(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0122238
(43) 공개일자 2024년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/65 (2006.01) *C08K 5/00* (2006.01)
C08K 5/45 (2006.01) *C08K 5/47* (2006.01)
C08L 101/00 (2006.01) *G01N 21/31* (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 21/65 (2013.01)
C08K 5/0041 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0015157
(22) 출원일자 2023년02월03일
심사청구일자 2023년02월03일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
우한영
서울특별시 강남구 광평로10길 15(일원동, 상록수아파트) 110-306
심상희
서울특별시 성동구 마장로 137(상왕십리동, 텐즈힐) 텐즈힐2 208-1704
정지은
대전광역시 유성구 가정로 141(장동)
(74) 대리인
특허법인 플러스

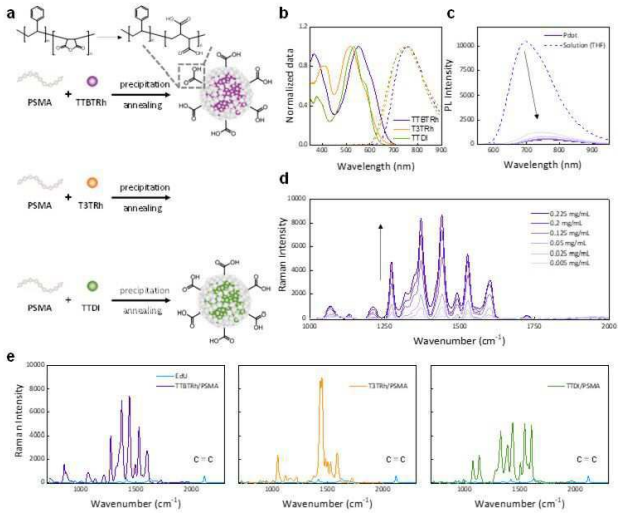
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **폴리머닷 및 이를 표지로 사용하는 라만 다중 분석 방법**

(57) 요 약

본 개시는 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료를 포함하는, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물, 내부에 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료가 응집된, 폴리머닷 및 상기 폴리머닷을 표지로 사용하는, 라만 다중 분석 방법에 관한 것으로, 본 개시에 따른 폴리머닷을 표지로 사용하여 라만 다중 분석 방법을 수행하는 경우, 라만 신호가 현저하게 향상되고, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되며, 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행이 가능한 우수한 효과를 나타낸다. 뿐만 아니라, 상기 폴리머닷은 수성 매질에서도 우수한 생체 적합성과 분산 안정성을 유지할 수 있고, 표면 변형을 통한 분자 특이적 표적화 또한 가능한 우수한 효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C08K 5/45 (2013.01)
C08K 5/47 (2013.01)
C08L 101/00 (2013.01)
G01N 21/3151 (2013.01)
G01N 2021/3155 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711160161
과제번호	KS2241-00
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국화학연구원
연구사업명	한국화학연구원연구운영비지원(소부장회계)
연구과제명	산업 선도형 정밀화학소재 기술
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한국화학연구원
연구기간	2022.01.31 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료를 포함하는, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

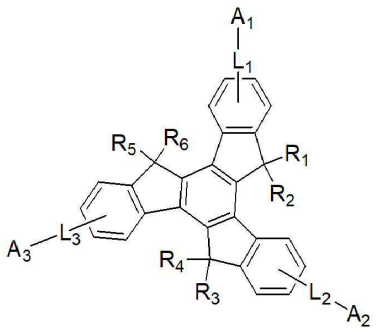
상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함하는 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

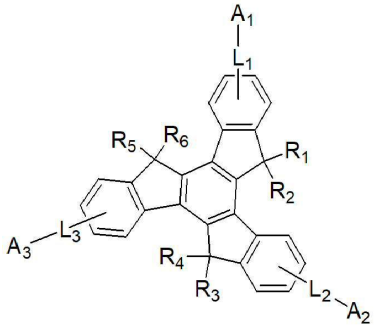
상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

청구항 4

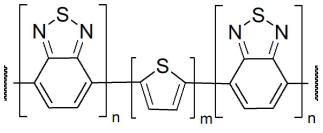
제3항에 있어서,

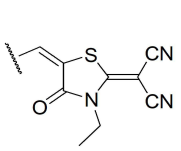
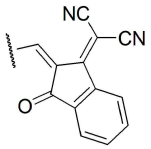
상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

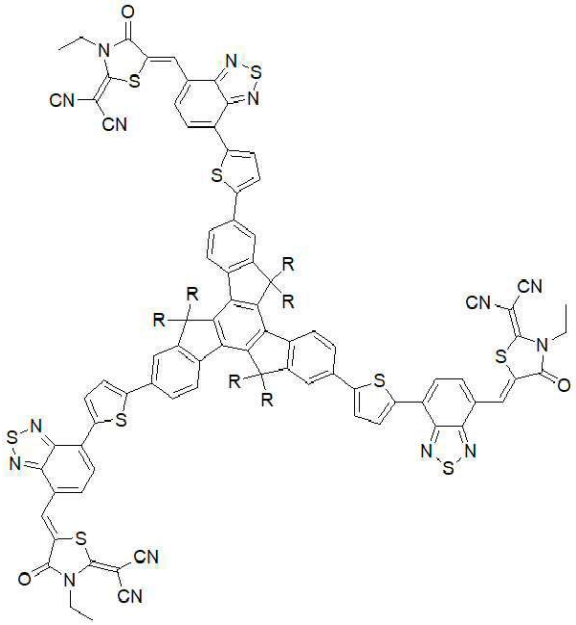
상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

청구항 5

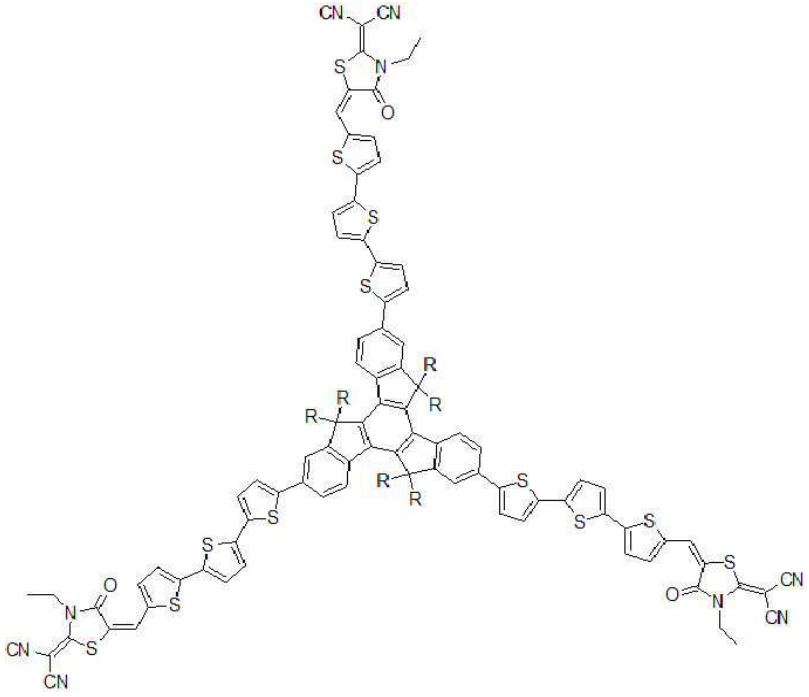
제4항에 있어서,

상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

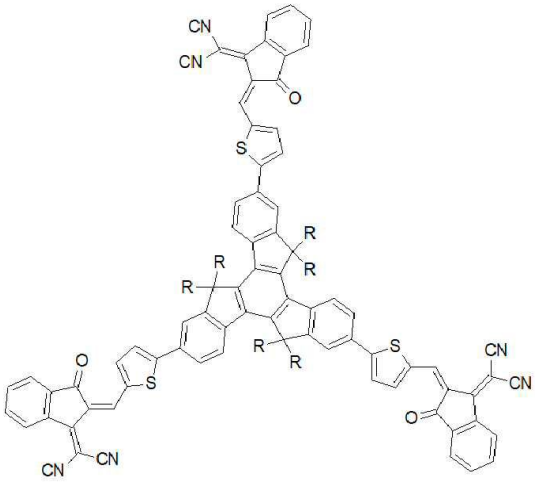
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



(상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

청구항 6

제1항에 있어서,

폴리머닷 매트릭스를 더 포함하는, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 공액 유기 염료는 630 내지 700nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것인, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물.

청구항 9

내부에 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료가 응집된, 폴리머닷.

청구항 10

제9항에 있어서,

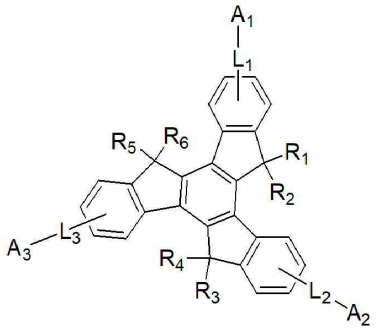
상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함하는 것인, 폴리머닷.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 폴리머닷.

[화학식 1]



(상기 화학식 1에서,

L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

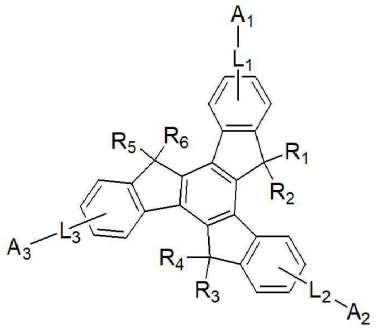
상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

청구항 12

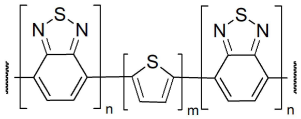
제11항에 있어서,

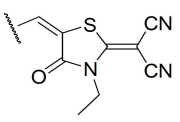
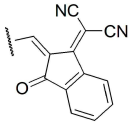
상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것인, 폴리머닷.

[화학식 2]



(상기 화학식 2에서,

L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

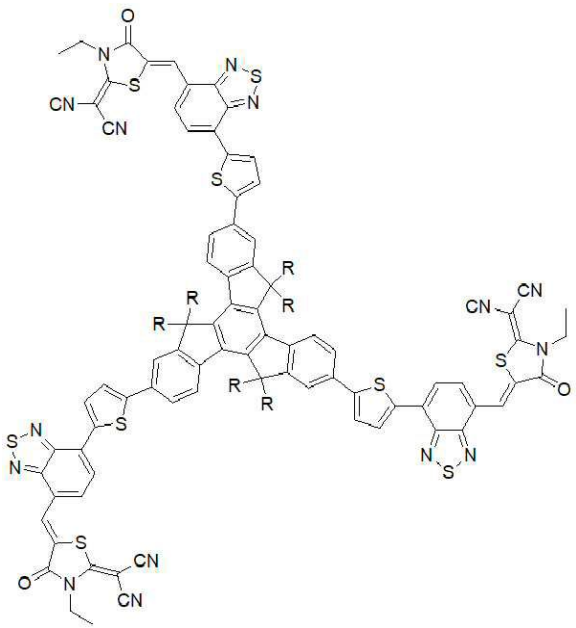
상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

청구항 13

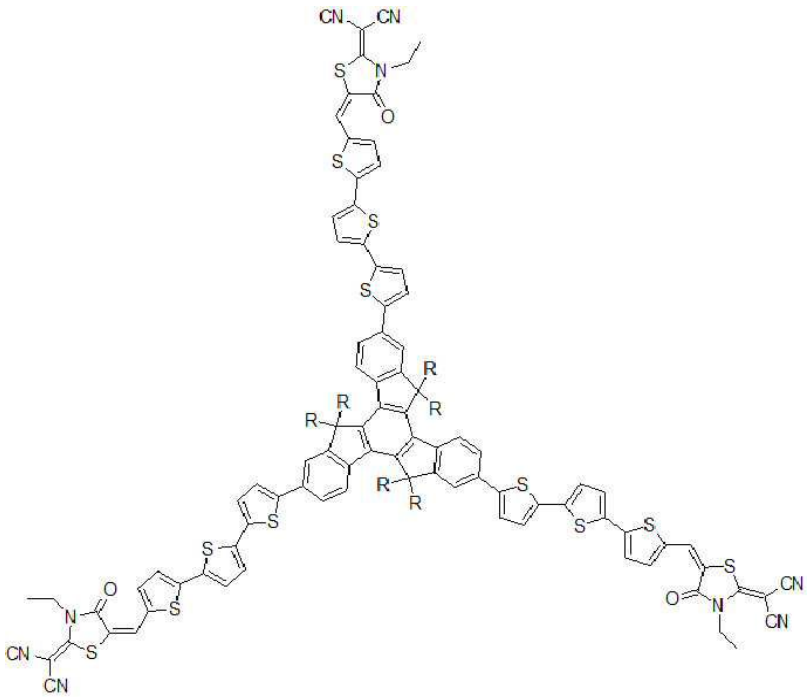
제12항에 있어서,

상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것인, 폴리머닷.

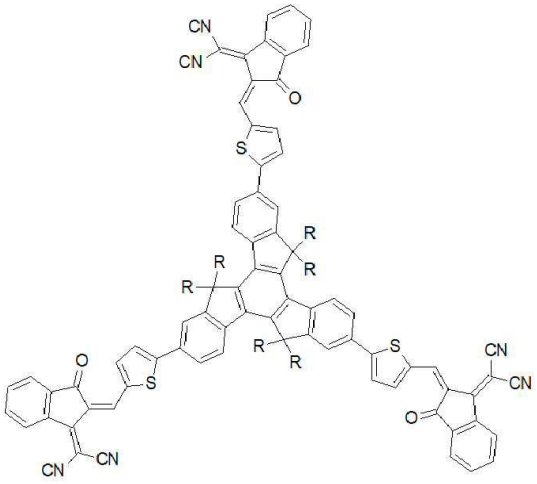
[화학식 3]



[화학식 4]



[화학식 5]



(상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

청구항 14

제9항에 있어서,

폴리머닷 매트릭스를 더 포함하는, 폴리머닷.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 것인, 폴리머닷.

청구항 16

제9항에 있어서,

480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는, 폴리머닷.

청구항 17

제9항에 있어서,

750 내지 760nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는, 폴리머닷.

청구항 18

제9항에 있어서,

광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 미만인, 폴리머닷.

청구항 19

제9항에 있어서,

유체역학적 직경이 1nm 내지 200nm인, 폴리머닷.

청구항 20

제9항 내지 제19항에 따른 폴리머닷을 표지로 사용하는, 라만 다중 분석 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 폴리머닷 및 상기 폴리머닷을 표지로 사용하는 라만 다중 분석 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 여러 마커들을 동시에 직접 시각화할 수 있는 다중 분석은 분자와 세포의 복잡성과 이질성으로 인해 바이오 분야에서 그 필요성이 커지고 있다.

[0003] DNA 시퀀싱 및 질량 분석과 같은 종래의 고처리량 분석은 단일 세포 수준까지의 분자 프로필을 제공하지만 이러한 방법에는 분자들의 조직 내 위치 정보가 부족한 문제가 있다.

