서 16시간 환류시켰다. 환류 후 얻어진 혼합물을 에틸 아세테이트를 이용, 추출하고, MgSO₄를 이용, 건조시킨 후, 진공조건에서 여과, 농축시켰다. 이후 클로로포름/메탄올(4:1 내지 1:1)을 용리액으로 하는 플래쉬 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 상기 농축 후 얻어진 미정제 생성물을 정제하여, 하기 화학식 5의 화합물을 정제하였다.

화학식 5



<33>

<34> 수득 2.2 g (90 %); IR (KBr): 3428 cm⁻¹; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.55 (dd, 2H, J = 5.0, J = 2.0

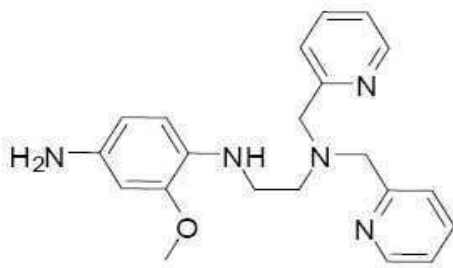
Hz), 7.85 (dd, 1H, $J = 9.0$, $J = 2.0$ Hz), 7.64 (td, 2H, $J = 7.5$, 2.0 Hz), 7.62 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.44 (dd, 2H, $J = 7.5$, 1.0 Hz), 7.17 (ddd, 2H, $J = 7.5$, 5.0, 1.0 Hz), 6.36 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 6.10 (br s, 1H), 3.99 (s, 3H), 3.92 (s, 4H), 3.29 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz), 2.93 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 170.5, 159.0, 149.2, 145.5, 144.5, 137.0, 123.7, 122.6, 120.1, 106.7, 104.9, 60.1, 52.9, 37.6, 23.3 ppm; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_3$: C, 64.28; H, 5.99; N, 17.24. Found: C, 64.11; H, 5.89; N, 17.80

<35> 실시예 1-3

<36> N-(4-아미노-2-메톡시페닐)-N',N'-[비스(2-피리딜메틸)]에틸렌디아민의 합성

<37> 실시예 1-2의 혼합물(1.2g, 3.00mmol) 및 $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (7.4g, 33mmol)의 혼합물을 아세트니트릴(50mL) 및 무수 에탄올(40mL)에서 12시간 환류시킨 후, 100mL의 포화 탄산 나트륨 100mL로 중화시키고, 디클로로메탄으로 추출하였다. 이후 클로로포름/메탄올(20:3)을 용리액으로 하는 플래쉬 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 상기 얻어진 미정제 생성물을 정제하여 하기 화학식 6의 화합물을 얻었다.

화학식 6



<38>

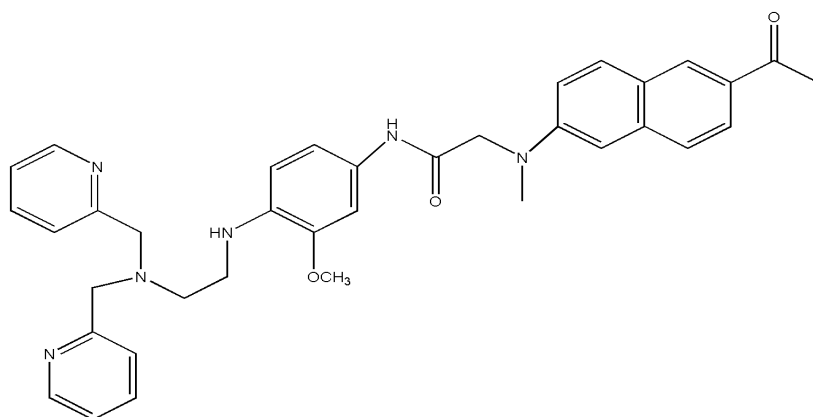
<39> 수득 0.9 g (80 %); IR (KBr): 3419 cm^{-1} ; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 8.50 (dd, 2H, $J = J = 5.0$, $J = 2.0$ Hz), 7.63 (td, 2H, $J = 7.5$, 2.0 Hz), 7.53 (dd, 2H, $J = 7.5$, 1.0 Hz), 7.13 (ddd, 2H, $J = 7.5$, 5.0, 1.0 Hz), 6.39 (d, 1H, $J = 9.0$ Hz), 6.27 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 6.22 (dd, 1H, $J = 9.0$, $J = 2.0$ Hz), 3.86 (s, 4H), 3.84 (s, 3H), 3.15 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz), 2.88 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 159.6, 149.1, 148.4, 137.6, 136.7, 131.2, 123.2, 122.3, 112.0, 107.9, 100.1, 60.5, 55.7, 53.4, 42.3 ppm; Anal. Calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_5\text{O}$: C, 69.55; H, 6.89; N, 18.98. Found: C, 69.40; H, 6.93; N, 19.27.

<40> 실시예 1-4

<41> 자유 아연 이온 모니터링용 이광자 염료(AZn2) 합성

<42> 6-아실-2-[N-메틸-N-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌(0.07g, 0.27mmol), 1-히드록시벤조트리아졸(0.037g, 0.27mmol), 1,3-디시클로헥실카르보디이미드(0.057g, 0.28mmol)을 디클로로메탄에 혼합시킨 후 30분간 교반하였다. 이후 상기 실시예 1-4에서 얻어진 화학식 6의 화합물을 첨가한 후, 질소 조건하에서 12시간 교반하고, 얻어진 생성물을 디클로로메탄로 추출하고, MgSO_4 를 이용, 건조시킨 후, 용매는 진공 조건에서 제거하였다. 이후 클로로포름/메탄올(20:1)을 용리액으로 하는 플래쉬 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 상기 얻어진 미정제 생성물을 정제하여 하기 화학식 7의 자유 아연 이온 모니터링용 이광자 염료를 합성하였다.

화학식 7



<43>

<44>

실시예 2

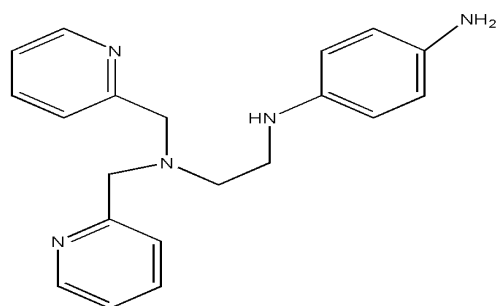
<45>

자유 아연 이온 모니터링용 이광자 염료(AZn1) 합성

<46>

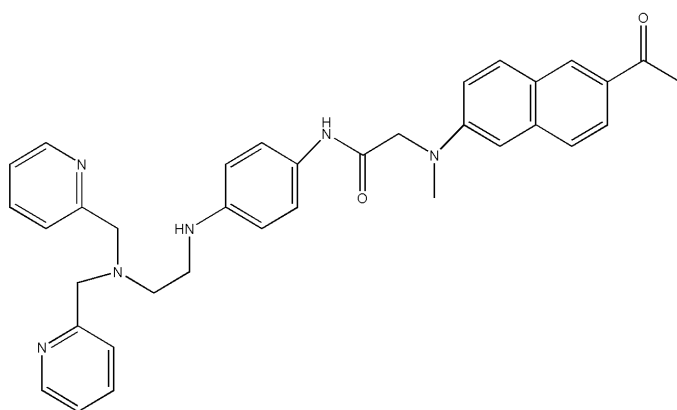
실시예 1-3의 화학식 6의 화합물 대신 하기 화학식 8의 화합물을 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-4와 동일한 방법으로 화학식 9의 이광자 염료를 합성하였다.

화학식 8



<47>

화학식 9



<48>

<49>

실험예 1

<50>

수용해도 측정

<51>

본 발명에 따른 실시예 1 및 실시예 2의 이광자 염료(AZn2 및 AZn1) 소량을 DMSO에 용해시켜 스톡 용액 (1.0×10^{-3} M)을 준비하였다. 이후 상기 용액을 (6.0×10^{-3} 내지 6.0×10^{-5})M로 희석시키고 마이크로 주사기를 이용, 3.0mL의 물을 함유하는 큐벳에 첨가하였다. 모든 경우, 물에서 DMSO 농도는 0.2%를 유지하였다.

<52>

도 1a 내지 1d는 상이한 농도의 이광자 염료에 대한 형광강도를 나타내는 그래프이다.

<53> 각각 AZn2 및 AZn1에 대한 농도 대비 형광강도를 나타내는 도 1b 및 1d를 살펴보면, 염료 농도에 대한 형광강도의 그래프는 저농도에서 선형을 나타내지만, 고농도로 갈수록 아래쪽으로 떨어진다. 이 경우 염료의 수용해도는 선형 패턴을 나타내는 최고 농도로 결정되며, 본 발명에 따른 두 염료 모두 3.0 μM의 수용해도를 나타내었다.

<54> 따라서 본 발명에 따른 이광자 염료가 가지는 3.0 μM 이상의 수용해도는 세포의 염색에 있어 매우 효과적이라는 것을 나타낸다.

<55>

<56> 실험예 2

<57> 흡광 스펙트럼 측정

<58> 본 발명에 따른 이광자 염료의 흡광 스펙트럼을 Hewlett-Packard 8453 다이오드 정렬 스펙트로미터 상에서 측정하였으며, 형광 스펙트럼을 1 cm 표준 석영 셀을 구비한 Amico-Bowman series 2 발광 스펙트로미터를 사용하여 측정하였다. 형광 양자 수율은 참고문헌 종래 문헌에 개시한 바에 따라 쿠마린(Coumarin) 307을 사용하여 측정하였다.

<59> 도 2a 및 2b는 본 발명에 따른 이광자 염료인 AZn1의 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼이고, 도 2c 및 2d는 본 발명에 따른 이광자 염료인 AZn2에 대한 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼이다.

<60> 또한 하기 표 1은 다양한 용매 조건에서 본 발명에 실시예 2 및 실시예 1의 이광자 염료(AZn1 및 AZn2)가 갖는 최대 발광 파장 ($\lambda_{\max}^{(1)}$), 최대 형광 파장 ($\lambda_{\max}^{\text{fl}}$) 및 형광 양자 수율을 나타낸다.

표 1

용매	$(E_T^N)^{[a]}$	$\lambda_{\max}^{(1)} [b]$		$\lambda_{\max}^{\text{fl}} [b]$		$\Phi^{[c]}$	
		AZn1	AZn2	AZn1	AZn2	AZn1	AZn2
1,4-dioxane (0.164)		344	344	414	415	0.19	0.094
DMF (0.386)		356	356	442	448	0.055	0.037
EtOH (0.654)		359	356	475	472	0.057	0.039
H ₂ O (1.000)		367	366	496	495	0.022	0.012

<61>

<62> *: 괄호 안의 수치는 용매 극성에 대한 정규화된 경험적 파라미터들이다. $\lambda_{\max}$ 는 nm단위이며, 또한 형광 양자 수율 $\pm 15\%$.

