



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0047719

(43) 공개일자 2015년05월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/16 (2006.01) *A61K 51/00* (2006.01)

C12Q 1/02 (2006.01) *C12Q 1/04* (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0127503

(22) 출원일자 2013년10월25일

심사청구일자 2013년10월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

조봉래

서울 성동구 성수일로4길 26, 103동 504호 (성수동2가, 서울숲힐스테이트)

(74) 대리인

특허법인충현

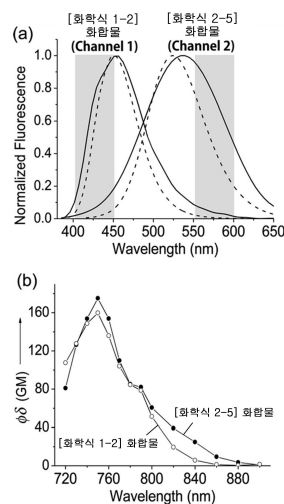
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 조성물 및 이를 이용한 리소좀 및 미토콘드리아의 영상화 방법**

(57) 요약

본 발명은 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용한 리소좀 및 미토콘드리아의 영상화 방법에 관한 것으로, 하기 [화학식 1]의 화합물 및 [화학식 2]의 화합물을 포함함으로써, 서로 다른 파장에서 이광자 여기 형광 인자(TPEF)를 방출하여 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있다.

대표도 - 도1



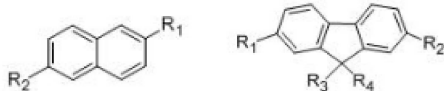
명세서

청구범위

청구항 1

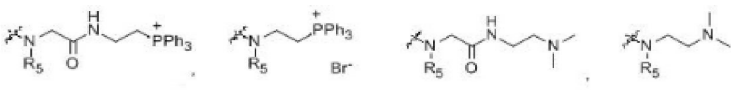
하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물 및 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 포함하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료:

[화학식 1] [화학식 2]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 2]에서,

R₁은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기 중에서 선택되고,

R₂는 , NO₂, NH₂, NHMe 및 NMe₂중에서 선택되며,

상기 R₃는 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기 중에서 선택되고,

R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소 원소가 포함된 탄소사슬기 중에서 선택된다.

청구항 2

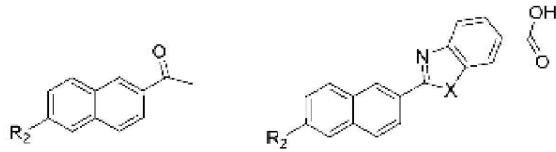
제1항에 있어서,

상기 R₁, R₃ 내지 R₅는 각각 독립적으로 수소, 시아노기, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 아세틸피페라진기, 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기, 금속이 치환된 산소원소기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기 및 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 1종 이상의 치환기로 더 치환되는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료.

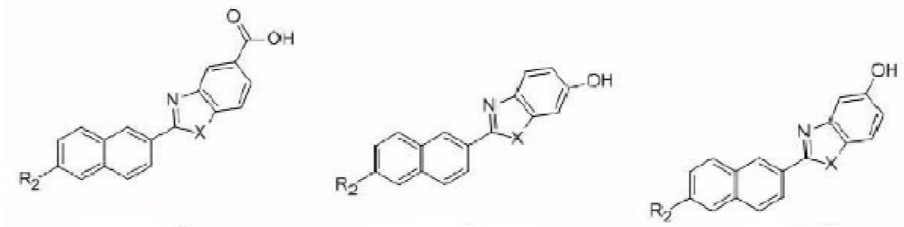
청구항 3

제1항에 있어서,

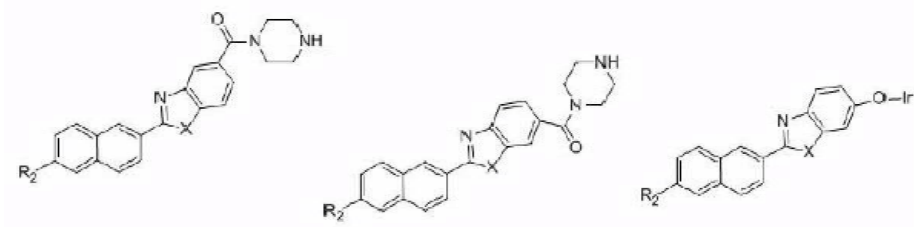
상기 [화학식 1]은 하기 [화학식 3] 내지 [화학식 15]로 표시된 화합물 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료:



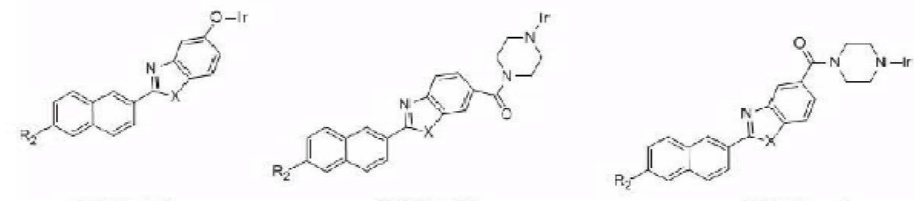
[화학식 3] [화학식 4]



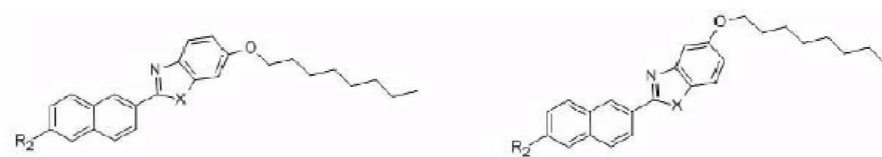
[화학식 5] [화학식 6] [화학식 7]



[화학식 8] [화학식 9] [화학식 10]



[화학식 11] [화학식 12] [화학식 13]



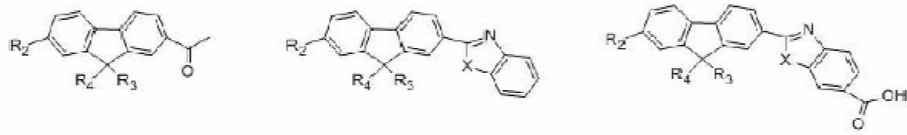
[화학식 14] [화학식 15]

상기 [화학식 3] 내지 [화학식 15]에서, R₂는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하고, X는 O 또는 S이다.

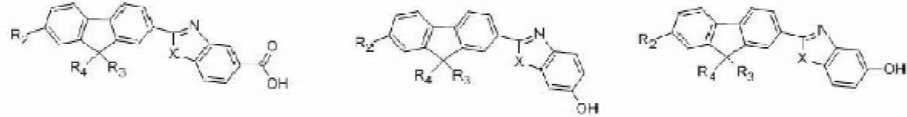
청구항 4

제1항에 있어서,

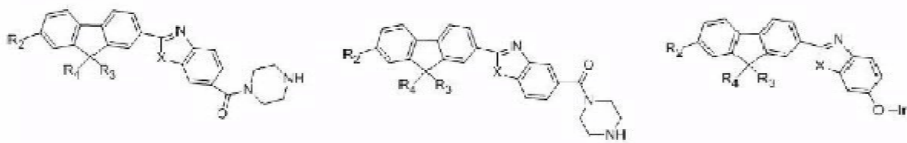
상기 [화학식 2]는 하기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]로 표시된 화합물 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료:



