(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년09월16일
(11) 등록번호 10-0858560
(24) 등록일자 2008년09월08일

(51) Int. Cl.
G01N 33/533 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0051131
(22) 출원일자 2007년05월25일
심사청구일자 2007년05월25일
(56) 선행기술조사문헌
JACS Vol.126:16353-16360 (2004)
JACS Vol.128:344-350 (2006)
PNAS Vol.100(26):15554-15559

(73) 특허권자
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
조봉래
서울 송파구 송파동 한양아파트 23동 207호
(74) 대리인
현종철

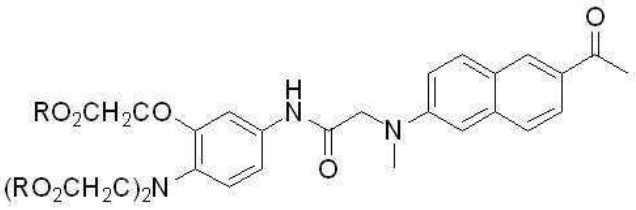
전체 청구항 수 : 총 8 항 심사관 : 안규정

(54) 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간모니터링 방법

(57) 요 약

본 발명은 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 화학식 1의 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법에 관한 것이다:

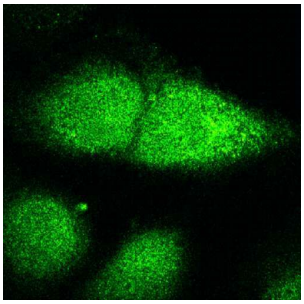
<화학식 1>



상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

본 발명에 따른 이광자 염료는 세포질 내 마그네슘 이온의 실시간 영상에 매우 적합하며, 이는 Mg^{2+}에 대한 이광자 여기 형광 현상에 있어서 17배 이상의 향상 효과를 나타내고, 이는 종래 통상적인 탐침들에 비해서 7배 이상의 높은 수치이다. 따라서, 세포에 염색되는 염료의 양을 현저하게 줄일 수 있고, 또한, 염료의 분자량이 작아서 세포 내에 염색이 매우 잘되며, 심층 조직 내부에 존재하는 Mg^{2+}의 모니터링에도 매우 적합하고, 세포질 내 Mg^{2+}를 정성적 뿐만 아니라 정량적으로도 측정할 수 있다는 효과가 있다.

대 표 도 - 도8c

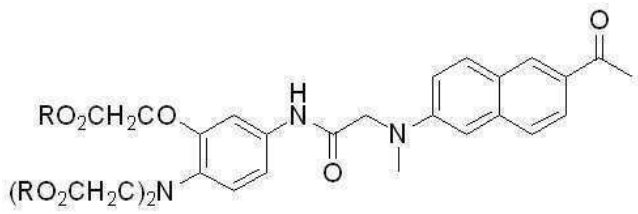


특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료:

<화학식 1>

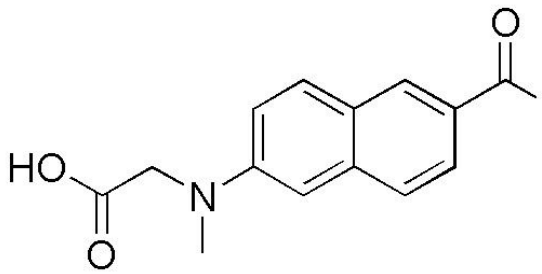


상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

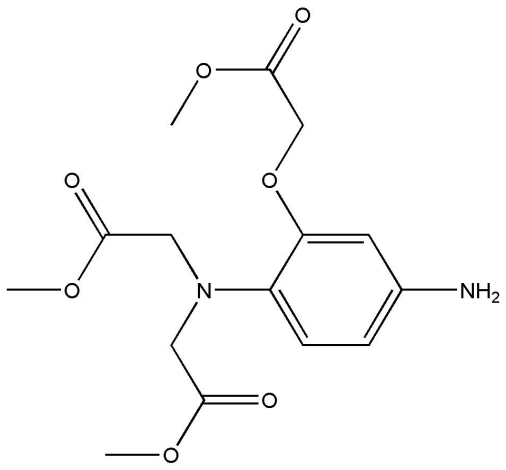
청구항 2

화학식 2의 화합물과 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드·HCl, 화학식 3의 화합물 및 4-디메틸아미노피리딘을 반응시켜서 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법:

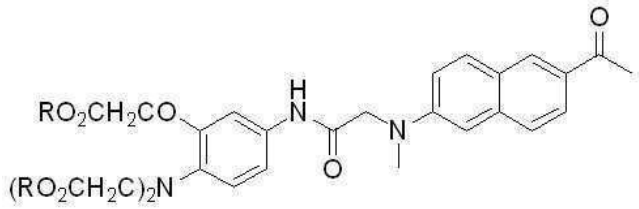
<화학식 2>



<화학식 3>



<화학식 1>

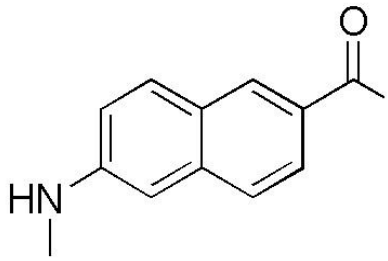


상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 메틸브로모아세테이트, Na_2HPO_4 및 NaI를 반응시켜서 제조되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법:

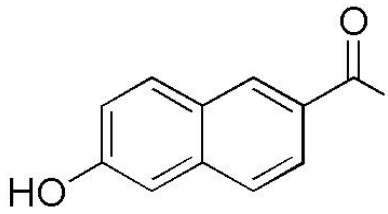
<화학식 4>



청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 5의 화합물과 $CH_3NH_2 \cdot HCl$, $Na_2S_2O_3$, NaOH 및 H_2O를 반응시켜서 제조되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법:

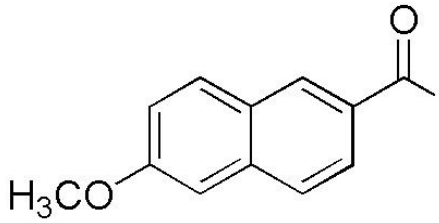
<화학식 5>



청구항 5

제4항에 있어서, 상기 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물과 HBr을 반응시켜서 제조되는 것을 특징으로 하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법:

<화학식 6>



청구항 6

제1항에 따른 이광자 염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입한 후 방출되는 이광자 여기 형광 이미지를 관찰하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 이광자 여기 형광 이미지는 500-620nm 범위의 파장을 사용하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 하기 수학식 1을 사용하여 세포질 내 마그네슘 이온의 농도를 정량적으로 측정하는 것을 특징으로 하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법:

<수학식 1>

$$[Mg^{2+}] = K_d[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$$

상기 식에서,

K_d는 본 발명에 따른 이광자 염료와 마그네슘 이온의 해리 상수이며,

F는 측정된 이광자 형광 강도이고,

F_{min} 및 F_{max}는 각각 최소 형광 강도 및 최대 형광 강도이다.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

<11> 본 발명은 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 염료의 분자량이 작아서 세포 내에 매우 염색이 잘 되고, 이광자 형광효율이 매우 커서 세포질 내 마그네슘 이온의 실시간 영상에 적합한 이광자 염료, 그 제조방법 및 이를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법에 관한 것이다.

<12> 마그네슘 이온 (Mg^{2+})은 세포 내에 가장 풍부한 양으로 존재하는 2가 금속 이온으로서, 수 백여 가지의 효소 활성 조절에 관여할 뿐만 아니라, 세포 증식 및 사멸과 같은 많은 세포 과정에 있어서 핵심적인 역할을 수행한다. 이러한 세포 내 마그네슘 이온을 검출하기 위해서, 다양한 세포-투과성 형광 탐침들이 개발되었으며, 그들 중 일부는 상업적으로도 구입가능하다 (*The Handbook*s-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed.; Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, **2005**.; H. Komatsu, N. Iwasawa, D. Citterio, Y. Suzuki, T. Kubota, K. Tokuno, Y. Kitamura, K. Oka, K. Suzuki, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16353-16360.; G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 344-350.). 그들 중 대부분은 아세트옥시메틸 (acetoxymethyl, AM) 에스테르로서 사용되는데, 이는 세포 내에서 효소 가수분해 과정을 거쳐서 금속-이온 탐침으로 변화된다 (R. Y. Tsien, *Nature* **1981**, *290*, 527-528). 그러나, 일광자 형광 탐침 (one-photon fluorescent probes)을 구비한 공초점 현미경 (confocal microscopy)은 조직 표면 (<100㎛) 근방으로만 사용이 제한된다.

<13> 따라서, 조직 내부 깊은 곳에서의 세포 현상들을 관찰하기 위해서는, 이광자 현미경 (two-photon microscopy, TPM)을 사용하는 것이 필수적이다. 여기를 위해서 2개의 근적외선 광자들을 채용하는 TPM은 일광자 현미경에 비해서 여러 가지 장점들을 제공할 수 있는데, 구체적으로 증가된 투과 깊이 (>500㎛), 낮은 조직 자가형광 (auto-fluorescent) 및 자체흡수 (self-absorption), 및 감소된 광손상 (photodamage) 및 광탈색 (photobleaching) 등이 그것이다 (W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 1369-1377; F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 932-940.).

<14> 특히, TPM의 높은 투과성은 조직 이미지화에 있어서 매우 중요한데, 이는 손상된 세포들과 같은 표면 제조 결과물은 뇌 박편 내부로 70㎛ 이상 연장되기 때문이다 (R. M. Williams, W. R. Zipfel, W. W. Webb, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 603-608.). 그러나, 현재 TPM으로 사용되는 대부분의 일광자 형광 탐침들은 작은 이광자 여기 형광 (two-photon action cross sections, $\phi\delta$)을 갖기 때문에, 그 용도가 TPM으로만 한정된다. 조직 이미지화와 관련된 또 다른 한계점은 표적오류 (mistargeting)의 문제이며, 이는 세포막-결합 탐침들로부터 야기되는데 (*The Handbook*s-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed,; Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, **2005**.; J. R. Long, R. S. Drago, *J. Chem. Ed.* **1982**, *59*, 1037-1039; K. *J.* Hirose, *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193-209.), 이는 탐침들이 세포 내의 임의의 세포막으로 둘러싸인 구조 내에 축적될 수 있고 대체적으로 형광 양자 효율이 세포질에서보다 세포막에서 더 높기 때문에, 세포막에 결합된 탐침들로부터의 신호들이 탐침-Mg^{2+} 복합체의 신호들로부터 분리되는 것은 실제로 매우 어렵다.

<15> 그러므로, 1) 더욱 밝은 TPM 이미지들에 대해서 향상된 $\phi\delta$값을 갖고, 2) 세포질과 세포막-결합 탐침들을 더 잘 구분하기 위해서, 다른 환경 하에서는 더 큰 스펙트럼 이동을 나타내는 효율적인 이광자 탐침을 개발할 필요성이 있다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<16> 따라서, 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는 생체 내에 존재하는 다양한 금속들 중에서 특히 마그네슘에 대한 이온 선택성이 매우 우수하고, 이광자 형광효율이 매우 커서 세포질 내 마그네슘 이온의 실시간 영상에 적합한 이광자 염료를 제공하는 것이다.

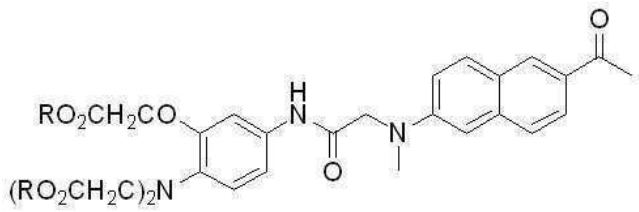
<17> 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 이광자 염료의 제조방법을 제공하는 것이다.

