



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0085270
(43) 공개일자 2011년07월27일

(51) Int. Cl.

G01N 33/52 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0004954

(22) 출원일자 2010년01월19일

심사청구일자 2011년01월10일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

조봉래

서울 송파구 송파동 151 한양아파트 23동 207호

(74) 대리인

특허법인충현

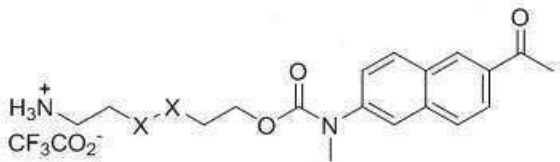
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 생체 세포 및 조직에서 티올을 검출하기 위한 이광자 형광 프로브

(57) 요약

본 발명의 이광자 형광 프로브는 리포터(reporter)로 2-메틸아미노-6-아세틸나프탈렌을 포함하고, 티올 반응 사이트로 이황화그룹을 포함하며, 하기의 화학식 1로 표시될 수 있다.

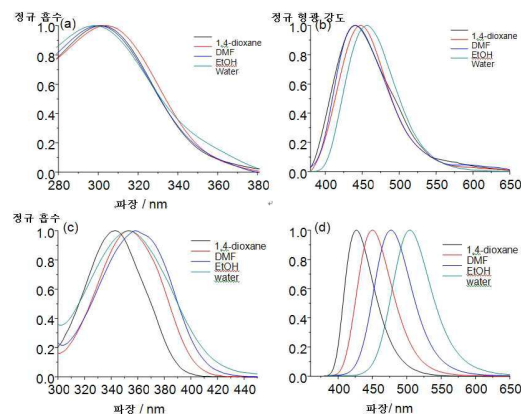
화학식 1



(화학식에서 X = S(황))

본 발명에 따른 티올 감지용 이광자 프로브는 생체 세포 및 생체 조직 내 90 내지 180 μ m 깊이에 존재하는 티올을 높은 선택성으로 감지할 수 있다. 또한, 종래의 프로브들에 비하여 형광 강도가 약 10배 증가되고, pH에 대한 의존성이 낮으므로 티올 감지를 위한 프로브로서 적용 범위가 매우 넓다.

대표도 - 도1

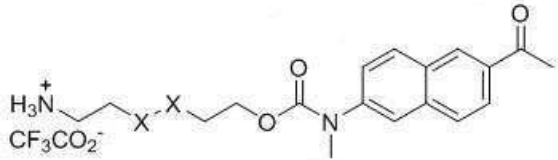


특허청구의 범위

청구항 1

하기의 화학식 1로 표시되는 티올의 검출을 위한 이광자 프로브.

화학식 1

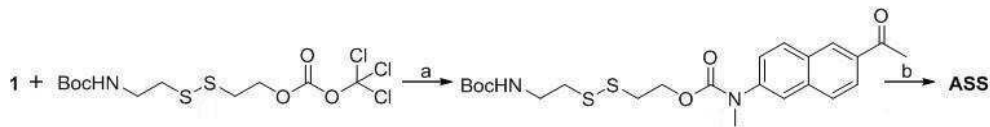


(화학식에서 X = S(황))

청구항 2

하기의 반응식 1에 의하여 제1항의 이광자 프로브를 제조하는 방법:

반응식 1



(상기 식에서, 1은 , a: 피리딘, 디메틸포름아미드, 4-디메틸아민피리딘, b: 트리플루오로아세트 에시드, 디클로로메탄)

청구항 3

제1항의 이광자 프로브를 이용하여 생체 세포 또는 생체 조직에서 티올을 검출하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

티올이 감지되는 생체 세포 또는 생체 조직의 깊이는 90 내지 180 μ m인 것을 특징으로 하는 생체 세포 또는 생체 조직에서 티올을 검출하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

생체 세포는 헬마 세포 또는 쥐 해마 세포인 것을 특징으로 하는 생체 세포 또는 생체 조직에서 티올을 검출하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서,

생체 조직은 미토콘드리아 또는 핵인 것을 특징으로 하는 생체 세포 또는 생체 조직에서 티올을 검출하는 방법.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 생체 세포 및 조직에서 티올을 검출하기 위한 이광자 형광 프로브에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 티올(thiols)은 시스테인(Cysteine: Cys)과 글루타티온(glutathione:GSH)과 같은 많은 아미노 산과 펩티드의 성분이다. 글루타티온은 농도가 1 내지 15 mM이 되는 가장 풍부한 세포성 티올이다(참조문헌 1). 글루타티온은 GSSG로 산화되는 과정에서 시토플라즘 단백질(cytoplasmic proteins) 내의 이황화결합을 티올로 환원시키고, 효소 글루타티온 환원제(enzyme glutathione reductase)에 의하여 GSSG로부터 재생산될 수 있다. 건강한 세포 및 조직에서, 전체 글루타티온의 90% 이상이 환원된 형태(GSH)로 존재하고 증가된 GSSG 대 GSH의 비율은 산화적 스트레스에 대한 지시로 간주된다(참조문헌 2). 생체 시스템에서 티올을 검출하기 위한 다양한 형광 프로브들이 개발되어 왔다(참조문헌 3). 이들의 대부분은 티올과 반응하여 강한 발광 생성물을 만드는 형광물질(fluorophore) 및 기능기로 형광염색(fluorescein), 로다민(rhodamine) 또는 녹색 형광 단백질(Green fluorescent protein)을 이용한다. 그러나 단일-광자 현미경(one-photon microscopy: OPM)을 가진 이와 같은 탐침의 사용은 얇은 투과 깊이(<80 μ m)로 인하여 조직 영상화에서 이들의 사용을 제한하는 비교적 짧은 여기 파장(<525nm)을 요구한다.

[0003] 생체 조직 내부에 깊이 위치하는 티올을 검출하기 위하여, 이광자 현미경(two-photon microscopy: TPM)을 사용하는 것이 필수적이다. 여기 원(excitation source)으로 2개의 근적외선 광자를 사용하는 이광자 현미경은 증가된 투과 깊이(약 500 μ m), 국소 여기 및 연장 관찰이 가능하고 이로 인하여 조직 영상화가 허용된다는 이점을 가진다(참조문헌 4). 최근 8-옥소-아세나프토 피롤(8-oxo-acenaphthopyrrole) 유도체로 표시된 세포의 이광자 현미경 이미지가 보고되었다. 이러한 탐침은 시스테인이 첨가될 때 430nm에서 580nm로 λ_{max} 가 변화되고, 호모시스테인(40 당량)이 추가로 첨가될 때 형광의 세기가 75배로 증가되므로, 시각적 변화에 의하여 티올을 감지할 수 있게 한다. 그러나 이광자 단면적이 매우 작아서(약 10GM) 형광원을 여기를 시키기 위하여 높이 레이저 파워(50mV)가 요구된다. 더욱이, 온전한 조직 내부에 깊이 위치하는 티올을 검출할 수 있는 이광자 탐침과 관련된 보고는 존재하지 않는다. 그러므로 본 발명은 리포터(reporter)로 2-메틸아미노-6-아세틸나프탈렌(2-methylamino-6-acetylnaphthalene)을 포함하고, 티올 반응 사이트로 이황화 그룹(disulfide group)을 포함하는 이광자 프로브에 대하여 개시한다. 본 발명에 따른 이광자 프로브는 90 내지 180 μ m 깊이에서 생체 세포 및 생체 조직에 있는 티올을 감지할 수 있어 합성과 생물학적 이미지 응용에 적용될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명이 해결하고자 하는 첫 번째 과제는 생체 세포 및 생체 조직에 있는 티올을 효과적으로 감지할 수 있는 이광자 프로브를 제공하는 것이다.