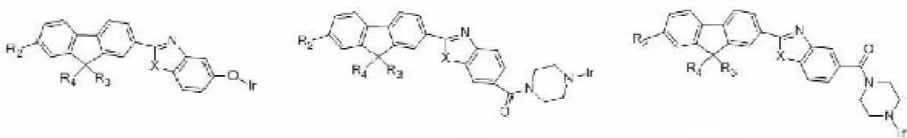
[화학식 16] [화학식 17] [화학식 18]



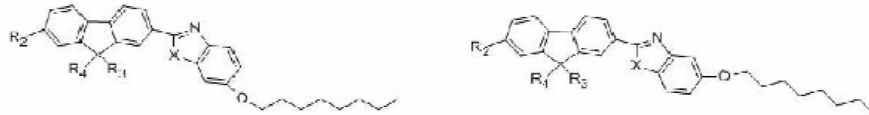
[화학식 19] [화학식 20] [화학식 21]



[화학식 22] [화학식 23] [화학식 24]



[화학식 25] [화학식 26] [화학식 27]



[화학식 28] [화학식 29]

상기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]에서, R_2 , R_3 및 R_4 는 상기 [화학식 2]에서의 정의와 동일하고, X 는 O 또는 S이다.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 각각 400 내지 450 nm 및 550 내지 600 nm 파장대의 빛에 의하여 여기되는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 750 nm의 파장대에서 동시에 158 내지 160 GM 및 173 내지 175 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta_{\max}$)을 갖는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 이광자 형광염료는 80 내지 170 μm 의 투과깊이에서 리소솜 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소솜 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 이광자 형광염료를 관찰 대상이 되는 생체질 내로 주입하는 단계; 및

상기 이광자 형광염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계;를 포함하는 생체 내 리소솜 및 미토콘드리아의 동시 영상화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 서로 다른 파장에서 이광자 여기 형광 인자(TPEF)를 방출하여 리소솜 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있는 이광자 형광염료 및 이를 이용한 리소솜 및 미토콘드리아의 영상화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 리소솜은 산성 세포 소기관으로서, 포유류 세포들의 말단 분해성 부위를 구성한다. 리소솜들은 포식, 식균 및 자가소화 경로를 통하여 거대분자들을 수용하고 분해하며, 다양한 생리 과정에서 중요한 역할을 수행한다.

[0003] 한편, 미토콘드리아는 대부분의 진핵세포에 존재하는 세포성 소기관이다. 미토콘드리아의 주 기능 중 하나는 산화성 인산화이고, 상기 과정을 통하여 포도당 또는 지방산과 같은 연료 물질의 대사로부터 유래되는 에너지가 ATP로 전환되며, 이는 다양한 에너지-요구 생합성 및 다른 대사성 활성을 추진시키는 데 이용된다.

[0004] 현재, 생리적 측면에서 미토콘드리아의 역할을 이해하기 위한 형광염료에 대한 연구는 진행되지 않고 있으나, 리소솜의 역할을 이해하기 위한 다양한 형광염료들은 개발되었다. 이들 중 일부는 상업적으로도 구입가능하다 (Anderson, R. G. W.; Orci, L. J. Cell Biol. 1988, 106, 539; A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed. (Ed.: R. P. Haugland), Molecular Probes, Eugene, OR, 2005).

[0005] 그러나, 이러한 형광염료들을 일광자 현미경법에 사용할 때에는 단파장광($\sim 350\text{--}550\text{ nm}$)으로 여기시켜야 하며, 따라서 얇은 투과 깊이, 광탈색 (photobleaching) 및 세포 자가형광과 같은 문제점들이 발생된다. 이러한 문제점들을 극복하기 위해서는 이광자 현미경법(two-photon microscopy, TPM)에 의해서 생체 세포 및 조직 깊은 곳에서 원하는 물질을 검출할 수 있는 이광자 표지자가 필요하다.

[0006] 이광자 현미경법은 여기를 위해서 낮은 에너지를 갖는 2개의 광자를 사용하며, 장시간 동안 세포 깊은 곳을 온전히 영상화할 수 있는 새로운 기술이다(Helmchen, F.; Denk, W. Nat. Methods 2005, 2, 932; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nat. Biotechnol. 2003, 2, 1369; Kim, H. M.; Cho, B. R. Acc. Chem. Res. 2009, 42, 863.; Kim, H. M.; Cho, B. R. Chem. Asian J. 2011, 6, 58).

[0007] 종래기술로서, 대한민국 공개특허번호 제2010-0000044호는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법을 개시하고 있는데, 이는 세포질에 존재하는 산성 소포체와 선택적으로 결합하여 이광자 여기 형광을 발산하는 이광자 염료에 관한 것이다.

[0008] 이와 같이 종래에는 세포 내의 한 가지 물질을 이광자 현미경법으로 검출할 수 있으나, 두 가지 물질을 동시에 검출하는 방법에 대해서는 연구된바 없다. 따라서, 세포 내의 리소솜 및 미토콘드리아와 동시에 반응할 수 있는 이광자 형광염료에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

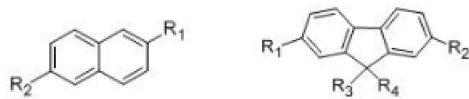
[0009] 본 발명의 목적은 서로 다른 과정에서 이광자 여기 형광 인자(TPEF)를 방출하여 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료를 제공하는데 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료를 이용하여 리소좀 및 미토콘드리아를 영상화하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 [화학적식 1]로 표시되는 화합물 및 [화학적식 2]로 표시되는 화합물을 포함하는 이광자 형광염료를 제공한다.

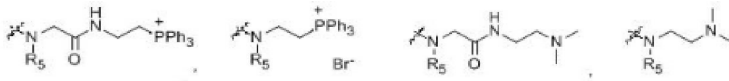
[0012] [화학적식 1] [화학적식 2]



[0013]

[0014] 상기 [화학적식 1] 내지 [화학적식 2]에서,

[0015] R₁은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기 중에서 선택된다.

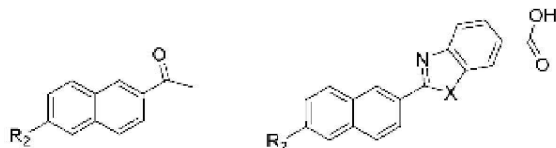


[0016] R₂는 NO_2 , NH_2 , NHMe 및 NMe_2 중에서 선택되고, 상기 R₅는 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

[0017] R₃ 및 R₄는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소 원소가 포함된 탄소사슬기 중에서 선택된다.

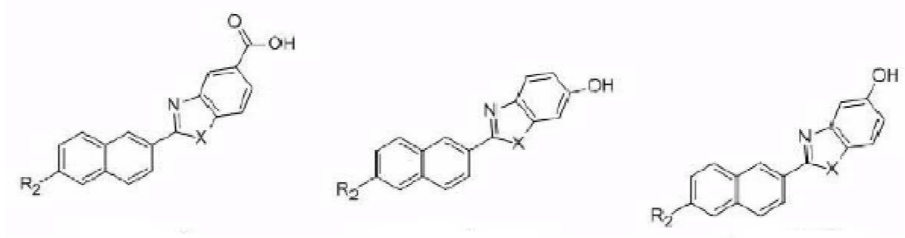
[0018] 상기 R₁, R₃ 내지 R₅는 각각 독립적으로 수소, 시아노기, 할로젠 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 아세틸피페라진기, 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기, 금속이 치환된 산소원소기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기 및 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 1종 이상으로 치환될 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 의하면, 상기 [화학적식 1]은 하기 [화학적식 3] 내지 [화학적식 15]로 표시된 화합물 중에서 선택될 수 있다.