<18> 또한, 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 기술적 과제는 상기 이광자 염료를 이용한 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

<19> 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료를 제공한다:

화학식 1

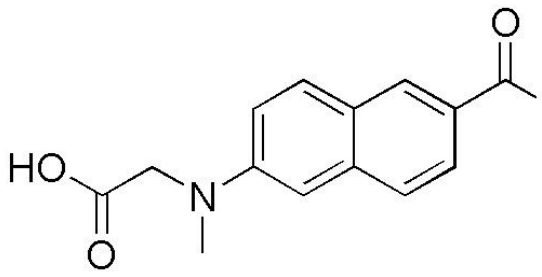


<20>

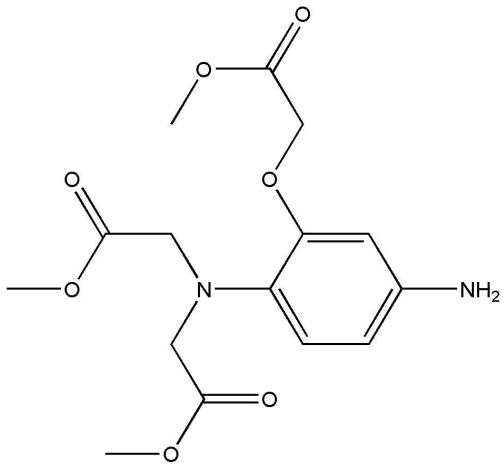
<21> 상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

<22> 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 2의 화합물과 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드·HCl, 화학식 3의 화합물 및 4-디메틸아미노피리딘을 반응시켜서 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법을 제공한다:

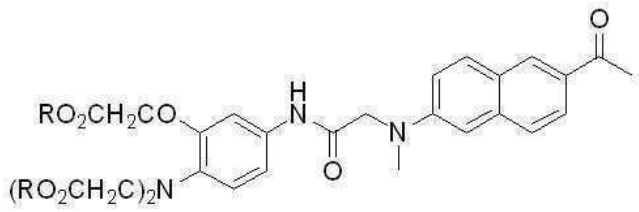
화학식 2

<23> 

화학식 3

<24> 

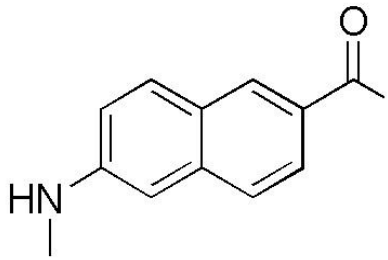
<25> <화학식 1>

<26> 

<27> 상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

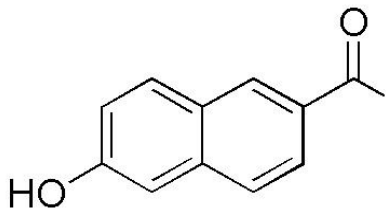
<28> 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 메틸브로모아세테이트, Na_2HPO_4 및 NaI를 반응시켜서 제조될 수 있다:

화학식 4

<29> 

<30> 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 5의 화합물과 $CH_3NH_2 \cdot HCl$, $Na_2S_2O_3$, NaOH 및 H_2O를 반응시켜서 제조될 수 있다:

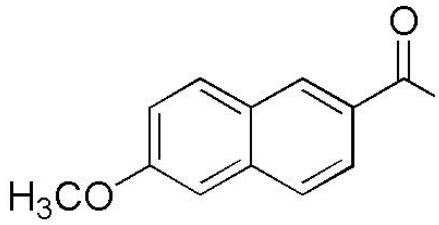
화학식 5

<31> 

.

<32> 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물과 HBr을 반응시켜서 제조될 수 있다:

화학식 6

<33> 

.

<34> 본 발명은 상기 세 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

<35> 상기 이광자 염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입한 후 방출되는 이광자 여기 형광 이미지를 관찰하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법을 제공한다.

<36> 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 이광자 여기 형광 이미지는 500-620nm 범위의 파장을 사용하여 얻어질 수 있다.

<37> 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 하기 수학식 1을 사용하여 세포질 내 마그네슘 이온의 농도를 정량적으로 측정할 수도 있다:

수학식 1

<38> $[Mg^{2+}] = K_d[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$

<39> 상기 식에서,

<40> K_d는 본 발명에 따른 이광자 염료와 마그네슘 이온의 해리 상수이며,

<41> F는 측정된 이광자 형광 강도이고,

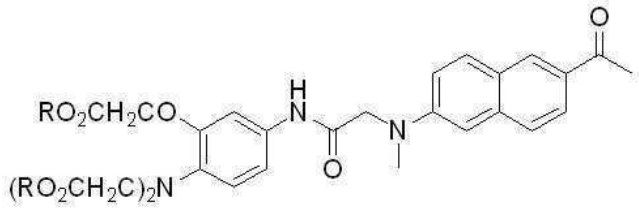
<42> F_{min} 및 F_{max}는 각각 최소 형광 강도 및 최대 형광 강도이다.

<43> 이하, 첨부된 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

<44> 본 발명에 따른 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료는 이광자 형광효율이 매우 커서 세포에 염색되는 염료의 양을 현저하게 줄일 수 있고, 또한, 염료의 분자량이 작아서 세포 내에 염색이 매우 잘되기 때문에 세포질 내 마그네슘 이온의 실시간 영상에 적합하다는 특성을 갖는다.

<45> 본 발명은 하기 화학식 1의 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료를 제공하며:

<46> <화학식 1>



<47>

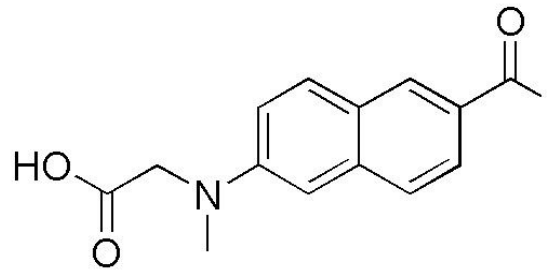
<48> 상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

<49> 상기 화학식 1에서, 2-아세틸-6-(디메틸아미노)나프탈렌은 이광자 발색단으로서 기능하며, *o*-아미노페놀-*N,N,O*-트리아세트산은 Mg^{2+}에 대한 선택적 결합 부위로서 기능한다. 본 발명에 따른 이광자 염료는 Mg^{2+}와 복합체를 형성하는 경우에 강화 이광자 여기 형광 (Two-Photon Excited Fluorescence; TPEF)을 방출하며, 상기 복합체는 용매 환경의 극성에 따라서 매우 다른 파장 범위의 광을 방출하기 때문에, 서로 다른 검출 창들 (detection windows)을 사용함으로써 세포막-결합 탐침들과 상기 복합체가 용이하게 구분될 수 있다.

<50> 한편, 상기 화학식 1의 화합물에 있어서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3일 수 있는데, R이 CH_2OCOCH_3인 경우, 본 발명에 따른 이광자 염료의 세포 투과도를 더욱 향상시킬 수 있게 된다.

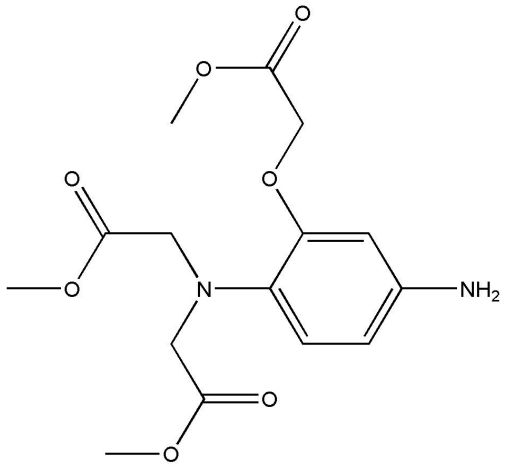
<51> 본 발명은 또한, 화학식 2의 화합물과 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카보디이미드·HCl, 화학식 3의 화합물 및 4-디메틸아미노피리딘을 반응시켜서 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링용 이광자 염료의 제조방법을 제공한다:

<52> <화학식 2>



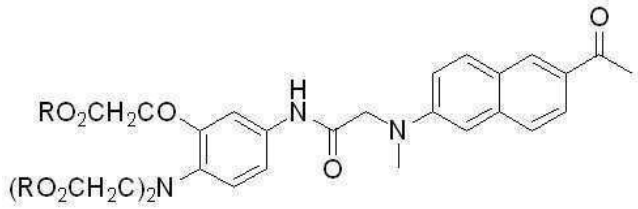
<53>

<54> <화학식 3>



<55>

<56> <화학식 1>

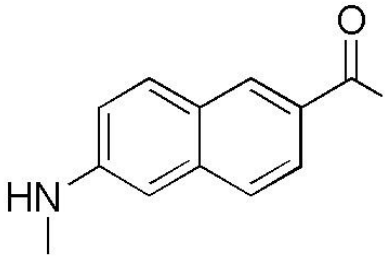


<57>

<58> 상기 식에서, R은 H 또는 CH_2OCOCH_3이다.

<59> 바람직하게는, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 4의 화합물과 메틸브로모아세테이트, Na_2HPO_4 및 NaI를 반응시켜서 제조될 수 있다:

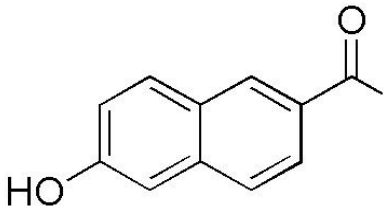
<60> <화학식 4>



<61>

<62> 바람직하게는, 상기 화학식 4의 화합물은 화학식 5의 화합물과 $CH_3NH_2 \cdot HCl$, $Na_2S_2O_3$, NaOH 및 H_2O를 반응시켜서 제조될 수 있다:

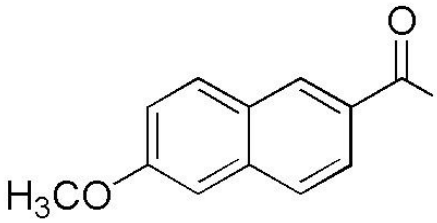
<63> <화학식 5>



<64> .

<65> 또한, 상기 화학식 5의 화합물은 화학식 6의 화합물과 HBr을 반응시켜서 제조될 수 있다:

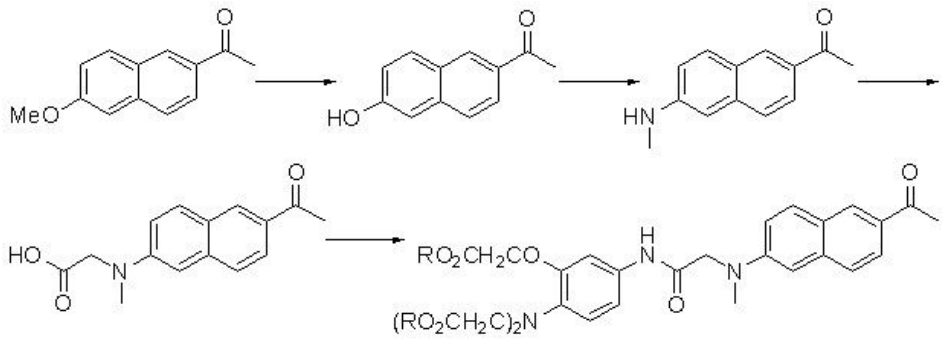
<66> <화학식 6>



<67> .

<68> 참고로, 하기 반응식 1에는 화학식 6의 화합물로부터, 화학식 1의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.