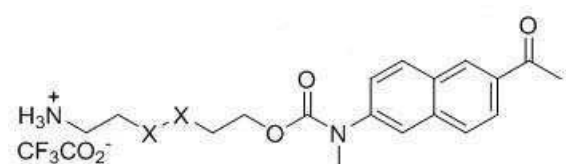
[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 두 번째 과제는 상기 이광자 프로브의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 세 번째 과제는 상기 이광자 프로브를 이용하여 티올을 검출하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여, 하기의 화학식 1로 표시되는 티올의 검출을 위한 이광자 프로브를 제공한다.

[0008] 화학식 1



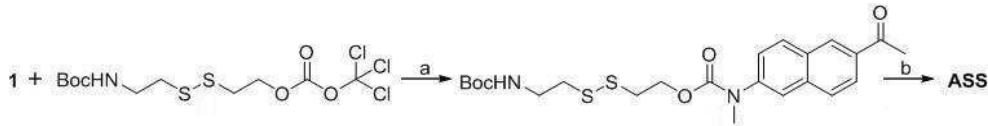
[0009]

[0010] (화학식에서 X = S(황))

[0011] 본 발명은 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 하기의 반응식 1에 의하여 제조되는 제1항의 이광자 프로브의 제조방법을 제공한다.

[0012] 반응식 1

[0013]



[0014] (1: , a: 피리딘, 디메틸포름아미드, 4-디메틸아민피리딘, b: 트리플루오로아세트 에시드, 디클로로메탄)

[0015] 본 발명은 상기 세 번째 과제를 해결하기 위하여, 상기 이광자 프로브를 이용하여 생체 세포 또는 생체 조직에서 티올을 감지하는 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 티올이 감지되는 생체 세포 또는 생체 조직의 깊이는 90 내지 180 μ m인 것이 바람직하다.

[0017] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 생체 세포는 헬마 세포 또는 쥐 해마 세포일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 생체 조직은 미토콘드리아 또는 핵일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 티올 감지용 이광자 프로브는 생체 세포 및 생체 조직 내 90 내지 180 μ m 깊이에 존재하는 티올을 높은 선택성으로 감지할 수 있다. 또한, 종래의 프로브들에 비하여 형광 강도가 약 10배 증가되고, pH에 대한 의존성이 낮으므로 티올 감지를 위한 프로브로서 적용 범위가 매우 넓다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1의 (a), (b), (c) 및 (d)는 1,4-디옥산, DMF, EtOH 및 H₂O의 ASS(a, c)와 화합물1(b, d)의 정규 흡수(Normalized absorbption) 및 방출 스펙트럼(emission)을 각각 도시한 것이다.

도 2는 다양한 용액(Solvent)에서 ASS와 화합물1의 광물리적 성질을 요약한 것이다.

도 3의 (a), (b) 및 (c)는 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μ M)와 2-아미노에탄티올(10 mM)의 반응에 대한 시간의 경과에 따른 이광자 형광 강도(two-photon fluorescence intensity)의 변화를, 단일- 및 이광자 과정에 대한 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μ M)와 2-아미노에탄티올(10 mM)의 반응에 대한 $\ln(F_{\infty}-F)$ 대 시간에 대한 도표를 그리고 MOPS 버퍼에서 ASS(μ M)과 다양한 2-아미노에탄티올 농도(10-100 mM)의 반응에 대한 $\ln(F_{\infty}-F)$ 대 시간에 대한 도표를 각각 도시한 것이다.

도 4의 (a), (b) 및 (c)는 ASS, 화합물 1 및 ASS와 2-아미노에탄티올 사이이 반응생성물에 대한 HPLC 궤적(traces)을 도시한 것이다.

도 5의 (a), (b), (c) 및 (d)는 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μ M)와 2-AET(10 mM)의 반응에 대한 시간의 경과에 따른 단일-광자 형광 강도의 변화를, k_{obs} 대 (2-AET) 농도에 대한 도표를, GSH, Cys, DTT, 2-ME 및 2-AET를 향한 ASS의 형광 반응을 그리고 MOPS 버퍼에서 ASS, ASS+2-AET 및 화합물1의 2-광자 여기 스펙트럼을 각각 도시한 것이다.

도 6은 GSH 및 다른 분석물(analytes)에 대한 ASS의 형광 반응을 나타낸 것이다.

도 7은 ASS(검은색 사각형)와 MOPS 버퍼에서 ASS와 2아미노에탄티올 사이의 반응생성물(흰색 원)의 단일-광자 형광 강도에 대한 pH의 효과를 도시한 것이다.

도 8a는 ASS(3 μ M)로 배양된 HeLa 세포의 TPM(a 내지 c) 및 밝은 영역(d)를 각각 도시한 것이다.

도 8b는 3 μ M ASS로 표시된 HeLa 세포의 밝은 영역 및 TMP 이미지를 각각 도시한 것이다.

도 9는 ASS(3 μ M), 미토틱렉커(1 μ M) 및 Hoechst(1 μ M)으로 함께 표시된 HeLa 세포의 TPM 및 OPM 이미지를 각각 도시한 것이다.

도 10은 약 120 μ m의 깊이에서 20 μ M ASS로 염색된 신선한 쥐 해마 조각의 밝은 영역 및 TPM 이미지를 도시한 것이다.

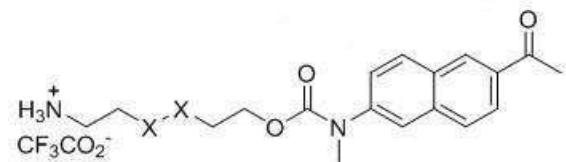
도 11은 20 μ M ASS로 염색된 신선한 쥐 해마 조각의 TMP 이미지를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

본 발명의 이광자 형광 프로브는 리포터(reporter)로 2-메틸아미노-6-아세틸나프탈렌을 포함하고, 티올 반응 사이트로 이황화화합물을 포함하며, 하기의 화학식 1로 표시될 수 있다.