[0020]

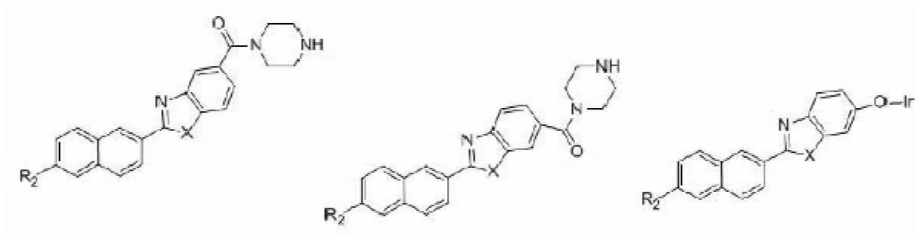
[0021] [화학적식 3] [화학적식 4]



[0022]

[0023]

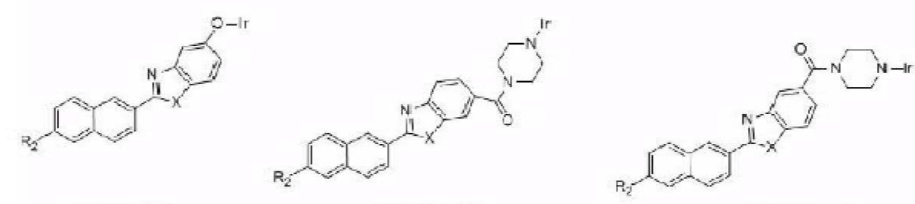
[화학식 5] [화학식 6] [화학식 7]



[0024]

[0025]

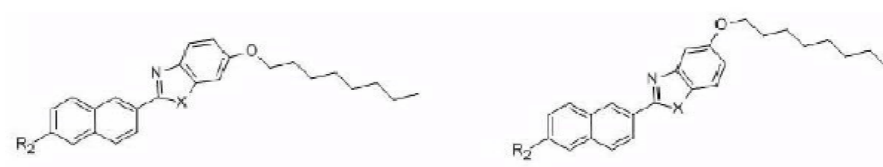
[화학식 8] [화학식 9] [화학식 10]



[0026]

[0027]

[화학식 11] [화학식 12] [화학식 13]



[0028]

[0029]

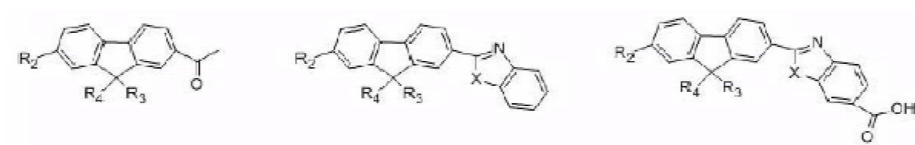
[화학식 14] [화학식 15]

[0030]

상기 [화학식 3] 내지 [화학식 15]에서, R₂는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하고, X는 O 또는 S이다.

[0031]

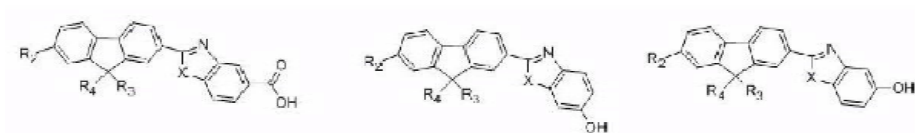
또한, 상기 [화학식 2]는 하기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]로 표시된 화합물 중에서 선택될 수 있다.



[0032]

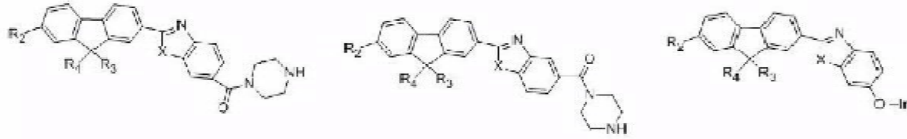
[0033]

[화학식 16] [화학식 17] [화학식 18]



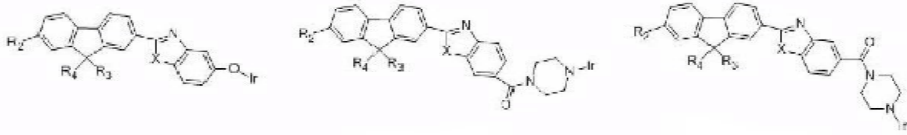
[0034]

[0035] [화학식 19] [화학식 20] [화학식 21]



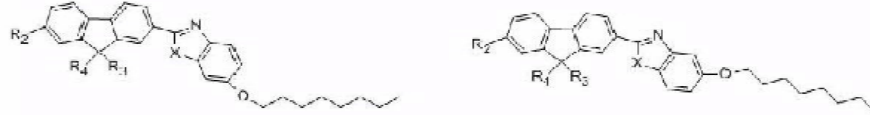
[0036]

[0037] [화학식 22] [화학식 23] [화학식 24]



[0038]

[0039] [화학식 25] [화학식 26] [화학식 27]



[0040]

[0041] [화학식 28] [화학식 29]

[0042] 상기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]에서, R_2 , R_3 및 R_4 는 상기 [화학식 2]에서의 정의와 동일하고, X 는 O 또는 S이다.

[0043] 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 각각 400 내지 450 nm 및 550 내지 600 nm 파장대의 빛에 의하여 여기될 수 있다.

[0044] 또한, 750 nm의 파장대에서 동시에 158 내지 160 GM 및 173 내지 175 GM의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta_{\max}$)을 가질 수 있다.

[0045] 또한, 80 내지 170 μm 의 투과깊이에서 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있다.

[0046] 상기 또 다른 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화 방법을 제공한다.

[0047] (a) 본 발명에 따른 상기 이광자 형광염료를 관찰 대상이 되는 생체질 내로 주입하는 단계,

[0048] (b) 상기 이광자 형광염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계.

발명의 효과

[0049] 본 발명에 따른 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료는 750 nm fs-레이저 펄스에서 각각 400-450 nm(λ), 550-600 nm(λ) 방출에 의해 여기되어 80 내지 170 μm 의 투과 깊이에 존재하는 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있다.

[0050] 또한, 중요한 이광자 동작 단면적, 높은 광안정성을 보이며, 세포 및 조직에 쉽게 채울 수 있고, pH 또는 세포 독성으로부터의 최소 간섭과 이광자 현미경법(TPM)에 의해 오랜 시간 동안 살아있는 세포 및 조직에서 리소좀 및 미토콘드리아를 시각화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 형광염료로 표시된 Raw 264.7 세포의 정규화된 이광자 여기된 형광 그래프(실선) 및 일광자 형광 그래프(점선)이다.

도 1b는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 두 화합물의 이광자 동작 단면적 그래프이다.

도 2a는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 이광자 현미경법(TPM) 이미지이며,

도 2b는 LTR로 공동-표지된 Raw 264.7세포의 일광자 현미경법(OPM) 이미지이고,

도 2c는 상기 도 2a 및 도 2b의 이미지가 병합된 이미지이며,

도 2d는 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7세포의 이광자 현미경법(TPM) 이미지이고,

도 2e는 MTR로 공동-표지된 Raw 264.7세포의 일광자 현미경법(OPM) 이미지이며,

도 2f는 상기 도 2d 및 도 2e의 이미지가 병합된 이미지이다.

도 2g 내지 2j는 본 발명의 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 듀얼-컬러 TPM이미지이며,

도 2k 내지 2n은 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 듀얼-컬러 TPM 이미지이고,

도 2o 내지 2r은 상기 도 2g 및 도 2n의 이미지가 각각 병합된 이미지이다.