반응식 1



<69>

<70> 전술한 바와 같이, 세포 투과도의 향상을 위해서 상기 R은 H 대신에 CH_2OCOCH_3로 치환될 수 있는데, 바람직하게는, 이러한 치환 과정은 R이 H인 화학식 1의 화합물과 브로모에틸 아세테이트 및 트리에틸아민을 반응시킴으로써 수행될 수 있다.

<71> 한편, 본 발명은 또한 상기 이광자 염료를 관찰 대상이 되는 세포질 내로 주입한 후 방출되는 이광자 여기 형광 이미지를 관찰하는 단계를 포함하는 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법을 제공한다.

<72> 특히, 후술하는 바와 같이, 500-620nm 범위의 파장을 사용하여 상기 이광자 여기 형광 이미지를 얻는 경우에는, 세포막에 결합된 이광자 염료에 의한 발광 기여도를 최소화하면서 세포질 내에 유리 상태로 존재하는 Mg^{2+} 이온들만을 선택적으로 측정하는 것도 가능하다.

<73> 또한, 본 발명에 따른 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법은 종래기술과는 달리 세포질 내 마그네슘의 정성적 분석뿐만 아니라, 이를 정량적으로 측정하는 것도 가능한 바, 바람직하게는 세포질 내 마그네슘 이온 농도의 측정은 하기 수학식 1에 의해서 수행될 수 있다:

<74> <수학식 1>

<75> $[Mg^{2+}] = K_d[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$

<76> 상기 식에서,

<77> K_d는 본 발명에 따른 이광자 염료와 마그네슘 이온의 해리 상수이며,

<78> F는 측정된 이광자 형광 강도이고,

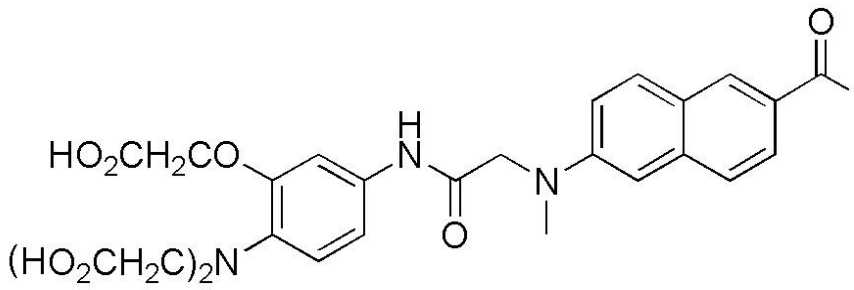
<79> F_{min} 및 F_{max}는 각각 최소 형광 강도 및 최대 형광 강도이다.

<80> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 서술된 것이다.

<81> 제조예 1. 본 발명에 따른 이광자 염료의 제조

<82> 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 이광자 염료인 화학식 7의 화합물을 제조하였다.

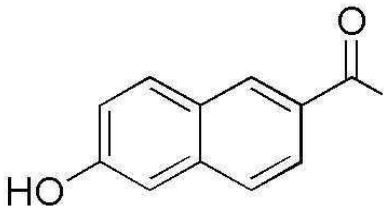
화학식 7



<83>

<84> 제조예 1.1. 6-아세틸-2-히드록시나프탈렌 (화학식 8)의 제조

화학식 8



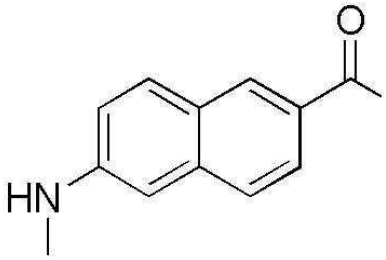
<85>

<86> 빙초산 (100 mL) 중의 6-아세틸-2-메톡시나프탈렌 (10.4 g, 52 mmol) 용액에, 48 %의 HBr (43.0 g, 0.53 mol)을 첨가하였다. 상기 혼합물을 100 ℃에서 12 시간 동안 교반하였다. 과량의 아세트산을 진공 중에서 제거하고, 잔류물을 에틸 아세테이트 중에 흡수시킨 다음, 희석 $NaHCO_3$ 및 염수로 세척하였다. 유기층을 $MgSO_4$로 건조시키고, 용매를 진공 중에서 제거하였다. 최종 산물은 에틸 아세테이트/헥산 (1:1)을 용리액으로 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다.

<87> 수율 7.2 g (74 %); 융점 173 ℃; IR (KBr): 3362, 1664 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.41 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 7.99 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.70 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.20 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 7.18 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 5.70 (br s, 1H), 2.71 (s, 3H). Anal. Calcd for $C_{12}H_{10}O_2$: C, 77.40; H, 5.41. Found: C, 77.52; H, 5.46.

<88> 제조예 1.2. 6-아세틸-*N*-메틸-2-나프틸아민 (화학식 9)의 제조

화학식 9



<89>

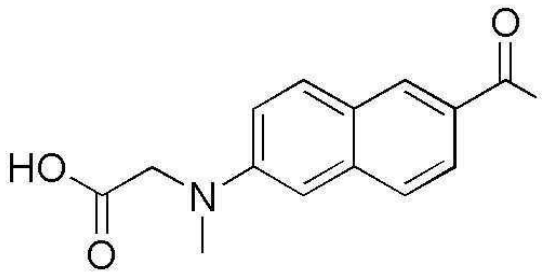
<90> 상기 제조예 1.1에서 제조된 화학식 8의 화합물 (6.5 g, 35 mmol), $Na_2S_2O_5$ (13.3 g, 70 mmol), NaOH (7.0 g, 0.17 mol) 및 H_2O (200 mL)의 혼합물을 스틸-봄 반응기 (steel-bomb reactor) 내에 넣고 $CH_3NH_2 \cdot HCl$ (14.2 g, 0.17 mol)을 첨가한 다음, 혼합물을 140 ℃에서 48 시간 동안 교반하였다. 산물을 여과에 의해서 수집하고, 물로 세척한 다음, 클로로포름/에틸 아세테이트 (50:1)을 용리액으로 사용하는 플래시 컬럼에 의해서 정제하였다. 이어서, 메탄올로부터의 재결정에 의해서 더욱 정제하였다.

<91> 수율 5.9 g (85 %); 융점 181 ℃; IR (KBr): 3347, 1663 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.30 (d, 1H, *J* =

2 Hz), 7.93 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 7.72 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.63 (d, 1H, J = 9 Hz), 6.91 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 6.77 (d, 1H, J = 2 Hz), 4.17 (br s, 1H), 2.97 (s, 3H), 2.67 (s, 3H). Anal. Calcd for $C_{13}H_{13}NO$: C, 78.36; H, 6.58; N, 7.03. Found: C, 78.32; H, 6.56; N, 7.08.

<92> 제조예 1.3. 6-아세틸-2-[*N*-메틸-*N*-(카르복시)아미노]나프탈렌 (화학식 10)의 제조

화학식 10



<93>

<94> 상기 제조예 1.2에서 제조된 화학식 9의 화합물 (4.5 g, 23 mmol), 메틸 브로모아세테이트 (5.2 g, 34 mmol), Na_2HPO4 (4.8 g, 34 mmol) 및 NaI (1.4 g, 9.2 mmol)의 혼합물을 MeCN (150 mL) 중에 넣고, N_2 하에서 18 시간 동안 환류시켰다. 산물을 에틸 아세테이트로 추출하고, 염수로 세척한 다음, 클로로포름/에틸 아세테이트 (30:1)을 용리액으로 사용하는 플래시 컬럼에 의해서 정제하였다.

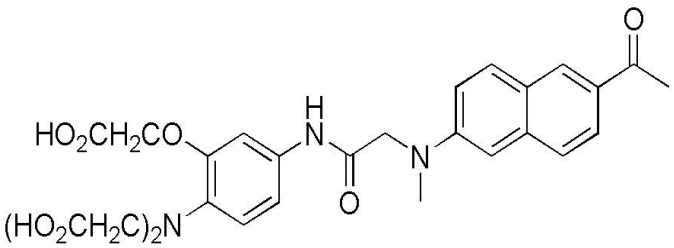
<95> 수율 5.2 g (83 %); 융점 92 ℃; IR (KBr): 1754, 1671 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.32 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.92 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 7.80 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.08 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 6.88 (d, 1H, J = 2 Hz), 4.23 (s, 2H), 3.74 (s, 3H), 3.21 (s, 3H), 2.67 (s, 3H); Anal. Calcd for $C_{16}H_{17}NO_3$: C, 70.83; H, 6.32; N, 5.16. Found: C, 70.88; H, 6.35; N, 5.10.

<96> 상기 얻어진 중간체 (2.0 g, 7.4 mmol) 및 KOH (0.8 g, 14 mmol)를 에탄올/H_2O (50/10 mL)에 넣고 5 시간 동안 교반하였다. 결과물인 용액을 얼음물 (100 mL)로 희석하고, < 5 ℃에서 pH 3까지 농축 HCl 수용액을 천천히 첨가하였다. 결과물인 침전을 수집하고, 증류수로 세척한 다음, MeOH로부터의 재결정에 의해서 정제하였다.

<97> 수율 1.6 g (84 %); 융점 158 ℃; IR (KBr): 2906, 1739, 1678 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.39 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.86 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 7.84 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.64 (d, 1H, J = 9 Hz), 7.18 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 6.93 (d, 1H, J = 2 Hz), 4.27 (s, 2H), 3.19 (s, 3H), 2.65 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 199.3, 173.2, 149.8, 138.2, 130.9, 130.9, 130.8, 126.4, 125.7, 124.1, 116.0, 105.5, 53.5, 38.7, 25.4 ppm; Anal. Calcd for $C_{15}H_{15}NO_3$: C, 70.02; H, 5.88; N, 5.44. Found: C, 70.08; H, 5.79; N, 5.45.

<98> 제조예 1.4. 본 발명에 따른 이광자 염료 (화학식 11)의 제조

화학식 11

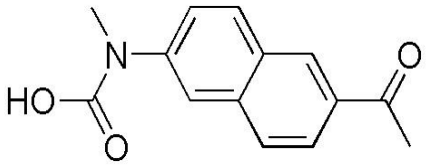


<99>

<100> 상기 제조예 1.3에서 제조된 화학식 10의 화합물 (0.50 g, 1.9 mmol) 및 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드·HCl (0.44 g, 2.3 mmol)을 DMF (20 mL)에 넣고 혼합한 다음 20분 동안 교반하였다. 상기 혼합물에, 하기 화학식 12의 화합물 (0.71 g, 2.1 mmol) 및 4-디메틸아미노피리딘 (0.033 g, 0.29 mmol)을 첨가하고

N_2 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 하기 화학식 12의 화합물은 문헌 (B. Metten, M. Smet, N. Boens, W. Dehaen, *Synthesis* **2005**, *11*, 1838.)에 개시된 바에 따라서 제조하였다.

화학식 12



<101>

<102> 산물을 에틸 아세테이트로 추출하고, $MgSO_4$ 상에서 건조시킨 다음, 용매를 진공 중에서 제거하였다. 최종 산물은 클로로포름/에틸 아세테이트 (1:1)를 용리액으로 사용하는 컬럼 크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 메탄올로부터의 재결정을 통하여 더욱 정제함으로써 백색 고체를 수득하였다.