[0004] 분자 특이적 분석을 위해 사용되는 형광 현미경은 스펙트럼 대역폭이 넓기 때문에 구별할 수 있는 표적의 수가 제한되어 있다. 따라서 형광 다중 분석은 각 마커에 대해 표지, 이미징 및 세척의 순서를 반복하는 방법을 사용한다. 다만 형광 다중 분석은 처리량의 확장이 가능하기는 하나, 수행 시 반복되는 흐름 주기(flow cycle)로 인해 데이터 수집 시간이 길다는 문제가 있다. 따라서 형광 다중 분석을 수행 시 종래의 고처리량 분석에 비해 식별 가능한 표적의 수와 분석 가능한 세포의 수가 훨씬 더 제한적이다.

[0005] 라만 다중 분석은 진동 신호의 좁은 스펙트럼 대역폭으로 인해 형광 현미경에 대한 대안이 될 수 있다. 그러나 형광에 비해 자발 라만 산란 신호가 극히 미약하여 생물학적 분석에서의 적용이 어려운 문제가 있다.

[0006] CARS(coherent anti-Stokes Raman scattering) 및 SRS(stimulated Raman scattering)와 같은 라만 분광법은 신호를 여러 자릿수로 증폭하나, 형광 현미경에 비해 감도가 낮은 문제가 있다.

[0007] 최근에 epr-SRS(electronic pre-resonance SRS)는 공초점 형광 현미경과 동등한 감도로 세포와 조직의 스펙트럼 다중 분석을 달성했으며, epr-SRS에 의한 진동 여기 후 형광 검출을 사용하여 단일 분자 수준으로 감도를 더욱 향상시킬 수 있기는 하나, 파장 튜닝이 가능한 피코초 또는 펨토초 레이저를 사용하기 때문에, 고가의 장비를 사용하고, 좁은 주파수 영역의 스펙트럼만 얻을 수 있는 문제가 있다.

[0008] 자발 라만 분광기(spontaneous Raman spectrometer)는 수천 개의 파수에 걸친 광범위한 라만 스펙트럼을 제공하는 범용 장비로, 자발 라만 분광기를 사용하기 위해서는 라만 강도가 충분히 증폭된 라만 프로브 분자를 개발하는 것이 요구되는 실정이다.

[0009] 공명 라만 분광법은 라만 프로브 분자의 전자 전이 에너지와 일치하는 광원을 사용하여 라만 신호를 여러 자릿수로 향상시킨다. 특히 공액 분자 (conjugated molecules)는 라만 산란의 공명 향상을 위해 전자 전이에 가까운 가시광선을 사용하는 공명 라만 프로브 분자의 유망한 후보가 될 수 있다. 서로 다른 공액 구조들은 분자 구조 고유의 진동 모드를 가질 수 있기 때문에, 공액 분자는 라만 활성 공액 구조를 미세 조정함으로써 라만 다중 분석을 위한 효율적인 플랫폼으로 사용될 수 있다.

[0010] 상기 epr-SRS는 라만 신호를 공초점 형광 현미경 수준으로 향상시키기 위해 상용 형광체의 최대 흡수 파장에서 일정 에너지 이상 떨어진 파장을 이용하는 전자 사전 공명 (electronic pre-resonance) 조건을 사용했다. 형광체의 흡수 최대값과 유사한 광원을 사용할 경우, 압도적인 형광 배경 신호 로 인해 상대적으로 낮은 라만 신호를 식별할 수 없기 때문에 라만 프로브 분자로 사용하기가 어려운 문제가 있었다. 즉, epr-SRS는 압도적인 형광 배경 신호를 피하기 위해 라만 향상 계수의 손해를 감수하고 흡수 최대값에서 주파수가 1400-2100 cm^{-1} 떨어진 사전 공명 조건을 사용한 것이다.

[0011] 상기와 같은 문제를 고려하였을 때 범용 자발 라만 분광기를 사용하여 라만 다중 분석을 수행하기 위해, 전자 공명으로 인한 향상된 공명 라만 신호와 형광 배경 신호 억제를 동시에 달성할 수 있으면서도, 세포 독성이 적은 새로운 라만 프로브 분자가 요구되는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 개시는 라만 다중 분석 방법에 표지로 사용 시 라만 신호가 향상되고, 형광 배경 신호가 억제되며, 세포 독성이 낮아 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행이 가능한 폴리머닷을 제공하는 것을 목적으로 한다.

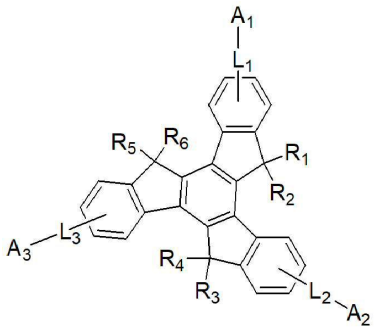
과제의 해결 수단

[0013] 본 개시는 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료를 포함하는, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물을 제공한다.

[0014] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0015] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0016] [화학식 1]

[0017] 

[0018] (상기 화학식 1에서,

[0019] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

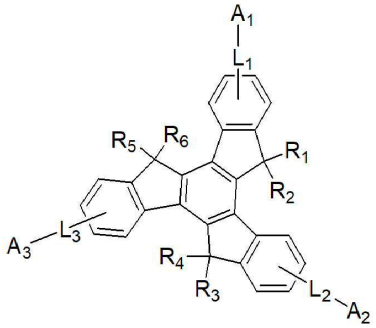
[0020] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

[0021] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

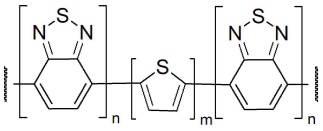
[0022] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

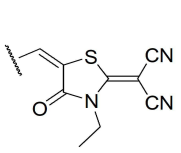
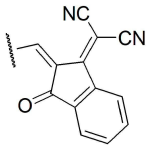
[0023] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0024] [화학식 2]

[0025] 

[0026] (상기 화학식 2에서,

[0027] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

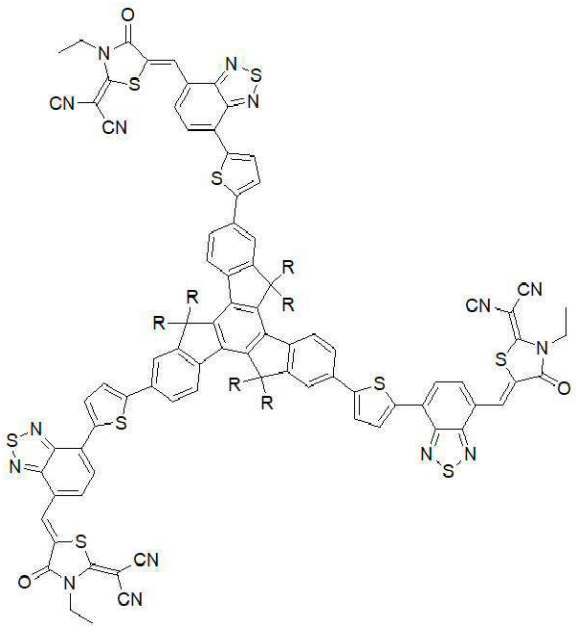
[0028] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

[0029] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

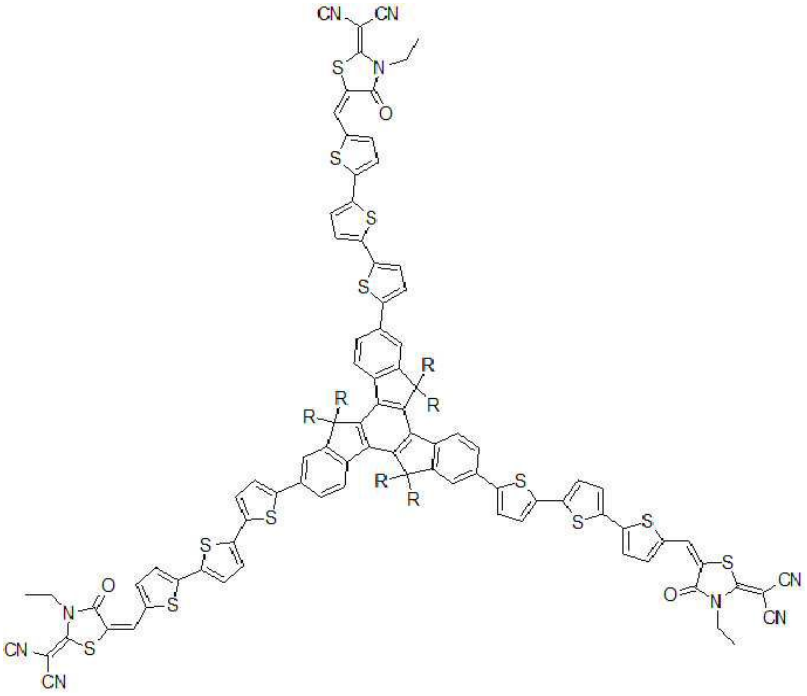
[0030] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

[0031] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것일 수 있다.

[0032] [화학식 3]

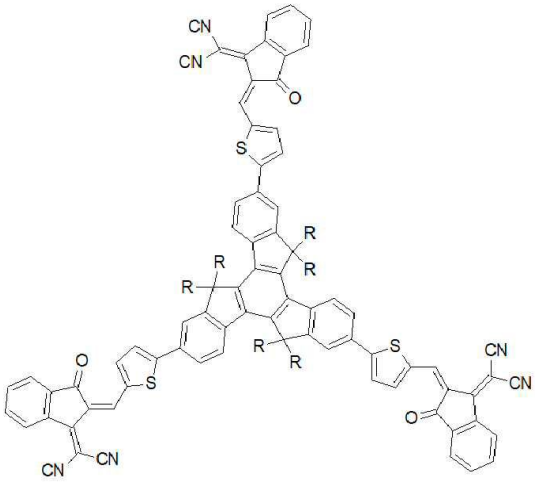
[0033] 

[0034] [화학식 4]



[0035]

[0036] [화학식 5]



[0037]

[0038] (상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

[0039] 일 구현예에서 상기 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물은 폴리머닷 매트릭스를 더 포함할 수 있다.

[0040] 일 구현예에서 상기 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물은 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 것일 수 있다.

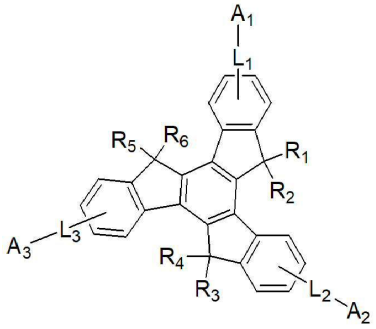
[0041] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 630 내지 700nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다.

[0042] 또한, 본 개시는 내부에 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료가 응집된, 폴리머닷을 제공한다.

[0043] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0044] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0047] (상기 화학식 1에서,

[0048] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

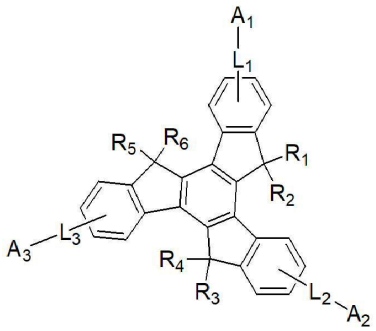
[0049] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

[0050] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

[0051] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

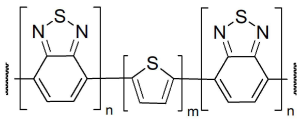
[0052] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

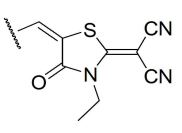
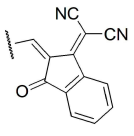
[0053] [화학식 2]



[0054]

[0055] (상기 화학식 2에서,

[0056] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

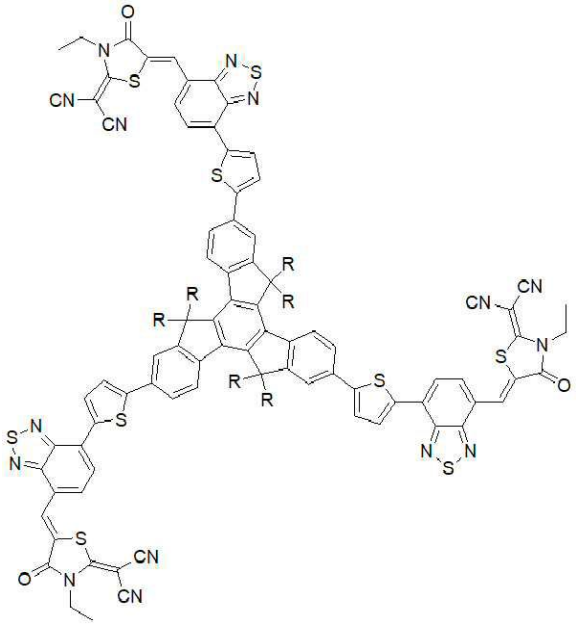
[0057] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

[0058] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

[0059] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

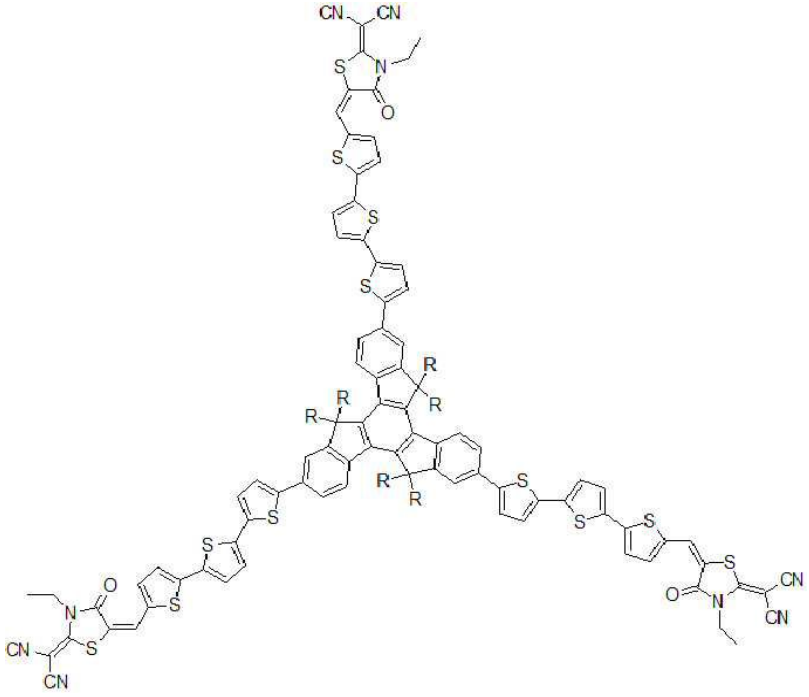
[0060] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것일 수 있다.