도 2s는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 형광염료로 표시된 세포의 상대 TPEF 강도이다.

도 2t는 10× 배율에 의해 120 μm 깊이에서 수집된 본 발명의 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 쥐 해마 절편의 듀얼-채널 TPM 이미지이며,

도 2u는 10× 배율에 의해 120 μm 깊이에서 수집된 본 발명의 다른 실시예에 따라 제조된 화합물로 공동-표지된 쥐 해마 절편의 듀얼-채널 TPM 이미지이고,

도 2v는 상기 도 2t 및 도 2u의 이미지가 병합된 이미지이며, 도 2w-y는 상기 도 2t-v를 각각 200× 배율로 측정한 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052]

본 발명은 서로 다른 파장에서 이광자 여기 형광 인자(TPEF)를 방출하여 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화할 수 있는 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화용 이광자 형광염료 및 이를 이용한 리소좀 및 미토콘드리아의 영상화 방법에 관한 것이다.

[0053]

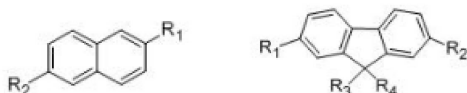
이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0054]

본 발명에 따른 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물 및 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 포함하는 이광자 형광염료는 생체 세포 및 조직 깊은 곳에서 리소좀 및 미토콘드리아와 선택적으로 반응하여 강한 형광을 나타낸다.

[0055]

[화학식 1] [화학식 2]



[0056]

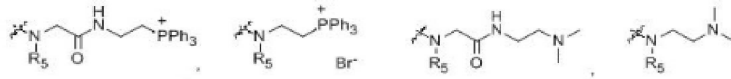
[0057]

상기 [화학식 1] 내지 [화학식 2]에서,

[0058]

R₁은 치환 또는 비치환된 카르보닐기, 치환 또는 비치환된 벤조옥사졸기 및 치환 또는 비치환된 벤조티아졸기 중

에서 선택된다.

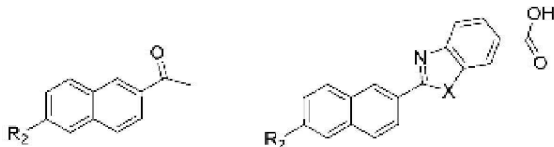


R_2 는 NO_2 , NH_2 , NHMe 및 NMe_2 중에서 선택되고, 상기 R_5 는 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기, 치환 또는 비치환된 탄소수 6 내지 40의 아릴기 및 치환 또는 비치환된 탄소수 2 내지 30의 헤테로아릴기 중에서 선택된다.

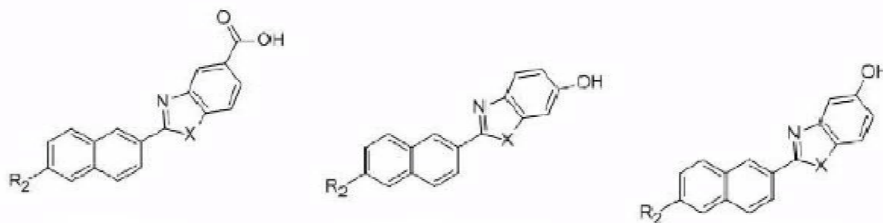
R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 수소, 치환 또는 비치환된 탄소수 1 내지 30의 알킬기 및 탄소수 1 내지 30의 탄소 사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소 원소가 포함된 탄소사슬기 중에서 선택된다.

상기 R_1 , R_3 내지 R_5 는 각각 독립적으로 수소, 시아노기, 할로겐 원자, 히드록시기, 니트로기, 카르복시기, 아세틸피페라진기, 탄소수 1 내지 30의 탄소사슬 내에 적어도 하나 이상의 산소원소가 포함된 탄소사슬기, 금속이 치환된 산소원소기, 탄소수 1 내지 40의 알킬기, 탄소수 1 내지 40의 알콕시기, 탄소수 1 내지 40의 알킬아미노기, 탄소수 6 내지 40의 아릴아미노기, 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴아미노기, 탄소수 1 내지 40의 알킬실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴실릴기, 탄소수 6 내지 40의 아릴기, 탄소수 3 내지 40의 아릴옥시기 및 탄소수 3 내지 40의 헤테로아릴기 중에서 선택되는 1종 이상으로 치환될 수 있다. 구체적인 일례로서, R_1 의 치환된 벤즈옥사졸기에서 치환기로 카르복시기가 치환될 수 있다.

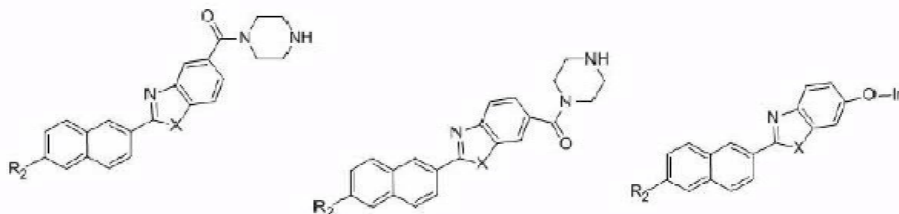
상술한 바와 같은 구조를 갖는 상기 [화학식 1]에 대한 구체적인 예는 본 발명에서 제한되는 것은 아니지만, 구체적으로 하기 [화학식 3] 내지 [화학식 15]로 표시되는 화합물 중 어느 하나일 수 있다.



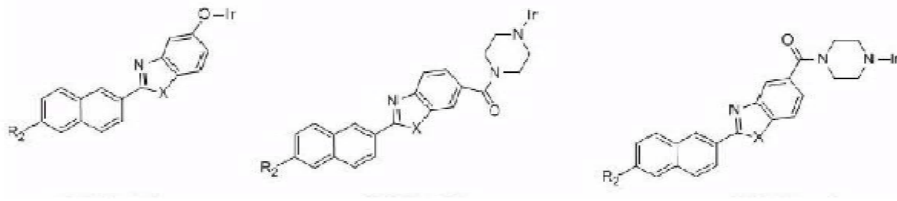
[화학식 3] [화학식 4]



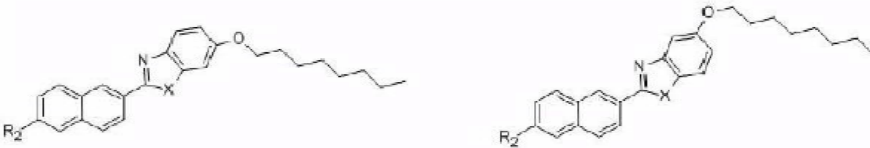
[화학식 5] [화학식 6] [화학식 7]



[화학식 8] [화학식 9] [화학식 10]



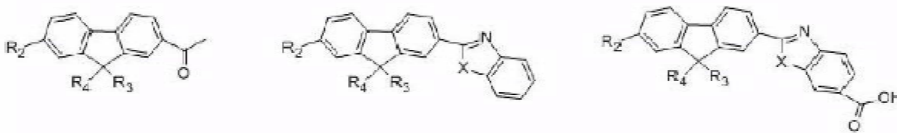
[화학식 11] [화학식 12] [화학식 13]



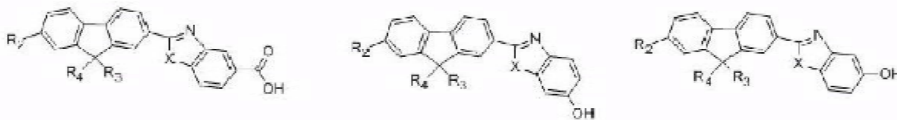
[화학식 14] [화학식 15]

상기 [화학식 3] 내지 [화학식 15]에서, R_2 는 상기 [화학식 1]에서의 정의와 동일하고, X는 O 또는 S이다.