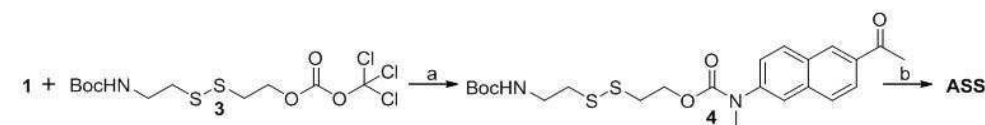
화학식 1



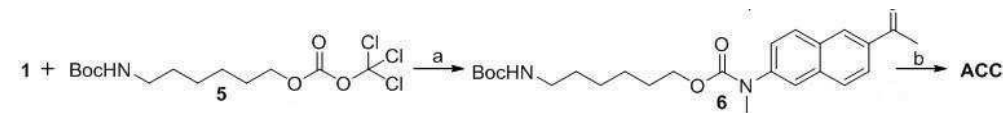
(화학식에서 X = S(황))

본 발명에 따른 이광자 프로브(ACC)는 아래와 같은 반응식 1로부터 합성될 수 있고 대비되는 프로브(ACC)는 반응식 2에 제시된 과정을 통하여 합성될 수 있다.

반응식 1



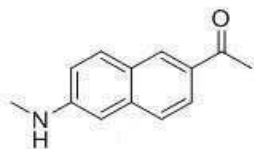
반응식 2



반응식 1 및 반응식 2에서 1 내지 6으로 표시된 것은 화합물 1 내지 화합물 6을 나타낸다. 화합물 1은 2-메틸아미노-6-아세틸나프탈렌을 나타내고 ASS 또는 ACC는 이광자 프로브를 의미한다. 또한 a는 피리딘(pyridine), 디메틸포름아미드(dimethylformamide, DMF) 및 4-디메틸아민피리딘(4-dimethylaminepyridine, DMAP)이고, b는 트리플루오로아세트 에시드(trifluoroacetic acid, TFA) 및 디클로로메탄(dichloromethane, CH_2Cl_2)이다.

[0033] 화합물 1은 아래와 같은 화학식 2로 표시된다.

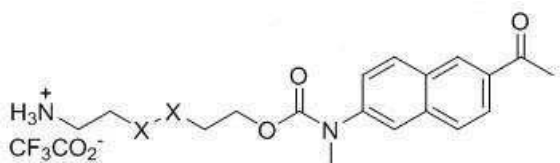
[0034] 화학식 2



[0035]

[0036] 반응식 1 및 반응식 2의 생성물은 아래와 같은 화학식 2로 표시된다.

[0037] 화학식 2



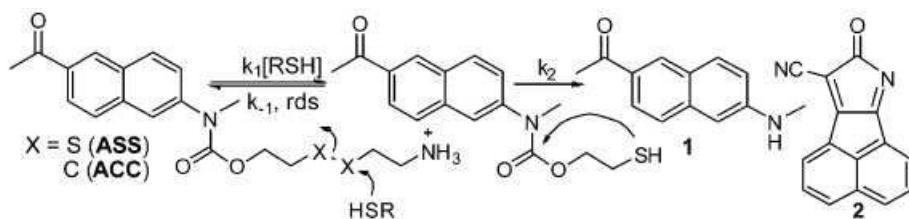
[0038]

[0039] 화학식 2에서 $X = S$ (황)가 되면 본 발명에 따른 이광자 프로브(ASS)가 되고 그리고 $X = C$ (탄소)가 되면 본 발명과 대조 이광자 프로브(ACC)가 된다. 본 발명에 따른 이광자 프로브는 $X = S$ 가 되는 이황화 그룹(disulfide group)을 가지는 것을 특징으로 한다.

[0040] 이광자 프로브(ASS, ACC)의 적용 과정에 대하여 설명한다.

[0041] 아래에서 제시된 메커니즘은 ASS, ACC, 화합물 1 및 화합물 2의 구조와 ASS의 티올-유도 산화의 메커니즘을 나타낸 것이다.

[0042] 메커니즘



[0043]

[0044] 아래에서 제시된 메커니즘에 대하여 구체적으로 설명한다.

[0045] 도 1의 (a), (b), (c) 및 (d)는 1,4-디옥산(1,4-dioxane), 디메틸포름아미드(DMF), 에탄올 및 물에서 ASS(a, c)와 화합물 1(b, d)의 정규 흡수도(Normalized absorbption) 및 방출 스펙트럼(emission)을 각각 도시한 것이다. 도 2는 다양한 용매(solvent)에서 ASS와 화합물 1의 광물리적 성질을 요약한 것이다. 방출 스펙트럼은 정규 형광 강도(Normalized fluorescence intensity)로 표시된다. 흡수 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer에 기록되고, 형광 스펙트럼은 1-cm 표준 수정(quartz) 셀을 이용하여 Amico-Bowman series 2 luminescence spectrometer으로 얻어졌다. 형광 광자 효율(fluorescence quantum yield)은 Demas, J. N.; Crosby, G. A. *J. Phys. Chem.* 1971, 75, 991에 개시된 방법에 따라 쿠머린 307(coumarin 307) 및 로다민 B(rhodamine B)를 사용하여 결정된다. 도 2에서 [a]에서 괄호 안의 숫자는 Reichardt, C. *Chem. Rev.* 1994, 94, 2319-2358에 개시된 것처럼 용액 극성의 정규 실험 매개 변수를 나타내고, [b]의 단일-광자 흡수 및 방출 스펙트럼은 nm 단위로 나타낸 것이고, [c]는 형광 광자 생성물을 나타낸 것이다. 오차 범위는 15%가 된다.