[0061] [화학식 3]



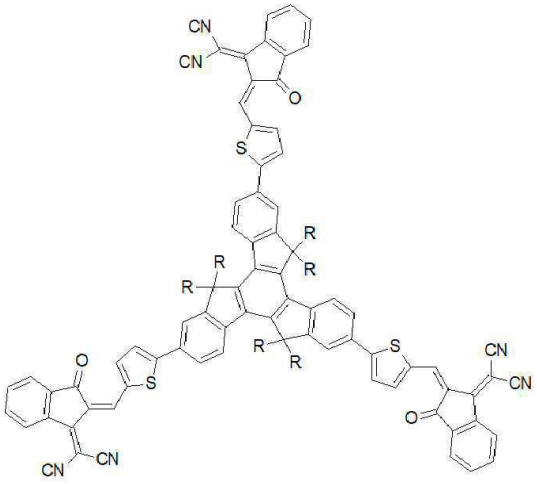
[0062]

[0063] [화학식 4]



[0064]

[0065] [화학식 5]

[0066] 

[0067] (상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

[0068] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 폴리머닷 매트릭스를 더 포함할 수 있다.

[0069] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 것일 수 있다.

[0070] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타날 수 있다.

[0071] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 750 내지 760nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타날 수 있다.

[0072] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 미만일 수 있다.

[0073] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 유체역학적 직경이 1nm 내지 200nm일 수 있다.

[0074] 또한, 본 개시는 상기 폴리머닷을 표지로 사용하는, 라만 다중 분석 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0075] 본 개시는 내부에 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료가 응집된, 폴리머닷 및 상기 폴리머닷을 표지로 사용하는, 라만 다중 분석 방법에 관한 것이다.

[0076] 상기 공액 유기 염료는 링커 및 수용체 단위로 트루센 코어를 확장하여 유효 공액 변형을 통해 합성되어, 라만 지문 (fingerprint) 영역에서 서로 다른 라만 신호 패턴을 나타내며 라만 프로브 분자로 사용될 수 있다. 별 모양의 상기 트루센(truxene)은 3개의 팔에서 쉽게 변형할 수 있는 공명 라만 분석의 빌딩 블록으로 간주된다. 견고하고 평면적인 구조를 갖는 트루센(truxene)은 효율적인 공면 스태킹(cofacial stacking)이 가능하며, 강력한 응집체를 형성할 수 있다. 특히, 상기 공액 유기 염료가 폴리머닷 매트릭스 내부에 응집된 형태인 본 개시에 따른 폴리머닷(Pdots)은 응집-유발 소광(aggregation-caused quenching, ACQ)을 통해 형광 배경 신호를 최소화하면서 동시에 라만 신호를 현저하게 향상시킬 수 있다. 상기 폴리머닷은 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 이하로 측정되어, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되는 우수한 효과를 나타냄을 실험적으로 확인할 수 있다.

[0077] 또한, 라만 프로브 분자의 수에 선형적으로 의존하는 라만 신호 강도는 폴리머닷에서 공액 유기 염료 공액 분자의 농도에 비례하여 증가하게 된다. 상기 폴리머닷은 폴리머닷 매트릭스 내부에 공액 유기 염료를 가두어 응집시키는 구조로 존재하며, 이러한 구조적 특징으로 인해 내부에 응집된 공액 유기 염료 농도를 증가시킬 수 있다. 따라서 상기 폴리머닷을 라만 다중 분석의 표지로 사용할 경우 라만 신호 강도가 현저하게 향상된다.

[0078] 뿐만 아니라, 상기 공액 유기 염료 분자를 친수성 표면 작용기를 가지는 폴리머닷 매트릭스에 가둠으로써 본래 수성 매질에서 매우 낮은 용해도 및 분산성을 가지는 공액 유기 염료를 몇 개월 동안 수성 매질에서 우수한 생

체 적합성과 현저한 분산 안정성을 유지하도록 하는 우수한 효과를 나타낸다.

[0079] 또한, 상기 폴리머닷의 표면은 능동적 타겟팅을 위해 기능화될 수 있다. 폴리머닷 형성 후 폴리머닷 표면의 말레산 무수물 단위는 카르복실산 그룹으로 가수분해되며, 이후 아미드 결합 형성을 통해 분자 특이적 표적화를 위한 표면 기능화를 허용한다. 특히, 폴리머닷 표면에 항체를 표지할 경우 표적 특이적 폴리머닷을 사용하여 세포 내 특정 위치에 라벨링이 가능하며, 세포 내 다중 라만 분석을 실현할 수 있어 향후 확장성이 뛰어난 우수한 효과를 나타낸다.

[0080] 상기 폴리머닷(Pdots)은 자발 라만 분광기에서 가장 널리 사용되는 레이저 원인 532 nm에 근접한 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타난다. 따라서 공명 라만 산란으로 인해 라만 신호가 대폭 향상되므로 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행을 가능하게 하는 우수한 효과를 나타낸다. 또한, 자발 라만 분광기의 광원으로 사용되는 532 nm 근처 파장에서 흡광 특성을 가지는 다양한 형광체들을 폴리머닷 매트릭스 내 응집시켜 형광 배경 신호를 감쇄함으로써 향후 라만 다중 분석을 위한 라만 프로브로 확장할 수 있다.

[0081] 즉, 본 개시에 따른 폴리머닷을 표지로 사용하여 라만 다중 분석 방법을 수행하는 경우, 라만 신호가 현저하게 향상되고, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되며, 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행이 가능한 우수한 효과를 나타낸다. 뿐만 아니라, 상기 폴리머닷은 수성 매질에서도 우수한 생체 적합성과 분산 안정성을 유지할 수 있고, 표면 변형을 통한 분자 특이적 표적화 또한 가능한 우수한 효과를 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1은 시약 및 조건이 i) *N*,*N*,*N*′,*N*′-테트라메틸에틸렌디아민, n-부틸리튬, $(CH_3)_3SnCl$, THF; ii) 7-브로모-2,1,3-벤조티아디아졸-4-카르복스알데히드, $Pd_2(dba)_3$, 트리(*o*-톨릴)포스핀, 톨루엔; iii) 2-(3-에틸-4-옥소-티아졸리딘-2-일리덴)말로노니트릴, 피페리딘, $CHCl_3$; iv) 1,1-디시아노메틸렌-3-인단온, 피리딘, $CHCl_3$인 트루센 유도체 TTBTRh, T3TRh 및 TTDI에 대한 합성 경로를 나타내는 도면이다.

도 2는 (a) 용액(THF)에서 공액 유기 염료의 흡수(실선) 및 발광(점선) 스펙트럼, (b) TTBTRh, (c) T3TRh 및 (d) TTDI 필름 및 용액(THF에서 0.2 mg/mL)의 라만 스펙트럼(모든 라만 스펙트럼은 532nm에서 레이저 여기로 획득됨)을 나타내는 도면이다. 필름 샘플의 경우 형광체가 응집되어 응집 유도 형광 억제 현상으로 인해 형광 배경 신호가 감쇄되어 라만 스펙트럼 분석이 가능하지만, 용액 샘플의 경우 형광 배경 신호로 인해 라만 스펙트럼 식별이 불가능하다.

도 3은 (a) 폴리머닷 매트릭스로 사용될 수 있는 PSMA (polystyrene maleic anhydride)와의 공침을 통한 라만 활성 폴리머닷의 준비 도식, (b) 수용액에서 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷의 흡수(실선) 및 발광(점선) 스펙트럼, (c) TTBTRh 농도를 변화시킴으로써 TTBTRh/PSMA 폴리머닷의 형성을 통한 TTBTRh의 형광 배경 신호 감쇄 스펙트럼, (d) TTBTRh의 농도가 증가함에 따라 TTBTRh/PSMA 폴리머닷의 향상된 라만 신호를 나타내는 라만 스펙트럼 ([TTBTRh] = 0.05 내지 0.225mg / mL, [TTBTRh+PSMA] = 0.25mg / mL), (e) TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷(0.2 mg/mL)을 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU, 물에서 10 mg/mL)와 비교하여 참조한 라만 스펙트럼을 나타내는 도면이다.

도 4는 THF(점선, 0.2 mg/mL) 및 폴리머닷(실선, 0.2 mg/mL)에서 (a) T3TRh 및 (b) TTDI의 광발광 강도 변화를 나타내는 도면이다.

도 5는 (a) T3TRh/PSMA 및 (b) TTDI/PSMA 폴리머닷([T3TRh] = [TTDI] = 0.05 내지 0.225 mg/mL, [T3TRh+PSMA] = [TTDI+PSMA] = 0.25 mg/mL)에서 라만 프로브 분자의 농도가 증가함에 따라 향상된 라만 신호를 나타내는 도면이다.

도 6은 (a) 532 nm에서 여기된 TTBTRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷의 지문 라만 스펙트럼, (b) TTBTRh/PSMA 또는 TTDI/PSMA 폴리머닷을 포함하는 살아있는 COS-7 세포 혼합물 준비의 개략도 및 그 (c) 2850 내지 2950cm^{-1}(검은색)에서 세포 지질 또는 단백질 라만 신호와 함께 1528cm^{-1}(보라색, TTBTRh/PSMA 폴리머닷) 및 1544cm^{-1}(녹색, TTDI/PSMA 폴리머닷)에서 획득한 임계값 처리된 라만 매핑 이미지(축척 막대 = 40 μm)를 나타내는 도면이다.

도 7은 (a) 561 nm 레이저 여기 하에서 700/75 nm 형광 필터를 통한 TTBTRh/PSMA(성분 1), T3TRh/PSMA(성분

2) 및 TTDI/PSMA(성분 3) 폴리머닷 혼합물의 패턴화된 샘플의 공초점 형광 이미지, (b) 중첩 및 (c) MCR 분석 후 단일 성분 라만 매핑 이미지: 성분 1(왼쪽), 성분 2(가운데) 및 성분 3(오른쪽), (d) 실험으로 얻은 라만 프로브들의 라만 스펙트럼(검은색 선) 및 MCR(컬러 선)에 의해 계산된 라만 스펙트럼을 나타내는 도면이다.

도 8은 TTBTRh/PSMA(보라색, 구성 요소 1), T3TRh/PSMA(주황색, 구성 요소 2), TTDI/PSMA(녹색, 구성 요소 3), ITBT/PSMA(청록색, 구성 요소) 4), ITIC/PSMA(빨간색, 구성 요소 5) 및 IDIC/PSMA(파란색, 구성 요소 6) 폴리머닷을 표지하여 공동 배양한 COS-7 세포의 라만 매핑: (a) 기준 샘플(검은색) 및 MCR(색상)로 계산된 구성 요소의 라만 스펙트럼, (b) 상기 여섯 가지 폴리머닷을 표지한 각각의 COS-7 세포군을 공동 배양한 후 얻은 라만 매핑 이미지로, MCR에 의한 농도 프로파일을 기반으로 분리 및 오버레이된 라만 매핑 이미지, 오른쪽 하단: 6개의 폴리머닷으로 인코딩된 세포를 각각 컬러 코드에 해당하는 채색 원(colored circle)이 표시한 명시야(brightfield) 이미지를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

[0084] 또한, 본 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.

[0085] 또한, 본 명세서에서 사용되는 수치 범위는 하한치와 상한치와 그 범위 내에서의 모든 값, 정의되는 범위의 형태와 폭에서 논리적으로 유도되는 증분, 이중 한정된 모든 값 및 서로 다른 형태로 한정된 수치 범위의 상한 및 하한의 모든 가능한 조합을 포함한다. 본 발명의 명세서에서 특별한 정의가 없는 한 실험 오차 또는 값의 반올림으로 인해 발생할 가능성이 있는 수치범위 외의 값 역시 정의된 수치범위에 포함된다.

[0086] 본 명세서의 용어 '포함한다'는 '구비한다', '함유한다', '가진다' 또는 '특징으로 한다' 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다.

[0087] 본 명세서의 용어 "치환체(substituent)", "라디칼(radical)", "기(group)", "모이어티(moiety)", 및 "절편(fragment)"은 서로 바꾸어 사용할 수 있다.

[0088] 본 명세서의 용어 "C_A-C_B"는 "탄소수가 A 이상이고 B 이하"인 것을 의미한다.

[0089] 본 명세서의 용어 "알킬"은 탄소 및 수소 원자만으로 구성된 1가의 직쇄 또는 분쇄 포화 탄화수소 라디칼을 의미한다. 상기 알킬은 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, t-부틸, 펜틸, 헥실, 에틸헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 도데실, 운데실 등을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0090] 본 명세서의 용어 "헤테로아릴"은 하나의 수소 제거에 의해서 방향족 탄화수소로부터 유도된 유기 라디칼로, B, N, O, S, P(=O), Si 및 P로부터 선택된 하나 이상의 헤테로원자를 포함하는 3 내지 8개의 고리원자를 포함하는 일환상 또는 다환상 방향족 탄화수소 라디칼일 수 있고, 각 고리에 적절하게는 3 내지 8개의 고리원자를 포함하는 단일 또는 융합 고리계를 포함하며, 하나 이상의 헤테로아릴이 단일결합으로 연결되어 있는 형태까지 포함한다. 구체적인 예로 퓨릴, 싸이오펜일, 피롤릴, 이미다졸릴, 피라졸릴, 티아졸릴, 이소티아졸릴, 이속사졸릴, 옥사졸릴, 피리딜 등의 단환 헤테로아릴, 벤조퓨란일, 다이벤조퓨란일, 다이벤조티오페일, 벤조티오펜일, 이소벤조퓨란일, 벤조이미다졸릴, 벤조티아졸릴, 벤조이소티아졸릴, 벤조이속사졸릴, 벤조옥사졸릴, 퀴놀릴, 이소퀴놀릴, 카바졸릴 등의 다환식 헤테로아릴 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0091] 본 명세서에서의 용어, "헤테로아릴렌"은 상기 헤테로아릴에서 하나의 수소 제거에 의해 유도된 2가의 유기 라디칼을 의미한다.

[0092] 본 명세서의 용어, "형광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)"은 흡수된 광자 대비 방출된 광자의 비를 의미한다.

[0093] 본 명세서의 용어, "유체역학적 직경"은 동적 광산란으로 측정되는 직경을 의미한다.

[0094] 본 명세서의 용어, "공액 유기기"는 공액 유기 화합물로부터 하나의 수소 제거에 의해서 유도된 1가의 유기 라디칼을 의미한다.

[0095] 이하, 본 개시에 따른 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물, 폴리머닷 및 라만 다중 분석 방법에 대하여

상술한다.

[0096] 본 개시는 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료를 포함하는, 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물을 제공한다.

[0097] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 400nm 이상, 450nm 이상, 480nm 이상, 500nm 이상, 510nm 이상, 520nm 이상, 530nm 이상, 540nm 이상 또는 550nm 이상의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다. 또한 상기 공액 유기 염료는 700nm 이하, 650nm 이하, 600nm 이하, 590nm 이하, 580nm 이하, 570nm 이하 또는 560nm 이하의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다. 상기 공액 유기 염료는 500nm 내지 600nm, 480nm 내지 580nm 또는 510nm 내지 560nm의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다.