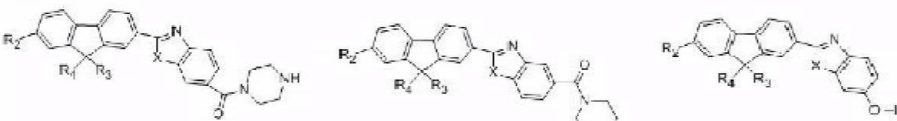
또한, 상술한 바와 같은 구조를 갖는 상기 [화학식 2]에 대한 구체적인 예는 본 발명에서 제한되는 것은 아니지만, 구체적으로 하기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]로 표시되는 화합물 중 어느 하나일 수 있다.



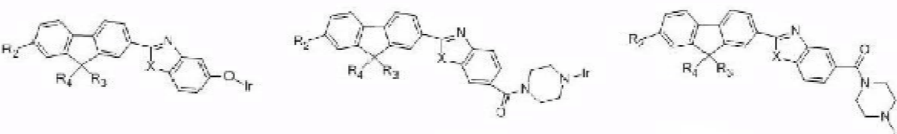
[화학식 16] [화학식 17] [화학식 18]



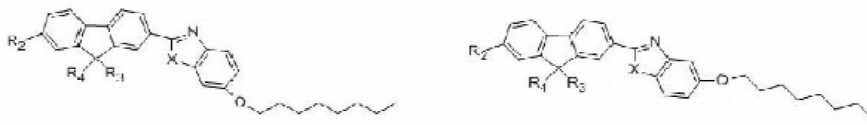
[화학식 19] [화학식 20] [화학식 21]



[화학식 22] [화학식 23] [화학식 24]



[화학식 25] [화학식 26] [화학식 27]



[0083]

[0084]

[화학식 28] [화학식 29]

[0085]

상기 [화학식 16] 내지 [화학식 29]에서, R_2 , R_3 및 R_4 는 상기 [화학식 2]에서의 정의와 동일하고, X 는 O 또는 S이다.

[0086]

본 발명에 따른 이광자 형광염료는 각각 400 내지 450 nm 및 550 내지 600 nm 파장대의 빛에 의하여 여기될 수 있는 것을 특징으로 한다. 구체적으로 [화학식 1]의 화합물은 400 내지 450 nm 파장대의 빛에 의하여 여기되며, [화학식 2]의 화합물은 550 내지 600 nm 파장대의 빛에 의하여 여기된다.

[0087]

이와 같이, 이광자 형광염료가 단파장과 장파장대의 빛에 의하여 동시에 여기되므로 80 내지 170 μ m의 투과 깊이에서 리소좀 및 미토콘드리아를 실시간으로 동시에 영상화할 수 있다.

[0088]

또한, 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 750 nm의 파장대에서 동시에 158 내지 160 GM 및 173 내지 175 GM의 이광자 동작 단면적(cross section, $\Phi \delta_{\max}$)을 갖는 것을 특징으로 한다. 구체적으로 [화학식 1]의 화합물이 158 내지 160 GM, [화학식 2]의 화합물이 173 내지 175 GM의 이광자 동작 단면적을 갖는다. 이는 종래의 10 GM 수준의 이광자 동작 단면적에 비하여 현저히 높은 수준이다.

[0089]

더 나아가, 본 발명에 따른 이광자 형광염료는 물에 대하여 용해도가 10.0 μ M 이상이므로 세포를 충분한 수준으로 염색할 수 있다.

[0091]

또한, 본 발명은 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화 방법을 제공한다.

[0092]

생체 내 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 영상화하는 방법은 상기 이광자 형광염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입하는 단계 및 상기 이광자 형광염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함한다. 상기 생체 내 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 영상화는 이광자 여기 형광 인자(Two-photon excited fluorescence, TPEF)의 변화에 의해 수행된다.

[0093]

본 발명에 따른 상기 영상화 방법은 종래의 기술에 비하여 표면으로부터 깊이 존재하는 세포의 영상까지 얻을 수 있고, 낮은 에너지의 광원을 이용하기 때문에 장시간 동안 세포 손상 없이 영상을 얻을 수 있으므로, 정확한 세포 모니터링이 가능하다는 장점을 갖는다.

[0094]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시 예를 제시하나, 하기 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.

[0095]

<실시예>

[0096]

합성예 1. [화학식 1-2]로 표시되는 이광자 형광염료의 합성

[0097]

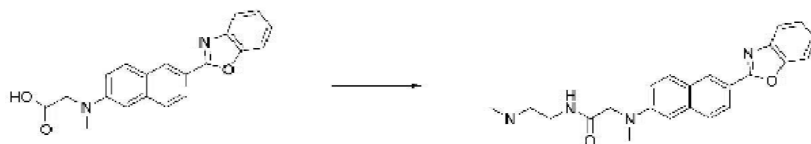
1-1. [화학식 1-1]로 표시되는 화합물의 제조

[0098]

하기 [반응식 1]에 따라 [화학식 1-1]의 화합물을 제조하였다.

[0099]

[반응식 1]



[0100]

[0101]

[화학식 1-1]

[화학식 1-2]

[0102]

[화학식 1-1] 54 mg(0.16 mmol)과 DCC(1,3-Dicyclohexylcarbodiimide) 34 mg(0.16 mmol) 및 하이드록시벤조트리아졸(Hydroxybenzotriazole) 24 mg(0.17 mmol)을 디클로로메탄에 용해한 후 질소하에서 25 , 1시간 동안 교반하였다. 반응이 종결되면 N,N-디메틸에틸렌디아민(N,N,-dimethylethylenediamine) 14 mg(0.16 mmol)을 첨가하여 질소하에서 12시간 동안 교반한 후 필터하고 농축하였다. 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피(CHCl₃:MeOH=10:1)로 정제하여 하기 [화학식 1-2]로 표시되는 화합물 61 mg(수율: 93%)을 얻었다.

[0103]

m.p. 143-147 °C; IR(KBr): 3396 cm⁻¹

[0104]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.60 (d, 1H, *J* = 1.6 Hz), 8.19 (dd, 1H, *J* = 8.4, *J* = 1.6 Hz), 7.83 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 7.77-7.73 (m, 2H), 7.59-7.57 (m, 1H), 7.35-7.32 (m, 2H), 7.10 (dd, 1H, *J* = 9.2, *J* = 2.4 Hz), 6.96 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 4.02 (s, 2H), 3.36 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 3.15 (s, 3H), 2.33 (t, 2H, *J* = 5.6 Hz), 2.05 (s, 6H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 169.9, 163.7, 150.8, 148.5, 142.4, 136.4, 130.5, 128.0, 127.2, 126.8, 124.9, 124.6, 121.2, 119.9, 116.6, 113.5, 110.6, 107.1, 58.4, 58.2, 45.3, 40.2, 37.0 ppm; HRMS (FAB⁺): *m/z* calcd for [C₂₄H₂₆N₄O₂]: 403.2134, found: 403.2137.

[0105]

합성에 2. [화학식 2-5]로 표시되는 이광자 형광염료의 합성

[0106]

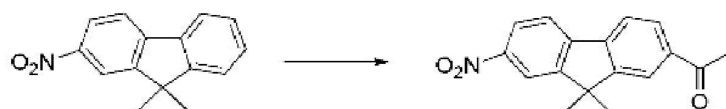
2-1. [화학식 2-2]로 표시되는 화합물의 제조

[0107]

하기 [반응식 2]에 따라 [화학식 2-2]의 화합물을 제조하였다.