<63> 도 2a 내지 2d 및 상기 표1을 참조하면, 1,4-디옥산(dioxane)<DMF<EtOH<H₂O의 순서로 용매 극성이 증가함에 따라서 큰 적색 이동 (bathochromic shift)이 관찰된다는 점은 본 발명에 따른 이광자 염료가 극성 탐침자로서 매우 유용하다는 것을 나타낸다.

<64> 실험예 3

<65> Zn²⁺ 농도 변화에 따른 흡광도 변화 측정

<66> 본 발명에 따른 Zn²⁺ 농도 변화에 따른 이광자 염료(AZn2, AZn1)의 일광자 또는 이광자 흡광 또는 발광 스펙트럼을 측정하였으며, 이를 도 3a 내지 도 3f에 도시하였다.

<67> 도 3a 내지 3f로부터 알 수 있는 바와 같이, MOPS 버퍼 용액 중의 실시예 1 및 실시예 2의 이광자 염료(AZn2, AZn1)(30 mM, pH 7.2, I⁻=0.10)에 Zn²⁺을 미세히 증분하면서 첨가하였을 때, 이광자 여기 형광(발광) 강도 및 일광자 여기 형광 강도는 서서히 증가하지만, 흡수 스펙트럼에는 어떠한 영향이 없었다. 이는 Zn²⁺과의 착화 (complexation)에 의한 광유도 전자-전달 (photoinduced electron-transfer, PET) 과정의 차단에 기인한 것으로 추측된다.

<68> 실험예 4

<69> 상용 탐침들과의 이광자 스펙트럼 특성 비교

<70> 일광자 형광 및 이광자 형광 방법 중 실시예 1의 이광자 염료(AZn2)가 갖는 형광 증가 인자(Fluorescence enhancement factor) $[FEF=(F-F_{min})/F_{min}]$ 는 실시예 2의 이광자 염료(AZn1)가 갖는 형광 강화 인자보다 2.5배 이상 큰데, 이것은 과잉의 Zn^{2+} 가 없는 경우 실시예 1의 이광자 염료가 실시예 2의 이광자 염료보다 더 낮은 형광 양자 수율(Φ)을 가지는 데 비해, 과잉의 Zn^{2+} 가 존재하는 경우 실시예 1의 이광자 염료(AZn2)가 실시예 2의 이광자 염료(AZn1)보다 더 큰 양자 수율(Φ)을 가지기 때문이다.

<71> 이러한 분석결과는 하기 표 3의 측정 결과로부터 보다 용이하게 이해될 수 있다.

표 2

Compd ^[a]	$\lambda_{max}^{(1)}$ [b]	λ_{max}^{fl} [b]	Φ [c]	K_d^{OP}/K_d^{TP} [d]	FEF^{OP}/FEF^{TP} [e]	$\lambda_{max}^{(2)}$ [f]	δ [g]	$\Phi\delta$ [h]
AZn1	365	496	0.022	-	-	nd ^[i]	nd ^[i]	nd ^[i]
AZn1+ Zn^{2+}	365	498	0.47	1.1/1.1	21/24	780	210	86
AZn2	365	494	0.012	-	-	nd ^[i]	nd ^[i]	nd ^[i]
AZn2+ Zn^{2+}	365	499	0.65	0.5/0.5	54/52	780	140	95
FluZin+ Zn^{2+}	494 ^[j]	516 ^[j]	0.43 ^[j]	15 ^[j] /-	50 ^[j] /-	780	55	24
TSQ+ Zn^{2+} [k]	362	495	0.43	-	-	780	10	4

<72>

<73> 상기 측정 결과는 모두 20mM MOPS, 100mM KCl, 10mM EGTA, pH 7.2의 조건하에서 Zn^{2+} 를 첨가하거나, 첨가하지 않은 경우로 나누어 측정하였다. 또한 λ_{max} 는 nm단위로서, 일광자 흡광 및 발광 스펙트럼이며, Zn^{2+} 의 해리상수(dissociation constant)는 일광자(K_d^{OP}) 및 이광자 방법(K_d^{TP})에 따라 측정하였으며, 형광 증가 인자 또한 일광자 방법(OP) 및 이광자 방법에 따라 측정하였다. $\lambda_{max}^{(2)}$ 는 nm단위의 이광자 여기 스펙트럼을 의미하고, δ 는 광자당 피크 이광자 단면적으로 $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}$ 의 단위를 가지며, $\Phi\delta$ 는 이광자 동작 단면적(two photon action cross-section)을 나타낸다. 상기 측정 결과 중 이광자 여기 형광 강도는 너무 약하여 단면적을 정확하게 측정할 수 없었기 때문에 이를 nd로 나타내었으며, TSQ+ Zn^{2+} 의 측정 결과는 메탄올에서 Zn^{2+} 의 존재 하에서 얻어진 수치이다.

<74> 실험예 5

<75> 컴퓨터 분석

<76> N,N-디-2-피콜릴에틸렌디아민(DPEN, R1), 2-메톡시-DPEN(R2) 및 AZn1과 AZn2의 Zn 착화합물(AZn1- Zn^{2+} , AZn2- Zn^{2+})의 기하학적 구성을 가우시안 03 프로그램에서 실행되는 밀도 기능 이론(DFT)에서 B3LYP/6-31G 수준을 이용, 최적화하였다. 계산된 HOMO 및 LUMO 에너지를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

	HOMO (eV)	LUMO (eV)	total energy (hartree)
R1	-4.948	-0.688	-1202.418503
R2	-4.246	-0.747	-1316.936545
AZn1	-4.535	-1.589	-1834.429445
AZn2	-4.340	-1.648	-1948.949859
AZn1-Zn ²⁺	-8.762	-7.329	-3689.630523
AZn2-Zn ²⁺	-8.733	-7.196	-3804.163346

<77>

<78>

표 3을 참조하면, 모든 경우 CH₃O기는 HOMO 에너지 수준을 상승시키는 것을 알 수 있다. 이러한 경향성은 분자가 보다 복잡해지는 경우 즉, R>AZn>AZn-Zn²⁺로 갈수록 약화된다. 이것은 R2의 HOMO로부터 AZn2로의 전자 이동은 R1으로부터 AZn1으로 진행되는 경우보다 보다 큰 에너지, 즉 보다 큰 열을 발산하는 것을 의미한다(발열반응). 또한 DPEN(R1), 2-메톡시-DPEN(R2), AZn1 및 AZn2의 HOMO 에너지는 각각 -4.948, -4.246, -8.762 및 -8.733eV라는 것을 알 수 있는데, 이것은 결국 R2에서 AZn2로의 PET는 열역학적 관점에서 보다 효과적으로 일어날 것이고, 그 결과 Φ 를 떨어뜨리게 된다. 반면 AZn2-Zn²⁺의 보다 큰 Φ (표 2 참조)는 보다 강한 결합에서 그 이유를 찾을 수 있는데, 강한 결합은 진동 완화 경로를 감소시키기 때문이다.

<79>

도 4a 및 4b는 각각 AZn1 및 AZn2와 자유 Zn²⁺의 착화물에 대한 힐 그래프(Hill plot)이다.

<80>

상기 도 4a 및 4b를 참조하면, 기울기가 1인 직선으로 나타난 Hill 그래프는 Zn²⁺와 본 발명에 따른 이광자 염료는 1:1로 착화합물을 형성하는 것을 나타낸다.

<81>

더 나아가 최적화된 AZn1-Zn²⁺ 및 AZn2-Zn²⁺ 착물의 기하학적 구조는 삼각형의 이중 피라미드 구조이며, 여기에 Zn²⁺ 이온은 4개의 질소 원자 및 하나의 물 분자에 의하여 배위되며, 이는 B3LYP/6-31G* 수준에서 AZn1-Zn²⁺ 및 AZn2-Zn²⁺의 착화합물의 최적화된 기하학적 구조를 나타낸 도 5를 통하여도 알 수 있다.

<82>

또한 AZn1-Zn²⁺와 AZn2-Zn²⁺ 복합체의 결합 길이와 결합각을 B3LYP/6-31G** 수준으로 계산하여 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

	AZn1-Zn ²⁺	AZn2-Zn ²⁺
r(Zn-N ₁)	2.098	2.099
r(Zn-N ₂)	2.040	2.033
r(Zn-N ₃)	2.045	2.060
r(Zn-N ₄)	2.169	2.158
r(Zn-O ₁)	2.143	2.144
∠(O ₁ ZnN ₄)	173.4	172.4
∠(N ₁ ZnN ₂)	118.7	126.2
∠(N ₁ ZnN ₃)	116.6	112.2
∠(N ₁ ZnN ₄)	84.9	84.9
∠(N ₁ ZnO ₁)	89.0	88.0
∠(N ₂ ZnN ₃)	120.3	117.4
∠(N ₂ ZnN ₄)	82.2	82.9
∠(N ₃ ZnN ₄)	82.0	81.7

<83>

<84> 실시예 6

<85> 해리 상수(K_d^{OP} 및 K_d^{TP})의 결정

<86> 다양한 양의 ZnSO₄ 및 10mM의 EGTA(에틸렌글리콜-비스(2-아미노에틸에테르)-N,N',N'-테트라아세트산)을 함유하는 MOPS(4-모르폴린프로판술포산) 완충용액(30mM, pH 7.2, 0.1M KCl)을 준비하였다.

<87> 자유 Zn²⁺의 농도($[Zn^{2+}]_{free}$)를 하기 수학적 식 1을 이용하여 $K_{Zn-EGTA}^{app}$, $[EGTA]_{total}$, 및 $[Zn^{2+}]_{total}$ 로부터 계산하였다.

수학적 식 1

$$[Zn^{2+}]_{free} = [Zn^{2+}]_{total} / (\alpha_{Zn} \times K_{Zn-EGTA}^{app} \times [EGTA]_{free})$$

<88>

<89> 여기에서,

$$K_{Zn-EGTA}^{app} = K_{Zn-EGTA} / \alpha_{Zn} \alpha_{EGTA},$$

<90>

$$\alpha_{Zn} = 1 + 10^{(pH-pK_1)} + 10^{(2pH-pK_1-pK_2)} + 10^{(3pH-pK_1-pK_2-pK_3)} \dots,$$

<91>

$$\alpha_{EGTA} = 1 + 10^{(pK_1-pH+0.11)} + 10^{(pK_1+pK_2-2pH+0.22)} + 10^{(pK_1+pK_2+pK_3-3pH+0.33)} \dots,$$

<92>

$$[EGTA]_{free} = [EGTA]_{total} - [Zn^{2+}]_{total}$$

및 이다.