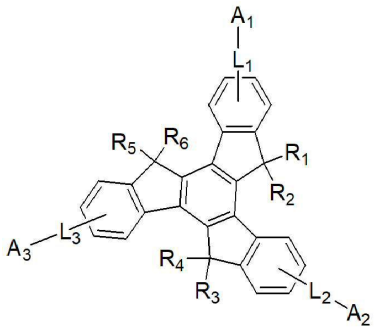
[0098] 상기 공액 유기 염료는 자발 라만 분광기에서 가장 널리 사용되는 레이저원인 532nm에 근접한 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타난다. 따라서 공명 라만 산란으로 인해 라만 신호가 대폭 향상되므로 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행을 가능하게 하는 우수한 효과를 나타낸다.

[0099] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함할 수 있다.

[0100] 상기 공액 유기 염료는 링커 및 수용체 단위로 트루센 코어를 확장하여 유효 공액 변형을 통해 합성되어, 라만 지문 영역에서 서로 다른 라만 신호 패턴을 나타내며 라만 프로브 분자로 사용될 수 있다. 별 모양의 상기 트루센(truxene)은 3개의 팔에서 쉽게 변형할 수 있는 공명 라만 분석의 빌딩 블록으로 간주된다. 견고하고 평면적인 구조를 갖는 트루센(truxene)은 효율적인 공면 스태킹(cofacial stacking)이 가능하며, 강력한 응집체를 형성할 수 있다.

[0101] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0102] [화학식 1]

[0103] 

[0104] (상기 화학식 1에서,

[0105] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

[0106] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

[0107] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

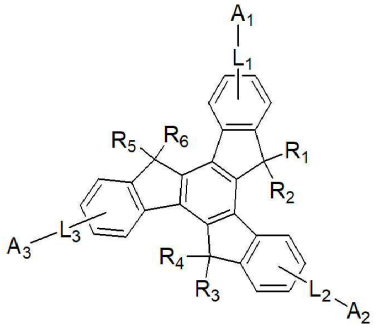
[0108] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

[0109] 일 구현예에서 상기 L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C60 헤테로아릴렌, C3-C50 헤테로아릴렌, C3-C40 헤테로아릴렌, C3-C30 헤테로아릴렌, C3-C20 헤테로아릴렌, C3-C10 헤테로아릴렌 또는 C3-C8 헤테로아릴렌일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0110] 일 구현예에서 상기 R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

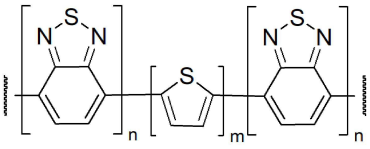
[0111] 일 구현에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

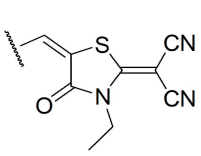
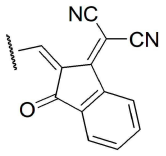
[0112] [화학식 2]



[0113]

[0114] (상기 화학식 2에서,

[0115] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

[0116] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

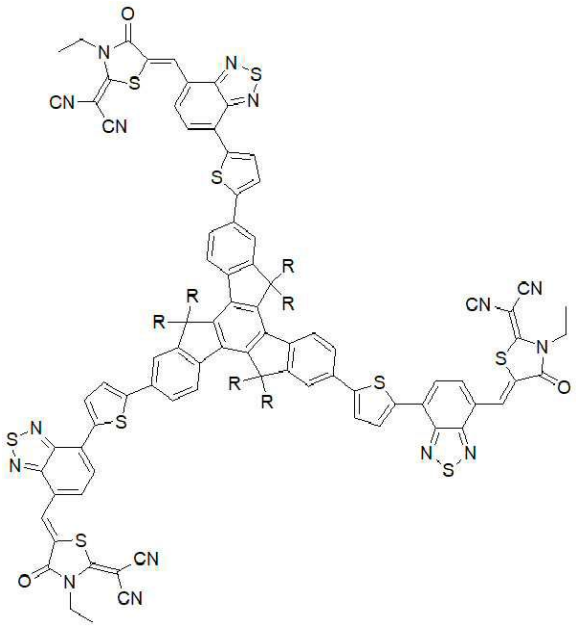
[0117] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

[0118] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

[0119] 일 구현예에서 상기 R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

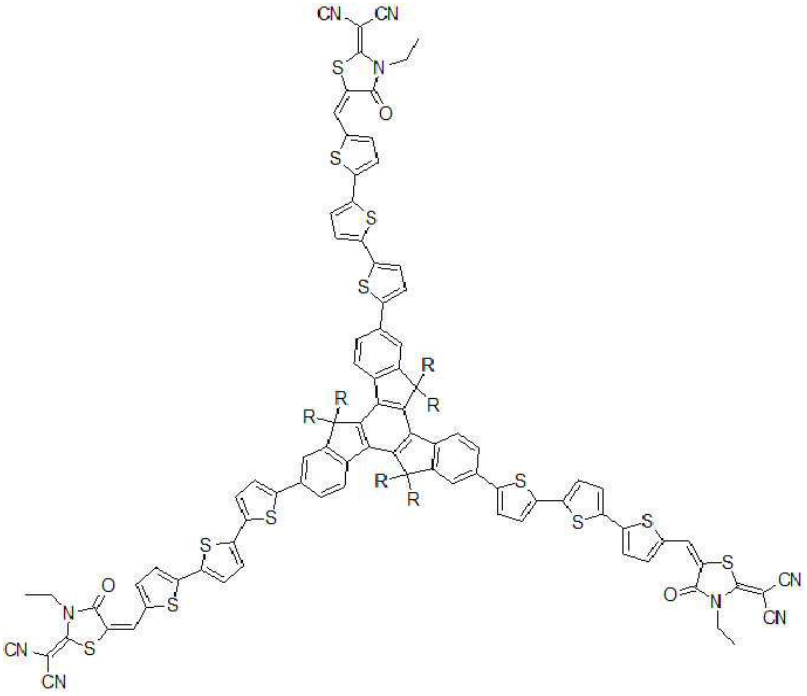
[0120] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것일 수 있다.

[0121] [화학식 3]



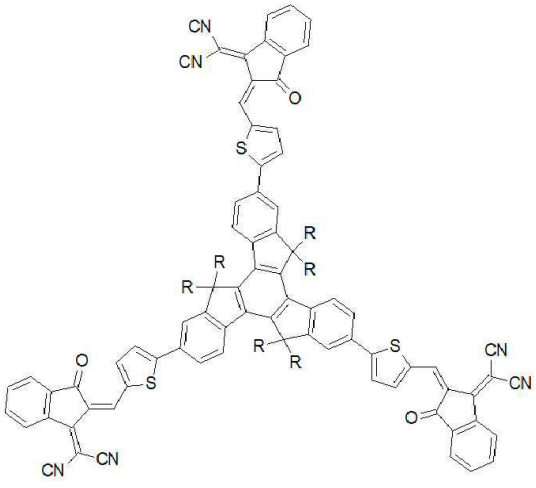
[0122]

[0123] [화학식 4]



[0124]

[0125] [화학식 5]



[0126]

[0127] (상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

[0128] 일 구현예에서 상기 R은 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0129] 일 구현예에서 상기 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물은 폴리머닷 매트릭스를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0130] 상기 폴리머닷 매트릭스는 폴리(스티렌-co-말레산 무수물)(poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA)을 포함하는 것일 수 있다.

[0131] 상기 라만 다중 분석용 폴리머닷 조성물은 상기 폴리머닷 매트릭스로서 폴리(스티렌-co-말레산 무수물)(poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA)을 포함함으로써 낮은 세포 독성 특성을 나타낼 수 있다.

[0132] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.1 이상, 0.2 이상, 0.4 이상, 0.6 이상, 0.7 이상 또는 0.8 이상일 수 있다. 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.95 이하, 0.9 이하, 0.85 이하 또는 0.8 이하일 수 있다. 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.2 내지 0.9, 0.4 내지 0.9 또는 0.7 내지 0.9일 수 있다.

[0133] 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 경우 최대화된 라만 신호 및 최소화된 광발광을 나타내는 우수한 효과를 나타낸다.

[0134] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 620nm 이상, 630nm 이상, 640nm 이상, 650nm 이상, 660nm 이상, 670nm 이상, 680nm 이상 또는 690nm 이상의 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다. 또한 상기 공액 유기 염료는 750nm 이하, 730nm 이하, 710nm 이하 또는 700nm 이하의 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다. 상기 공액 유기 염료는 620nm 내지 750nm 또는 630 내지 700nm의 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다.

[0135] 또한, 본 개시는 내부에 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 공액 유기 염료가 응집된, 폴리머닷을 제공한다.

[0136] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 400nm 이상, 450nm 이상, 480nm 이상, 500nm 이상, 510nm 이상, 520nm 이상, 530nm 이상, 540nm 이상 또는 550nm 이상의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다. 또한 상기 공액 유기 염료는 700nm 이하, 650nm 이하, 600nm 이하, 590nm 이하, 580nm 이하, 570nm 이하 또는 560nm 이하의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다. 상기 공액 유기 염료는 500nm 내지 600nm, 480nm 내지 580nm 또는 510nm 내지 560nm의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다.

[0137] 상기 공액 유기 염료는 자발 라만 분광기에서 가장 널리 사용되는 레이저원인 532nm에 근접한 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타난다. 따라서 공명 라만 산란으로 인해 라만 신호가 대폭 향상되므로 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행을 가능하게 하는 우수한 효과를 나타낸다.

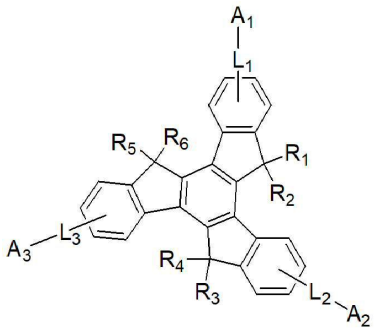
[0138] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 트루센(truxene) 유래 화합물을 포함할 수 있다.

[0139] 상기 공액 유기 염료는 링커 및 수용체 단위로 트루센 코어를 확장하여 유효 공액 변형을 통해 합성되어, 라만 지문 영역에서 서로 다른 라만 신호 패턴을 나타내며 라만 프로브 분자로 사용될 수 있다. 별 모양의 상기 트루센(truxene)은 3개의 팔에서 쉽게 변형할 수 있는 공명 라만 분석의 빌딩 블록으로 간주된다. 견고하고 평면적인 구조를 갖는 트루센(truxene)은 효율적인 공면 스태킹(cofacial stacking)이 가능하며, 강력한 응집체를 형성할 수 있다. 특히, 상기 공액 유기 염료가 내부에 응집된 형태인 본 개시에 따른 폴리머닷(Pdots)은 응집-유발 소광(aggregation-caused quenching, ACQ)을 통해 형광 배경 신호를 최소화하면서 동시에 라만 신호를 현저하게 향상시킬 수 있다. 상기 폴리머닷은 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 이하로 측정되어, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되는 우수한 효과를 나타냄을 실험적으로 확인할 수 있다.

[0140] 또한, 라만 프로브 분자의 수에 선형적으로 의존하는 라만 신호 강도는 폴리머닷에서 공액 유기 염료 공액 분자의 농도에 비례하여 증가하게 된다. 그런데 상기 폴리머닷은 내부에 공액 유기 염료를 응집시키는 구조로 존재하며, 이러한 구조적 특징으로 인해 내부에 응집된 공액 유기 염료 농도를 증가시킬 수 있다. 따라서 상기 폴리머닷을 라만 다중 분석의 표지로 사용할 경우 라만 신호 강도가 현저하게 향상된다.

[0141] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0142] [화학식 1]

[0143] 

[0144] (상기 화학식 1에서,

[0145] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C50 헤테로아릴렌이고;

[0146] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로 공액 유기기이고;

[0147] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

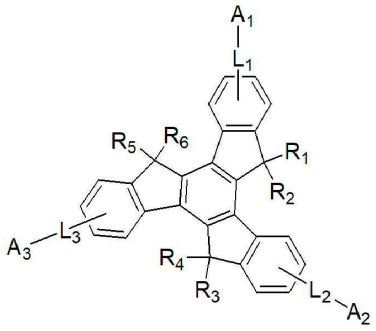
[0148] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

[0149] 일 구현예에서 상기 L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로 C3-C60 헤테로아릴렌, C3-C50 헤테로아릴렌, C3-C40 헤테로아릴렌, C3-C30 헤테로아릴렌, C3-C20 헤테로아릴렌, C3-C10 헤테로아릴렌 또는 C3-C8 헤테로아릴렌일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

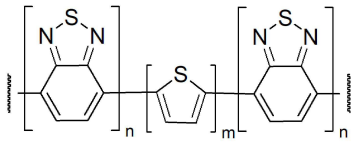
[0150] 일 구현예에서 상기 R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

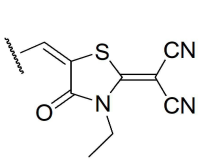
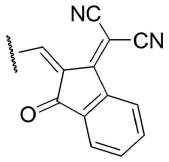
[0151] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물을 포함하는 것일 수 있다.

[0152] [화학식 2]

[0153] 

[0154] (상기 화학식 2에서,

[0155] L_1, L_2 및 L_3은 각각 독립적으로  이고, 상기 n은 0 내지 2의 정수이고, 상기 m은 1 내지 4의 정수이고;

[0156] A_1, A_2 및 A_3은 각각 독립적으로  또는  이고;

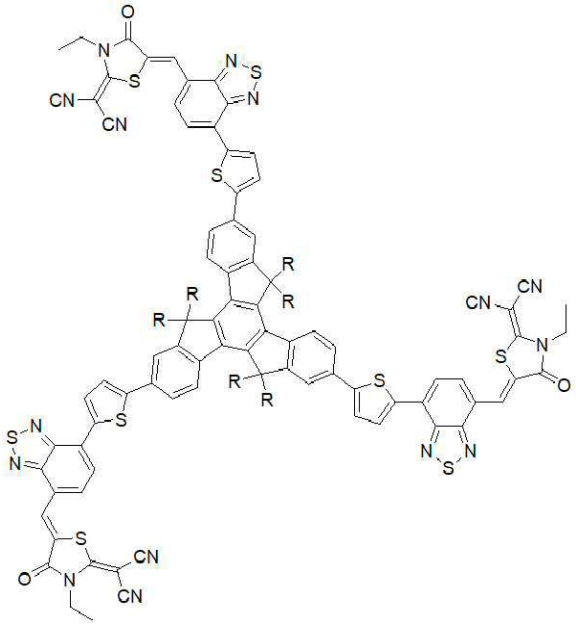
[0157] R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소 또는 C1-C20 알킬이고;

[0158] 상기 헤테로아릴렌은 N, O 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자를 포함한다.)