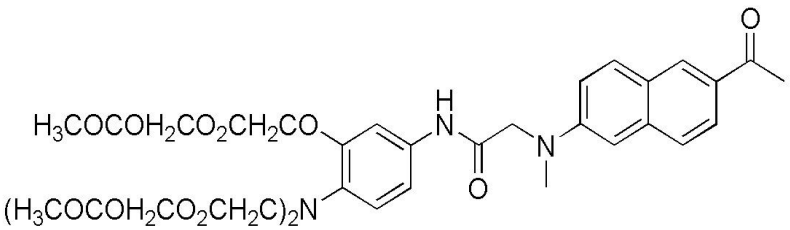
<103> 수율 0.64 g (58 %); 융점 120 ℃; IR (KBr): 3264, 1754, 1663 cm^{-1}; ^1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.35 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 8.15 (s, 1H), 7.96 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 7.86 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.69 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.35 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 7.12 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 7.05 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 6.84 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 6.80 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 4.68 (s, 2H), 4.16 (s, 4H), 4.09 (s, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.69 (s, 6H), 3.22 (s, 3H), 2.68 (s, 3H); Anal. Calcd for $C_{30}H_{33}N_3O_9$: C, 62.17; H, 5.74; N, 7.25. Found: C, 62.22; H, 5.76; N, 7.16.

<104> 상기 에스테르 (0.5 g, 0.86 mmol)를 상기 제조예 1.3에 서술된 바와 같은 방법에 의해서 가수분해시켰다. 결과물인 침전을 수집하고, 증류수로 세척한 다음, 메탄올-$CHCl_3$-페트로륨 에테르로부터의 결정화에 의해서 정제하였다.

<105> 수율 0.32 g (69 %); 융점 148 ℃; IR (KBr): 3271, 2905, 1747, 1663 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): δ 8.38 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 7.84 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.83 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.22 (s, 1H), 7.18 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 7.03 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 6.97 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 6.85 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz), 4.61 (s, 2H), 4.22 (s, 2H), 4.06 (s, 4H), 3.20 (s, 3H), 2.62 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ = 199.2, 174.3, 171.1, 169.7, 150.2, 149.9, 138.0, 135.9, 133.3, 130.9, 130.8, 130.7, 126.3, 125.8, 124.0, 120.0, 116.2, 113.8, 107.1, 105.8, 65.3, 56.4, 54.3, 39.1, 25.2 ppm; Anal. Calcd for $C_{27}H_{27}N_3O_9$: C, 60.33; H, 5.06; N, 7.82. Found: C, 60.31; H, 5.12; N, 7.78.

<106> 제조예 1.5. 본 발명에 따른 이광자 염료 (화학식 13)의 제조

화학식 13



<107>

<108> 상기 제조예 1.4에서 제조된 화학식 11의 화합물 (0.15 g, 0.28 mmol), 브로모메틸 아세테이트 (0.34 g, 2.2 mmol) 및 Et_3N (0.22 g, 1.7 mmol)을 $CHCl_3$ (5 ml)에 넣고 N_2 하에서 15 시간 동안 교반하였다. 용액을 진공 중에서 제거하고, 조 생성물을 에틸 아세테이트/헥산 (3:1)을 용리액으로 사용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 이어서, 메탄올로부터의 재결정화에 의해서 더욱 정제함으로써 백색 고체를 수득하였다.

<109> 수율 0.12 g (58%); 융점 104 ℃; IR (KBr): 3257, 1754, 1708, 1663 cm^{-1}; ^1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 8.35 (d, 1H, *J* = 2 Hz), 8.18 (s, 1H), 7.97 (dd, 1H, *J* = 9, *J* = 2 Hz), 7.87 (d, 1H, *J* = 9 Hz), 7.70 (d, 1H,

J = 9 Hz), 7.34 (d, 1H, J = 2 Hz), 7.15 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 7.05 (d, 1H, J = 2 Hz), 6.89 (dd, 1H, J = 9, J = 2 Hz), 6.84 (d, 1H, J = 9 Hz), 5.80 (s, 2H), 5.75 (s, 4H), 4.71 (s, 2H), 4.18 (s, 4H), 4.09 (s, 2H), 3.23 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 2.09 (s, 6H), 2.07 (s, 3H); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ = 197.9, 170.1, 169.7, 169.7, 168.0, 167.7, 150.1, 149.2, 137.3, 135.9, 133.0, 132.4, 131.6, 130.3, 127.0, 126.7, 125.3, 121.0, 116.7, 114.1, 107.8, 107.7, 79.5, 77.4, 65.9, 59.6, 53.7, 40.4, 26.7, 20.9, 20.8 ppm; Anal. Calcd for $C_{36}H_{39}N_3O_{15}$: C, 57.37; H, 5.22; N, 5.58. Found: C, 57.32; H, 5.31; N, 5.52.

<110> 실시예 1. 흡광 스펙트럼 측정

<111> 상기에서 제조된 화학식 13의 화합물에 대한 흡광 스펙트럼을 Hewlett-Packard 8453 다이오드 정렬 스펙트로미터 상에서 측정하였으며, 형광 스펙트럼을 1 cm 표준 석영 셀을 구비한 Amico-Bowman series 2 발광 스펙트로미터를 사용하여 측정하였다. 형광 양자 수율은 참고문헌 (J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991.)에 기재된 바와 같이, Coumarin 307을 사용하여 측정하였다.

<112> 다양한 용매들 중에서 화학식 13의 화합물에 대한 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼을 측정하였으며, 그 결과를 각각 도 1a 및 1b에 도시하였고, 하기 표 1에는 다양한 용매들 중에서 화학식 13의 화합물에 대한 최대 발광 파장 ($\lambda_{max}^{(1)}$) 및 최대 형광 파장 (λ_{max}^{fl})을 나타내었다.

표 1

<113>

화합물	용매 (E_T^N)*	$\lambda_{max}^{(1)}$ (nm)	λ_{max}^{fl} (nm)
화학식 13	1,4-디옥산 (0.164)	344	413
	DMF (0.386)	356	441
	에탄올 (0.654)	359	473
	H_2O (1.000)	363	495

<114> *: 괄호 안의 수치는 용매 극성에 대한 정규화된 경험적 패러미터들이다 (C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319-2358.)

<115> 도 1a, 1b 및 표 1로부터 알 수 있는 바와 같이, 용매 극성이 증가함에 따라서 큰 적색 이동 (bathochromic shift)이 관찰된다는 점은 본 발명에 따른 화합물이 극성 탐침으로서 매우 유용하다는 것을 나타낸다.

<116> 실시예 2. Mg^{2+} 농도 변화에 따른 흡광도 변화 측정

<117> 화학식 7에 따른 화합물의 Mg^{2+} 농도 변화에 따른 흡광도 변화를 측정하였으며, 그 결과를 하기 도 2a 및 2b에 도시하였다. 도 2a로부터 알 수 있는 바와 같이, Tris 버퍼 용액 중의 화학식 7의 화합물 (10 mM, pH 7.05)에 Mg^{2+}를 첨가하였을 때, 흡수 스펙트럼에 경미한 변화가 관찰되었다. 이와는 대조적으로, Mg^{2+} 농도가 증가함에 따라서 형광도는 급격하게 증가하였으며 (도 2b), 이는 금속-이온 복합체에 의한 광유도 전자-전달 (photoinduced electron-transfer, PET) 과정의 차단 때문인 것으로 추측된다. 100 mM Mg^{2+}의 존재 하에서 형광도 향상 인자는 17로 관측되었다.

<118> 한편, 거의 동일한 결과가 이광자 과정에 대해서도 관찰되었으며, 도 2c에는 다양한 농도의 $MgCl_2$ (0-100 mM) 존재 하에서 이광자 형광 스펙트럼을 도시하였다. 더 나아가, 도 3a 내지 3c에는 Ca^{2+} (0-1000 μM) 존재 하에서 화학식 7의 화합물에 대한 일광자 흡수 스펙트럼 (도 3a), 발광 스펙트럼 (도 3b) 및 이광자 형광 스펙트럼 (3c)을 각각 도시하였다.

<119> 실시예 3. 베네시-힐데브란드 플롯 (Benesi-Hildebrand Plot)

<120> 화학식 7의 화합물의 Mg^{2+} 및 Ca^{2+}에 대한 복합체 모드는 베네시-힐데브란드 플롯 분석법 (H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703.)에 의해서 결정하였다. 형광 변화는 화학식 7의 화합물 (L)과 금속 이온 (M) 사이의 1:1 복합체 형성에 의해서만 야기된다는 전제 하에서, 총 탐침 농도 및 형광 강도는

$[L]_0$ = [L] + [LM] 및 F = Φ_L[L] + Φ_{ML}[ML]으로 표시될 수 있다. 여기에서, $[L]_0$ 및 $[M]_0$는 각각 총 농도이고, [L] 및 [LM]은 각각 L 및 M의 평형 농도이고, Φ_L 및 Φ_{ML}은 유리 형태 및 복합 형태의 화학식 7의 화합물에 대한 형광 양자 수율이다. 만약 $[M]_0$가 $[L]_0$보다 월등하게 큰 값을 갖는다면, 베네시-힐데브란드 식은 하기 수학식 2와 같이 표현될 수 있다.

수학식 2

$$\frac{1}{F-F_{min}} = \frac{1}{(\phi_{ML}-\phi_L)[L]_0} + \frac{1}{K[L]_0(\phi_{ML}-\phi_L)[M]_0}$$

<121>

<122> 화학식 7의 화합물과 금속 이온들 사이에서 1:1 금속-탐침 복합체가 형성된다면, 수학식 2에 따른 데이터의 베네시-힐데브란드 플롯은 선형일 것이며 (H. A. Benesi, J. H. Hildebrand, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, *71*, 2703.), 도 4a 및 4b에는 각각 화학식 7의 화합물의 Mg^{2+} 및 Ca^{2+}에 대한 결합에 있어서, $1/(F-F_{max})$ vs $1/[Mg^{2+}]$의 플롯을 도시하였다. 도 4a 및 4b로부터, 플롯이 선형임을 알 수 있으며, 이로부터 1:1 복합체가 형성된다는 것을 추측할 수 있다.

<123> 실시예 4. 해리 상수의 결정

<124> pH 7.05인 24 ℃, 100 mM KCl 및 20 mM NaCl 중의 Mg^{2+}-EGTA에 대한 해리 상수 (dissociation constant, K_d)를, WinMAXC (C. Patton, Stanford University, Palo Alto, CA) 프로그램을 사용하여 계산하였으며, 계산값은 28 mM이었다. 용액 중의 유리 $[Mg^{2+}]$ 수준은 K_d = 28 mM을 사용하는 Mg^{2+}-EGTA 완충용액에 의해서 조절하였다 (G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440.).

<125> Mg^{2+}-화학식 7의 화합물 복합체에 대한 K_d를 결정하기 위해서, 10 mM Tris, 100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA로 이루어진 용액 3.0 mL 중에, 화학식 7의 화합물 2 μM을 넣고, 24 ℃에서 HCl로 pH를 7.05로 조정한 다음, 형광 스펙트럼을 기록하였다. 이어서, 상기 용액 1.5 ㎕를 버리고, 화학식 7의 화합물 2 μM, 103.6 mM의 $MgCl_2$, 4.6 mM의 EGTA, 10 mM의 Tris를 포함하며, pH가 7.05인 용액 1.5 ㎕를 보충한 다음 스펙트럼을 기록하였다.

<126> 이전 용액은 1 mM의 유리 EGTA를 포함하지만, 다음 용액은 100 mM의 유리 Mg^{2+}를 포함하기 때문에, 99.95:0.05 (v/v) 복합체는 0.05 mM 유리 Mg^{2+}가 되었다. 1.5, 3.0, 6.0, 6.0, 6.0, 6.5, 15, 15, 61, 63, 128, 365, 420 및 970㎕의 혼합물을 연속적으로 폐기하고 각각을 고농도 Mg 스톡 용액의 동일한 부피로 대체함으로써, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0, 4.0, 6.0, 10, 21, 32 및 54 mM의 유리 Mg^{2+}를 얻었다.