따라서,

$$K_{Zn-EGTA}^{app} = \frac{K_{Zn-EGTA} (1 + 10^{(pK_{Zn-EGTA} - pH)})}{(1 + 10^{(pH - pK_{Zn})}) (1 + 10^{(pK_1 - pH)} + 10^{(pK_1 + pK_2 - 2pH)})}$$

이 된다.

이후 EGTA($K_{Zn-EGTA}$)의 Zn^{2+} 착물의 안정성 상수를 공지된 방법에 따라 얻었으며, 따라서 EGTA(pH 7.2, 0.1M KCl, 25℃)에 대하여, $pK_1=9.40$, $pK_2=8.79$, $pK_3=2.70$, $\log K_{Zn-EGTA}=12.6$ 이 얻어진다.

0.1M 이온 강도에서 워크 아웃될 때, 모든 양성자화 상수는 0.11만큼 위쪽으로 보정되며, $[EGTA]_{total}$ 은 10mM에서 고정되고, $[Zn^{2+}]_{total}$ 은 0 내지 9.5mM의 범위이다.

각 용액에 대한 계산된 $[Zn^{2+}]_{free}$ 농도는 하기 표 5와 같다.

표 5

$[Zn^{2+}]_{total}$ (mM)	0.50	1.00	1.50	2.00	2.50	3.00	3.50	4.00	4.99	5.99	6.98	7.98	8.97	9.47
$[Zn^{2+}]_{free}$ (nM)	0.14	0.29	0.46	0.66	0.87	1.1	1.4	1.8	2.6	3.9	6.1	10	22	47

이광자 염료에 대한 명확한 해리 상수를 결정하기 위하여, 상기 도 3b 및 3e로부터 하기 수학식 2을 이용하여 형광 적정 곡선을 구하였다.

수학식 2

$$F = F_0 + (F_{max} - F_0) \frac{[Zn^{2+}]_{free}}{K_d + [Zn^{2+}]_{free}}$$

여기에서, F는 형광 강도, F_{max} 는 최고 형광 강도이며, F_0 는 Zn^{2+} 가 없는 조건에서의 형광 강도, $[Zn^{2+}]_{free}$ 는 자유 Zn^{2+} 농도를 나타낸다.

도 6a 및 6b는 각각 실시예 2의 이광자 염료(AZn1) 및 실시예 1의 이광자 염료(AZn2)의 형광 적정 곡선을 나타낸다.

수학식 2에 따른 적정 곡선 (도 2c)에 가장 잘 부합되는 K_d 수치를 상용 엑셀 프로그램을 사용하여 계산하였다. 또한, 이광자 과정에서의 K_d 수치를 결정하기 위해서, 780 nm의 파장 및 1180 mW의 출력에 세팅되고 (초점 평면에서 대략 10 mW에 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 곡선 (도 3a 및 3d)을 얻었으며, 이를 상기 수학식 2에 피팅시켰다(도 6a 및 6b).

도 6a 및 6d를 참조하면, 일광자 형광 적정 곡선 및 이광자 형광 적정 곡선으로부터 계산된 AZn1 및 AZn2의 해

리 상수 K_d^{OP} 및 K_d^{TP} 는 각각 1.1 ± 0.1 및 $0.50 \pm 0.04 nM$ 이다(상기 표 2 참조). 이때 이들 이광자 염료의 검출 한계는 nM 범위 이하이다. 특히 여기서 주목하여야 할 점은 AZn2의 K_d^{TP} 값이 더 작다는 것인데, 이는 상술한 바와 같이 AZn2 및 Zn^{2+} 간의 보다 강한 결합(상기 표 3 및 도 5 참조)을 의미한다.

<106> 실시예 7

<107> 금속 양이온들에 대한 선택성 측정

<108> 도 7a 및 7b는 각각 30mM의 MOPS 완충용액(100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH 7.2)과 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 10 μM 의 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 및 1 μM 의 Zn^{2+} 를 첨가한 경우 1 μM 의 AZn1 및 AZn2의 상대적 형광강도를 나타내는 그래프이다. 그래프 중 내부가 채워진 막대는 Zn^{2+} 가 첨가된 경우이며, 내부가 채워지지 않은 막대는 Zn^{2+} 가 첨가되지 않은 경우이다.

<109> 도 7a 및 7b를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 10 μM 의 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 과 비교하여 Zn^{2+} 에 대한 높은 선택도를 보여준다.

<110> 도 8a 및 8b는 30mM의 MOPS 및 100mM의 KCl 혼합용액에서 자유 Zn^{2+} 가 0.0(○) 및 1 μM (■)일 때 1 μM 의 AZn1 및 AZn2의 pH변화에 따른 일광자 형광 강도를 나타낸다.

<111> 도 8a 및 8b를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 생물학적으로 연관된 pH 조건에서 높은 형광강도를 나타내며, pH 조건에 따라 영향을 받지 않음을 알 수 있다.

<112> 이상의 결과로부터 본 발명에 따른 이광자 염료는 Zn^{2+} 에서 매우 높은 선택성을 가지고, 더 나아가 생체 내의 pH 조건에 민감하지 않으며, 생체 내 아연 이온에 대한 이광자 염료로서 매우 유용하다는 것을 알 수 있다.

<113> 실시예 8

<114> 이광자 단면적 및 동작 스펙트럼의 측정

<115> 이광자 단면적(δ)을 펨토초(fs) 형광 측정 기술을 사용하여 측정하였다.

<116> AZn1, AZn2, FluZin 및 TSQ를 30mM MOPS 완충용액(100mM KCl, 10mM EGTA, pH7.2)에서 $5.0 \times 10^{-6} M$ 의 농도에서 용해시킨 후, 이광자 염료의 특성이 문헌상에 잘 알려진 플루오레세인(fluorescein)을 대조물질로 하여 740-940nm에서 이광자 유도 형광 강도를 측정하였다. 대조물질 및 샘플의 이광자 유도 형광 스펙트럼의 강도를 측정하였고, TPA 단면적은 하기 수식 3에 의하여 계산하였다.

수식 3

$$\delta = \frac{S_s \Phi_r \phi_r c_r}{S_r \Phi_s \phi_s c_s} \delta_r$$

<117>

<118> 도 9는 1.8 μM 자유 Zn^{2+} 의 조건에서 AZn1(□), AZn2(●), FluZin(▲) 및 TSQ(▽)에 대한 이광자 동작 스펙트럼을 나타낸다.

<119> 도 9를 참조하면, 완충용액에서 AZn1 및 AZn2와 Zn^{2+} 의 착화합물에 대한 TP 동작 스펙트럼은 780nm에서 ~90GM의 $\Phi \delta$ 값을 나타내었으며, 이는 TSQ 및 FluZin-3 보다 4 내지 24배 이상 큰 수치이다. 따라서 이상의 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료에 의하여 염색된 샘플은 종래의 이광자 염료(TSQ 및 FluZin-3)에 비하여 현저하게 밝은 영상을 나타내는 것을 의미한다. 이러한 결과는 상기 표 2의 결과치에서도 명확하게 알 수 있다.

<120> 실시예 9

- <121> 본 발명에 따른 이광자 염료를 이용한 세포 관찰
- <122> 10% FBS(WelGene), 페니실린(100 유닛/ml) 및 스트렙토마이신($100\mu\text{g}/\text{ml}$)을 첨가한 DMEM(WelGene)에서 293 세포를 배양하였다.
- <123> 영상화하기 이틀 전 세포를 유리-바닥 접시(Glass-bottomed dish, MatTek)상으로 옮긴 후 플레이팅하였다. 표지화를 위하여 성장 배지를 제거하고, 무 FBS DMEM으로 교체하였다. 세포를 처리한 후, 5% 이산화탄소 하에서 30분간 37°C 에서 $2\mu\text{M}$ 센서를 이용하여 인큐베이션하였고, 세포를 포스페이트-완충 살린(PBS; Gibco로 3회 세척한 후, 무색의 무혈청 배지에서 15분간 추가 인큐베이션하였다. 생후 1일된 쥐의 대뇌 피질(Sparague-Dawley; SD)로부터 주요 피질(primary cortical) 세포 배양물을 취하였다. $1\text{ U}/\text{ml}$ 의 파파인(papain, Worthington Biochemical Corporation, NJ, 미국)을 함유하는 Hank's balanced solution(HBSS; Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)에 대뇌피질을 해리시킨 후, 폴리-D-리신 및 라미닌-코팅 유리 커버슬립 상에 $100\text{ 내지 }200\text{ cells}/\text{mm}^2$ 의 조건으로 플레이팅한 후, CO_2 인큐베이터에서 2% B-27(Gibco) 및 페니실린/스트렙토마이신을 첨가한 뉴로베이살 배지(Neurobasal Medium, Gibco)의 조건에서 37°C 로 유지하였다. 시험관 안에서 7 내지 15일 경과 후, 피질 세포 배양물을 PBS로 3회 세척한 후, 37°C 의 온도 하에서 30분간 PBS에서 $2\mu\text{M}$ AZn2로 인큐베이션하였다.
- <124> $\times 100$ 오일 물체, 천공수 (NA) = 1.30의 스펙트럼 공초점 및 다광자 현미경 (spectral confocal and multiphoton microscopes) (Leica TCS SP2)을 사용하여 AZn2로 표지된 세포 및 조직의 이광자 형광 현미경 영상들을 얻었다. 상기 이광자 형광 현미경 영상들은 모드-락된 티타늄-사파이어 레이저 광원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)으로 파장 780 nm, 출력 전력 1230mW(이것은 초점면에서 대략 10mW의 평균 전력에 대응된다)에서 탐침(이광자 염료)들을 여기킴으로써 얻었다. 영상들을 각각 360-460nm 및 500-620nm 영역의 파장에서 얻기 위하여, 신호들을 400 Hz 스캔 속도에서 8 비트 미표지된 512×512 픽셀들로 수집하기 위해서 내부 PMT들이 사용되었다.
- <125> 도 10a 내지 10e는 $2\mu\text{M}$ AZn2-표지화 293 세포의 TPM영상으로서, 각각 밝은 영역의 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가하기 전에 360 내지 460nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가하기 전에 500 내지 620nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가한 후에 360 내지 460nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가한 후에 500 내지 620nm에서 수집된 영상이다.
- <126> 또한 도 11a 내지 11e는 $2\mu\text{M}$ AZn1-표지화 293 세포의 TPM영상으로서, 각각 밝은 영역의 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가하기 전에 360 내지 460nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가하기 전에 500 내지 620nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10mM SNOC를 첨가한 후에 360 내지 460nm에서 수집된 영상, 영상화 용액에 10 mM SNOC를 첨가한 후에 500 내지 620nm에서 수집된 영상이다.
- <127> 도 10b 및 11b를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료(AZn1, AZn2)로 표지화된 293 세포는 360 내지 460nm에서 TPEF(이광자 방출 형광)을 방출하지 않는다는 것을 알 수 있다. 하지만, 도 10c 및 11c를 참조하면 500 내지 620nm에서는 상당한 TPEF가 방출되는 것을 알 수 있다.
- <128> 비교예로서, Mg^{2+} 및 Ca^{2+} 용의 아세단(acedane)-유도 TP 이광자 염료로 표지화된 세포의 TPM 영상은 각각 360 내지 460nm 및 500 내지 620nm에서 모두 TPEF를 방출하였으며, 이것은 각각 시토졸 및 멤브레인과 결합한 이광자 염료에 기인한다. (H. M. Kim, B. R. Kim, J. H. Hong, J.-S. Park, K. J. Lee, B. R. Cho, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 7589-7592; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 7445-7448 참조)
- <129> 따라서 본 발명에 따른 AZn2는 주로 시토졸 분획구조에 위치하는 것으로 판단되며, 이것은 아마도 낮은 분자량에 기인하는 것으로 추정된다. 따라서 멤브레인 부착 탐침으로부터의 어떠한 간섭없이 생체 내 세포의 $[\text{Zn}^{2+}]_i$ 을 검출할 수 있다. 하지만 더 나아가 본 발명에 따른 이광자 염료는 pH<4의 조건에서 형광 강도가 조금씩 증가하기 때문에(도 8a 및 8b 참조), 산성 소포체 내의 이광자 염료가 TPM 영상화에 기여하는 것으로 판단할 수 있는 여지가 있다. 따라서, 이러한 여지 또는 가능성을 배제하기 위하여, 293 세포 및 주요 피질 배양물을 동시에 AZn2 및 산성 소포체용의 잘 알려진 일광자 염료 LysoTracker Red(LTR)로 염색하고, 이에 따라 얻어진 영상을 동일하게 위치시킨 후 도 12 및 13에 나타내었다.
- <130> 도 12는 AZn2 및 LTR-표지화된 ($2\mu\text{M}$) 293 세포에 대한 영상으로서, (a-e)는 영상화 용액에 $100\mu\text{M}$ TPEN(N,N,N',N'-테라키스(2-피리딜)에틸렌디아민)을 첨가하기 전, (f-j)는 첨가한 후의 영상이다. 보다 구체적으로 설명하면, (a, f)는 밝은 영역의 영상이고, (b, g) 및 (c, h)는 각각 360-460nm 및 500-580nm에서 수집된