[0159] 일 구현예에서 상기 R_1 내지 R_6은 각각 독립적으로 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

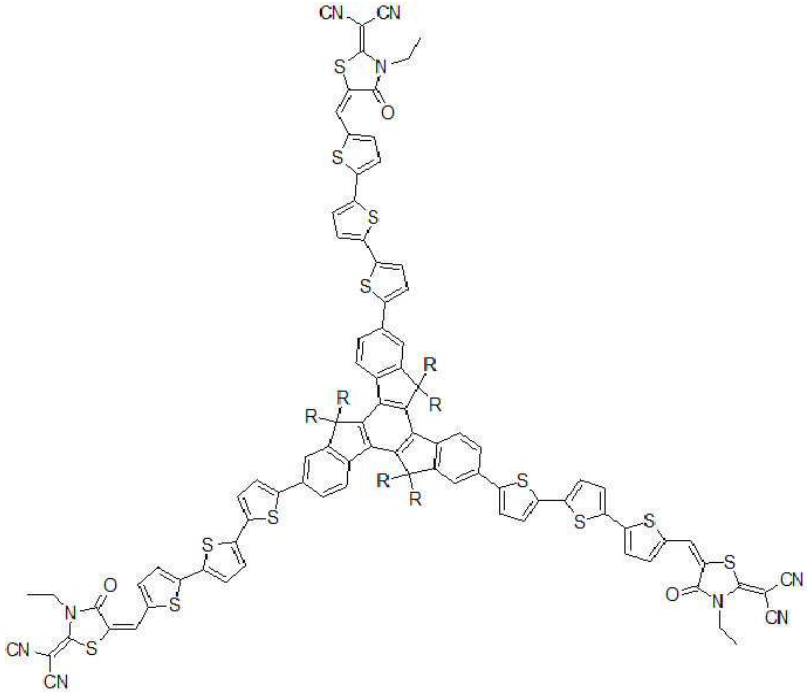
[0160] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료는 하기 화학식 3 내지 5로 표시되는 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 1종을 포함하는 것일 수 있다.

[0161] [화학식 3]



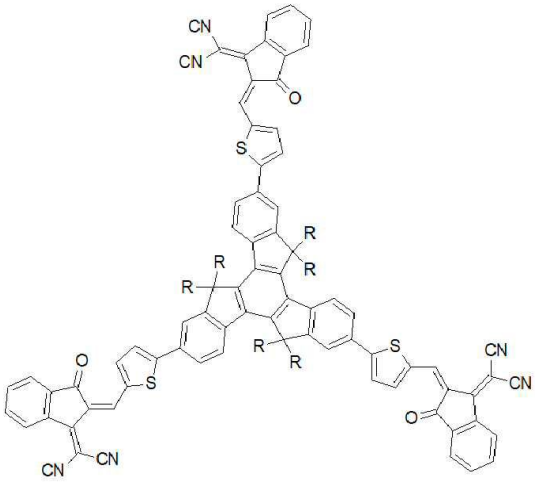
[0162]

[0163] [화학식 4]



[0164]

[0165] [화학식 5]

[0166] 

[0167] (상기 화학식 3 내지 5에서, R은 수소 또는 C1-C20 알킬이다.)

[0168] 일 구현예에서 상기 R은 수소, C1-C20 알킬, C1-C10 알킬, C1-C7 알킬 또는 C1-C5 알킬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0169] 또한, 자발 라만 분광기의 광원으로 사용되는 532 nm 근처 파장에서 흡광 특성을 가지는 다양한 형광체들을 폴리머닷 매트릭스 내 응집시켜 형광 배경 신호를 감쇄함으로써 향후 라만 다중 분석을 위한 라만 프로브로 확장할 수 있다.

[0170] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 폴리머닷 매트릭스를 더 포함할 수 있다.

[0171] 라만 프로브 분자의 수에 선형적으로 의존하는 라만 신호 강도는 폴리머닷에서 공액 유기 염료 공액 분자의 농도에 비례하여 증가하게 된다. 그런데 상기 폴리머닷은 폴리머닥 매트릭스 내부에 공액 유기 염료를 가두어 응집시키는 구조로 존재하며, 이러한 구조적 특징으로 인해 내부에 응집된 공액 유기 염료 농도를 증가시킬 수 있다. 따라서 상기 폴리머닷을 라만 다중 분석의 표지로 사용할 경우 라만 신호 강도가 현저하게 향상된다.

[0172] 뿐만 아니라, 상기 공액 유기 염료 분자를 친수성 표면 작용기를 가지는 폴리머닷 매트릭스에 가둠으로써 본래 수성 매질에서 매우 낮은 용해도 및 분산성을 가지는 공액 유기 염료를 몇 개월 동안 수성 매질에서 우수한 생체 적합성과 현저한 분산 안정성을 유지하도록 하는 우수한 효과를 나타낸다.

[0173] 일 구현예에서 상기 폴리머닷 매트릭스는 폴리(스티렌-co-말레산 무수물)(poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA)을 포함하는 것일 수 있다.

[0174] 상기 폴리머닷은 상기 폴리머닷 매트릭스로서 폴리(스티렌-co-말레산 무수물)(poly(styrene-co-maleic anhydride), PSMA)을 포함함으로써 낮은 세포 독성 특성을 나타낼 수 있다.

[0175] 또한 상기 폴리머닷의 표면은 능동적 타겟팅을 위해 기능화될 수 있는데, 상기 폴리머닷 매트릭스의 말레산 무수물 단위는 카르복실산 그룹으로 가수분해되어 아미드 결합 형성을 통해 분자 특이적 표적화를 위한 표면 기능화를 허용한다. 따라서 항체 표지를 통해 폴리머닷 표면 변형이 있는 표적 특이적 폴리머닷을 사용하여 세포 내 다중 라만 분석을 실현할 수 있어 향후 확장성이 뛰어난 우수한 효과를 나타낸다.

[0176] 일 구현예에서 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.1 이상, 0.2 이상, 0.4 이상, 0.6 이상, 0.7 이상 또는 0.8 이상일 수 있다. 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.95 이하, 0.9 이하, 0.85 이하 또는 0.8 이하일 수 있다. 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.2 내지 0.9, 0.4 내지 0.9 또는 0.7 내지 0.9일 수 있다.

[0177] 상기 공액 유기 염료와 상기 폴리머닷 매트릭스의 중량 합계 대비 상기 공액 유기 염료의 중량이 0.4 내지 0.9인 경우 상기 폴리머닷은 최대화된 라만 신호 및 최소화된 광발광을 나타내는 우수한 효과를 나타낸다.

[0178] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 400nm 이상, 450nm 이상, 480nm 이상, 500nm 이상, 510nm 이상, 520nm 이상, 530nm 이상, 540nm 이상 또는 550nm 이상의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크

가 나타나는 것일 수 있다. 또한 상기 폴리머닷은 700nm 이하, 650nm 이하, 600nm 이하, 590nm 이하, 580nm 이하, 570nm 이하 또는 560nm 이하의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다. 상기 폴리머닷은 500nm 내지 600nm, 480nm 내지 580nm 또는 510nm 내지 560nm의 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나는 것일 수 있다.

[0179] 상기 폴리머닷(Pdots)은 자발 라만 분광기에서 흔히 사용되는 레이저원인 532nm에 근접한 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타난다. 따라서 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행을 가능하게 하는 우수한 효과를 나타낸다.

[0180] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 740nm 이상, 750nm 이상, 752nm 이상, 754nm 이상, 755nm 이상 또는 756nm 이상에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다. 또한 상기 폴리머닷은 770nm 이하, 760nm 이하 또는 758nm 이하의 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다. 상기 폴리머닷은 740nm 내지 770nm 또는 750 내지 760nm의 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나는 것일 수 있다.

[0181] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 5% 이하, 4% 이하, 3% 이하, 또는 2% 이하일 수 있다.

[0182] 상기 폴리머닷은 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 이하인 경우, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되는 우수한 효과를 나타낸다.

[0183] 일 구현예에서 상기 폴리머닷은 유체역학적 직경이 200nm 이하, 100nm 이하, 50nm 이하 또는 30nm 이하일 수 있다. 또한 상기 폴리머닷은 유체역학적 직경이 1nm 이상, 10nm 이상, 50 nm 이상, 또는 100nm 이상일 수 있다. 상기 폴리머닷은 유체역학적 직경이 1nm 내지 200nm, 또는 1nm 내지 50nm일 수 있다.

[0184] 또한 본 개시는 상기 폴리머닷을 표지로 사용하는, 라만 다중 분석 방법을 제공한다.

[0185] 상기 폴리머닷을 표지로 사용하여 라만 다중 분석 방법을 수행하는 경우, 라만 신호가 현저하게 향상되고, 형광 배경 신호가 현저하게 억제되며, 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행이 가능한 우수한 효과를 나타낸다.

[0186] 일 구현예에서 상기 라만 다중 분석 방법은 325nm, 532nm, 633nm 또는 785nm 레이저를 사용하여 수행될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0187] 상기 라만 다중 분석 방법은 325nm, 532nm, 633nm 또는 785nm 레이저를 사용할 수 있는데, 상기 폴리머닷(Pdots)은 자발 라만 분광기에서 가장 널리 사용되는 레이저원인 532nm에 근접한 480 내지 580nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타난다. 따라서 자발 라만 분광기와 같은 범용 장비에서도 라만 다중 분석의 수행을 가능하게 하는 우수한 효과를 나타낸다.

[0188] 이하 실시예 및 비교예를 바탕으로 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 더욱 상세히 설명하기 위한 하나의 예시일 뿐, 본 발명이 하기 실시예 및 비교예에 의해 제한되는 것은 아니다. 발명에서 달리 언급하지 않는 한 온도는 모두 ℃ 단위를 의미하고, 다른 언급이 없는 한 조성물의 사용량은 중량%의 단위를 의미한다.

[0189] [합성예 1: TTBTRh의 합성]

[0190] 무수 테트라히드로푸란(THF)(20mL)에 용해된 도 1의 화합물 1(1g, 0.8mmol) 및 N,N,N',N'-테트라메틸에틸렌디아민(0.3g, 2.8mmol)의 용액을 -78℃로 냉각시켰다. n-부틸리튬(헥산 중 2.5 M, 1.1 mL, 2.8 mmol)을 적가하고 -78℃에서 2시간 동안 교반하였다. 트리메틸주석 클로라이드(THF 중 1M, 2.8mL, 2.8mmol)를 첨가하고 혼합물을 주위 온도에서 6시간 동안 교반하였다. 그 후, 반응물을 물에 붓고 디에틸 에테르로 추출하고 염수로 세척하고 무수 $MgSO_4$로 건조시켰다. 감압 하에서 용매를 제거한 후 잔류물을 에탄올로 재결정하여 도 1의 화합물 2를 얻었다.

[0191] 7-브로모-2,1,3-벤조티아디아졸-4-카르복스알데히드(0.7g, 2.85mmol), 화합물 2(1g, 0.57mmol), 트리(o-톨릴)포스핀(8mol%) 및 트리스(디벤질리덴아세톤)디팔라듐(0)(4mol%)을 N_2 하에서 30mL 마이크로파 바이알에 첨가하였다. 무수 톨루엔(15mL)을 바이알에 첨가하고, 반응 혼합물을 마이크로파 반응기에서 80℃에서 5분, 100℃에서 5분, 120℃에서 10분, 140℃에서 60분 동안 단계적으로 가열하였다. 반응이 완료되면 감압 하에서 용매를 제거하고 헥산/디클로로메탄(5:5 부피비)을 용리액으로 사용하여 컬럼크로마토그래피로 정제하여 도 1의 화합물 3을 얻었다.

[0192] 2구 둥근 바닥 플라스크에서 상기 도 1의 화합물 3(0.1mmol)을 클로로포름(50mL)과 피페리딘(1mL)의 혼합물 하에서 2-(3-에틸-4-옥소-티아졸리딘-2-일리덴)-말로노니트릴(0.5mmol)과 노베나겔(Knoevenagel) 반응시켰다. 반응 용액을 질소 하에서 12시간 동안 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 메탄올(200mL)에 붓고 여과하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0193] ^{1}H NMR(500MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 8.65 (s, 3H), 8.46 (d, 3H), 8.37 (d, 3H), 8.07 (d, 3H), 7.84 (m, 9H), 7.63 (d, 3H), 4.40 (m, 6H), 3.02 (m, 6H), 2.22 (m, 6H), 1.47 (t, 9H), 1.05-0.68 (m, 90H). ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCL_3$) : δ (ppm) 166.31, 165.95, 154.68, 153.98, 151.78, 148.96, 145.84, 140.72, 138.07, 137.42, 132.51, 131.91, 131.20, 131.02, 130.56, 125.18, 124.55, 124.20, 123.59, 119.37, 118.34, 113.11, 112.15, 56.16, 56.02, 40.73, 37.12, 31.83, 29.88, 29.31, 29.10, 24.15, 22.54, 14.23, 14.02. MALDI-TOF (m/z): [M^+] $C_{132}H_{141}N_{15}O_3S_9$에 대한 계산치, 2287.24; 측정치, 2287.7996.

[0194] [합성예 2: T3TRh의 합성]

[0195] 노베나겔(Knoevenagel) 반응을 통해 합성되었다. 2구 둥근 바닥 플라스크에서 도 1의 화합물 4(0.1mmol)를 클로로포름(50mL)과 피페리딘(1mL)의 혼합물 하에서 2-(3-에틸-4-옥소-티아졸리딘-2-일리덴)-말로노니트릴(0.5mmol)과 반응시켰다. 반응 용액을 질소 하에서 12시간 동안 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 메탄올(200mL)에 붓고 여과하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0196] ^{1}H NMR(500MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 8.40 (m, 3H), 8.08 (s, 3H), 7.72 (m, 6H), 7.43 (m 6H), 7.37 (m, 3H), 7.30 (m, 6H), 7.24 (m, 3H), 4.33 (m, 6H), 3.00 (m, 6H), 2.15 (m, 6H), 1.42 (t, 9H), 1.05-0.69 (m, 90H). ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCL_3$) : δ (ppm) 165.83, 165.40, 154.59, 146.29, 145.46, 144.93, 140.19, 139.53, 137.98, 136.73, 135.30, 135.17, 133.97, 131.90, 128.56, 127.07, 125.60, 125.07, 124.91, 124.59, 123.94, 119.11, 113.51, 113.28, 112.25, 55.85, 55.74, 40.68, 37.03, 31.83, 29.82, 29.24, 29.07, 24.04, 22.54, 14.22, 14.02. MALDI-TOF (m/z): [M^+] $C_{138}H_{147}N_9O_3S_{12}$에 대한 계산치, 2364.47; 측정치, 2364.9165.

[0197] [합성예 3: TTDI의 합성]

[0198] 노베나겔(Knoevenagel) 반응을 통해 합성되었다. 도 1의 화합물 5(0.1mmol)와 1,1-디시아노메틸렌-3-인단온(0.5mmol)을 클로로포름(50mL)과 피리딘(1mL)의 혼합물에 첨가했다. 반응 용액을 질소 하에서 12시간 동안 환류시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 메탄올(200mL)에 붓고 여과하였다. 잔류물을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 정제하였다.