<127> 100 mM KCl 및 30 mM MOPS 중의 pH 7.2에서의 Ca^{2+}-EGTA에 대한 해리 상수 (K_d)는 전술한 바와 같이 계산하였으며, 그 값은 144 nM이었다. 다양한 $[Ca^{2+}]$를 포함하는 일련의 보정 용액들 (calibration solutions)은 2가지 종류의 용액 (10 mM K_2EGTA를 포함하는 용액 A 및 10 mM CaEGTA를 포함하는 용액 B)을 다양한 비율로 혼합함으로써 얻었으며, 다만 50-1000 mM 농도들은 $CaCl_2$를 첨가함으로써 얻었다 (G. Grynkiewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien. *J. Biol. Chem.* **1985**, *260*, 3440; R. Y. Tsien, T. Pozzan, T. J. Rink. *J. Cell Biol.* **1982**, *94*, 325; R. Y. Tsien, T. Pozzan, *Methods Enzymol.* **1989**, *172*, 230; A. Takahashi, P. Camacho, J. D. Lechleiter, B. Herman. *Physiol. Rev.* **1999**, *79*, 1089.). 2가지 용액들 모두 100 mM KCl 및 30 mM MOPS를 포함하며, pH 7.2로 조정되었다.

<128> 화학식 7의 화합물과 Mg^{2+} 사이에 1:1 금속-리간드 복합체가 형성되는 경우에, 그 평형 상태는 하기 수학식 3과 같이 표현될 수 있으며, 여기에서 L 및 M은 각각 화학식 7의 화합물과 Mg^{2+}를 나타낸다.

<129> 총 탐침 및 금속 이온 농도는 각각 $[L]_0$ = [L] + [LM] 및 $[M]_0$ = [M] + [LM]로 정의되며, $[L]_0$ 및 $[M]_0$의 값이

주어지는 경우에 K_d는 하기 수학식 4 또는 수학식 5로 표현될 수 있다:

수학식 3

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

<130>

수학식 4

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

<131>

수학식 5

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

<132>

<133> 상기 식에서, F는 측정된 형광 강도이고, F_{min}은 최소 형광 강도이며, F_{max}는 최대 형광 강도이다. 수학식 5에 따른 적정 곡선 (도 5a)에 가장 잘 부합되는 K_d 수치를 상용 엑셀 프로그램을 사용하여 계산하였다 (J. R. Long, R. S. Drago, *J. Chem. Ed.* **1982**, *59*, 1037; K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193).

<134> 또한, 이광자 과정에 대한 K_d 수치를 결정하기 위해서, 780 nm의 파장 및 1230 mW의 출력에 세팅되고 (초점 평면에서 대략 10 mW에 해당), 모드-락된 티타늄-사파이어 레이저 광원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)에 의해서 여기되는 DM IRE2 Microscope (Leica)를 사용하여 TPEF 스펙트럼을 얻었다. TPEF 적정 곡선 (도 5b)을 얻었으며, 이를 수학식 5에 피팅시켰다.

<135> 전술한 과정에 의해서 Mg^{2+} 및 Ca^{2+}에 대한 일광자 과정에 있어서의 해리 상수를 측정한 결과, 각각 1.4 ± 0.1 mM 및 9.0 ±0.3 mM이었으며, 이는 이광자 과정에 있어서의 해리 상수인 1.6 ±0.1 mM 및 11 ±1 mM과 매우 유사한 수치였다. 상기 결과는 일광자 과정 및 이광자 과정 모두에 있어서 결합이 진행되는 동안 유사한 메카니즘이 작동된다는 것을 의미한다.

<136> 실시예 5. 금속 양이온들에 대한 선택성 측정

<137> 도 6a에는 화학식 7의 화합물의 다른 금속 양이온들에 대한 선택성을 도시하였으며, 도 6a를 참조하면 화학식 7의 화합물은 Mg^{2+}, Ca^{2+}, Zn^{2+} 및 Mn^{2+}에 대해서는 중간 내지 강한 반응을 보였으나, Fe^{2+}, Cu^{2+} 및 Co^{2+}에 대해서는 훨씬 약한 반응을 보였다. 화학식 7의 화합물의 금속 이온 선택성은 기존의 MgG 및 Mag-Fura-2 (*The Handbook*s-A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, 10th ed,; Haugland, R. P. Ed.; Molecular Probes: Eugene, OR, **2005**.)에 대해서 보고된 바와 유사한 것이다.

<138> 한편, 유리 Mg^{2+}의 세포내 농도 (0.1-6.0 mM)는 Ca^{2+}의 세포내 농도 (10 nM -1 μM)보다 훨씬 높고, 킬레이트화 가능한 Zn^{2+}는 생체 내의 특정 영역들을 제외하고는 존재하지 않기 때문에, 상기 화학식 7의 화합물은 Ca^{2+} 및 Zn^{2+}에 의한 간섭 없이 Mg^{2+}를 검출할 수 있게 한다. 더욱이, 도 6b에서 볼 수 있는 바와 같이, 화학식 7의 화합물 및 화학식 7의 화합물-Mg^{2+}는 생물학적으로 관련성 있는 pH 범위 내에서 pH 변화에 민감하지 않은 특성을 갖는다.

<139> 실시예 6. 상용 탐침들과의 이광자 스펙트럼 특성 비교

<140> 완충용액 중의 화학식 7의 화합물, MgG 및 Mag-fura-2와, Mg^{2+}와의 복합체에 대한 이광자 스펙트럼 특성을 도 7

에 비교 도시하였으며, 하기 표 2에는 각 탐침들에 대한 광물리학적 특성들을 열거하였다.

표 2

<141>

화합물[1]	$\lambda_{max}^{(1)}$ (nm)[2]	λ_{max}^{fl} (nm)[2]	$\lambda_{max}^{(2)}$ (nm)[3]	Φ[4]	δ_{max}[5]	Φ δ[6]
화학식 13	360	495	ND[7]	0.07[8]	ND[7]	ND[7]
화학식 7	365	498	ND[7]	0.04	ND[7]	ND[7]
화학식 7-Mg^{2+}	365	498	780	0.58	215	125
Mag-fura-2-Mg^{2+}	330[9]	491[9]	780	0.30[9]	56	17
MgG-Mg^{2+}	506[9]	532[9]	800	0.42[9]	37	16

<142> 1) 모든 데이터들은 10mM Tris 완충용액 중에서 (100 mM KCl, 20 mM NaCl, 1 mM EGTA, pH 7.05), 50 mM의 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 존재 및 부존재 하에서 측정되었다.

<143> 2) 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼의 λ_{max}

<144> 3) 이광자 여기 스펙트럼의 λ_{max}

<145> 4) 형광 양자 수율, ±10%

<146> 5) 10^{-50} cm^4s/광자 (GM) 중의 피크 이광자 단면, ±15%

<147> 6) 이광자 활동 단면

<148> 7) 미결정. 이광자 여기 형광 강도가 너무 미약하여 단면을 정확하게 측정할 수 없음.

<149> 8) DMF 중에서 Φ=0.32±0.02

<150> 9) H. Szmacinski, J. R. Lakowicz, *J. Fluoresc.* 1996, *6*, 83-95.

<151> 도 7 및 표 2의 결과로부터, 종래의 통상적인 탐침들보다 본 발명에 따른 화합물들을 사용하는 경우에, TPM 이미지가 더욱 밝다는 것을 알 수 있다.

<152> 실시예 7. 본 발명에 따른 이광자 염료를 사용한 세포 관찰

<153> Hep3B 세포들을 페니실린/스트렙토마이신 및 10% 우 태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)으로 보충된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 중에서 배양하였으며, 배양은 37℃ CO_2 배양기 중에서 수행하였다.

Hep3B 세포들은 무혈청 배지로 3회 세척되었으며, 무혈청 배지 중의 화학식 13의 화합물-Mg^{2+} 복합체 2μM와 함께 37℃에서 30분 동안 배양되었다. 세포들을 무혈청 배지로 3회 세척하고, 무혈청 배지 중에서 15분 동안 더 배양한 다음 관찰하였다.

<154> 화학식 13의 화합물이 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 현미경 이미지들은 스펙트럼 공초점 및 다광자 현미경 (spectral confocal and multiphoton microscopes) (Leica TCS SP2)을 사용하여 ×100 오일 물체, 천공수 (NA) = 1.30으로 얻었다. 이광자 형광 현미경 이미지들은 모드-락된 티타늄-사파이어 레이저 광원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)으로 파장 780 nm에서 탐침들을 여기킴으로써 얻었다. 이미지들은 각각 360-620nm, 360-460nm 및 500-620nm의 파장에서 얻어졌으며, 신호들을 400 Hz 스캔 속도에서 8 비트 미표지된 512 ×512 픽셀들로 수집하기 위해서 내부 PMT들이 사용되었다.

<155> 도 8a 내지 8c에는 각각 360-620nm, 360-460nm 및 500-620nm에서 얻어진 이광자 현미경 이미지들을 도시하였다. Tris 완충용액 중의 화학식 7의 화합물-Mg^{2+}의 형광 양자 수율 (Φ=0.58) 및 DMF 중의 화학식 13의 화합물의 형광 양자 수율이 Tris 완충용액 중의 화학식 7의 화합물의 형광 양자 수율 (Φ=0.04) 및 화학식 13의 화합물의 형광 양자 수율 (Φ=0.07)보다 훨씬 크기 때문에, 세포들로부터 발광된 TPEF는 대부분 세포내 화학식 7의 화합물-Mg^{2+} 복합체 또는 세포막 결합 탐침들로부터 기인한 것이다. DMF 중의 화학식 13의 화합물은

후자에 대한 훌륭한 모델인 바, 이는 λ_{max}^{fl} 수치가 비슷하기 때문이다 (하기 도 8d 참조). 이러한 설명에 대한 추가적인 증거는 2 mM 에틸렌디아민테트라아세트산 존재 하의 10 μM 칼시마이신 처리 이후에 화학식 13의 화합물-Hep3B 세포들로부터 방출되는 무시할 만한 TPEF에 의해서 제공되며; 형광은 100 mM $MgCl_2$ 존재 하의 10 μM 칼시마이신 처리에 의해서 증가한다. 더욱이, 360-620nm에서 수집된 이미지들은 집중적인 반점들 및 밝은 부위들을 나타내며, 이때 TPEF 최대값들은 λ=440 (청색) 및 498 nm (적색)에서 나타난다 (도 8d).

<156> 표 2로부터 알 수 있는 바와 같이, Tris 완충용액 중에서 측정된 발광 스펙트럼과 비교해 보면, 청색 밴드는 현저하게 청색-이동되었지만, 적색 밴드는 거의 동일하였다. 2종류의 스펙트럼은 모두 439 및 488 nm에서 최대값을 갖고 (도 8d의 옅은 청색선), 426 및 498 nm에서 최대값을 갖는 (도 8d의 갈색선) 2가지 가우스 함수들 (Gaussian functions)에 피팅될 수 있다. 분리된 스펙트럼들의 피크 위치들은 비슷하며, 이는 탐침들이 다른 극성을 지니면서 2가지 영역들에 존재할 수 있다는 것을 의미한다. 더 나아가, 집중 지점 (intense spot)은 여기 상태의 수명이 3.3 ns이며, 이는 2.2 ns에 집중된 수명 분포 곡선의 최상단보다 훨씬 긴 것이다. 이러한 결과들로부터, 본 발명에 따른 탐침들은 2가지 서로 다른 환경 중에 존재하며, 이 중 더욱 극성이 강한 것은 세포질 내에 (짧은 수명을 갖는 적색 발광), 극성이 약한 것은 세포막에 결합되어 (긴 수명을 갖는 청색 발광) 존재한다는 사실을 추측할 수 있다.