AZn2로 표지화된 239 세포의 가짜(pseudo) 색채화된 영상이다. 또한 (d, i)는 600-650nm에서 수집된 LTR로 표지화된 293 세포의 OPM 영상이며, (e, j)는 얻어진 영상을 동일하게 위치시킨(co-localize) 영상이다. 여기에서 일광자 및 이광자 여기는 각각 543nm 및 780nm이고, 스케일 막대는 30 μm 이며, 또한 나타난 세포는 중복된 실험 (n=5)로부터의 대표 영상이다.

<131> 또한 도 13은 AZn1 및 LTR-표지화 (2 μM) 293 세포의 영상로서, (a-e)는 영상화 용액에 100 μM TPEN(N,N,N',N'-테라키스(2-피리딜)에틸렌디아민)을 첨가하기 전, (f-j)는 첨가한 후의 영상이다. 보다 구체적으로 설명하면, (a, f)는 밝은 영역의 영상이고, (b, g) 및 (c, h)는 각각 360-460nm 및 500-580nm에서 수집된 AZn1로 표지화된 239 세포의 가짜(pseudo) 색채화된 영상이다. 또한 (d, i)는 LTR로 표지화된 293 세포의 600-650nm에서 수집된 OPM 영상이며, (e, j)는 얻어진 영상을 동일하게 위치시킨(co-localized) 영상이다. 여기에서 일광자 및 이광자 여기는 각각 543nm 및 780nm이고, 스케일 막대는 30 μm 이며, 또한 나타난 세포는 중복된 실험 (n=5)로부터의 대표 영상이다.

<132> 도 12 및 13을 참조하면, 동일하게 위치시킨 두 영상은 병합되지 않으며, 더 나아가 100 μM 의 TPEN(이것은 멤브레인 투과성의 Zn^{2+} 킬레이트화제로서 Zn^{2+} 를 효과적으로 제거할 수 있다)으로 처리한 후의 TPM 영상은 TPEF를 거의 방출하지 않으며, TPEN으로 처리되기 전, 후의 OPM 영상이 거의 동일하다는 것을 알 수 있다(도 12, 13의 (d), (i) 참조). 따라서 이러한 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료가 산성 소포체와 결합한 탐침(이광자 염료)으로부터의 어떠한 간섭이나 방해 없이 TPM에 의하여 뉴론 내의 $[\text{Zn}^{2+}]_i$ 만을 선택적으로 검출할 수 있다는 것을 나타낸다.

<133> 실험예 10

<134> 이광자 여기 형광(TPEF) 분석

<135> 본 발명의 이광자 염료가 갖는 유용성을 나타내기 위하여, Zn^{2+} 의 방출을 유도할 수 있도록 내분비성 NO 공여체인 10mM의 S-니트로소시스테인(SNOC)를 첨가한 AZn2-표지화 293 세포의 TPEF를 모니터링한 후, 이를 도 14에 나타내었다.

<136> 도 14를 참조하면, SNOC 첨가 후 Zn^{2+} 의 방출에 따라 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지화된 세포의 TPEF 강도는 서서히 증가하는 것을 알 수 있다. 또한 반대로 멤브레인 투과성의 Zn^{2+} 킬레이트화제로서 Zn^{2+} 를 매우 효과적으로 제거할 수 있는 TPEN(N,N,N',N'-테라키스(2-피리딜)에틸렌디아민) 0.1mM을 첨가함에 따라 형광 강도가 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다. 본 발명에 따른 또 다른 이광자 염료인 AZn1의 보다 큰 K_d 때문에 반응 정도가 상대적으로 작은 것을 제외하고는, 도 13과 유사한 패턴을 나타낸다.

<137> 이상의 실험 결과는 또한 본 발명에 따른 이광자 염료가 1000초 이상의 시간동안 생체 세포에서 $[\text{Zn}^{2+}]_i$ 를 명확하게 검출할 수 있음을 나타낸다.

<138> 실험예 12

<139> 마우스 해마상 돌기의 미세박편의 모니터링

<140> 조직 내 세포의 영상화에 있어서 본 발명의 이광자 염료가 갖는 유용성을 증명하기 위하여, 마우스 해마상 돌기의 미세박편을 모니터링하였는데, 본 실험예에서는 10 μM 의 AZn2로 30분간 37°C에서 임큐베이션된 마우스 해마상 돌기의 미세박편에 대한 이광자 현미경 영상을 얻었다. 생후 14일의 쥐의 박편은 너무 커서 하나의 영상만을 나타내기 어려우므로, ~120 μm 의 두께로 동일 평면에서 얻어진 복수의 TPM 영상을 얻고, 이를 결합하였다.

<141> 도 15는 본 실험예에 따른 TPM 영상이며, 이를 보다 상세히 설명하면, (a)는 10x 배율로 ~120 μm 의 깊이에서 얻어진 TPM 영상, (b, c)는 각각 200 μM 의 TPEN을 첨가하지 전, 후의 CA3 영역의 투명층(stratum lucidum)에서 100x 배율 영상, (d-f)는 ~100 μm 두께의 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문(hilus)에서의 TPM 영상으로, (d, e)는 각각 영상화 용액에 50mM의 KCl을 첨가하지 전, 후의 영상이고, (f)는 (e)에 200 μM 의 TPEN을 첨가한 후의 영상이다.

<142> 도 15를 참조하면, CA3의 투명층(stratum lucidum) 및 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문(hilus)에서 강한 형광 강도를 나타내었다((a)의 노란 박스 참조). 보다 높은 배율에서 얻어진 영상은 명확하게 $[\text{Zn}^{2+}]_i$ 가 CA3 영역의

피라미드 신경의 말단부의 이끼섬유 축색(mossy fiber axon)에 농축된 것을 명확하게 보여준다((b) 참조). 또한 $[Zn^{2+}]_i$ 를 효과적으로 제거하는 TPEN 첨가 후 사실상 영상에서 TPEF가 사라지는 것은 상기 관찰 결과를 명확하게 증명한다((c) 참조).

- <143> 도 16은 10 μM 의 AZn2로 염색된 마우스 해마상 돌기의 미세박편의 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문(hilus)을 나타내는 x20 배율의 이광자 현미경 영상로서, 두께 깊이의 변화에 따른 이광자 현미경 영상을 나타낸다.
- <144> 도 16을 참조하면, 80-150 μm 의 깊이에서 얻어진 TPM(이광자 현미경) 영상은 z축 깊이(즉, 두께)에 따라 폐문 근처에 위치하는 치아 이랑 신경의 이끼섬유에 존재하는 $[Zn^{2+}]_i$ 분포를 명확하게 보여준다. 또한 멤브레인의 극성을 없애줌으로써 Zn^{2+} 의 방출을 유도하는 KCl을 50 mM 첨가하였을 때, TPEF의 강도는 증가하고, TPEN으로 처리하였을 때는 감소한다. 이는 도 15의 (d) 내지 (f)의 결과로부터도 알 수 있으며, 또한 마우스 해마상 돌기의 미세박편의 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문에 대한 상대적 이광자 형광 강도를 나타내는 도 17을 통해서도 TPEF 첨가에 따른 TPEF 감소 효과를 명확히 알 수 있다.
- <145> 이상의 실험 결과들은 본 발명에 따른 이광자 염료가 생체 조직의 세포 내에 존재하는 자유 Zn^{2+} 를 80 내지 150 μm 의 두께까지 매우 효과적으로 검출할 수 있다는 것을 나타낸다.
- <146> 결론적으로, 본 발명에 따른 두 이광자 염료는 Zn^{2+} 에 대하여 24 내지 52배의 TPEF 증가 효과를 가지며, 각각 1.1 ± 0.1 및 0.50 ± 0.04 nM의 해리 상수(K_d^{app})를 갖는다. 또한 생물학적으로 연관된 pH 조건에서 pH에 영향을 받지 않으며, 종래의 Zn^{2+} 를 검출하기 위한 이광자 염료인 TSQ 및 FluZin-3에 비하여 4 내지 24배 이상의 강한 TPEF를 발생시킨다. 또한 본 발명에 따른 이광자 염료는 1000초 이상의 시간범위에서 세포 내의 자유 Zn^{2+} 를 선택적인 검출할 수 있는데, 이는 종래의 어떠한 이광자 염료보다 우수한 특성이다. 더 나아가, 본 발명에 따른 이광자 염료는 멤브레인-결합 이광자 염료 또는 다른 금속 이온에 의한 간섭이나 방해받지 않고, 매우 효과적으로 세포 내의 자유 아연 이온만을 영상화하여, 모니터링할 수 있게 한다.