[0199] ^{1}H NMR(500MHz, $CDCl_3$) : δ (ppm) 8.97 (s, 3H), 8.76 (d, 3H), 8.82 (d, 3H), 8.03-7.95 (m, 12H), 7.83 (m, 6H), 7.71 (d, 3H), 3.03 (m, 6H), 2.27 (m, 6H), 1.09-0.89 (br, 60H), 0.72-0.55 (m, 30H). ^{13}C NMR(125 MHz, $CDCL_3$) : δ (ppm) 188.42, 160.75, 160.49, 154.78, 146.89, 146.41, 142.06, 140.02, 138.11, 137.94, 136.92, 136.37, 135.27, 134.60, 131.48, 125.40, 125.25, 124.94, 123.83, 122.55, 120.12, 114.52, 114.45, 69.85, 56.19, 36.96, 31.76, 29.72, 29.21, 29.02, 24.09, 22.49, 13.98. MALDI-TOF (m/z): [M^+] $C_{126}H_{132}N_6O_3S_3$ 에 대한 계산치, 1874.66; 측정치, 1875.0036.

[0200] [실시예 1]

[0201] 폴리머닷은 수정된 나노 침전 방법을 사용하여 제조되었다. TTBTRh 원액(1 mg/mL)을 THF에서 준비했다. TTBTRh/PSMA 폴리머닷을 제조하기 위해 TTBTRh(400 μL) 및 폴리(스티렌-co-말레산 무수물)(poly(styrene-co-maleic anhydride, PSMA) 100 μL 원액을 4.5mL에서 혼합하여 TTBTRh의 농도가 0.2mg/mL인 폴리머닷 용액을 제조했다. 초음파 처리 후, 폴리머닷 용액(5mL)을 초음파 수조에서 탈이온수(10mL)에 빠르게 옮겼다. 폴리머닷 용액을 90℃ 수조에서 질소 가스 기류 하에서 증발시켜 2mL로 농축했다. 이어서, 폴리머닷 용액을 0.1㎛ 실린지 필터를 통해 여과하고 갈색 바이알에 담았다.

[0202] 상기 폴리머닷은 552nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 755nm

파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 이하로 측정되었다.

[0203] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 3e에 나타내었다.

[0204] 상기 측정된 라만 스펙트럼은 형광 배경 신호가 최소화됨과 동시에 라만 신호가 현저하게 향상되어 라만 지문 영역에서 명확한 라만 피크를 나타낸다.

[0205] [실시예 2]

[0206] 실시예 1에서 TTBTRh 대신 T3TRh을 사용한 것을 제외하고는 동일하게 실시하였다.

[0207] 상기 폴리머닷은 516nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 751nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 2% 이하로 측정되었다.

[0208] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 3e에 나타내었다.

[0209] 상기 측정된 라만 스펙트럼은 형광 배경 신호가 최소화됨과 동시에 라만 신호가 현저하게 향상되어 라만 지문 영역에서 명확한 라만 피크를 나타낸다.

[0210] [실시예 3]

[0211] 실시예 1에서 TTBTRh 대신 TTDI를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 실시하였다.

[0212] 상기 폴리머닷은 532nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 756nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 0.1% 이하로 측정되었다.

[0213] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 3e에 나타내었다.

[0214] 상기 측정된 라만 스펙트럼은 형광 배경 신호가 최소화됨과 동시에 라만 신호가 현저하게 향상되어 라만 지문 영역에서 명확한 라만 피크를 나타낸다.

[0215] [실시예 4]

[0216] 실시예 1에서 TTBTRh 대신 2-(3-옥소2,3-디히드로-1H-벤조[b]시클로펜타[d]티오펜-1-일리덴)-말로노니트릴(ITBT)을 사용한 것을 제외하고는 동일하게 실시하였다.

[0217] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 8a에 나타내었다.

[0218] [실시예 5]

[0219] 실시예 1에서 TTBTRh 대신 1,1-디시아노메틸렌-3-인다논(ITIC)를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 실시하였다.

[0220] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 8a에 나타내었다.

[0221] [실시예 6]

[0222] 실시예 1에서 TTBTRh 대신 비스(알킬설파닐)메틸렌이 치환된 4,9-디하이드로-s-인다세노[1,2-b:5,6-b']디티오펜 기반 구조(IDIC)를 사용한 것을 제외하고는 동일하게 실시하였다.

[0223] 상기 폴리머닷의 측정된 라만 스펙트럼을 도 8a에 나타내었다.

[0224] [비교예 1]

[0225] THF 용매에 0.2 mg/mL 농도의 TTBTRh 용액을 상기 합성예 1에 따라 제작하였다. TTBTRh 용액 샘플은 542nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 695nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 60% 이하로 측정되었다.

[0226] 상기 TTBTRh의 측정된 라만 스펙트럼을 도 2b에 나타내었으며, 형광 배경 신호로 인해 라만 지문 영역 내 라만 스펙트럼을 식별할 수 없다.

[0227] [비교예 2]

[0228] THF 용매에 0.2 mg/mL 농도의 T3TRh 용액을 상기 합성예 2에 따라 제작하였다. T3TRh 용액 샘플은 513nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 688nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 30% 이하로 측정되었다.

[0229] 상기 T3TRh의 측정된 라만 스펙트럼을 도 2c에 나타내었으며, 형광 배경 신호로 인해 라만 지문 영역 내 라만 스펙트럼을 식별할 수 없다.

[0230] [비교예 3]

[0231] THF 용매에 0.2 mg/mL 농도의 TTDI 용액을 상기 합성예 3에 따라 제작하였다. TTDI 용액 샘플은 552nm 파장에서 자외선-가시광선(UV-vis) 흡광 스펙트럼의 최대 흡수 피크가 나타나고, 634nm 파장에서 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 나타나고, 광발광 양자 수율(photoluminescence quantum yield, PLQY)이 0.1% 이하로 측정되었다.

[0232] 상기 TTDI의 측정된 라만 스펙트럼을 도 2d에 나타내었다.

[0233] [실험예 1 - 측정 방법]

[0234] ^{1}H- 및 ^{13}C-NMR 스펙트럼은 각각 500MHz 및 125MHz에서 작동하는 브루커 어드밴스(Bruker Advance) Ⅲ HD 시스템을 사용하여 기록하였다.

[0235] 질량 스펙트럼은 2,5-디하이드록시벤조산(DHB)을 매트릭스로 사용하여 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 비행시간(MALDI-TOF/TOF™ 5800 시스템, AB SCIEX) 질량 분석기를 사용하여 얻었다.

[0236] UV-vis 스펙트럼은 자스코(Jasco) V-730 UV-vis 분광기(일본)를 사용하여 측정하였다.

[0237] 광발광(Photoluminescence, PL) 스펙트럼은 제논(Xenon) 램프 여기원(excitation source)이 있는 자스코(Jasco) FP-8600 형광 분광계(일본)를 사용하여 용액 샘플에 대해 90° 감지 각도를 사용하여 얻었다. 광발광 양자 수율(PLQY)은 pH=11에서 새로 준비한 플루오레세인(fluorescein) 용액을 기준으로 측정하였다.

[0238] 입자 크기 및 제타 전위 분석기(ELSZ-1000, Otsuka, 일본)를 사용하여 폴리머닷의 유체역학적 직경 및 제타 전위 값을 실온에서 수용액에서 측정하였다.

[0239] 자발적인 라만 스펙트럼 및 라만 매핑 이미지는 532nm 레이저를 사용하는 라만 분광기(HORIBA LabRAM HR Evolution, 일본)로 획득했다. 레이저 빔은 40x/0.65 NA 대물 렌즈(Plan N, Olympus, Japan)에 의해 현미경 단계에서 샘플에 초점을 맞췄다.

[0240] [실험예 2 - 세포 배양 및 라만 바코딩]

[0241] COS-7 세포(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)를 10% 태아 소 혈청(fetal bovine serum)(97068-085, VWR Life Science)과 1% 항생제-항진균제(15240-062, 깁코)가 첨가된 DMEM(Dulbecco's Modified Essential Medium)(SH30022.01, Hyclone)에서 배양하였다. 모든 세포는 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 성장시켰다. COS-7 세포를 커버슬립 바닥 8웰 챔버(155409, LAB-TEK)에서 밤새 성장시켰다. 상기 세포에 표지를 붙이기 위해 200 μL의 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷 원액(0.2mg/mL의 라만 활성 종) 각각을 원심분리 여과(Nanosep Omega 10K 원심분리 장치)를 통해 40 μL로 농축했다. 상기 절차를 통해 준비한 COS-7 세포(웰당 5 x 10^4 세포)를 180 μL의 DMEM 완충액에서 20 μL의 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷과 함께 각각 12시간 동안 배양했다. 배양액을 버린 후, 세포층을 덮도록 50 μL의 트립신 용액을 첨가하고, 세포를 37℃ 5% CO_2에서 3분간 배양하였다. 세포가 분리되면 DPBS(D8537, Sigma-Aldrich)를 첨가하고 여러 번 피펫팅하여 세포를 부드럽게 분산시켰다. 세포 현탁액을 15000rpm에서 3분 동안 원심 분리한 후, 서로 다른 라만 바코드가 표지된 세포 펠릿들을 1 mL DMEM에 함께 혼합했다. 세포 혼합물(30 μL)을 250 μL의 DMEM에 다시 희석하고 커버슬립 바닥이 있는 4웰 챔버의 커버슬립(18 x 18mm)으로 옮긴 다음 37℃, 5% CO_2에서 6시간 동안 배양했다.

[0242] [실험예 3 - 라만 스펙트럼 획득 및 매핑]

[0243] 532 nm 여기 레이저가 장착된 올림푸스(Olympus) 광학 현미경 시스템(Plan N 40X/0.65 및 MPlan N 5X/0.10 대물 렌즈)에 연결된 라만 분광계(Horiba, LabRAM HR Evolution)를 사용하여 측정하였다. 1064nm 비공명 스펙트럼은 여기 파장이 1064nm인 브루커 멀티램(Bruker MulitRam)(Bruker, Ettlingen, Germany)과 게르마늄 다이

오드 검출기를 사용하여 수집하였다. 분광계는 실리콘 웨이퍼를 사용하여 보정하였다. 라만 매핑 이미지를 얻기 위해 피에조(piezo) 스테이지를 사용하여 200 X 200㎛ 범위(데이터 포인트 = 6561)의 범위에서 5㎛의 단계 크기로 샘플을 이동하고 모든 지점에서 라만 스펙트럼을 기록했다. 얻어진 라만 스펙트럼은 랩스펙(LabSpec) 6 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 다중 세포 분석(도 8)의 경우 라만 강도의 임계 범위는 각각의 다양한 라만 스펙트럼을 명확하게 식별하기 위해 제어되었다.

[0244] [실험예 4 - 다변량 곡선 분해능(MCR, multivariate curve resolution)]

[0245] 다변량 곡선 분해능(MCR) 분석 전에 데이터를 기준선으로 수정하고 강도를 정규화했다. 데이터 세트를 최소화하기 위해 가변 원리 구성 요소 분석 하에서 언스크램블러(Unscrambler) X(Camo Analytics)를 PC1 점수와 함께 데이터 세트에서 실행하여 스펙트럼이 세포 또는 기질에서 발생했는지 확인하고 세포가 부착되었는지 확인했다. 이어서 언스크램블러(Unscrambler) X(Camo Analytics)를 사용하여 다변량 곡선 분해능(MCR) 분석을 통해 세포 샘플에 연결된 스펙트럼을 실행했다.

[0246] **공액 유기 염료**

[0247] 서로 다른 π-링커(벤조티아디아졸 및/또는 티오펜)와 수용체((2-(3-에틸-4-옥소-티아졸리딘-2-일리덴)말로노니트릴 또는 1,1-디시아노메틸렌-3-인다논)를 트루센 코어와 결합하여 효과적인 공액은 미세 조정되었다.

[0248] 테트라히드로푸란(THF)에서 TTBTRh, T3TRh 및 TTDI은 구조적 유사성으로 인해 각각 542, 513 및 552 nm에서 최대 흡수를 보이며 공명 라만 산란을 위해 기존의 532nm 레이저로 세 분자 모두 동시에 여기할 수 있다(도 2a). TTBTRh(광발광 양자 수율(PLQY) = 60% 이하), T3TRh(광발광 양자 수율(PLQY) = 30% 이하) 및 TTDI(광발광 양자 수율(PLQY) = 0.1% 이하)에 대해 각각 695, 688 및 634 nm에서 방출 최대값을 갖는 유사한 광발광 스펙트럼을 나타냈다.

[0249] 도 2a에서 볼 수 있듯이 공액 유기 염료의 광발광 스펙트럼의 큰 스펙트럼 중첩과 넓은 대역폭은 다중 형광 분석에서 스펙트럼 분리를 어렵게 한다. 그러나 서로 다른 링커와 수용체로 인한 구조적 차이로 인해 분자 진동 모드에 따라 각 분자에 고유한 라만 신호 패턴이 생성되었다(도 2b-d). 532nm에서 TTBTRh, T3TRh 및 TTDI의 여기 시 좁은 대역폭의 라만 지문 영역에서 분광적으로 잘 분해된 라만 신호가 측정되었으며, 이는 라만 다중 분석에서 본 개시에 따른 공액 유기 염료가 다양하고 넓은 용도로 활용될 수 있음을 의미한다.

[0250] **라만 활성 폴리머닷에서 공명 라만 산란 향상**

[0251] 공명 라만 측정에서 전자 흡수 에너지와 공명하는 여기 파장은 라만 신호를 향상시키는 데 사용된다. 그러나 동시 형광은 피할 수 없다. 상기 공액 유기 염료가 폴리머닷 매트릭스 내부에 응집된 폴리머닷은 응집-유발 소광(aggregation-caused quenching, ACQ)을 통해 형광 배경 신호를 최소화함과 동시에 현저하게 라만 신호를 향상시킬 수 있다.

[0252] 극적으로 감소된 형광 배경 신호가 수용액에서 폴리머닷에 대해 측정되었으며(광발광 양자 수율(PLQY) < 2% 이하), 이는 효율적인 응집-유발 소광(aggregation-caused quenching, ACQ)이 발생했음을 나타낸다(도 3c). 도 3d에서 TTBTRh/PSMA 폴리머닷은 수성 매질에서 무시할 수 있는 형광 배경 신호와 함께 라만 지문 영역에서 명확한 라만 피크를 보여준다. 필름 및 폴리머닷 형태에서 동일한 라만 패턴은 PSMA 매트릭스 분자가 라만 신호에 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 또한, 라만 강도는 라만 프로브 분자의 농도에 비례하기 때문에 TTBTRh/PSMA 폴리머닷의 라만 신호는 TTBTRh의 농도가 증가함에 따라 많은 수의 TTBTRh 분자가 폴리머닷 입자에 집중되어 점진적으로 향상된다(도 3d).