<157> 본 발명에 따른 이광자 염료를 사용하는 경우, 세포막 결합 탐침들로부터 기인하는 오차를 최소화할 수 있는 바, 이는 세포내 화학식 7 (또는 화학식 13)의 화합물-Mg^{2+} 복합체로부터의 TPEF를 측정함으로써 가능하다. 도 8d에 도시된 바와 같이, 분리된 가우스 함수 중에서 단파장 밴드 (옅은 청색선)는 λ ≒ 500nm에서 바닥선으로 감소하였으며, 따라서 세포막 결합 탐침들로부터 발광된 TPEF는 λ>500nm에서는 무시할 만하다. 반면에, DMF 중에 화학식 13의 화합물을 모델로 사용하는 경우에는, 500nm를 초과하는 발광 밴드의 꼬리 부분은 오차를 유발할 수도 있지만, λ>500nm에서의 꼬리 부분 영역은 전체 발광 밴드의 약 5% 정도를 차지하기 때문에, 중요한 고려사항이 되지는 않는다. 결과적으로, 500-620nm에서 수집된 TPEF 이미지들은 균질한 특성을 갖는 반면에, 단파장인 360-460nm를 사용하여 수집된 TPEF 이미지들은 집중 지점들을 보여준다. 그러므로, 500-620nm 범위의 파장을 사용하는 경우에는 세포막 결합 탐침들에 의한 기여도를 최소화하면서 Mg^{2+} 이온들을 측정할 수 있게 된다.

<158> 실시예 8. 세포질내 유리 Mg^{2+} 이온 농도의 측정

<159> 휴지 상태의 세포질 내 유리 Mg^{2+} 이온 농도를 하기 수학식 1에 의해서 측정하였다.

<160> <수학식 1>

<161> $$[Mg^{2+}] = K_d[(F-F_{min})/(F_{max}-F)]$$

<162> 상기 식에서,

<163> K_d는 본 발명에 따른 이광자 염료와 마그네슘 이온의 해리 상수이며,

<164> F는 측정된 이광자 형광 강도이고,

<165> F_{min} 및 F_{max}는 각각 최소 형광 강도 및 최대 형광 강도이다.

<166> F_{min}, 즉 최소 형광 강도의 측정은 2mM의 EDTA 존재하에서 10μM 칼시마이신을 사용하여 세포내 Mg^{2+}를 고갈시킴으로써 수행하였고, F_{max}, 즉 최대 형광 강도는 100mM $MgCl_2$ 존재하에서 10μM 칼시마이신을 사용하여 측정하였다 (G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, *128*, 344; I. J. Reynolds, *Current Protocols in Neuroscience*; Wiley: New York; 1998).

<167> 도 9a 내지 9c에는 각각 화학식 13의 화합물 (2μM)로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (F의 측정, 도 9a), 2mM의 EDTA 존재하에서 10μM 칼시마이신을 처리한 후 화학식 13의 화합물 (2μM)로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (F_{min}의 측정, 도 9b) 및 100mM $MgCl_2$ 존재하에서 10μM 칼시마이신을 처리한 후 화학

식 13의 화합물 (2μM)로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (F_{max}의 측정, 도 9c)를 도시하였다.

<168> 휴지 상태 Hep3B 세포에 있어서, 측정된 세포질내 유리 Mg^{2+} 이온의 농도는 0.65±0.10mM이었으며, 이러한 수치는 기존 문헌들에 보고된 바와 잘 일치하는 값이다 (J. G. Fitz, A. H. Sostman, J. P. Middleton, *Am. J. Physiol. (London)* **1994**, *266*, G677-G684; M. R. Cho, H. S. Thatte, M. T. Silvia, D. E. Golan, *FASEB J.* **1999**, *13*, 677-683).

<169> 비록 종래에 새로이 개발된 탐침인 2,3-디시아노히드로퀴논 (DCHQ)를 사용하여 이광자 형광 현미경으로 세포질내 마그네슘 이온을 정성적으로 분석한 결과는 보고된 바가 있지만 (G. Farruggia, S. Iotti, L. Prodi, M. Montalti, N. Zaccheroni, P. B. Savage, V. Trapani, P. Sale, F. I. Wolf, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 344-350), 정량적 분석 결과는 전혀 보고된 바가 없다.

<170> 실시예 9. 마우스 해마상 돌기의 미세박편 관찰

<171> 본 발명에 따른 이광자 염료가 조직의 심층 관찰에 유용하다는 점을 입증하기 위해서, 생후 3일된 마우스로부터 얻어진 해마상 돌기의 미세박편 (acute hippocampal slice)을 37℃에서 30분 동안 5μM의 화학식 13의 화합물과 함께 배양하였으며, 도 10a 내지 10d에는 관찰 사진들을 도시하였다.

<172> 도 10a는 명배경 이미지 (brightfield image)이며, 이를 참조하면 톱니모양의 뇌회 (dentate gyrus) 뿐만 아니라, CA1 및 CA3 영역들이 도시되어 있다 (10배 확대). 도 10b는 동일한 배율의 이광자 현미경 관찰 사진이며 (100-300㎛ 깊이), 동일한 영역들에서 Mg^{2+}가 분포하는 것을 알 수 있다. 한편, 상기 CA3 영역의 경우 Zn^{2+}가 발광에 기여하였을 가능성을 배제할 수는 없지만, 동일한 영역을 더욱 높은 배율로 관찰한 도 10c (40배 배율) 및 도 10d (100배 배율)을 참조하면, CA1 영역의 피라미드형 뉴런층에서 Mg^{2+} 분포가 관찰되며, 이러한 영역에는 Zn^{2+}가 거의 존재하지 않는다는 점을 감안하면 본 발명에 따른 이광자 염료가 Mg^{2+}에 대해서 높은 선택성을 갖는다는 점을 알 수 있다. 더 나아가, 도 10d를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 심층 조직 내부의 핵에 존재하는 Mg^{2+}까지도 탐지할 수 있다는 점을 알 수 있다.

발명의 효과

<173> 본 발명에 따른 이광자 염료는 세포질 내 마그네슘 이온의 실시간 영상에 매우 적합하며, 이는 Mg^{2+}에 대한 이광자 여기 형광 현상에 있어서 17배 이상의 향상 효과를 나타내고, 이는 종래 통상적인 탐침들에 비해서 7배 이상의 높은 수치이다. 따라서, 세포에 염색되는 염료의 양을 현저하게 줄일 수 있고, 또한, 염료의 분자량이 작아서 세포 내에 염색이 매우 잘되며, 심층 조직 내부에 존재하는 Mg^{2+}의 모니터링에도 매우 적합하고, 세포질 내 Mg^{2+}를 정성적 뿐만 아니라 정량적으로도 측정할 수 있다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1a 및 1b는 본 발명에 따른 이광자 염료에 대한 일광자 흡수 및 발광 스펙트럼을 측정한 결과를 도시한 그래프이다.

<2> 도 2a 내지 2c는 본 발명에 따른 이광자 염료의 Mg^{2+} 농도 변화에 따른 일광자 흡수 스펙트럼 (도 2a), 발광 스펙트럼 (2b) 및 이광자 형광 스펙트럼 (2c)를 도시한 그래프이다.

<3> 도 3a 내지 3c는 본 발명에 따른 이광자 염료의 Ca^{2+} 농도 변화에 따른 일광자 흡수 스펙트럼 (도 3a), 발광 스펙트럼 (3b) 및 이광자 형광 스펙트럼 (3c)를 도시한 그래프이다.

<4> 도 4a 및 4b는 각각 본 발명에 따른 이광자 염료의 Mg^{2+} 및 Ca^{2+}에 대한 결합에 있어서, $1/(F-F_{max})$ vs $1/[Mg^{2+}]$의 플롯을 도시한 그래프이다.

<5> 도 5a는 본 발명에 따른 세포질 내 마그네슘의 실시간 모니터링 방법에 있어서, 수학식 5에 따른 적정 곡선을 도시한 그래프이고, 도 5b는 이광자 여기 형광 적정 곡선을 도시한 그래프이다.

<6> 도 6a는 본 발명에 따른 이광자 염료의 Mg^{2+} 이외의 다른 금속 양이온들에 대한 선택성을 도시한 그래프이며, 도

6b는 본 발명에 따른 이광자 염료의 pH 변화에 따른 형광강도를 도시한 그래프이다.

<7> 도 7은 본 발명에 따른 이광자 염료와 Mg^{2+}와의 복합체 및 종래기술에 따른 탐침들과 Mg^{2+}와의 복합체에 대한 이광자 스펙트럼 특성을 비교 도시한 도면이다.

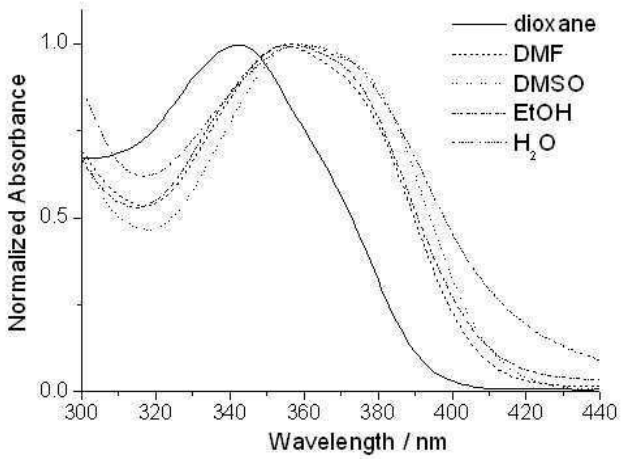
<8> 도 8a 내지 8c는 Hep3B 세포들을 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지한 후, 각각 360-620nm, 360-460nm 및 500-620nm의 파장을 사용하여 얻어진 이광자 현미경 사진들을 도시한 도면이다.

<9> 도 9a 내지 9c는 각각 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (도 9a), 2mM의 EDTA 존재하에서 10μM 칼시마이신을 처리한 후 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (도 9b) 및 100mM $MgCl_2$ 존재하에서 10μM 칼시마이신을 처리한 후 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지된 Hep3B 세포들의 이광자 형광 이미지 (도 9c)를 도시한 도면이다.

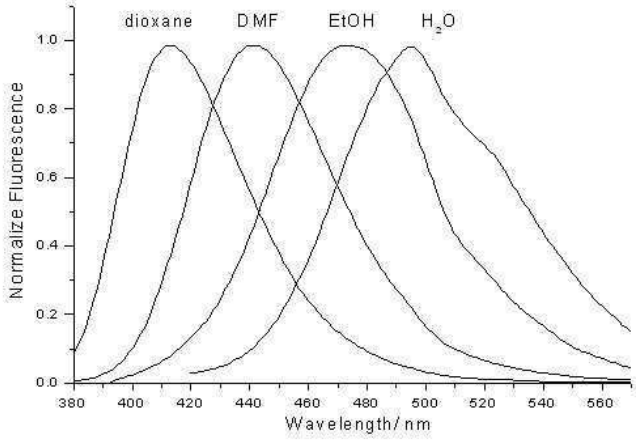
<10> 도 10a 내지 10d는 마우스 해마상 돌기의 미세박편을 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지한 후 관찰한, 10배 배율의 명배경 이미지 (도 10a), 10배 배율의 이광자 현미경 관찰 사진 (도 10b), 40배 배율의 이광자 현미경 관찰 사진 (도 10c) 및 100배 배율의 이광자 현미경 관찰 사진 (도 10d)을 도시한 도면이다.