[0108]

[반응식 2]



[0109]

[0110]

[화학식 2-1]

[화학식 2-2]

[0111]

[화학식 2-1] 10 g과 염화아세틸(CH₃COCl) 4.7 mL을 디클로로메탄 100 mL에 용해한 후 알루미늄클로라이드(AlCl₃) 7.2 g을 첨가하여 40 °C에서 1 시간 동안 교반하고 농축하였다. 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피(CHCl₃:MeOH=10:1)로 정제하여 하기 [화학식 2-2]로 표시되는 화합물(수율: 77%)을 얻었다.

[0112]

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.30 (d, 1H, *J* = 1.9 Hz), 8.26 (dd, 1H, *J* = 8.4, 1.9 Hz), 8.08 (d, 1H, *J* = 1.5 Hz), 8.00 (dd, 1H, *J* = 8.1, 1.5 Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 8.4 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 8.1 Hz), 2.66 (s, 3H), 1.55 (s, 9H)

[0113]

2-2. [화학식 2-3]으로 표시되는 화합물의 제조

[0114]

하기 [반응식 3]에 따라 [화학식 2-3]의 화합물을 제조하였다.

[0115]

[반응식 3]



[0116]

[0117]

[화학식 2-2]

[화학식 2-3]

[0118]

[화학식 2-2] 4.2 g과 염화암모늄수용액($\text{NH}_4\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) 1.6 g을 에탄올 40 mL에 용해한 후 철과우더 2.5 g과 다이옥산 40 mL을 첨가하여 80 °C에서 3 시간 동안 교반하고 농축하였다. 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 하기 [화학식 2-3]으로 표시되는 화합물(수율: 90%)을 얻었다.

[0119]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.98(s, 1H), 7.91(d, $J = 8.0$ Hz), 7.60 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.56 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 6.76 (s, 1H), 6.68 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 3.89 (br s, 2H), 2.64 (s, 3H), 1.47 (s, 6H)

[0120]

2-3. [화학식 2-4]로 표시되는 화합물의 제조

[0121]

하기 [반응식 4]에 따라 [화학식 2-4]의 화합물을 제조하였다.

[0122]

[반응식 4]



[0123]

[0124]

[화학식 2-3]

[화학식 2-4]

[0125]

[화학식 2-3] 2.3 g과 메틸요오드(CH_3I) 0.57 mL을 디메틸플로라이드 2 mL 하에서 25 °C, 3 시간 동안 교반하고 농축하였다. 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 하기 [화학식 2-4]로 표시되는 화합물(수율: 40%)을 얻었다.

[0126]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.98(d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.92 (d, $J = 8.4$, 1.6 Hz), 7.59 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz), 6.66 (d, 1H, $J = 1.8$ Hz), 6.61 (dd, 1H, $J = 8.4$, 1.8 Hz), 4.01 (br s, 1H), 2.93 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 1.48 (s, 6H)

[0127]

2-4. [화학식 2-5]로 표시되는 화합물의 제조

[0128]

하기 [반응식 5]에 따라 [화학식 2-5]의 화합물을 제조하였다.

[0129]

[반응식 5]



[0130]

[0131]

[화학식 2-4]

[화학식 2-5]

[0132]

[화학식 2-4] 0.23 g과 (3-브로모프로필)트리페닐포스포늄 브로마이드((3-bromopropyl)triphenylphosphonium bromide) 0.60 g을 디메틸플로라이드 3 mL에 용해한 후 제2인산나트륨(Na_2HPO_4) 0.18 g 및 요오드화나트륨(NaI) 0.052 g을 첨가하여 110 °C에서 24 시간 동안 교반하고 농축하였다. 농축된 화합물을 컬럼크로마토그래피($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=10:1$)로 정제하여 하기 [화학식 2-5]로 표시되는 화합물(수율: 11%)을 얻었다.

[0133]

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.97 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz), 7.91 (dd, 1H, $J = 7.8$, 1.5 Hz), 7.78-7.71 (m, 9H), 7.65-7.59 (m, 6H), 7.56 (d, 2H, $J = 7.8$ Hz), 6.72 (d, 1H, $J = 2.1$ Hz), 6.63 (dd, 1H, $J = 7.8$, 2.1 Hz), 3.90-3.75 (m, 4H), 3.07 (s, 3H), 2.63 (s, 3H), 2.03-1.90 (m, 2H), 1.42 (s, 6H)

- [0134] **시험예.**
- [0135] [화합식 1-2]의 화합물은 이광자 여기 형광인자(TPEF)가 단파장 영역인 469 nm에서 방출되며, [화합식 2-5]의 화합물은 장파장 영역인 573 nm에서 방출된다.
- [0136] 또한, [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물은 리소좀 및 미토콘드리아에 대하여 각각 형광체로 6-(벤조[d]옥사졸-2-일)-2-(N,N-디메틸아미노)나프탈렌(6-(benzo[d]oxazol-2'-yl)-2-(N,N-dimethyl-amino)naphthalene, BODAN) 및 2-아세틸-7-아미노-9,9-디메틸플루오렌(2-acetyl-7-amino-9,9-dimethyl fluorene, AAF)이 고용되며, 타겟 시트로 3차 아민 및 트리페닐포스포니움염(TPP)이 고용된다. 상기 BODAN은 Ca^{2+} (BCaM)에 대한 이광자 프로브로 사용되며, AAF의 파생물은 이광자 동작 단면적을 나타낸다.
- [0137] 이로 인하여 [화합식 1-2]의 화합물은 양성자 형태로 리소좀에 축적되고, [화합식 2-5]의 화합물은 미토콘드리아 막 전위 때문에 미토콘드리아에 집중된다.
- [0138] 상기 [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물로 이루어진 이광자 형광염료는 듀얼-컬러 이미지에 의해 긴 시간(100분 이하) 동안 살아있는 세포 및 조직에 있는 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 감지할 수 있다.
- [0139] [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물의 용해도는 각각 4.0 uM 이하(~ 4.0 uM), 바람직하게는 0.3 내지 4.0 uM; 10 uM 이상(10.0 uM $\sim$)이며, 이는 이광자 형광염료를 세포 염색용으로 충분히 사용할 수 있다는 것을 의미한다.
- [0140] 상기 용해도는 MOPS 버퍼(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid, 30 mM, 100 mM KCl, pH 7.2)에서 측정한다.
- [0141] MOPS 버퍼에서, [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물은 각각 469 nm($\Phi=1.0$) 및 572 nm($\Phi=0.13$)에서 방출 최대값($\lambda_{\text{max}}^{\text{FI}}$)과, 352 nm($\epsilon=1.10 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) 및 377 nm($\epsilon=0.90 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)에서 흡수 최대값(λ_{max})을 보였다. 용매의 극성이 증가하면, 흡수 최대값은 거의 유사한 반면 방출 최대값은 각각 43 nm 및 132 nm로 점차 증가되었다.
- [0142] 극성용매에서 [화합식 2-5]의 화합물에 대한 방출 최대값의 높은 감도는 강한 전자-끌개 그룹에 포함된 후자 형광단(latter fluorophore)의 들뜬 상태로 전하-이동의 경우보다 더 안정하기 때문이다.
- [0143] 도 1a는 에탄올에서 [화합식 1-2]의 화합물(0.5 uM) 및 [화합식 2-5]의 화합물(1.0 uM)로 표지(염색)된 Raw 264.7 세포의 정규화된 이광자 여기된 형광 그래프(실선) 및 일광자 형광 그래프(점선)이며, 도 1b는 에탄올에서 [화합식 1-2]의 화합물(빈 원) 및 [화합식 2-5]의 화합물(채워진 원)의 이광자 동작 단면적 그래프이다.
- [0144] [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물로 표지된 RAW 264.7 세포의 TPEF 스펙트럼은 MOPS 버퍼에서 측정된 것으로부터 약하게 청색 이동하여 각각 456 nm 및 540 nm에서 방출 최대값을 보인다(도 1a, 실선). 세포 기관에서 형광염료의 미세환경은 MOPS 버퍼보다 더 소수성으로 나타난다. 반면, 세포 내에서 [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물의 방출 최대값은 방광 내 환경의 극성을 충분히 대표할 수 있는 에탄올에서 측정된 것과 매우 유사하다.
- [0145] 또한, 상기 두 화합물에 의해 잘 구분된 방출 밴드는 각각 400-450 nm(blue, Ch1) 및 550-600 nm(red, Ch2)의 검출 창을 이용하여 TPEF의 선택적 검출을 허용한다. 또한, [화합식 1-2]의 화합물 및 [화합식 2-5]의 화합물은 생물학 관련 pH 범위에서 pH값을 구분하지 않는다.
- [0146] 도 1b의 이광자 동작 단면적은 에탄올에 로다민-6G(rhodamine-6G)를 사용하여 형광염료의 TPEF 스펙트럼을 조사하여 결정된다.
- [0147] 방광 내 환경에 대한 좋은 모델인 에탄올에서 [화합식 1-2] 화합물 및 [화합식 2-5] 화합물의 이광자 동작 단면적 값은 $\lambda=750$ nm에서 각각 160 GM 및 175 GM이다(도 1b). 상기 이광자 동작 단면적 값은 동일한 상태에서 측정된 Lysotracker-Red DND-99(LTR) 및 Mitotracker-Red FM(MTR)의 값 보다 6-8배 크다(하기 [표 1]).