[0253] TTBTRh 원액(1 mg/mL)을 THF에서 준비하고, 서로 다른 TTBTRh 농도(0.05 내지 0.225 mg/mL)를 갖는 총 부피가 500㎕인 TTBTRh/PSMA 폴리머닷 용액을 형성하기 위해 TTBTRh와 PSMA 저장 용액의 혼합 비율을 변경하여 제조하였다. 예를 들어 TTBTRh(400㎕) 및 PSMA(100㎕) 원액을 4.5mL에서 혼합하여 TTBTRh의 농도가 0.2mg/mL인 용액을 제조했다. 폴리머닷 형성 시 최적의 TTBTRh의 농도는 0.2mg/mL로 측정되었으며, 수용액 내 우수한 분산성을 보이면서도 최대화된 라만 신호 및 최소화된 광발광을 나타냈다(도 3d). 마찬가지 방법으로 실험을 진행하였을 때 T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷 용액에서 최적의 T3TRh 및 TTDI 농도 또한 0.2mg/ml로 측정되었다(도 4 및 도 5).

[0254] 최적화된 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷의 평균 유체역학적 직경은 수용액에서 DLS(동적 광산란) 측정을 통해 30nm 이하로 확인하였다. 폴리머닷이 형성되는 동안 PSMA에서 말레산 무수물의 가수분해는 카르복실산을 생성하여 수성 매질에서 폴리머닷의 분산 안정성을 증가시킨다. 상기 세 가지 유형의 폴리머닷 모

두 수개월 후에도 응집이나 광학적 특성의 현저한 변화를 나타내지 않았으며 수성 매질에서 눈에 띄는 분산 안정성은 제타 전위 측정(-27 내지 -28 mV)에 의해 추가로 확인되었다.

[0255] 도 3b 및 3c에서, TTBTRh/PSMA 폴리머닷은 THF에서 TTBTRh의 스펙트럼과 비교하여 형광 스펙트럼의 최대 방출 피크가 755nm 파장에서 측정되어 실질적으로 감소되고 적색 편이된 방출 스펙트럼을 나타내었으며, 이는 폴리머닷 내부에 TTBTRh 분자가 응집되었음을 의미한다. 유사하게, T3TRh/PSMA 폴리머닷의 경우 516nm 및 751nm에서, TTDI/PSMA 폴리머닷의 경우 532nm 및 756nm에서 적색 편이된 흡수 및 방출 최대치가 측정되었다(도 3b). 세 폴리머닷 모두에 대해 516-552nm 범위의 유사한 흡수 최대값은 532nm에서 공통 레이저를 사용하여 공명 라만 산란을 가능하게 한다.

[0256] 라만 프로브 분자로서 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷 적용을 입증하기 위해 3개의 폴리머닷(물에서 0.2mg/mL)의 라만 강도를 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU, 물에서 10mg/mL)을 기준 물질로 사용하여 측정했다(도 3e). 폴리머닷 내부에 응집된 공액 유기 염료로 인해 크게 향상된 공명 라만 산란이 사용되었다. 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU)의 농도가 폴리머닷의 농도보다 50배 높았지만, TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷에서 검출된 라만 신호는 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU)의 C≡C 진동 신호(2000 cm^{-1})보다 각각 13배, 16배 및 9배 더 높았다.

[0257] 중요한 것은 3개의 폴리머닷 모두 10^3 이상의 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU)에 대한 상대적인 라만 강도 수치(RIE, relative intensity versus EdU)를 나타냈으며, 이는 공액 유기 염료가 폴리머닷 매트릭스 내에서 응집하여 효율적인 라만 프로브 분자로 사용될 수 있음을 의미한다. TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷은 각각 5.9 x 10^3, 각각 7.5 x 10^3 및 3.3 x 10^3의 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU)에 대한 상대적인 라만 강도를 나타내었다. 라만 강도는 T3TRh, TTBTRh, TTDI 순으로 감소하여 몰흡광계수 감소에 따른 순서와 잘 일치함을 보여주었으며(T3TRh, TTBTRh 및 TTDI에 대해 각각 1.72 x 10^5, 1.39 x 10^5, 1.08 x 10^5 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$), 라만 신호 증폭에서 전자 공명의 중요성을 나타낸다.

[0258] **라만 매핑 이미지 1: 단일 피크 방법으로 세포를 구별**

[0259] 라만 다중 분석 전, 라만 매핑을 위한 특정 파수 창을 선택하여 살아있는 세포에서 TTBTRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷의 간단한 식별을 수행했다. TTBTRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷은 각각 구조-특정 라만 지문 패턴 내에서 TTBTRh의 1528cm^{-1} 피크와 TTDI로부터의 1544cm^{-1} 피크를 구분함으로써 확인할 수 있다 (도 6a). 상기 두 개의 폴리머닷을 포함하는 살아있는 세포 혼합물을 준비하기 위해 COS-7 세포의 두 배치를 TTBTRh/PSMA 또는 TTDI/PSMA 폴리머닷으로 독립적으로 표지하고 혼합하고 다시 플레이팅(re-plate)했다(도 6b). COS-7 세포를 세포 배양 배지에서 다양한 라만 활성 폴리머닷(0.1mg/mL)과 함께 배양하고 명시야 현미경으로 48시간 동안 모니터링했을 때 정상적인 세포 성장과 분열이 관찰되었으며 이는 폴리머닷의 낮은 세포 독성 특성을 나타낸다. 각 세포에 표지된 폴리머닷의 종류는 파수 창을 1528 cm^{-1} 또는 1544 cm^{-1}로 변경하여 라만 매핑 이미지에서 구별할 수 있었으며, 모든 세포의 위치 및 형태는 세포 지질 또는 단백질에서 유래하는 표지 없는 라만 신호로 관찰되었다(CH_2 및 CH_3 스트레칭 모드, 2850-2950cm^{-1}, 도 6c 검정색).

[0260] **라만 매핑 이미지 2: 다변량 분석에 의한 라만 다중 분석에서 세포 구분**

[0261] 단일 피크 분석은 추가 스펙트럼 비혼합 없이 간단하게 인식할 수 있다는 장점이 있지만, 모든 라만 프로브 분자에는 중첩되지 않고 스펙트럼적으로 분리된 라만 피크가 있어야 한다. 본 개시에서 3개의 폴리머닷(TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA, TTDI/PSMA)은 1200 내지 1600cm^{-1}의 스펙트럼 창에서 라만 스펙트럼이 중첩되어 명확하게 분리된 3개의 개별 라만 피크가 존재하지 않기 때문에 단일 피크 분석과 동일한 방식으로 구별할 수 없다. 그러나 3개의 폴리머닷이 서로 다른 라만 지문 패턴을 가지고 있기 때문에 하이퍼스펙트럴 라만 분석에서 복합 스펙트럼으로부터 해석 가능한 스펙트럼 성분과 그 농도 프로파일을 분리하는 표준 기술인 교대 최소자승법에 의한 다변량 곡선 분해능(MCR, multivariate curve resolution)을 사용했다.

[0262] 폴리머닷 혼합물의 패턴화된 필름을 준비하여 MCR이 혼합물에서 각 폴리머닷을 얼마나 효과적으로 구별하는지 확인했다(도 7). 패턴화된 필름의 라만 매핑 데이터는 각 폴리머닷의 기준 라만 스펙트럼을 사용하여 MCR에 의해 분석되었다. 532nm 레이저 조사 시, 3개의 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷이 동시에 여기되며 강한 공명 라만 신호를 보였다. MCR 분석은 3차원 데이터 세트(2개의 공간 차원과 1개의 스펙트럼 차원)를

분리하고 데이터 세트에서 3개의 폴리머닷의 상대 농도 프로파일을 계산한다. 3개의 스펙트럼 구성 요소는 실험 스펙트럼과 잘 일치했으며(도 7d) 결과 다색 이미지(도 7b-c)는 라만 스펙트럼이 많이 중첩되었음에도 불구하고 해당 구성 요소로 성공적으로 서로 다른 여러 피크로 분리되었다. 특히, 2개 이상의 폴리머닷이 혼합된 경우에도 각 폴리머닷의 존재를 성공적으로 식별하였다.

[0263] 3개의 폴리머닷을 사용하여 얻은 도트 패턴 샘플의 성공적인 라만 매핑 및 MCR 분석 후, 532nm 여기에서 유사한 공명 라만 산란을 생성할 수 있는 3개의 폴리머닷을 추가로 준비하여 이 전략을 확장했다. 자발 라만 분광기의 광원을 이용하여 여기되었을 때 유효 공명 라만 구조가 다른 형광체는 상기 기술한 전략을 활용하여 라만 다중 분석을 위한 라만 프로브로 확장할 수 있다. 2-(3-옥소2,3-디히드로-1H-벤조[b]시클로펜타[d]티오펜-1-일리덴)-말로노니트릴(ITBT) 또는 1,1-디시아노메틸렌-3-인다논(ITIC) 및 비스(알킬설파닐)메틸렌-치환된 4,9-디하이드로-s-인다세노[1,2-b:5,6-b']디티오펜 기반 구조(IDIC)는 532 nm 여기로 라만 지문 영역에서 강한 공명 라만 신호를 생성했다(도 8a). 532nm에서의 상당한 흡수로 인해 전자 공명에 의한 상당한 신호 증폭이 가능했다. 동일한 절차를 사용하여 제조된 ITBT/PSMA, ITIC/PSMA 및 IDIC/PSMA 폴리머닷은 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷과 유사하게 제타 전위가 -28 내지 -31mV인 나노입자(28 내지 30nm)를 형성하고 억제된 광발광 양자 수율(PLQY < 3%)로 향상된 공명 라만 신호를 나타낸다. 마지막으로, 6개의 폴리머닷은 구별 가능한 라만 지문 패턴을 보여주었다(도 8a).

[0264] 라만 다중 분석을 위해 6개의 살아있는 COS-7 세포를 6개의 라만 활성 폴리머닷으로 개별적으로 표지하고, 혼합하고, 하나의 플레이트에 다시 플레이팅했다. 표준 라만 분광계를 사용하여 측정된 라만 분석 데이터 결과는 도 8b와 같이 MCR 분석을 통해 처리되었다. 6개의 스펙트럼 구성요소의 계산된 스펙트럼은 6개의 폴리머닷의 실험적으로 수집된 기준 스펙트럼과 잘 일치했다. 공명 라만 활성 폴리머닷과 MCR 분석의 조합은 6개의 서로 다른 레이블이 있는 세포 혼합물에서 각 세포를 성공적으로 구별할 수 있다.

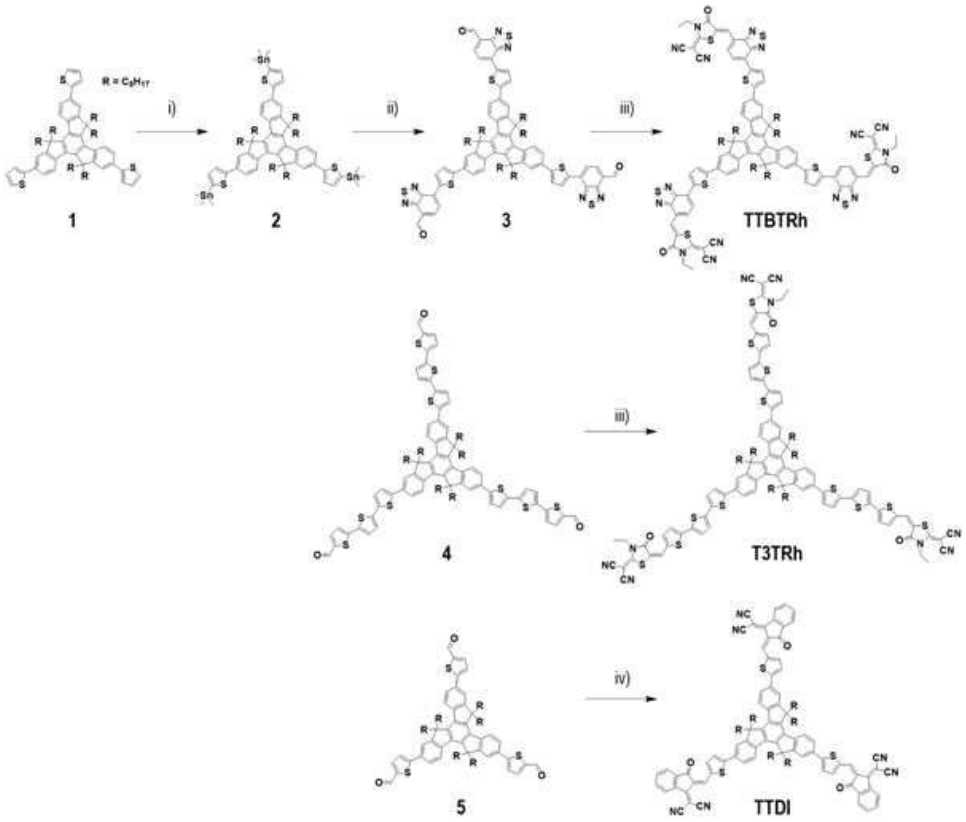
[0265] 공명 라만 활성 폴리머닷은 그 범위를 확장 가능하다. 다양한 라만 스펙트럼을 나타내는 공액 유기 염료의 수는 532nm 근처에서 흡수하는 다양한 공액 구조를 사용하여 더 확장될 수 있다. 또한, 폴리머닷 매트릭스(PSMA)의 말레산 무수물 단위는 카르복실산 그룹으로 가수분해되어 아미드 결합 형성을 통해 분자 특이적 표적화를 위한 표면 기능화를 허용한다.

[0266] 예를 들어, 아민 기능화된 2차 항체(당나귀 항-쥐(Donkey anti-rat))는 커플링 시약인 옥시마(oxyma)-유래 우로늄(uronium)염 (1-시아노-2-에톡시-2-옥소에틸리덴아미노옥시)디메틸아미노-모폴리노-카르베늄 헥사플루오로포스페이트(COMU)의 존재 하에 TTBTRh/PSMA, T3TRh/PSMA 및 TTDI/PSMA 폴리머닷 표면의 카르복실산기와 커플링될 수 있다. 따라서 항체 표지와 같은 표면 변형을 통해 준비된 표적 특이적 폴리머닷은 세포 내 소기관 등에 표지하여 다중 라만 매핑을 실현할 수 있는 우수한 효과를 나타낸다.