도면

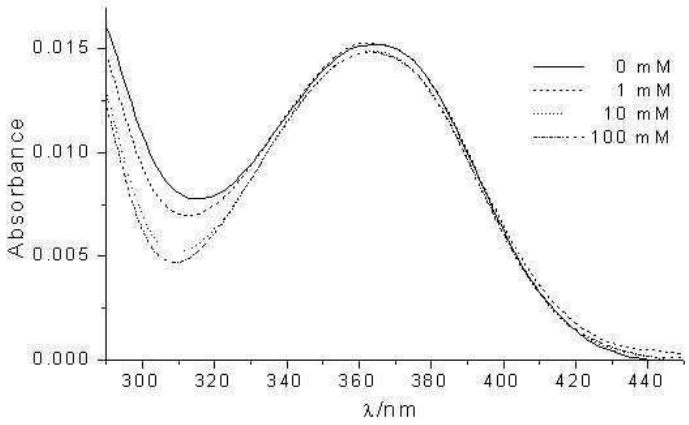
도면1a



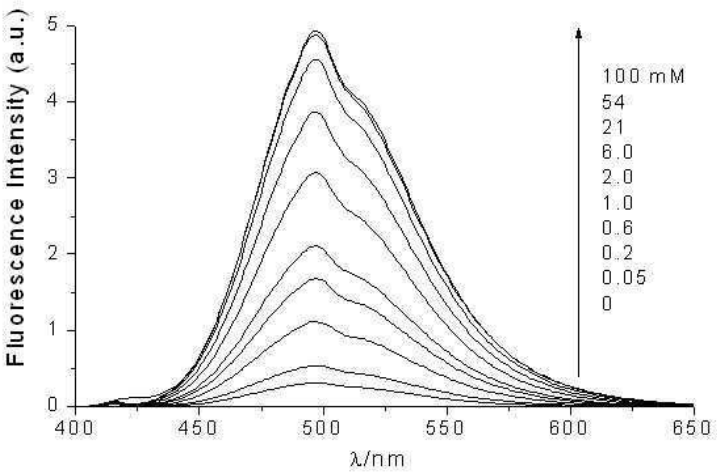
도면1b



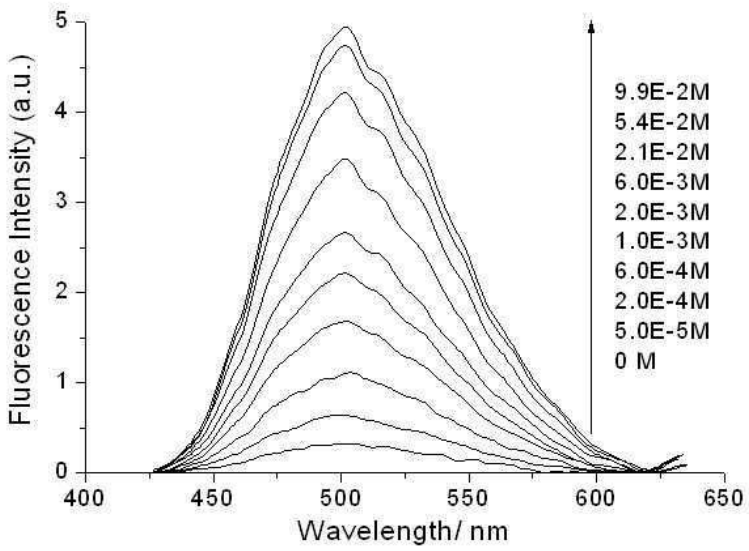
도면2a


Absorbance
0.015
0.010
0.005
0.000
300
320
340
360
380
400
420
440
λ/nm
0 mM
1 mM
10 mM
100 mM

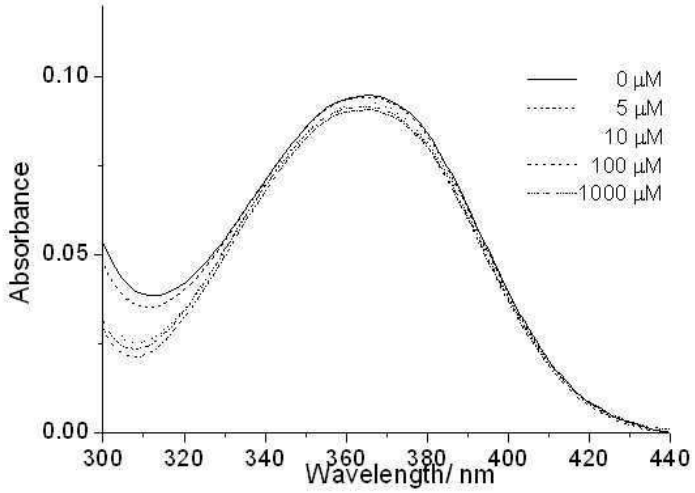
도면2b


Fluorescence Intensity (a.u.)
5
4
3
2
1
0
400
450
500
550
600
650
λ/nm
100 mM
54
21
6.0
2.0
1.0
0.6
0.2
0.05
0

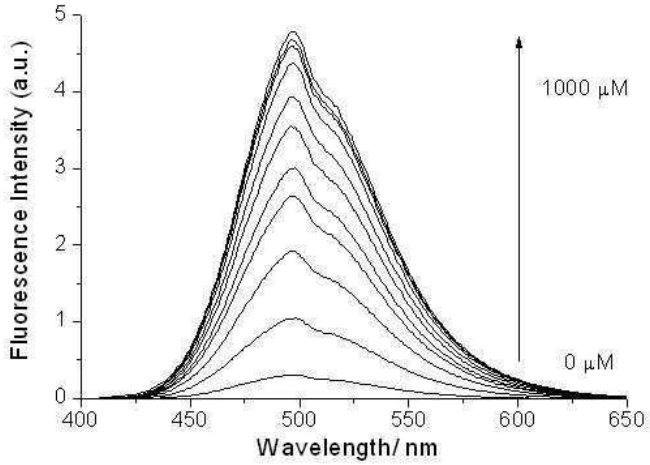
도면2c


Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm
9.9E-2M
5.4E-2M
2.1E-2M
6.0E-3M
2.0E-3M
1.0E-3M
6.0E-4M
2.0E-4M
5.0E-5M
0 M

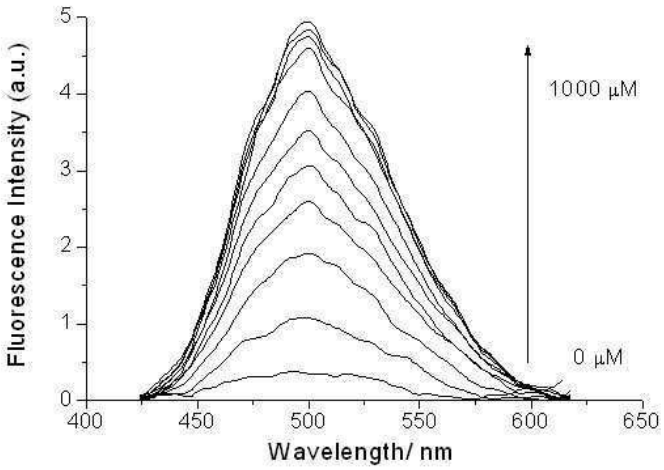
도면3a


Absorbance
Wavelength/ nm
0 μM
5 μM
10 μM
100 μM
1000 μM

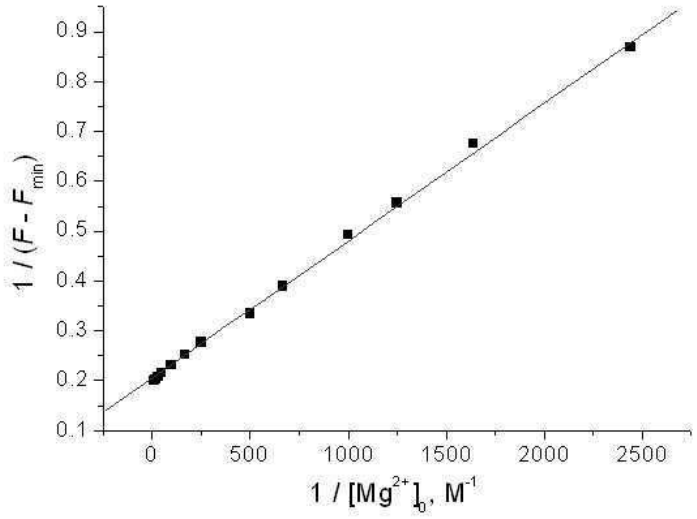
도면3b


Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm
1000 μM
0 μM
0
1
2
3
4
5
400
450
500
550
600
650

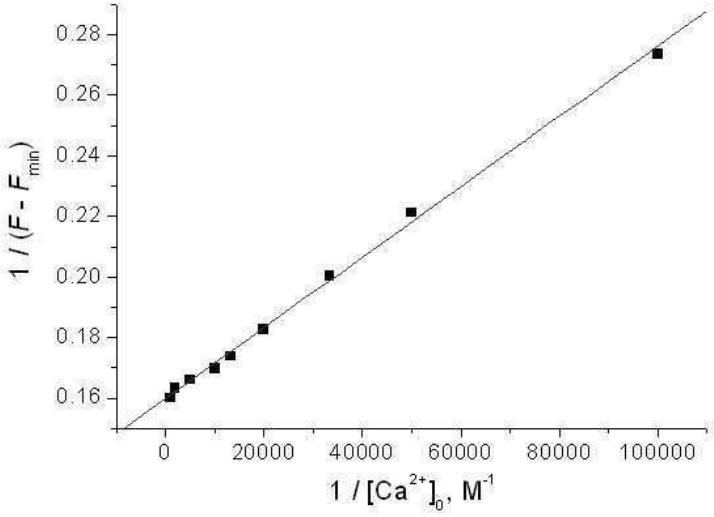
도면3c


Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm
1000 μM
0 μM
0
1
2
3
4
5
400
450
500
550
600
650

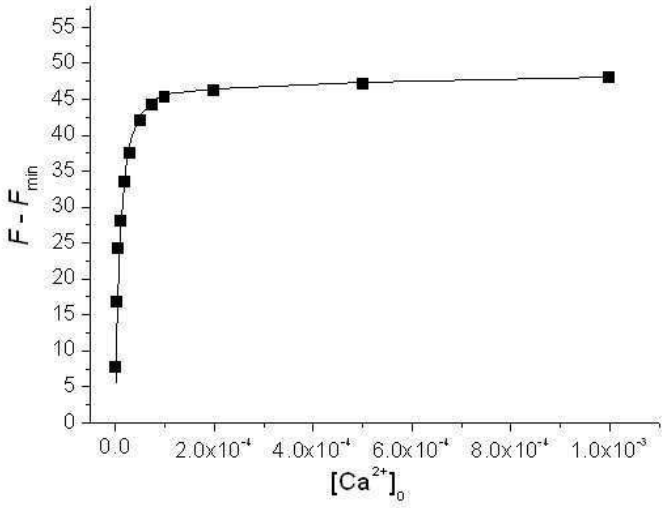
도면4a


0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
1 / (F - F_min)
0
500
1000
1500
2000
2500
1 / [Mg2+]0, M-1