표 1

구분	흡수최대값/방출최대값(일광자)	형광양자수율(Φ)	흡수최대값(이광자)	$\Phi \delta_{\text{max}}$
[화합식1-2] 화합물	354/451	1.00	750	160

[화학식2-5]화합물	372/523	0.63	750	175
LTR	577/599	-	940	25
MTR	579/642	-	940	21

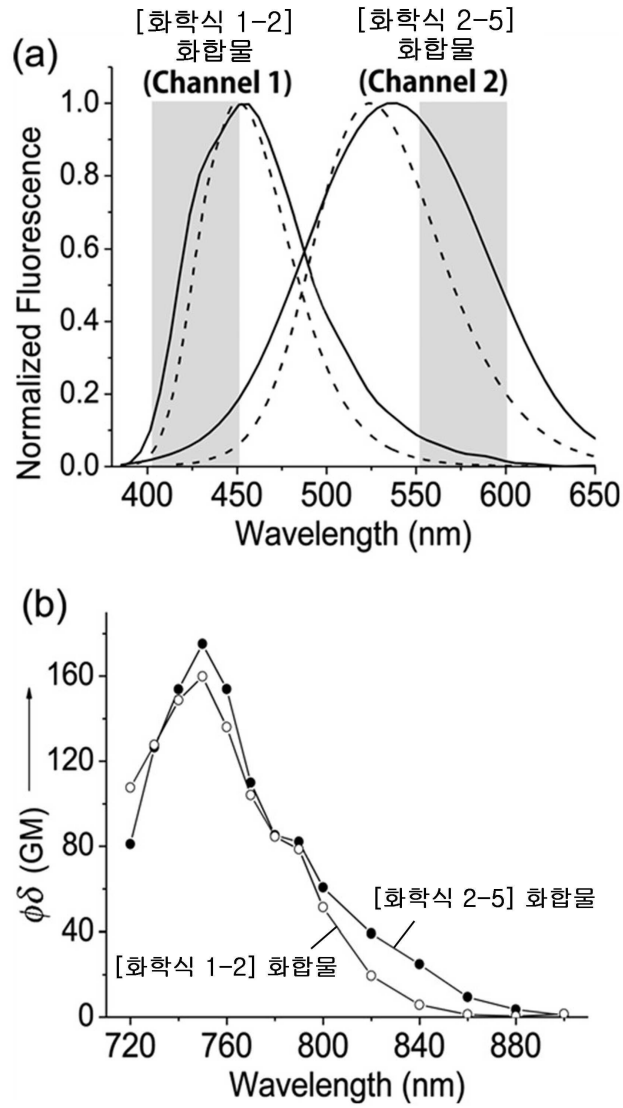
- [0149] *에탄올에서 수행됨
- [0150] 위 [표 1]에 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예에 따라 제조된 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물은 이광자 동작 단면적 값이 LTR 및 MTR에 비하여 우수한 것으로 확인되었다.
- [0151] 또한, 종래 이광자 형광염료보다 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 이루어진 본 발명에 따른 이광자 형광염료로 표시될 때 세포의 더 밝은 이광자 현미경법(TPM) 이미지를 보인다.
- [0152] 도 2a는 [화학식 1-2]의 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 이광자 현미경법(TPM) 이미지이며, 도 2b는 LTR로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 일광자 현미경법(OPM) 이미지이고, 도 2c는 상기 도 2a 및 도 2b의 이미지가 병합된 이미지이며, 도 2d는 [화학식 2-5]의 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 이광자 현미경법(TPM) 이미지이고, 도 2e는 MTR로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 일광자 현미경법(OPM) 이미지이며, 도 2f는 상기 도 2d 및 도 2e의 이미지가 병합된 이미지이다.
- [0153] 도 2g 내지 2r은 0-2시간 동안 세포가 자기소모를 유도하는 이미지이며, 세포는 자기소모를 유도하는 0-2시간 동안 라파마이신($50 \mu\text{g/mL}$)으로 처리되고 중간 열에 있는 숫자는 녹색 도메인과 빨간색 도메인의 겹침값(A 값)이다. 상기 도 2g 내지 2r 중에서 도 2g 내지 2j는 [화학식 1-2]의 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 듀얼-컬러 TPM이미지이며, 도 2k 내지 2n은 [화학식 2-5]의 화합물로 공동-표지된 Raw 264.7 세포의 듀얼-컬러 TPM이미지이고, 도 2o 내지 2r은 상기 도 2g 및 도 2n의 이미지가 각각 병합된 이미지이다.
- [0154] 도 2s는 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 표지된 세포의 상대 TPEF 강도이다.
- [0155] 도 2t는 $10\times$ 배율에 의해 $120 \mu\text{m}$ 깊이에서 수집된 [화학식 1-2]의 화합물로 공동-표지된 쥐 해마 절편의 듀얼-채널 TPM 이미지이며, 도 2u는 $10\times$ 배율에 의해 $120 \mu\text{m}$ 깊이에서 수집된 [화학식 2-5]의 화합물로 공동-표지된 쥐 해마 절편의 듀얼-채널 TPM 이미지이고, 도 2v는 상기 도 2t 및 도 2u의 이미지가 병합된 이미지이며, 도 2w-y는 상기 도 2t-v를 각각 $200\times$ 배율로 측정한 이미지이다. 상기 도 2에서 a), g)-j), t), w)는 $\approx 400\text{-}450 \text{ nm}$ (화학식 1-2)에서 수집된 TPM이미지이며, d), k)-n), u), x)는 $550\text{-}600 \text{ nm}$ (화학식 2-5)에서 수집된 TPM이미지이고, b)는 $\lambda=580\text{-}650 \text{ nm}$ (LTR), e)는 $630\text{-}680 \text{ nm}$ (MTR)에서 수집된 OPM 이미지이다.
- [0156] 도 2에서 일광자 또는 이광자 여기에 대한 파장은 각각 $\lambda=543 \text{ nm}$ 및 750 nm 이며, 도 2는 세포 반복 실험에서의 대표 이미지이다($n=5$). 도 2의 Scale bars는 f), r) $15 \mu\text{m}$, t) $300 \mu\text{m}$, 및 w) $75 \mu\text{m}$ 이다.
- [0157] 형광염료의 유용성을 입증하기 위하여, 각각 리소솜, 미토콘드리아 및 골지장치(Golgi apparatus)에 대한 일광성 형광염료로 알려진 소혈청알부민(bovine-serum albumin, BSA; BTC)으로 컴플렉스된 LTR, MTR 또는 BODIPY-TR 세라미드로 RAW 264.7 세포가 공동-표지되어 공동-정위 실험이 수행된다. 도 2c는 리소솜의 OPM이미지와 잘 일치되는 [화학식 1-2]의 화합물로 착색된 RAW 264.7세포의 TPM 이미지이다.
- [0158] 또한, 채널 사이 강도 분포의 상관관계를 설명한 겹침값(co-localization coefficient, A)은 Autoquant X2 소프트웨어를 사용하여 계산한다.
- [0159] LTR과 [화학식 1-2]의 화합물의 A 값은 각각 BTC 및 MTR로 계산된 0.25 및 0.20보다 더 큰 값인 0.97이다. 또한, [화학식 2-5]의 화합물로 표지된 RAW 264.7 세포의 TPM이미지는 A값이 0.96으로서 미토콘드리아의 OPM이미지와 좋은 일치를 보여준다(도 2 f)(리소솜의 A값은 0.13, 골지장치의 A값은 0.22).
- [0160] HeLa 및 A549 세포 실험은 유사한 결과를 보여주었으며, CCK-8 키트로의 분석은 두 화합물([화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물)이 낮은 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0161] 또한, [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 표지된 RAW 264.7 세포의 특징지점에서 TPEF 강도는 1시간 동안 fs-펄스의 연속 조사 후에도 거의 비슷하게 높은 광안정성을 나타낸다. 이러한 결과는 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 이루어진 형광염료가 pH 또는 세포독성에서 최소한의 간섭으로 오랜