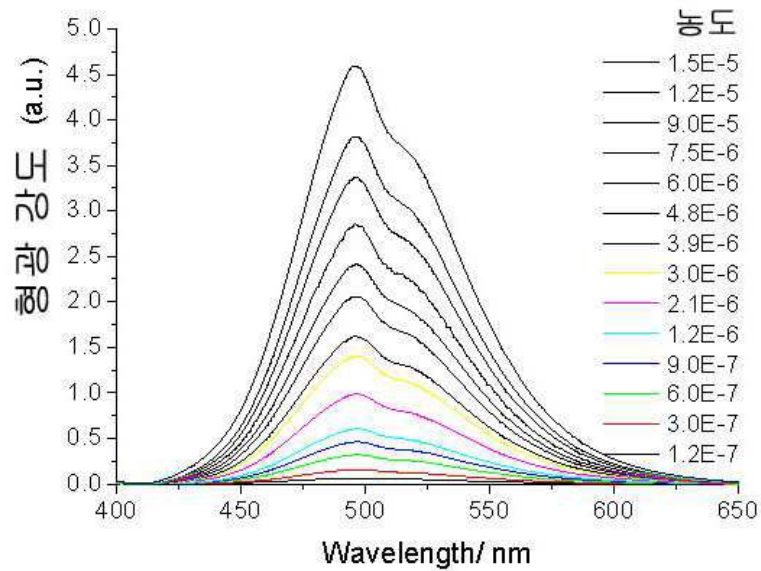
도면의 간단한 설명

- <147> 도 1a 내지 1d는 상이한 농도의 이광자 염료에 대한 형광강도를 나타내는 그래프이다.
- <148> 도 2a 및 2b는 본 발명의 실시예 2의 이광자 염료에 대한 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼이다.
- <149> 도 2c 및 2d는 실시예 1의 이광자 염료에 대한 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼이다.
- <150> 도 3a 내지 도 3f는 발명에 따른 Mg^{2+} 농도 변화에 따른 이광자 염료의 일광자 또는 이광자 흡광 또는 발광 스펙트럼이다.
- <151> 도 4a 및 4b는 각각 AZn1 및 AZn2와 자유 Zn^{2+} 의 착화에 대한 힐 그래프(Hill plot)이다
- <152> 도 5는 B3LYP/6-31G* 수준에서 AZn1- Zn^{2+} 및 AZn2- Zn^{2+} 의 착화합물의 최적화된 기하학적 구조를 나타내는 입체도이다.
- <153> 도 6a 및 6b는 각각 실시예 2의 이광자 염료(AZn1) 및 실시예 1의 이광자 염료(AZn2)의 형광 적정 곡선을 나타낸다.
- <154> 도 7a 및 7b는 각각 30mM의 MOPS 완충용액(100 mM KCl, 10 mM EGTA, pH7.2)과 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} ; 10 μM 의 Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} 및 1 μM 의 Zn^{2+} 를 첨가한 경우 1 μM 의 AZn1 및 AZn2의 상대적 형광강도를 나타내는 그래프이다.
- <155> 도 8a 및 8b는 30mM의 MOPS 및 100mM의 KCl 혼합용액에서 자유 Zn^{2+} 가 0.0(○) 및 1 μM (■)일 때 1 μM 의 AZn1 및 AZn2의 pH변화에 따른 일광자 형광 강도를 나타낸다.
- <156> 도 9는 1.8 μM 자유 Zn^{2+} 의 조건에서 AZn1(□), AZn2(●), FluZin(▲) 및 TSQ(▽)에 대한 이광자 동작 스펙트럼을 나타낸다.

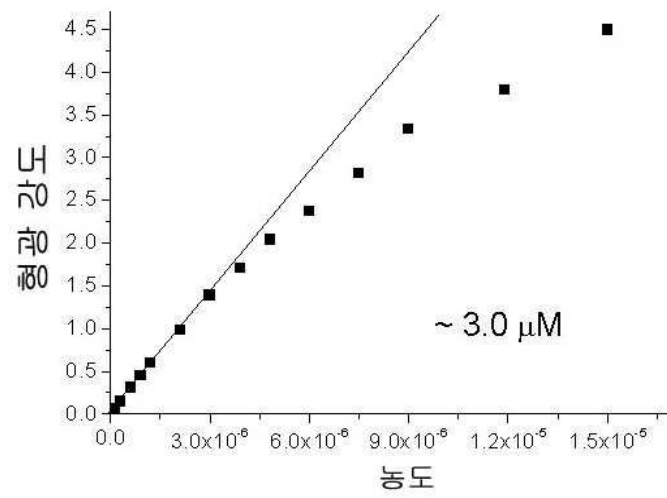
- <157> 도 10은 2 μ M AZn2-표지화 293 세포의 이광자 현미경(TPM) 영상이다.
- <158> 도 11은 2 μ M AZn1-표지화 293 세포의 TPM 영상이다.
- <159> 도 12는 AZn2 및 LTR-표지화된 (2 μ M) 293 세포에 대한 TPM 영상이다.
- <160> 도 13은 AZn1 및 LTR-표지화 (2 μ M) 293 세포의 TPM 영상이다.
- <161> 도 14는 10mM의 S-니트로소시스테인(SNOC)를 첨가한 AZn2-표지화 293 세포의 TPEF의 스펙트럼이다.
- <162> 도 15는 마우스 해마상 돌기의 미세박편에 대한 TPM 영상이다.
- <163> 도 16은 10 μ M의 AZn2로 염색된 마우스 해마상 돌기의 미세박편의 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문(hilus)에 대한 TPM 영상이다.
- <164> 도 17은 마우스 해마상 돌기의 미세박편의 치아 이랑(dentate gyrus)의 폐문에 대한 상대적 이광자 형광 강도를 나타내는 그래프이다.