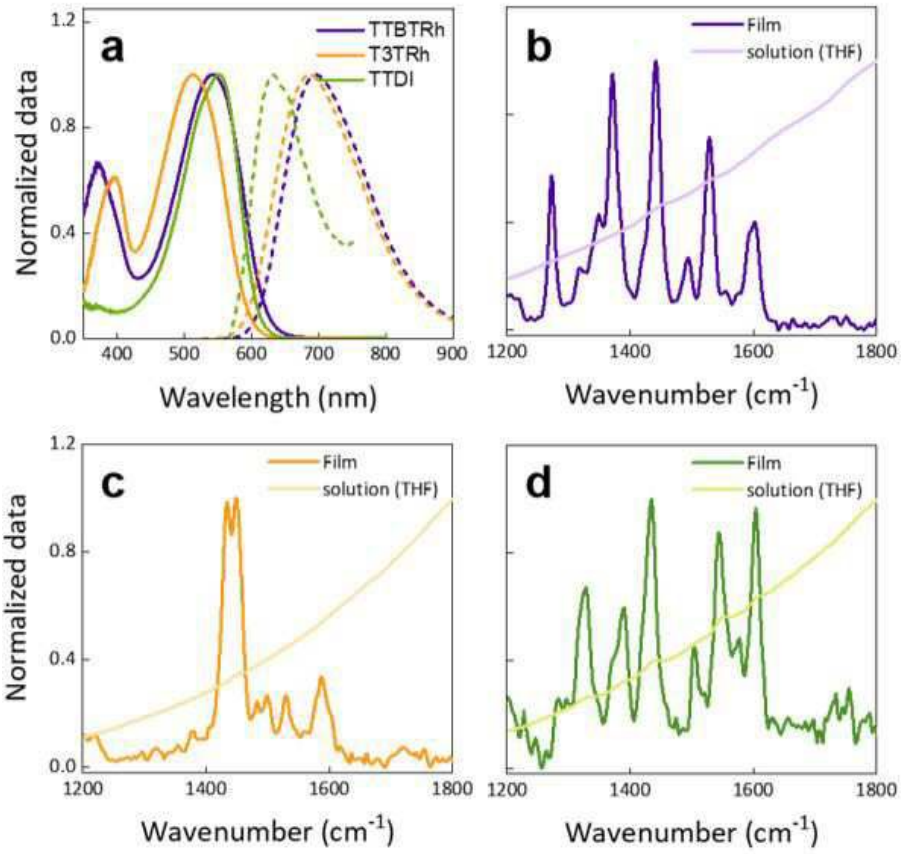
[0267] 이상에서 본 발명의 실시예를 설명하였으나, 본 발명은 다양한 변화와 균등한 범위를 사용할 수 있으며, 상기 실시예를 적절히 변형하여 동일하게 응용할 수 있음이 명확하다. 따라서, 상기 기재 내용은 하기의 특허청구범위에 의해 정해지는 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.

도면

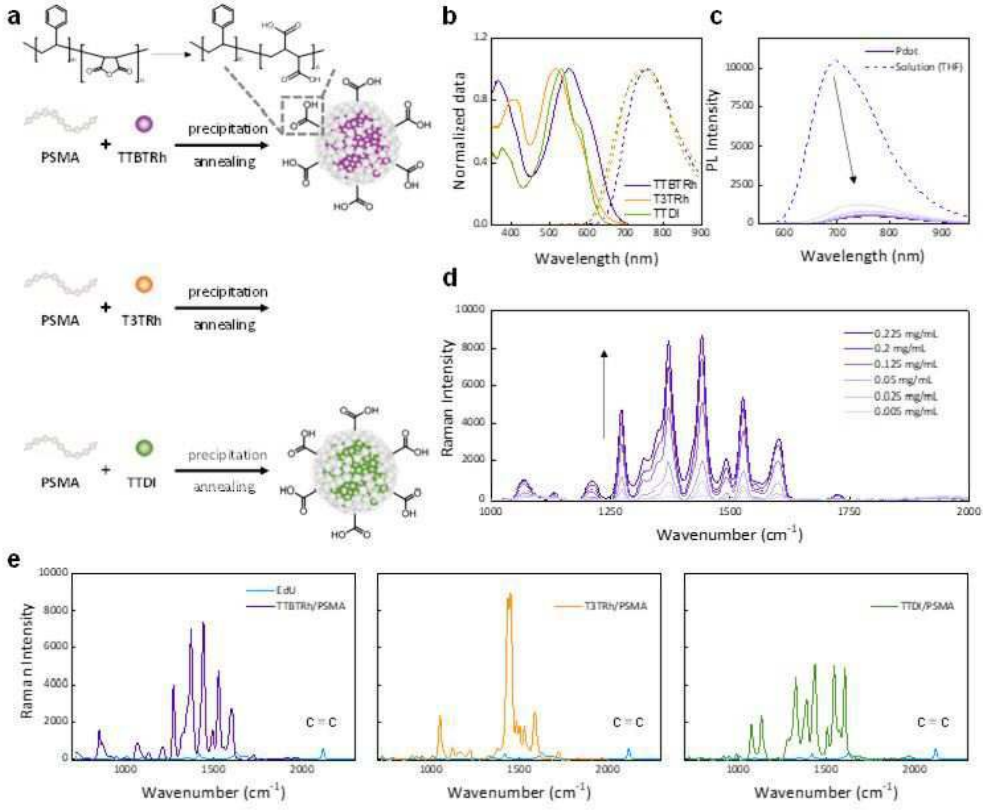
도면1



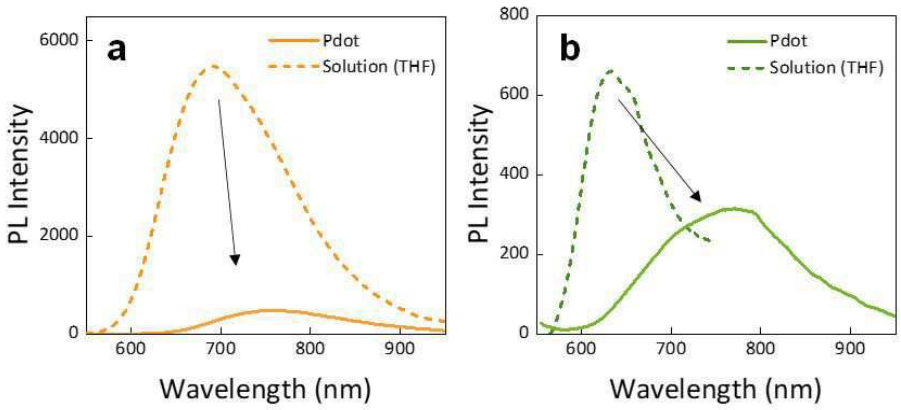
도면2


a
TTBTRh
T3TRh
TTDI
Normalized data
Wavelength (nm)
b
Film
solution (THF)
Wavenumber (cm-1)
c
Film
solution (THF)
Normalized data
Wavenumber (cm-1)
d
Film
solution (THF)
Wavenumber (cm-1)

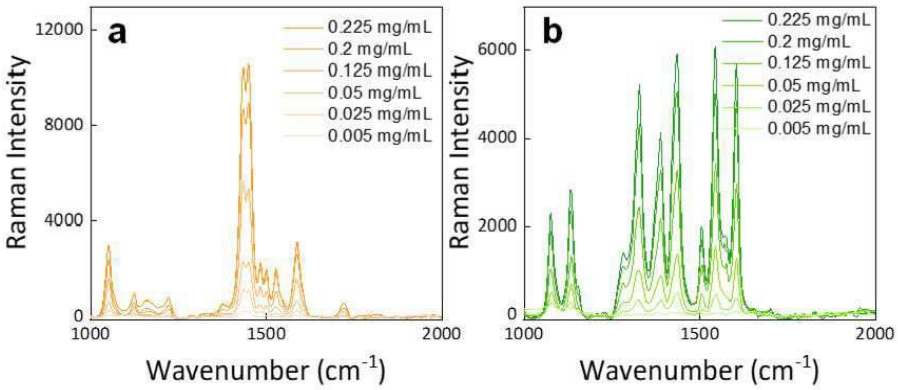
도면3


a
PSMA
TTBTRh
precipitation
annealing
PSMA
T3TRh
precipitation
annealing
PSMA
TTDI
precipitation
annealing
b
Normalized data
TTBTRh
T3TRh
TTDI
Wavelength (nm)
c
Pdot
Solution (THF)
PL Intensity
Wavelength (nm)
d
Raman Intensity
0.225 mg/mL
0.2 mg/mL
0.125 mg/mL
0.05 mg/mL
0.025 mg/mL
0.005 mg/mL
Wavenumber (cm-1)
e
Raman Intensity
EdU
TTBTRh/PSMA
C=C
Wavenumber (cm-1)
T3TRh/PSMA
C=C
Wavenumber (cm-1)
TTDI/PSMA
C=C
Wavenumber (cm-1)

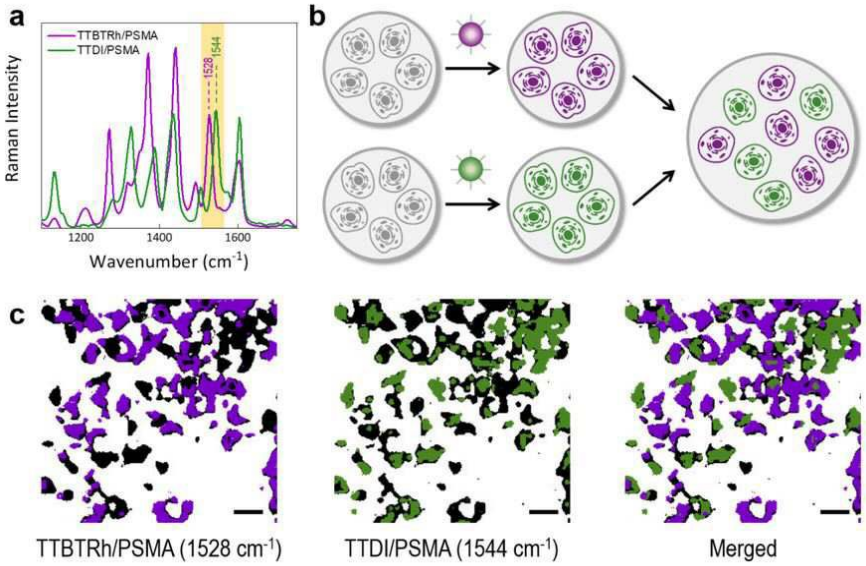
도면4


a
Pdot
Solution (THF)
PL Intensity
Wavelength (nm)
b
Pdot
Solution (THF)
PL Intensity
Wavelength (nm)

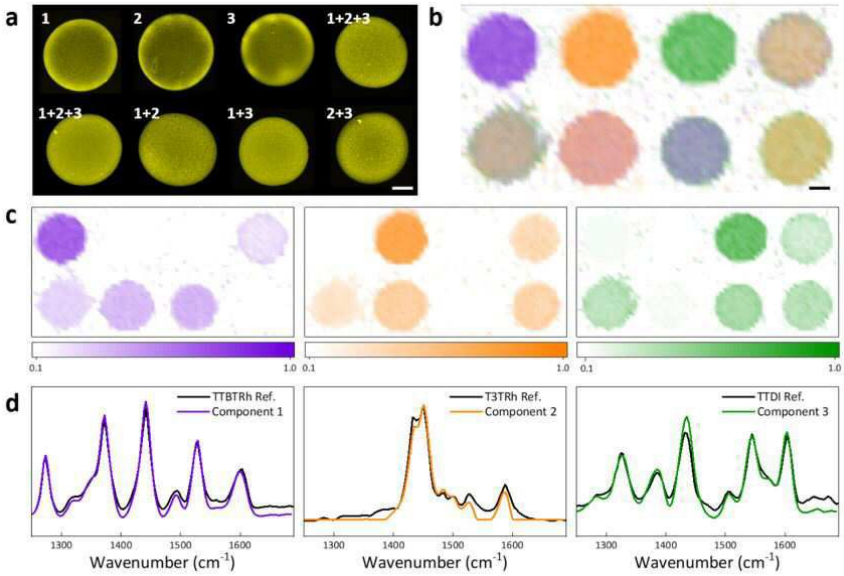
도면5


a
0.225 mg/mL
0.2 mg/mL
0.125 mg/mL
0.05 mg/mL
0.025 mg/mL
0.005 mg/mL
Raman Intensity
Wavenumber (cm-1)
b
0.225 mg/mL
0.2 mg/mL
0.125 mg/mL
0.05 mg/mL
0.025 mg/mL
0.005 mg/mL
Raman Intensity
Wavenumber (cm-1)

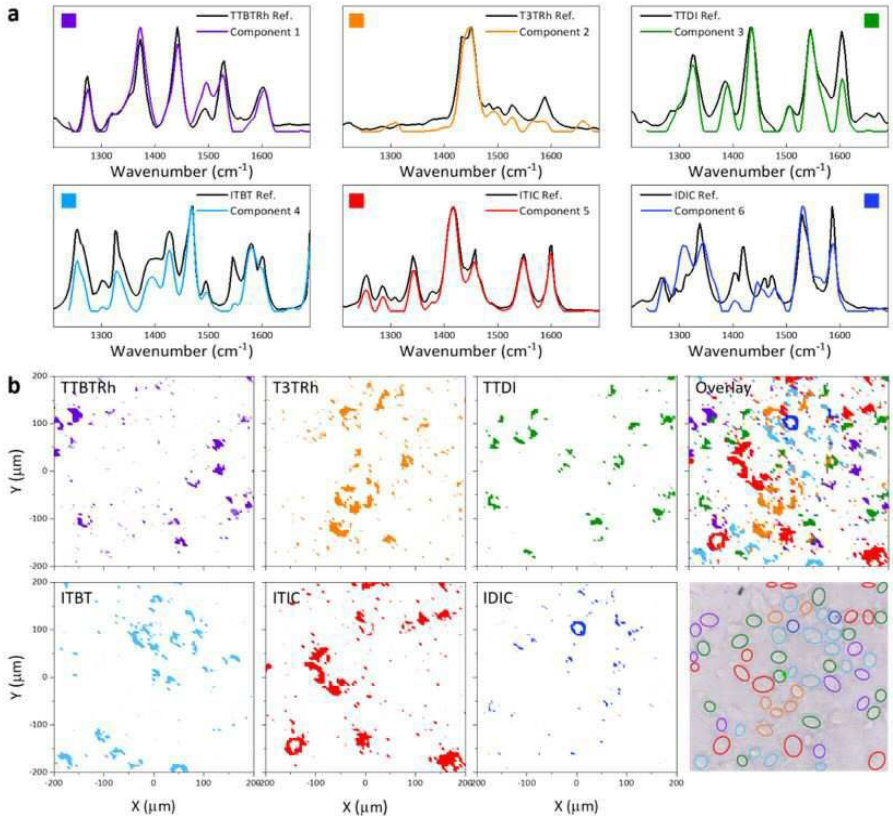
도면6


a
TTBTRh/PSMA
TTDI/PSMA
1528
1544
Raman Intensity
Wavenumber (cm-1)
b
c
TTBTRh/PSMA (1528 cm-1)
TTDI/PSMA (1544 cm-1)
Merged

도면7


a
1
2
3
1+2+3
1+2+3
1+2
1+3
2+3
b
c
0.1
1.0
d
TTBTRh Ref.
Component 1
T3TRh Ref.
Component 2
TTDI Ref.
Component 3
1300
1400
1500
1600
Wavenumber (cm-1)

도면8


a
TTBTRh Ref.
Component 1
T3TRh Ref.
Component 2
TTDI Ref.
Component 3
ITBT Ref.
Component 4
ITIC Ref.
Component 5
IDIC Ref.
Component 6
1300
1400
1500
1600
Wavenumber (cm-1)
b
TTBTRh
T3TRh
TTDI
Overlay
ITBT
ITIC
IDIC
Y (μm)
X (μm)
200
100
0
-100
-200