- [0046] 형광 방법에 의하여 결정된 ASS의 물에 대한 용해도는 4.0 내지 8.0 μM 이 되고 바람직하게 5.0 내지 7.0 μM 그리고 가장 바람직하게 6.0 μM 가 되고 이는 셀을 염색하기에 충분하다. ASS의 흡수 및 발광 스펙트럼은 용액 극성에 감지되지 않은 반면 화합물 1에 대한 흡수 및 발광 스펙트럼들은 1,4-디옥산<에탄올<물의 순서대로 큰 적색 천이를 나타냈다(도 1의 b와 c 그리고 도 2 참조). 효과는 흡수 스펙트럼(12nm)에 비하여 발광 스펙트럼(76 nm)이 더 크게 나타나고, 이로 인하여 극성 검출로 화합물 1의 유용성이 나타났다.
- [0047] 도 3의 (a), (b) 및 (c)는 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μM)와 2-아미노에탄티올(2-aminoethanethiol, 10mM)의 반응에 대한 시간의 경과에 따른 이광자 형광 강도(two-photon fluorescence intensity)의 변화를, 단일 및 이광자 과정에 대한 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μM)와 2-아미노에탄티올(10mM)의 반응에 대한 $\ln(F_{\infty}-F)$ 대 시간에 대한 도표를 그리고 MOPS 버퍼에서 ASS(μM)과 다양한 2-아미노에탄티올 농도(10-100 mM)의 반응에 대한 $\ln(F_{\infty}-F)$ 대 시간에 대한 도표를 각각 도시한 것이다.
- [0048] 도 4의 (a), (b) 및 (c)는 ASS, 화합물 1 및 ASS와 2-아미노에탄티올 사이이 반응생성물에 대한 HPLC 궤적(traces)을 도시한 것이다. HPLC 조건은 1.0 mL/min 유동 속도, 20분에 걸쳐 5%A 내지 90%A 및 307nm에서 검출가 된다. 용액 A는 0.1% TFA를 포함하는 아세토니트릴(acetonitrile) 그리고 용액 B는 0.1% TFA를 포함하는 물이 된다.
- [0049] 도 5의 (a), (b), (c) 및 (d)는 MOPS 버퍼에서 ASS(5 μM)와 2-AET(10mM)의 반응에 대한 시간의 경과에 따른 단일-광자 형광 강도의 변화를, k_{obs} 대 (2-AET) 농도에 대한 도표를, GSH, Cys, DTT, 2-ME 및 2-AET에 대한 ASS의 형광 반응을 그리고 MOPS 버퍼에서 ASS, ASS+2-AET 및 화합물 1의 이광자 여기 스펙트럼을 각각 도시한 것이다. (c)에서 흰색 및 검은 색 막대는 각각 티올의 첨가 전 및 티올을 첨가 후 1시간이 되는 시점에서 ASS의 형광 강도를 나타낸다.
- [0050] 도 6은 MOPS 버퍼에서 GSH 및 다른 분석물(analytes)에 대한 ASS의 형광 반응을 나타낸 것이다. 다른 분석물은 30당량, 1, Ca^{2+} 2, K^{+} 3, Na^{+} 4, Fe^{3+} 5, Zn^{2+} 6, Mg^{2+} 7, Glu 8, Ser 9, Val 10, Met 11, Ala 12, Ile 13, H_2O_2 14, GSH이 되고 흰색 및 검은 색 막대는 GSH의 첨가 전 및 첨가 후 3시간이 경과한 때에 다양한 분석물에 존재에서 ASS(5 μM)의 형광 강도를 나타낸 것이다.
- [0051] 도 7은 ASS(검은색 사각형)와 MOPS 버퍼에서 ASS와 2-아미노에탄티올 사이의 반응생성물(흰색 원)의 단일-광자 형광 강도에 대한 pH의 효과를 도시한 것이다. ASS(5 μM)와 2-아미노에탄티올(10 mM)의 반응은 상온에서 버퍼 용액(2 mL)에서 2시간 동안 진행되고 여기 파장은 365nm이다.
- [0052] 2-아미노에탄티올(2-AET, 10mM)이 3-(N-모르폴리노)프로판 설포닉 산(MOPS) 버퍼 용액(30mM, 100mM KCl, 10mM EGTA, pH 7.2)의 버퍼 용액에 첨가되는 경우, 단일 및 2-광자 형광 강도가 시간의 경과와 함께 점차적으로 증가되었다(도 5의 (a) 및 도 3의 (a) 참조). 반응은 HPLC 분석에 의하여 밝혀진 것처럼 유일한 생성물로 화합물 1을 만들었다(도 4참조). 더욱이 시간 대 $\ln(F_{\infty}-F)$ 의 도표는 직선이 되었고, 상기에서 F_{∞} 및 F 는 각각 무한대(>10 반감기) 및 주어진 시간에서 측정된 형광 강도를 나타낸다(도 5의 (b), 도 3의 (b)와 (c) 참조). 도표의 기울기는 관측된 유사-1차-속도 상수(pseudo-first-order rate constant: k_{obs})가 된다. k_{obs} 대 (2-AET) 농도에 대한 도표는 원점을 통과하는 직선이 된다. 이와 같은 결과는 반응은 ASS에 대한 2차(second order), 1차(first order) 그리고 2-AET에 대한 1차가 되고 $k_2=2.2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 이 된다는 것을 나타낸다(도 5의 (b) 참조). 그러므로 관측된 결과는 반응구조에서 개략적으로 제시된 것처럼 화합물 1을 제공하기 위한 C-N의 절단에 의하여 후속되는 이황화결합에서 티올의 속도 제한적 개입(rate-limiting attack)에 기인한 것으로 가장 합리적으로 판단될 수 있다.
- [0053] ASS는 GSH, Cys, 디티올테레이톨(dithiothreitol: DTT), 2-메르캅토에탄올(2-mercaptoethanol, 2-ME) 및 2-AET에 강한 반응을 보이고 티올 기(glu, ser, val, met, ala, ile), 금속 이온(Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+}) 및 H_2O_2 에 대하여 무시할 수 있는 반응을 보이고(도 5의 (c) 및 도 6참조) 그리고 생물학적 관련 pH에 영향을 받지 않는 pH가 되었다(도 7참조). 그러므로 이러한 탐침은 다른 생물학적 관련 분석물(analytes) 및 pH로부터 간섭이 없이 세포 내 티올을 검출할 수 있다.
- [0054] ASS의 TP 작동 스펙트럼 및 MOPS 버퍼 용액 내에서 ASS와 2-AET 사이의 반응 생성물은 780nm에서 11 및 113 GM의 이광자 작동 단면($\Phi \delta$) 값을 나타내었다. 이는 ASS가 화합물 1로 환원되는 경우 이광자 여기 형광(TPEF)

강도에서 10배 증가를 나타낸다. 예상된 것처럼, 반응 생성물의 2-광자 작동 스펙트럼은 화합물 1의 이광자 작동 스펙트럼과 거의 동일하다. 추가로 화합물 1의 이광자 작동 단면 값은 화합물2의 이광자 작동 단면 값보다 더 큰 11배가 되고, ASS-표지 셀을 위한 TPM은 화합물 2로 염색된 TPM 이미지보다 상당히 밝아야 한다고 예측된다.

[0055] 아래에서 생체 세포에서 티올을 검출하는 ASS의 능력에 대하여 설명된다.

[0056] 도 8a는 ASS(3 μ M)로 배양된 HeLa 세포의 TPM(a 내지 c) 및 밝은 영역(d)을 각각 도시한 것이다. 도 8a에서 (a)는 30분 동안의 이미지를 도시한 것이고, (b)와 (c)는 ASS로 표지되기 전에 1일 동안 리포 산(lipoic acid)(500 μ M)으로 그리고 30분 동안 NEM(100 μ M)으로 선처리(pretreated)된 것을 도시한 것이다. 이광자 여기는 femto second 펄스를 이용하여 780 nm에서 제공되고 스케일 바(scale bars)는 복제 실험(n=5)으로부터 대표적인 이미지를 나타낸다.

[0057] 도 8b는 3 μ M ASS로 표시된 헬라(HeLa) 세포의 밝은 영역 및 TMP 이미지를 각각 도시한 것이다.

[0058] 도 8b에서 (a)는 밝은 영역을 도시한 것이고 그리고 (b) 및 (c)는 TPEF는 360~460nm 및 500~620nm에서 수집된 것을 각각 도시한 것이다. 그리고 도 9의 (d)는 3 μ M ACC로 표시된 헬라 세포의 TPM 이미지를 도시한 것이다. 이광자 여기는 femto-second 펄스를 이용하여 780nm에서 제공되고 도시된 세포는 복제 실험(n=5)로부터 얻어진 대표적인 이미지를 나타내고 스케일 바는 30 μ m가 된다.