도면

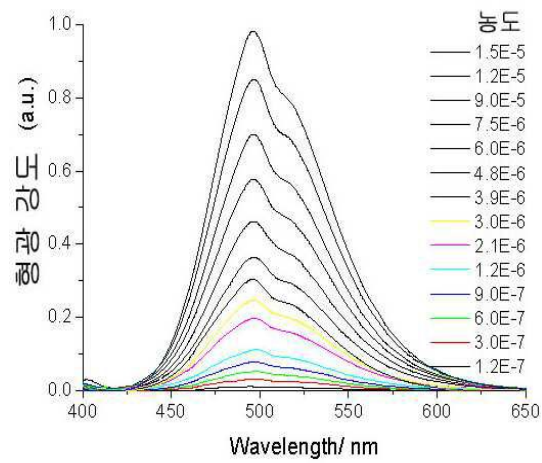
도면1a



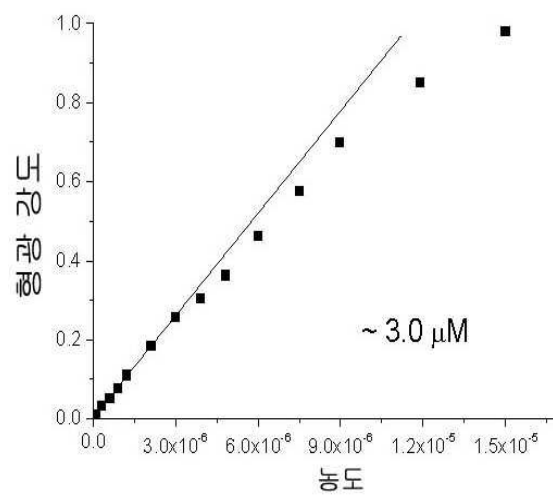
도면1b



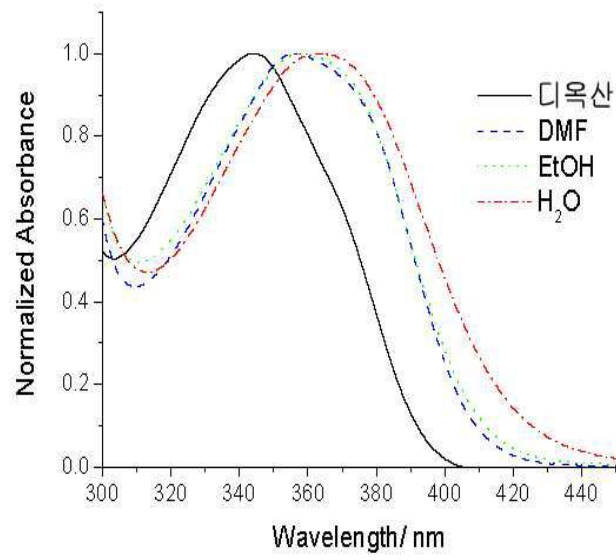
도면1c



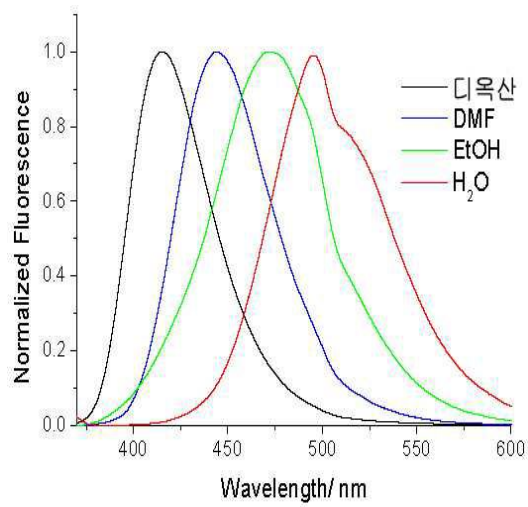
도면1d



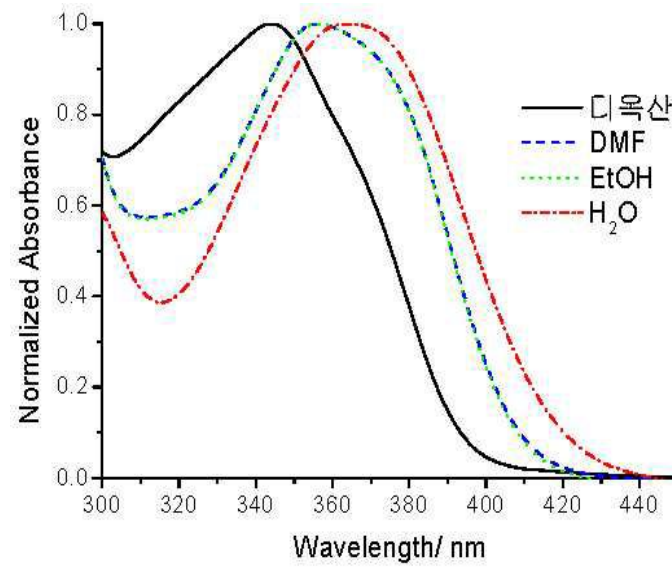
도면2a



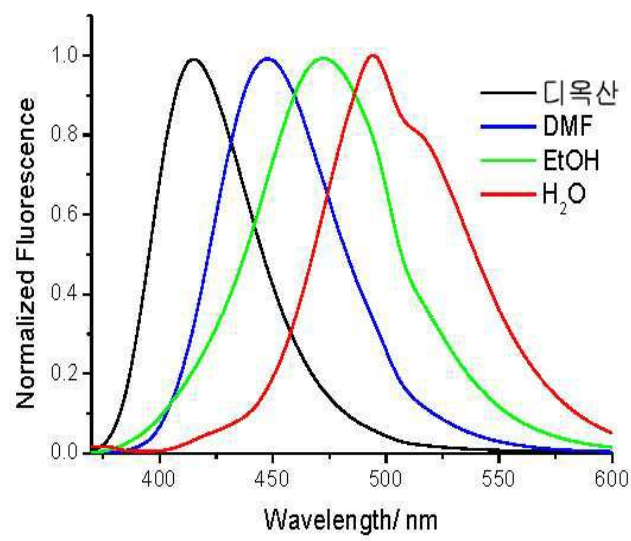
도면2b



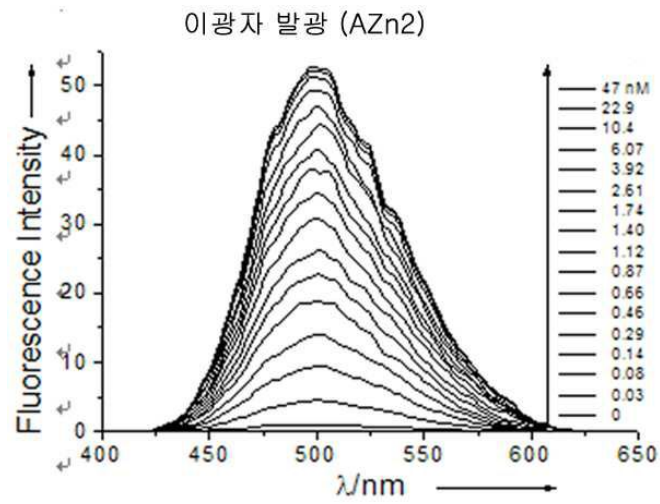
도면2c



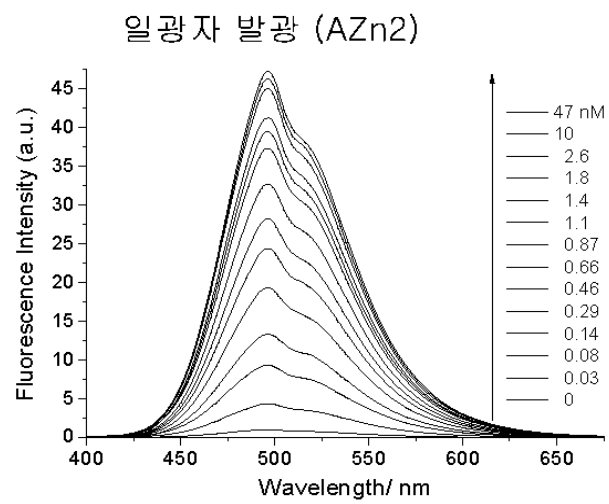
도면2d



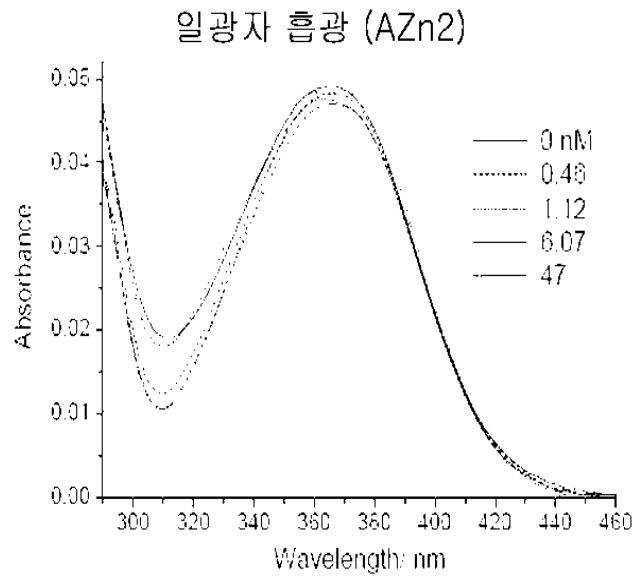
도면3a



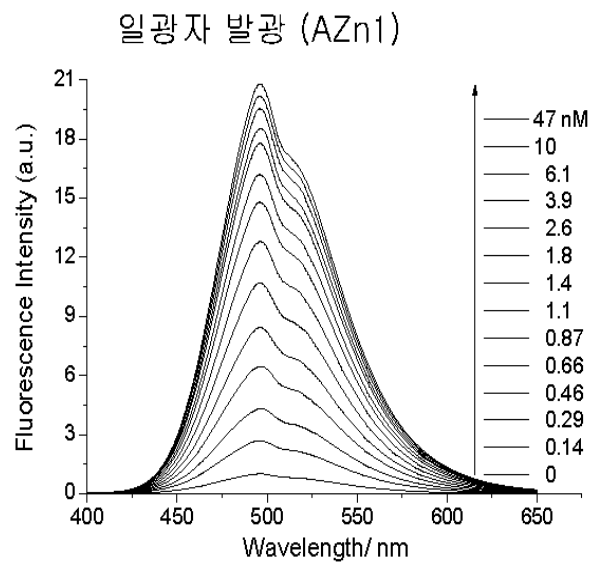