시간 동안 TPM에 의해 리소좀 및 미토콘드리아를 감지할 수 있다는 의미이다.

- [0162] 듀얼-컬러 이미지로 자기소모(autophagy)를 시각화하는 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물의 능력이 테스트되었다.
- [0163] 자가소화작용의 자극(autophagic stimulation)에서, 미토콘드리아를 포함하는 세포질 부분은 자가포식소체(autophagosome)를 형성하여 이중 막(phagophore) 또는 분리 막(isolation membrane)으로 둘러싸인다. 자가포식소체의 외부 막은 엔도솜, 다음으로 리소좀으로 융합되고, 내용물이 퇴화된다.
- [0164] 자기소모(autophagy)를 조사하기 위하여, RAW 264.7 세포는 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 공동-표지되며, 리소좀 및 미토콘드리아에서 방출된 TPEF 강도는 세포를 자극하기 전, 후를 비교한다.
- [0165] 처리되지 않은 세포의 TPM이미지는 리소좀(녹색) 및 미토콘드리아(빨간색)를 나타내었다(도 2 g, k, o; 0 h).
- [0166] 세포가 자기소모를 유도하는 약리학 에이전트(pharmacologic agent)인 라파마이신(rapamycin, 50 mg/mL)으로 처리될 때, TPEF 강도는 $\lambda=400-450$ nm([화학식 1-2])에서 증가되는 반면, $\lambda=550-600$ nm([화학식 2-5])에서 감소된다(도 2 h, l, p 및 s). 이는 자기소모하는 동안 미토콘드리아의 붕괴 및 리소좀의 활성화와 일치하는 결과이다.
- [0167] 녹색 도메인 및 빨간색 도메인이 병합되고 1시간 후 노란색 영역의 모양으로 나타났다(도 2 p). 녹색 도메인과 빨간색 도메인의 A값은 각각 1, 1.5 및 2 h 동안 고갈 후 0.03(0 h)에서 각각 0.18, 0.38, 0.62로 증가된다. 이 결과는 자기소모 동안 자가포식소체 및 리소좀의 융합 과정을 반영한다. 유사한 결과는 세포가 아미노산/혈청 결핍 버퍼에 굶주릴 때 관찰된다. 융합에 의한 점진적 증가와, 리소좀의 활성화 및 미토콘드리아의 퇴화로 동시에 증가한다.
- [0168] 따라서 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물로 이루어진 형광염료는 단일 여기 소스를 사용하여 듀얼-컬러 이미지에 의해 살아있는 세포에서 자기소모 모니터링을 명확히 할 수 있다.
- [0169] 세포조직 이미지에서 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물의 유틸리티는 더 조사된다.
- [0170] 37 °C에서 1시간 동안 [화학식 1-2]의 화합물(10 μ M) 및 [화학식 2-5]의 화합물(15 μ M)과 배양된 생후 2주된 쥐에서 얻은 신선한 쥐의 해마 절편의 명시야상(bright-field image)은 CA1 및 CA3 영역에 드러났을 뿐만 아니라, 치상회(dentate gyrus, DG)이다.
- [0171] 듀얼-채널 TPM이미지 및 병합된 이미지는 120 μ m 깊이에서 같은 영역에 있는 리소좀 및 미토콘드리아를 보여준다(도 2t-v). 또한, 80-170 μ m 깊이에서 얻어진 TPM이미지는 리소좀 및 미토콘드리아가 전체 깊이에서 거의 고르게 분포하는 것으로 나타났다.
- [0172] 또한, 높은 배율로 촬영한 이미지는 CA3 영역의 거대 뉴런(pyramidal neuron) 층에 있는 리소좀 및 미토콘드리아의 분포를 명확하게 분석했다(도 2w-y). 흰색 실선 원에서 두 이미지는 A값인 0.17과 약간 중복되는 것으로 보이며, 이러한 결과는 [화학식 1-2]의 화합물 및 [화학식 2-5]의 화합물이 TPM을 사용하여 살아있는 조직 내 80-170 μ m 깊이에서 서로 최소 간섭으로 리소좀 및 미토콘드리아를 감지할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 0.41의 A값과 흰색 점선 원에서 두 이미지는 부분 중복을 보이며, 듀얼-컬러 이미지에 의한 두 개의 세포기관(리소좀 및 미토콘드리아)이 감지하는 능력을 훼손하지 않는다.
- [0173] 결론적으로, 750 nm fs-레이저 펄스에서 각각 $\lambda=400-450$ nm, 550-600 nm 방출에 의해 여기될 수 있는 리소좀 및 미토콘드리아를 위한 이광자 형광염료를 개발하였다. 본 발명의 이광자 형광염료는 중요한 이광자 동작 단면적, 높은 광안정성을 보이며, 세포 및 조직에 쉽게 채울 수 있고, pH 또는 세포독성으로부터의 최소 간섭과 TPM에 의해 오랜 시간 동안 살아있는 세포 및 조직에서 리소좀 및 미토콘드리아를 시각화할 수 있다.

도면

도면1



도면2