[0059] 도 9는 ASS(3 μ M), 미토트랙커(1 μ M) 및 Hoechst(1 μ M)으로 함께 표시된 헬라 세포의 TPM 및 OPM 이미지를 각각 도시한 것이다. 단일 및 이광자 여기를 위한 파장은 514 및 780nm가 되고 스케일 바는 30 μ m가 되고 그리고 도시된 세포는 복제 실험(n=5)으로부터 대표적인 이미지를 나타낸다.

[0060] 도 9에서 (a), (b) 및 (c)는 TPEF가 500~620nm(ASS)에서 수집된 것, 단일광자 형광이 600~660nm(미토트랙커)에서 수집된 것 그리고 450~550nm(Hoechst)에서 수집된 것을 각각 나타내고 (d) 및 (e)는 공영역된 이미지(colocalized images)를 나타낸다.

[0061] 생체 세포에서 티올을 검출하기 위하여 ASS의 능력을 시험되었다. ASS-표지 헬라 세포들의 TPM 이미지는 가정적으로 티올 유도된 산화의 쉬운 로딩(loading) 및 편리한 비율 및 반응 생성물의 현저한 이광자 작동 단면 값으로 인하여 밝았다(도 8a의 (a) 참조). 세포가 α -리포 산으로 1일 동안 미리 배양되어 GSH 생성을 증가시키는 경우(도 8a의 (b) 참조) TPEF 강도는 현저하게 증가하였고 그리고 잘 알려진 티올-차단제인 N-에틸말레이미드(NEM)로 처리되면 급격하게 감소되었다(도 8a의 (c) 참조). 대조적으로, ACC로 표시된 세포로부터 TPEF는 거의 검출되지 않았다(도 8b 참조). 더욱이 밝은 영역 이미지는 세포가 이미지 연구를 통하여 계속 독자적으로 생존하고 있는 것으로 확인된다(도 8a의 (d)참조). 그러므로 ASS는 명확히 생체 세포에서 티올을 검출할 수 있다. 추가로 ASS, 미토트랙커(Mito Tracker) 및 널리 알려진 미토콘드리아와 핵을 위한 광자 형광 검출인 Hoechst 33342(참조문헌9)로 함께 염색된 헬라 세포의 TPM 이미지는 미토콘드리아의 OPM 이미지와 잘 병합이 되었다(도 9의 (e)참조). 이러한 결과는 티올이 미토콘드리아에서 우월적으로 존재한다는 것을 나타낸다.

[0062] 본 발명에 따른 이광자 프로브는 조직 이미징에 적용될 수 있다.

[0063] 도 10은 약 120 μ m의 깊이에서 20 μ M ASS로 염색된 신선한 쥐 해마 조각의 밝은 영역 및 TPM 이미지를 도시한 것이다.

[0064] 도 10에서 (a)는 밝은 영역 그리고 (b)는 TPM 이미지 10 $\times$ 배율, 스케일 바 300 μ m로 적용되었고, (c)는 100 $\times$ 배율, 스케일 바 30 μ m로 약 100 μ m의 깊이에서 CA1 영역의 TPM 이미지를, (d)는 20 μ M ASS로 표지되기 전 NEM(200 μ M)로 선처리가 된 (b)의 TPM 이미지를 각각 나타낸 것이다. TPEF는 femto second 펄스를 이용하여 780nm에서 여기가 되어 500~620 nm에서 수집되었다.

[0065] 도 11은 20 μ M ASS로 염색된 신선한 쥐 해마 조각의 TMP 이미지를 나타낸 것이다.

[0066] 이미지는 10 $\times$ 배율로 90 내지 180 μ m의 깊이에서 얻어졌다. TPEF는 femto second 펄스를 이용하여 780nm에서 여기가 되고 500~620nm에서 수집되었고 스케일 바는 300 μ m가 된다.

[0067] 조직 이미징에서 이러한 탐침의 유용성이 추가로 조사되었다. 밝은 영역 이미지는 치아이랑(dentate gyrus: DG)뿐만 아니라 CA1 및 CA3을 보여준다(도 10의 (a) 참조). 1 μ M의 ASS로 배양된 신선한 쥐 해마(hippocampal) 조각의 일부에 대한 TPM 이미지는 120 μ m 깊이에서 CA1 및 DG 영역이 풍부하다는 것을 보여준다(도 10의 (d)참조). 더 큰 배율에서 이미지는 100 μ m 깊이에 있는 CA1 영역에서 티올 분포를 보여준다(도 10의 (c)참조).

더욱이 90, 120, 150, 및 180 μm 에서 TPM 이미지는 각각의 xy 평면 내 및 z 방향을 따라 티올 분포를 보여준다 (도 11 참조). 추가로 TPEF 강도는 조직 조각이 NEM으로 미리 처리되었을 때(도 10의 (d)참조) 급격하게 감소되었다. 이러한 사실은 ASS가 TPM을 사용할 때 생체 조직에서 90 내지 180 μm 깊이에서 티올을 검출할 수 있다는 것을 보여준다.

[0068] 본 발명의 실시 예에 따른 프로브는 티올에 반응하여 10배로 TPEF 향상을 보여주고, 생물학적 관련 pH에서 pH-영향을 받지 않고 그리고 공지의 프로브와 비교할 때 11배로 우월 강성 TPEF를 방출한다. 그리고 본 발명에 따른 프로브는 다른 생물학 관련 종으로부터 간섭을 받지 않고 90 내지 180 μm 깊이에서 생체 세포 및 생체 조직 내 티올이 검출될 수 있도록 한다는 이점을 가진다.

[0069] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0070] 화합물 1, 화합물 3 및 화합물 5의 제조 공정은 이 분야에서 공지되어 있고 예를 들어 Kim, H. M.; Jung, C.; Kim, B. R.; Jung, S. Y.; Hong J. H.; Ko, Y. G.; Lee, K. J.; Cho, B. R. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 346 b) Pires, M. M. Chmielewski, J. Org. Lett. 2008, 10, 837과 같은 문헌에 개시되어 있다. 상기 문헌은 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0071] 실시예 1(화합물 4의 제조)

[0072] 화합물 4의 제조를 위하여 DMF(5mL) 내에 화합물 3(500mg, 1.6mmol), 피리딘(0.64 mL, 7.9 mmol) 및 화합물 1(630 mg, 3.2 mmol)이 혼합된 용액에 N, N-디메틸아미노피리딘(DMAP)이 촉매량(catalytic amount)으로 첨가되고 그리고 실온에서 14시간 동안 교반이 된다. 용제가 진공에서(in vacuo)에서 제거되고 결과물인 갈색 잔여물은 CH_2Cl_2 에 용해되고 1 %의 HCl(aq)에서 두 번 세척이 된다. 불순물을 포함하는 생성물은 용리액(eluent)으로 헥산/에틸 아세테이트(4:1)을 사용하는 실리카-겔 칼럼 크로마토그래피에 의하여 정제된다. 최종 생성물은 310 mg(41%)가 된다. 제조된 화합물 4는 이광자 프로브에 해당하는 ASS 또는 ACC의 제조를 위하여 사용된다.