도면3b



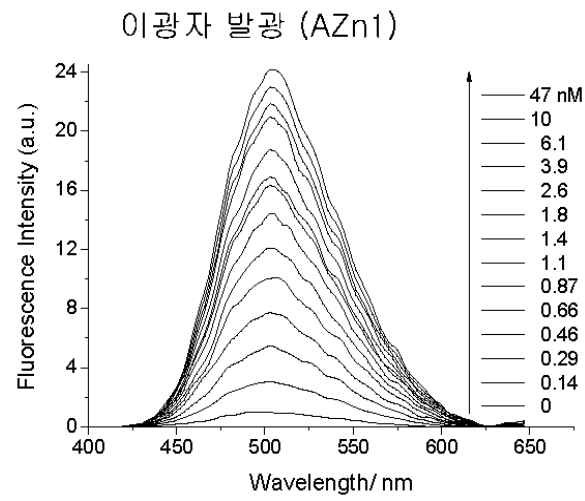
도면3c



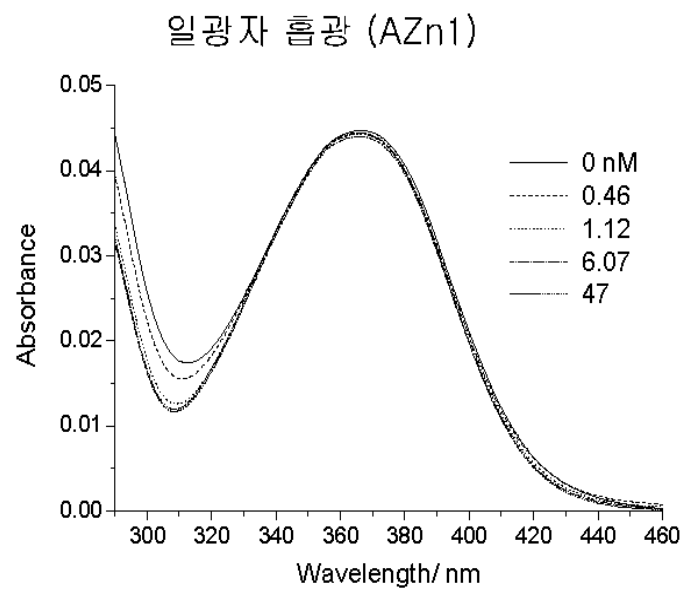
도면3d



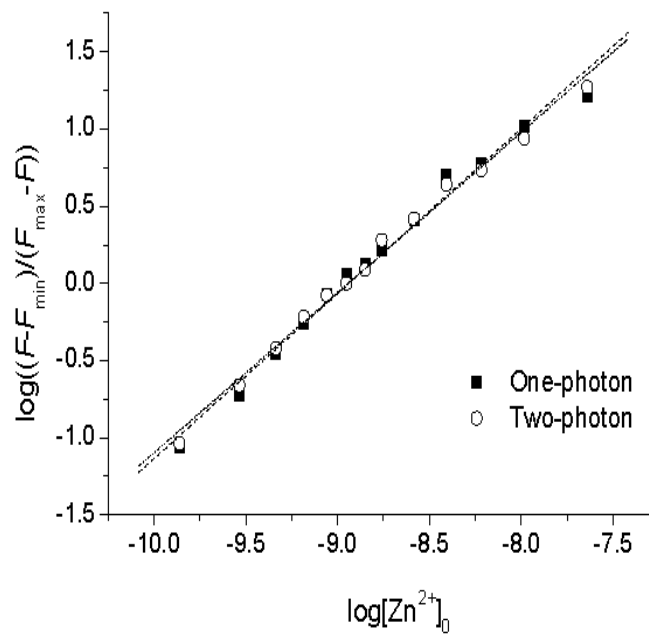
도면3e



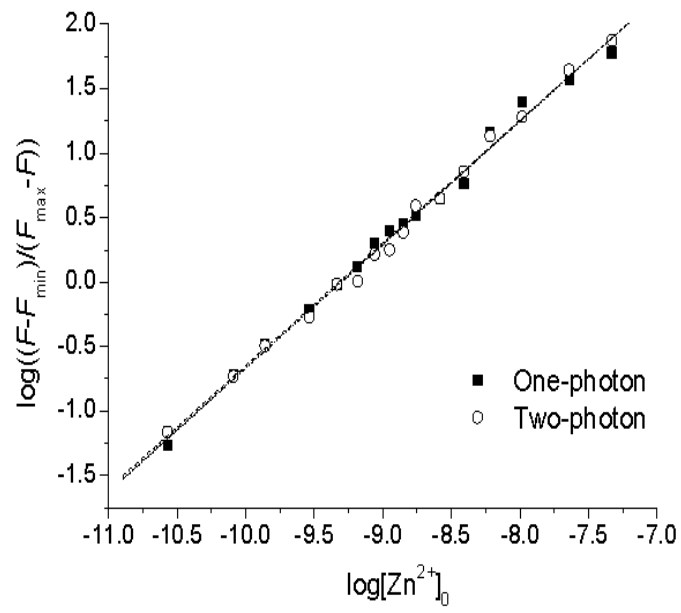
도면3f



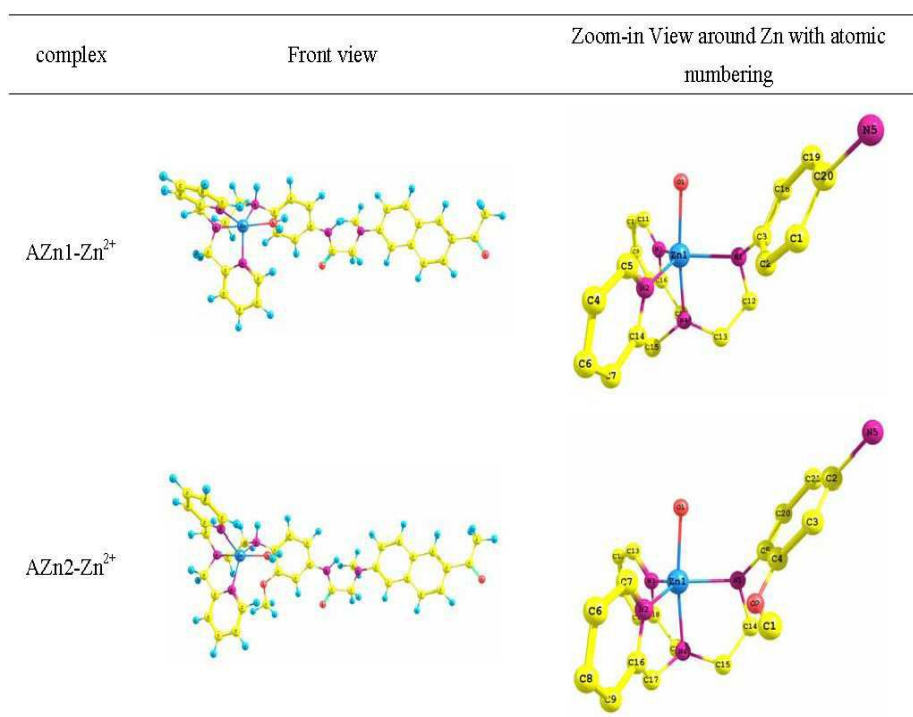
도면4a



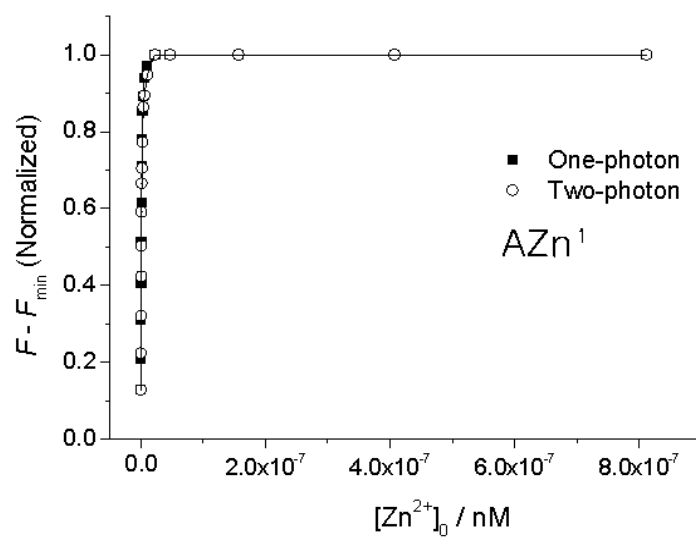
도면4b



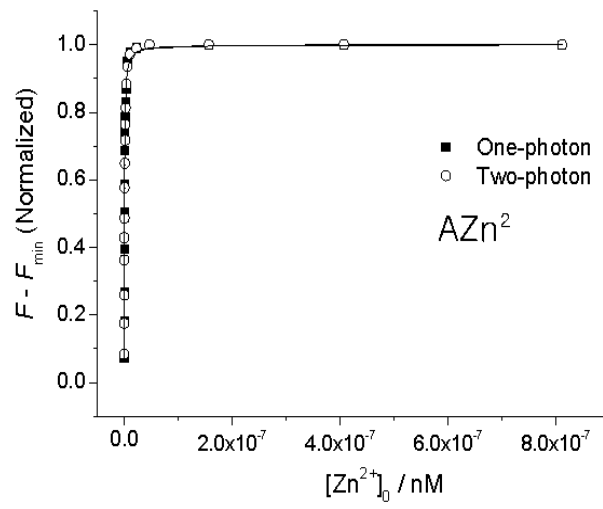
도면5



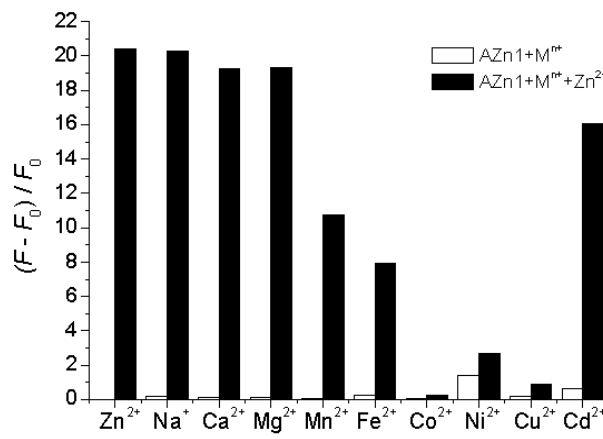
도면6a



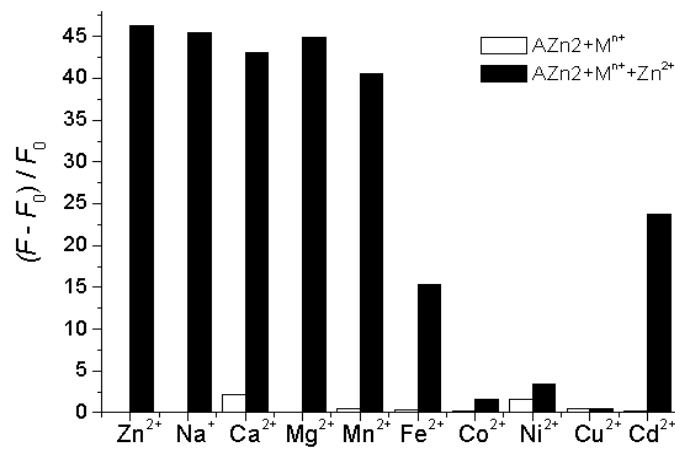
도면6b



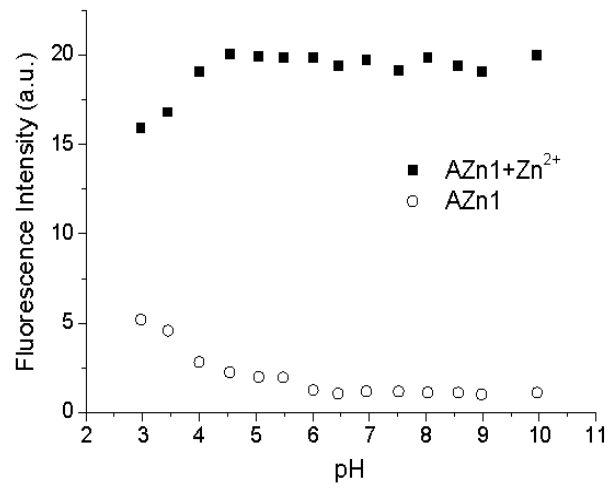