[0073] 실시예 1-2(ASS의 제조)

[0074] 화합물4(300 mg, 6.8 mmol)가 암실 조건의 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (1/1, 10 mL)에 용해된다. 용액은 0 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1 시간 동안 교반되고, 실온으로 가열되고, 2시간 동안 교반이 되고 그리고 용매가 진공 상태(in vacuo)에서 제거된다. 잔여물은 MeOH에 용해되어 여과된다. 프리-HPLC를 사용하여, ASS는 10%의 용리액 A(0.1 % TFA를 포함하는 HPLC-등급 MeCN) 및 90 %의 용리액 B(0.1 % TFA를 포함하는 HPLC-등급 물)의 혼합액을 이용하여 정제되고 120분의 시간에 걸쳐 10 mL/min의 흐름 속도로 80 % 용리액 A와 20 %의 용리액 B에 이르는 선형 기울기(linear gradient)를 가지도록 반응 공정이 진행된다. 순수 ASS가 갈색 기름으로 수득이 된다. 최종 생성물은 140 mg(46 %)가 된다.

[0075] 실시예 1-3(화합물 6의 제조)

[0076] 화합물 6은 화합물 3을 대신하여 화합물 5(140 mg, 0.50 mmol)가 사용되는 것을 제외하면 화합물4의 합성 공정과 동일한 공정을 통하여 제조된다. 용리액으로 헥산/에틸 아세테이트(4:1)를 사용하여 실리카-겔 칼럼 크로마토그래피에 의한 정제가 화합물5에 적용된다. 최종 수득율은 90 mg(41%)가 된다.

[0077] 비교예(ACC의 제조)

[0078] ACC는 화합물 4를 대신하여 화합물 6(50 mg, 0.11 mmol)이 사용된다는 것을 제외하면 실시예의 합성 과정과 동일한 공정을 통하여 제조된다. ACC는 위에서 기술한 것과 동일한 과정을 사용하여 프리-HPLC에 의하여 정제된다. 최종 생산물은 32 mg(62%)가 된다.

[0079] 평가예 1-1(화합물 4의 분석)

[0080] 실시예 1-1에 따라 제조된 화합물 4에 대한 IR(KBr), ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz) 및 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz)분석을 수행하였다. IR 피크는 3361, 1714, 1681 cm^{-1} 에서 관찰되었고, ^1H NMR은 δ 8.45 (d, J = 1.9 Hz, 1H) 8.06 (dd, J = 1.9, 8.8 Hz, 1H), 7.96 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.86 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.72(d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.55 (d, J = 1.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 4.41(t, J = 6.6 Hz, 2H), 3.44 (s, 3H), 3.41 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.75 (t, J = 6.6 Hz, 2H), 2.73 (s, 3H), 1.43 (s, 9H)에서 피크가 관찰되었으며, ^{13}C NMR은 δ 198.2, 155.3, 136.8, 136.0, 134.7, 130.7, 130.4, 130.0, 128.4, 125.7, 124.8, 122.9, 120.8, 63.9, 39.3, 38.8, 38.0, 37.4, 28.6, 26.9, 14.4에서 피크가 관찰되었다.

[0081] 평가예 1-2(ASS의 분석)

[0082] 실시예 1-2에 따라 제조된 ASS에 대한 IR(KBr), ^1H NMR(CD_3OD , 300 MHz) 및 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz)분석을 수행하였다. IR 피크는 3442, 1712, 1680 cm^{-1} 에서 관찰되었고, ^1H NMR은 δ 8.60 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 8.04 (dd, J = 2.0 Hz, 8.9 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.9 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 7.60 (dd, J = 2.0 Hz, 8.9 Hz 1H), 4.42 (t, J = 6.5 Hz, 2H) 3.43 (s, 3H), 3.22 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 3.00 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.90 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H)에서 피크가 관찰되었으며, ^{13}C NMR은 δ 199.0, 155.7, 147.8, 143.2, 136.1, 134.6, 130.9, 130.2, 130.1, 128.1, 125.6, 124.1, 123.0, 63.7, 37.8, 36.9, 36.6, 34.2, 29.9, 25.5에서 피크가 관찰되었다.

[0083] 평가예 1-3(화합물 6의 분석)

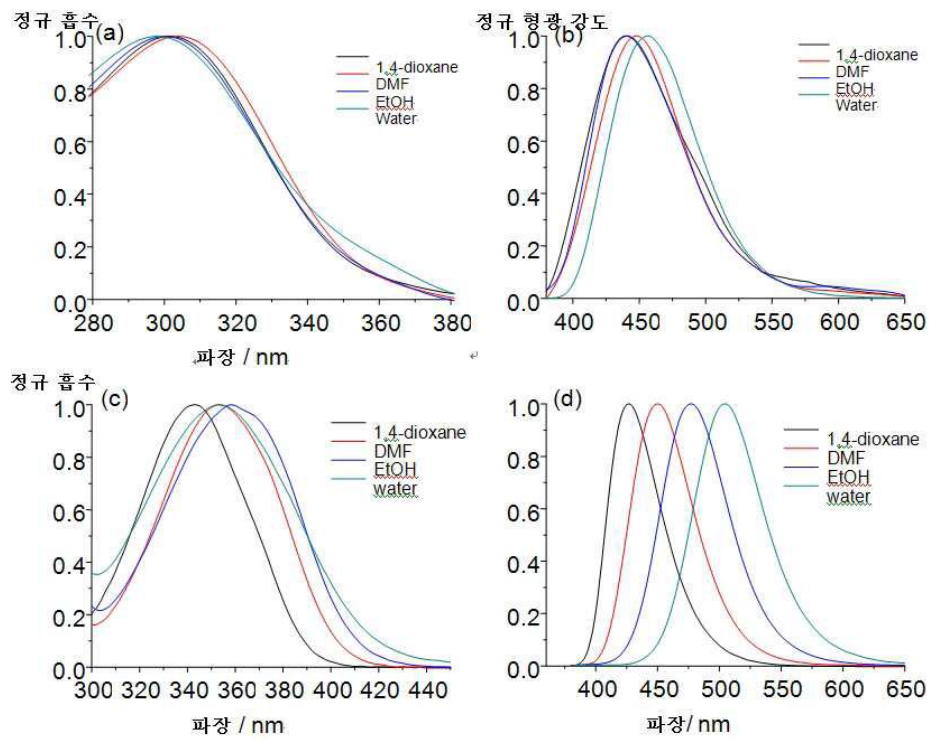
[0084] 실시예 1-2에 따라 제조된 ASS에 대한 IR(KBr), ^1H NMR(CDCl_3 , 300 MHz) 및 ^{13}C NMR(CDCl_3 , 100 MHz)분석을 수행하였다. IR 피크는 3365, 1710, 1680 cm^{-1} 에서 관찰되었고, ^1H NMR은 δ 8.43 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.03 (dd, J = 1.6 Hz, 8.7 Hz 1H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.83 (d, J = 8.7 Hz, 1H), 7.68 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 7.53 (dd, J = 1.6 Hz, 8.7 Hz, 1H), 4.13 (t, J = 6.6 Hz, 2H) 3.41 (s, 3H), 3.06 (t, J = 6.6 Hz 2H), 2.71 (s, 3H), 1.61 (m 4H), 1.42 (s, 9H), 1.30 (m, 4H)에서 피크가 관찰되었으며, ^{13}C NMR은 δ 198.2, 155.8, 143.5, 136.0, 134.5, 130.5, 130.2, 130.1, 128.3, 125.8, 125.1, 124.7, 122.5, 66.2, 40.7, 37.8, 30.2, 29.0, 28.6, 28.3, 27.0, 26.6, 25.8에서 피크가 관찰되었다.

[0085] 평가예 1-4(ACC의 분석)

[0086] 실시예 1-2에 따라 제조된 ASS에 대한 IR(KBr), ^1H NMR(CD_3OD , 300 MHz) 및 ^{13}C NMR(CD_3OD , 100 MHz)분석을 수행하였다. IR 피크는): 3423, 1685, 1677 cm^{-1} 에서 관찰되었고, ^1H NMR은 δ 8.60 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 1H),, 8.05 (dd, J = 1.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.58 (dd, J = 1.9 Hz, 8.8 Hz, 1H), 4.15 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 3.41 (s, 3H), 2.86 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.72 (s, 3H) 1.63 (m, 4H), 1.37 (m, 4H)에서 피크가 관찰되었으며, ^{13}C NMR은 δ 199.0, 156.2, 143.4, 136.2, 134.5, 130.8, 130.1, 128.8, 128.0, 127.5, 125.7, 124.8, 124.1, 65.9, 39.4, 36.8, 28.5, 27.3, 25.8, 25.5, 25.3, 25.1에서 피크가 관찰되었다.

도면

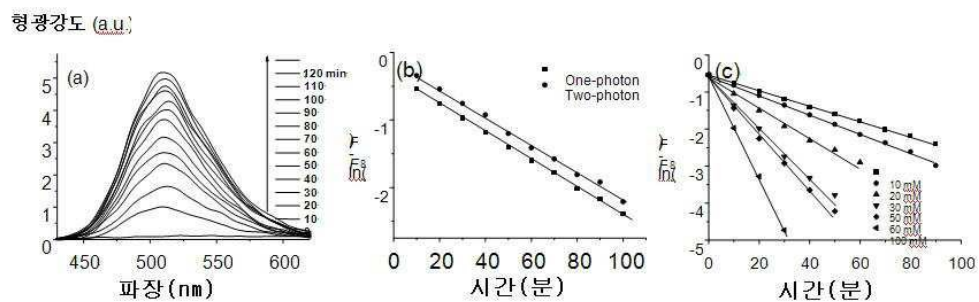
도면1



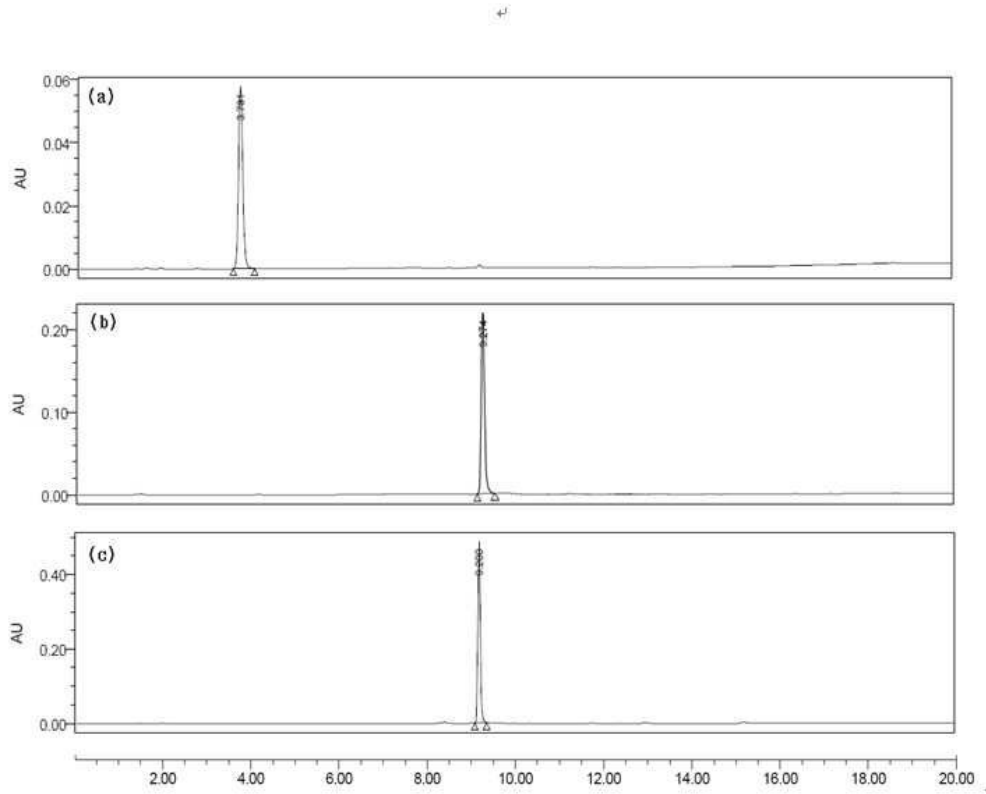
도면2

용매 (E_T^N) ^[a]	$\lambda_{max}^{(l)}$ [b] ¹		λ_{max}^{fl} [b] ²		Φ [c] ³	
	ASS ⁴	1 ⁵	ASS ⁴	1 ⁵	ASS ⁴	1 ⁵
Dioxane (0.164) ⁶	293 ⁷	370 ⁸	448 ⁹	427 ¹⁰	2.0×10^{-3} ¹¹	0.21 ¹²
DMF (0.386) ⁶	305 ⁷	389 ⁸	444 ⁹	450 ¹⁰	3.0×10^{-3} ¹¹	0.49 ¹²
EtOH (0.654) ⁶	307 ⁷	396 ⁸	441 ⁹	477 ¹⁰	6.0×10^{-3} ¹¹	0.44 ¹²
H ₂ O (1.00) ⁶	321 ⁷	382 ⁸	457 ⁹	503 ¹⁰	2.2×10^{-1} ¹¹	0.17 ¹²