도면7a



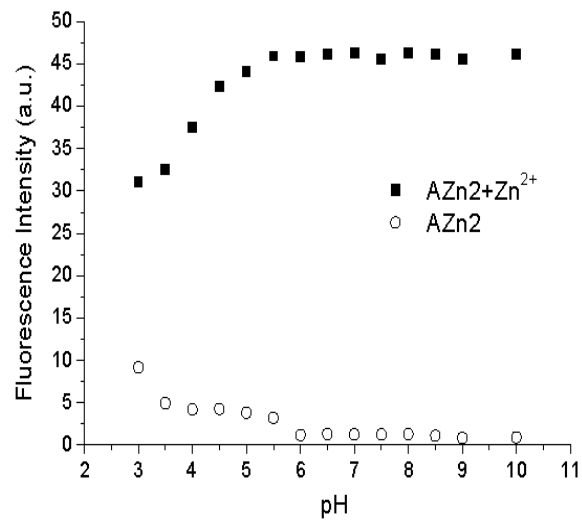
도면7b



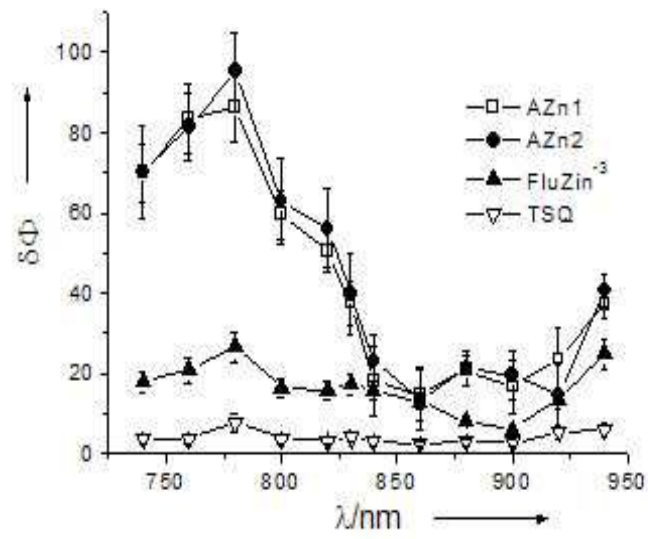
도면8a



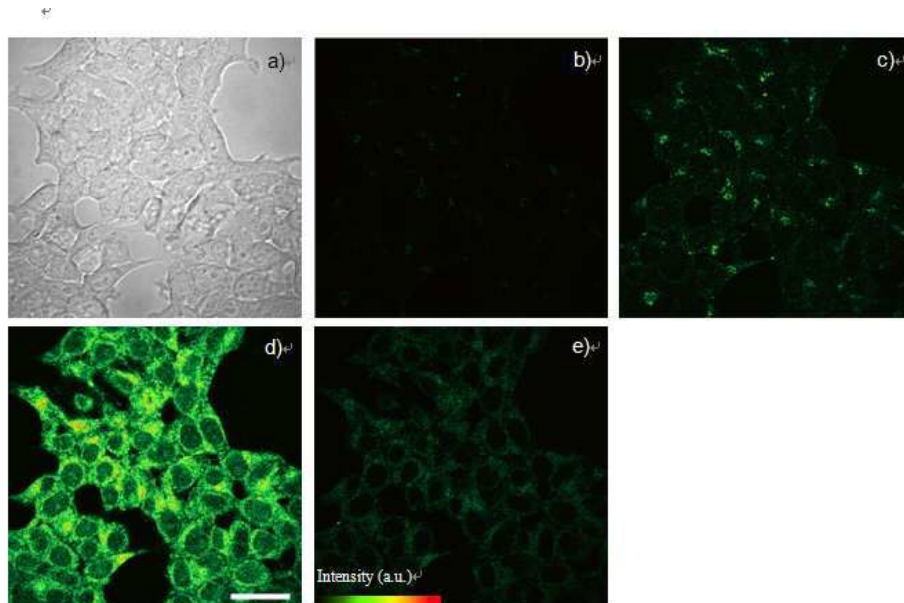
도면8b



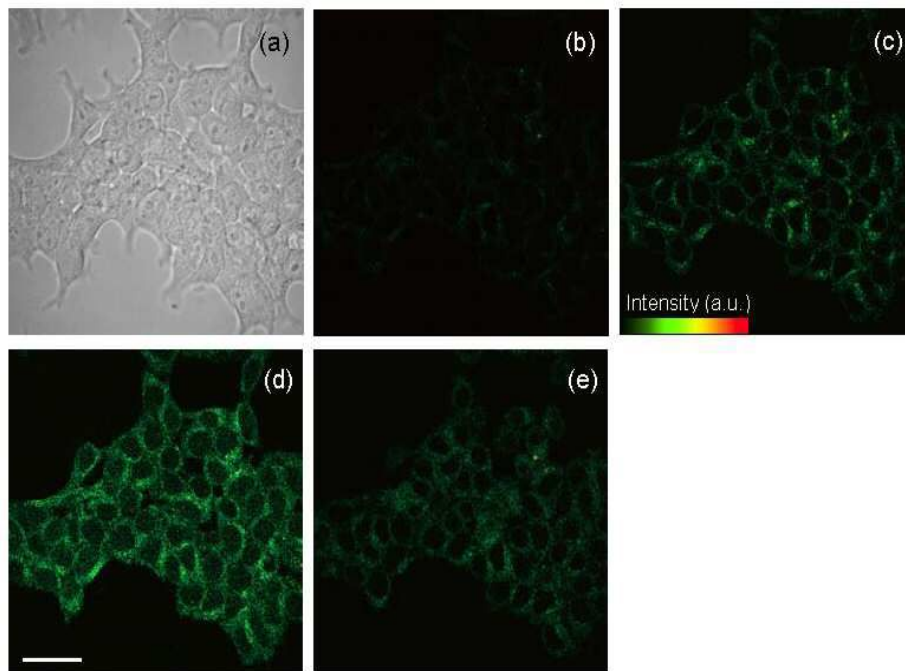
도면9



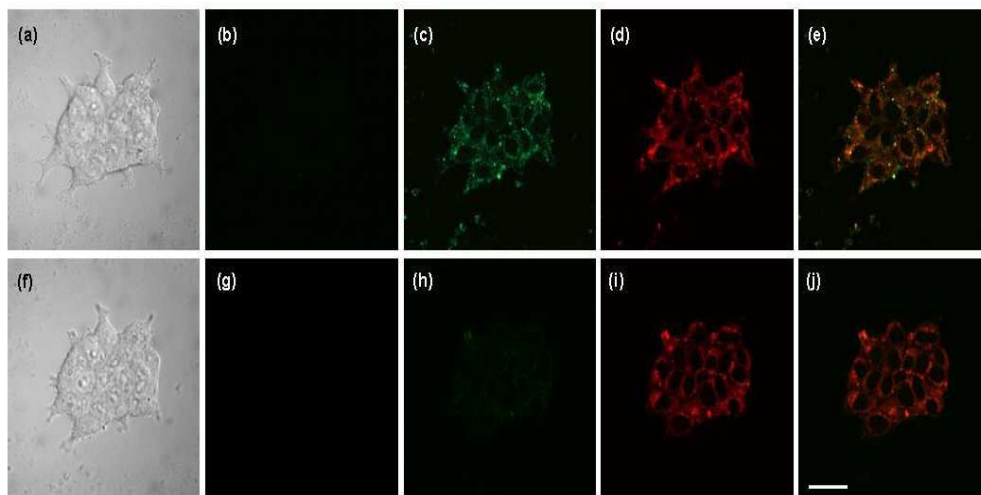
도면10



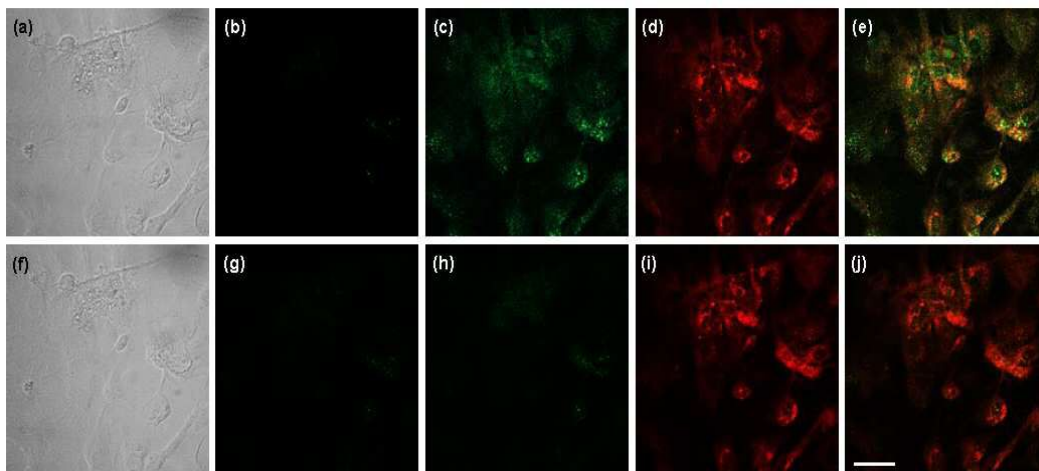
도면11



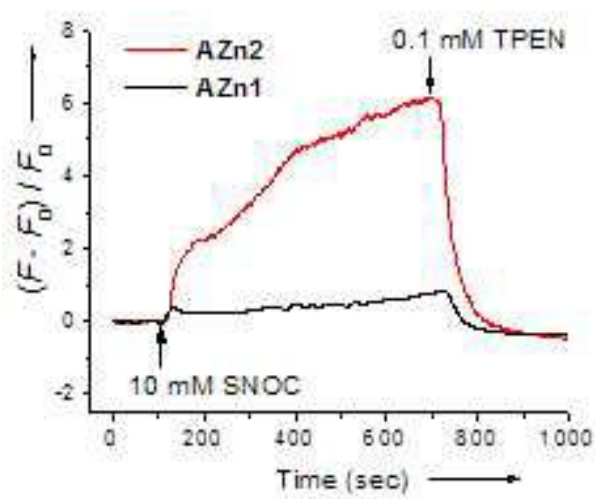
도면12



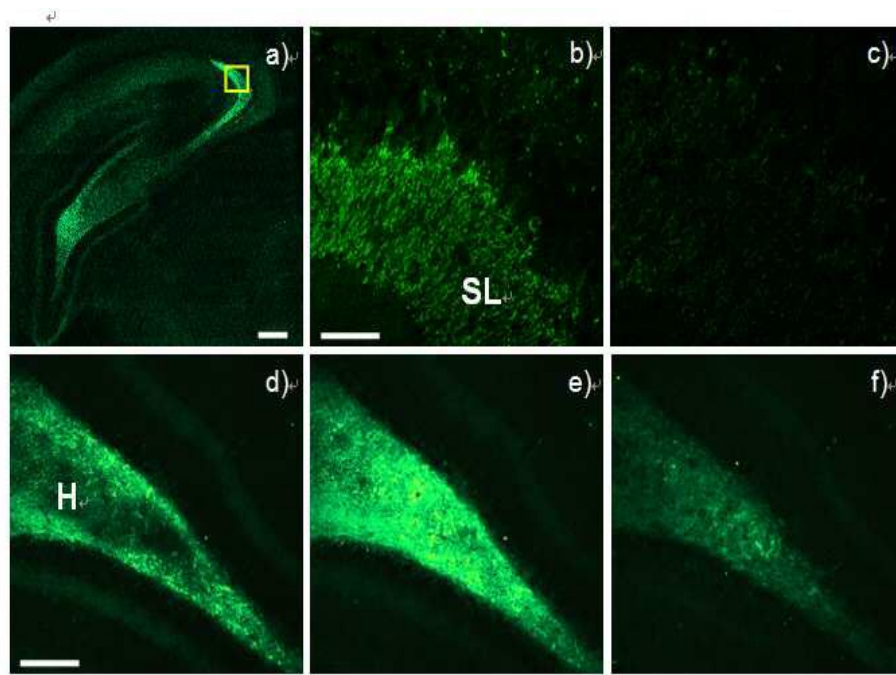
도면13



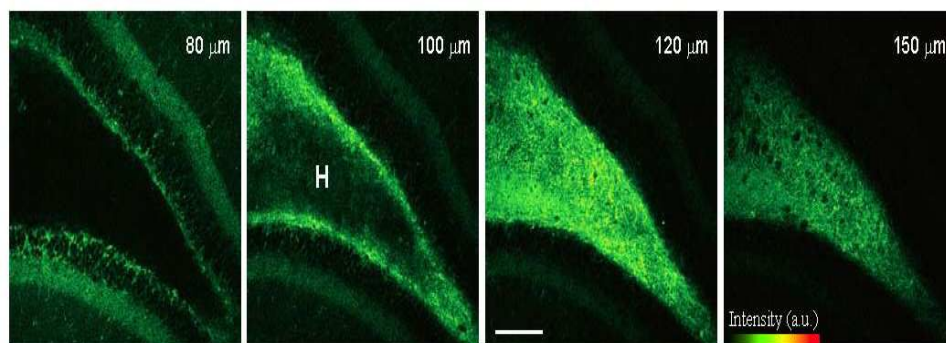
도면14



도면15



도면16



도면17