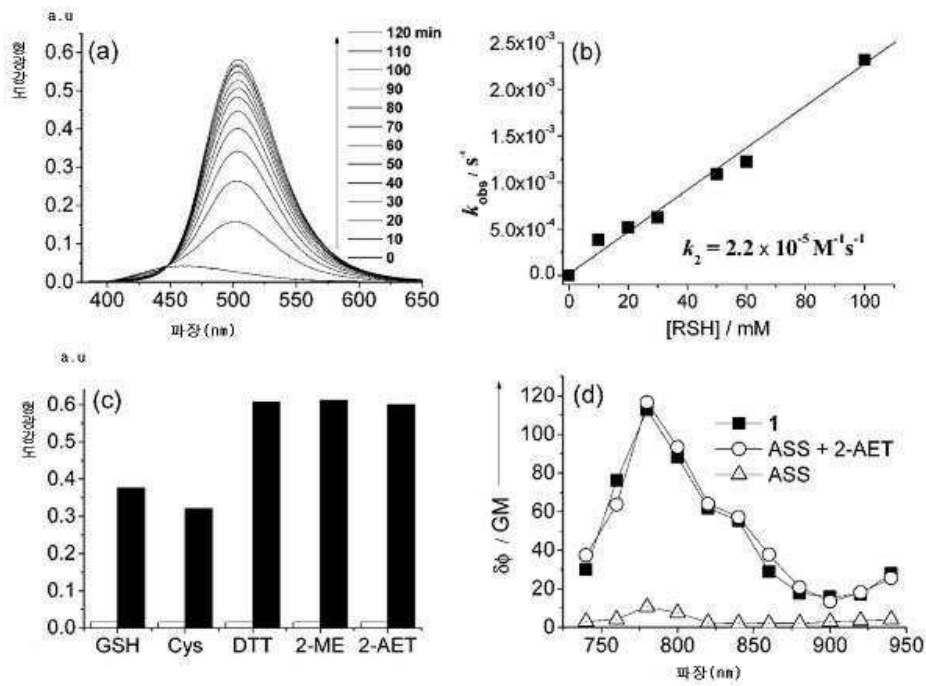
도면3



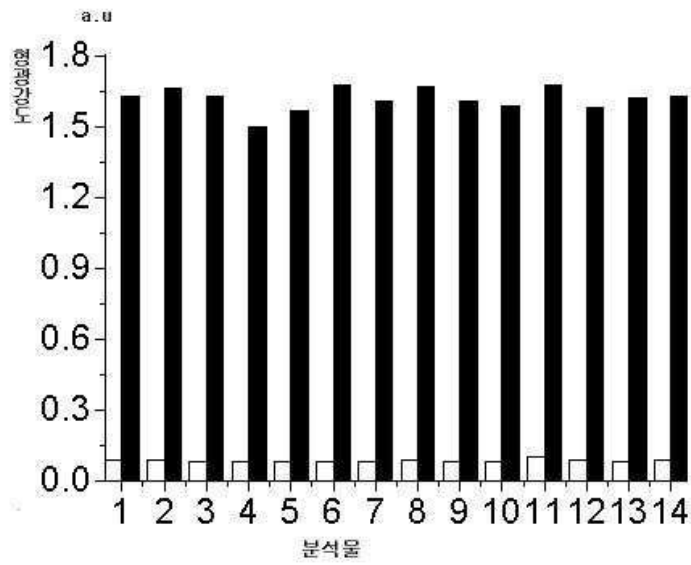
도면4



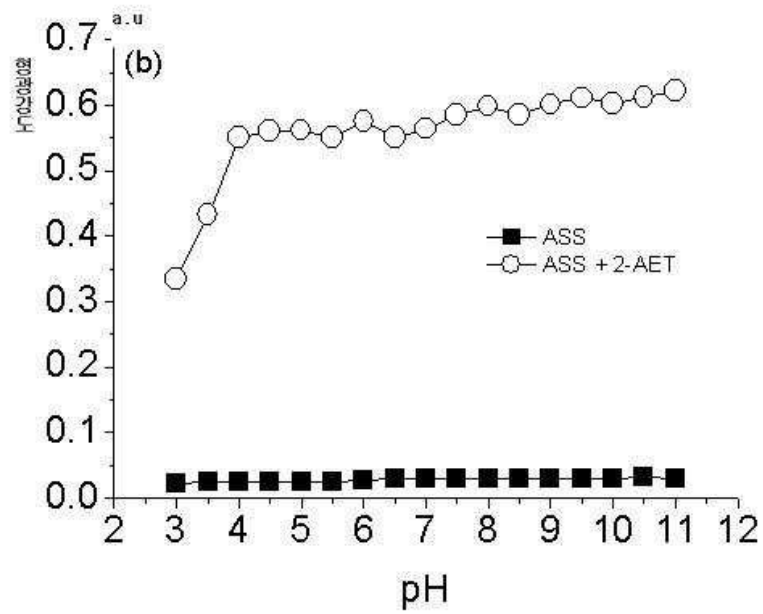
도면5



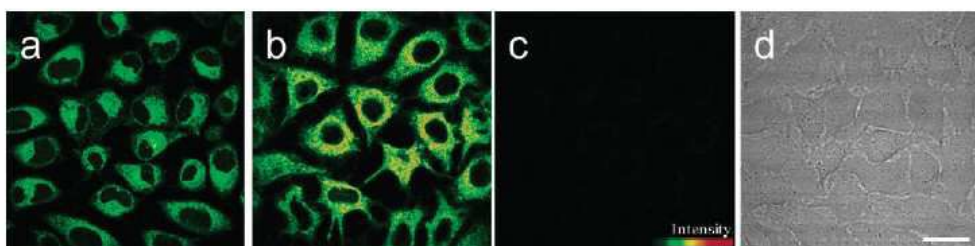
도면6



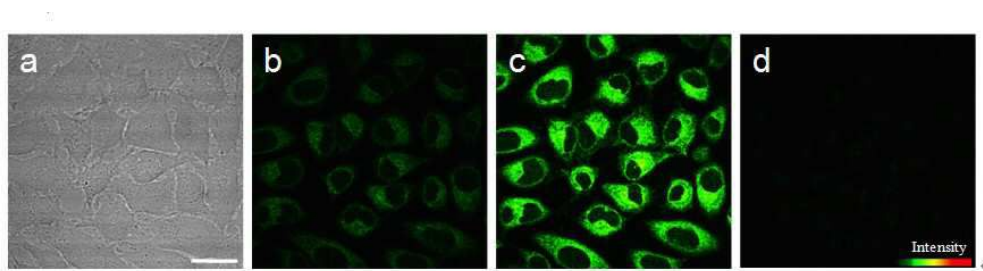
도면7



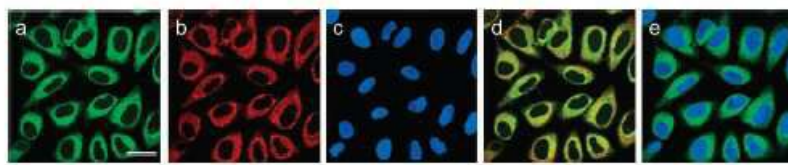
도면8a



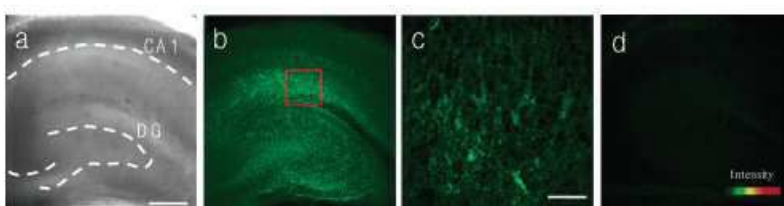
도면8b



도면9



도면10



도면11