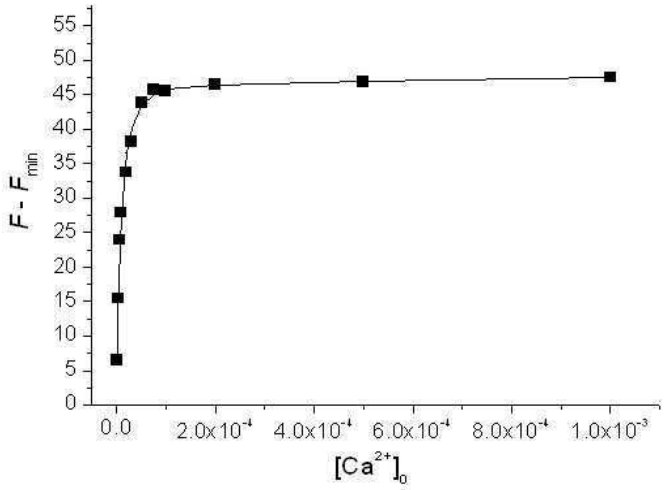
도면4b


0.28
0.26
0.24
0.22
0.20
0.18
0.16
1 / (F - F_min)
0
20000
40000
60000
80000
100000
1 / [Ca2+]0, M-1

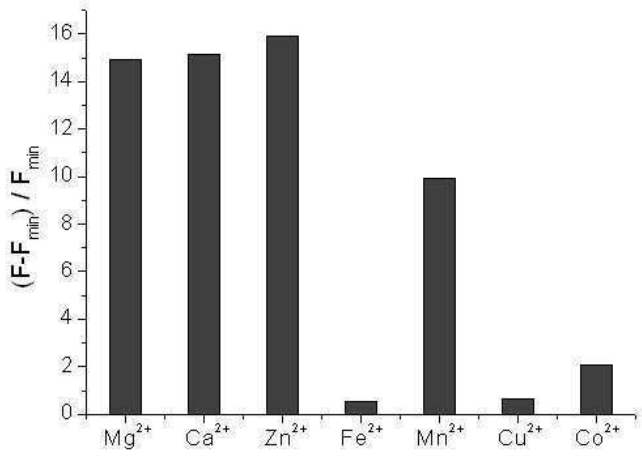
도면5a


F - F min
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.0
2.0x10-4
4.0x10-4
6.0x10-4
8.0x10-4
1.0x10-3
[Ca2+]0

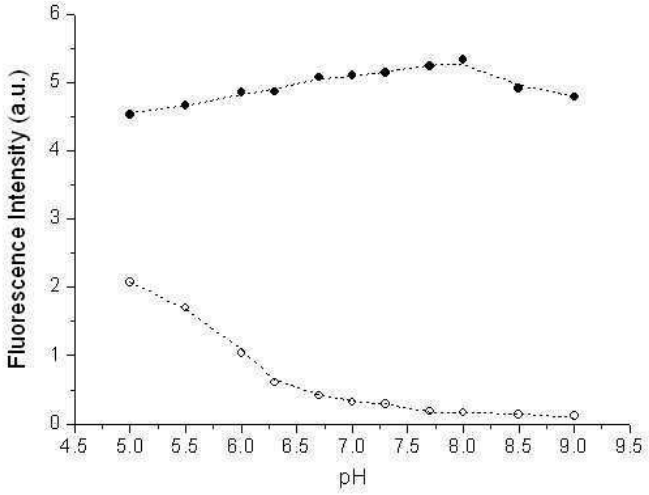
도면5b


F - F min
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0.0
2.0x10-4
4.0x10-4
6.0x10-4
8.0x10-4
1.0x10-3
[Ca2+]0

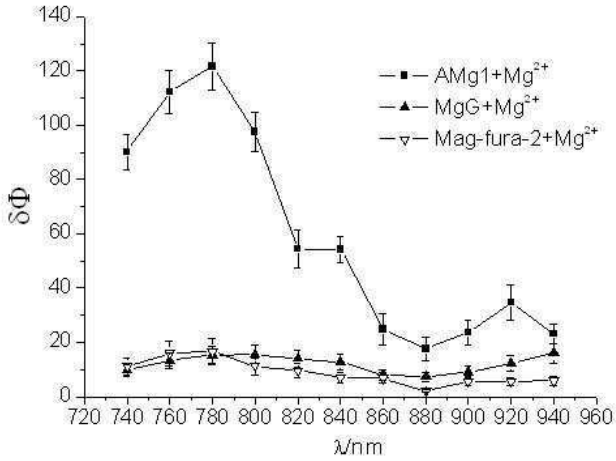
도면6a


(F-F$_{min}$) / F$_{min}$
0
2
4
6
8
10
12
14
16
Mg^{2+}
Ca^{2+}
Zn^{2+}
Fe^{2+}
Mn^{2+}
Cu^{2+}
Co^{2+}

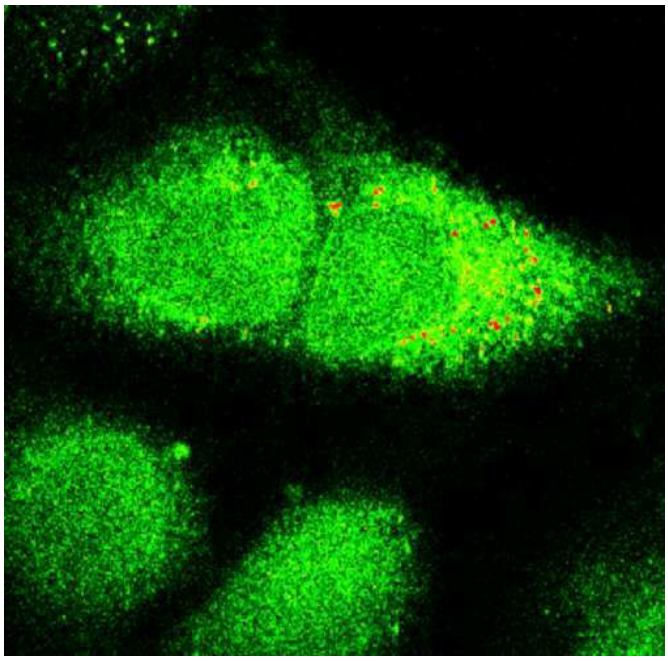
도면6b


Fluorescence Intensity (a.u.)
0
1
2
3
4
5
6
4.5
5.0
5.5
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
9.0
9.5
pH

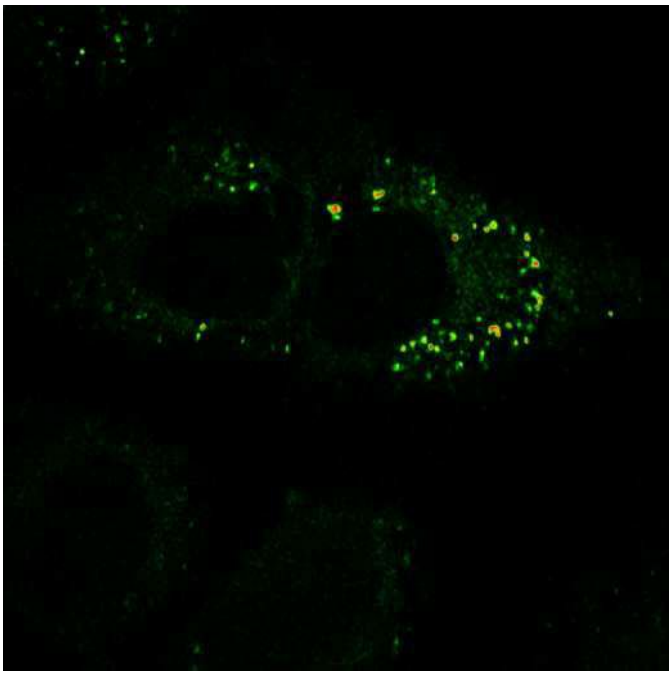
도면7


140
120
100
80
60
40
20
0
δΦ
720 740 760 780 800 820 840 860 880 900 920 940 960
λ/nm
AMg1+Mg2+
MgG+Mg2+
Mag-fura-2+Mg2+

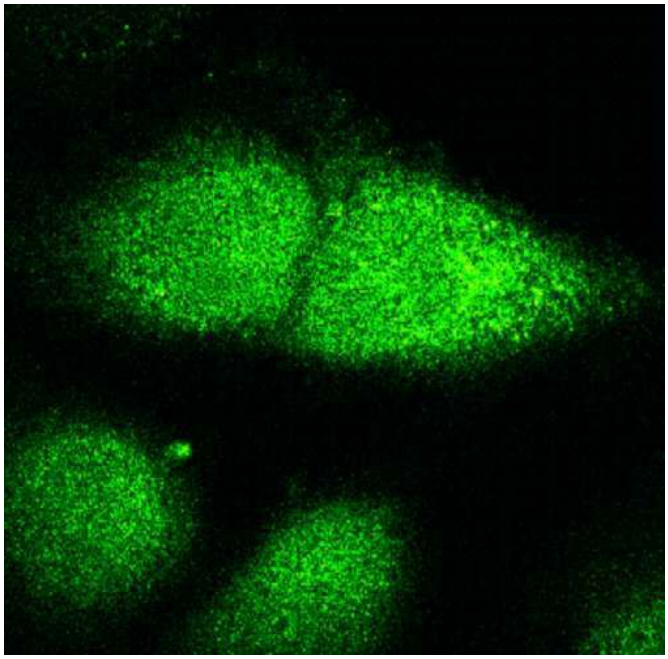
도면8a



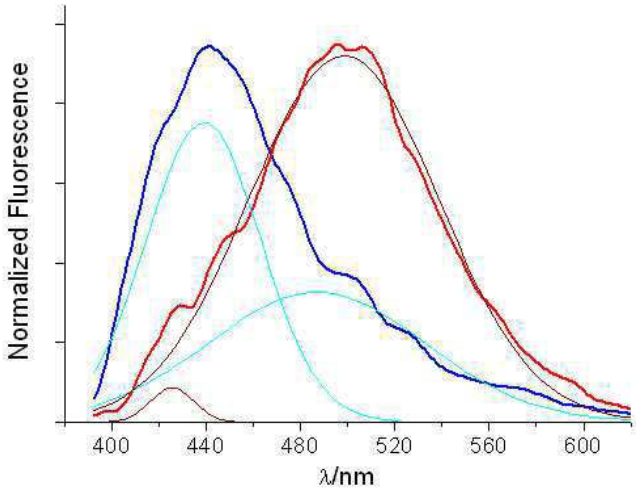
도면8b



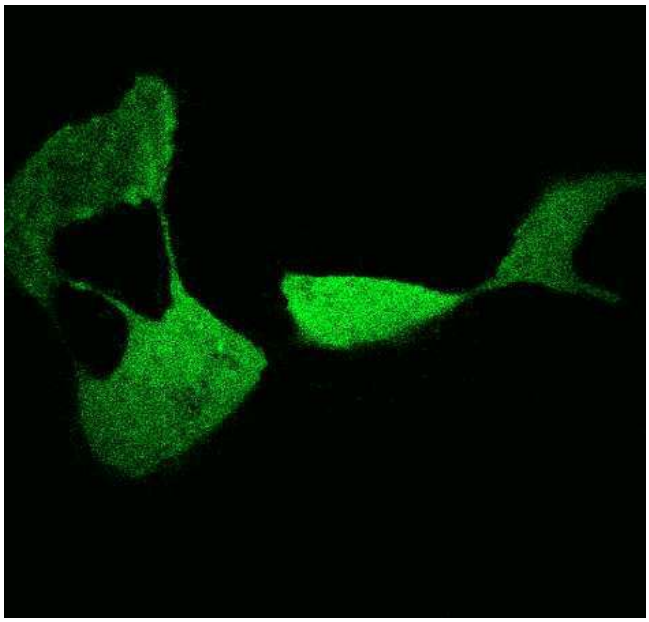
도면8c



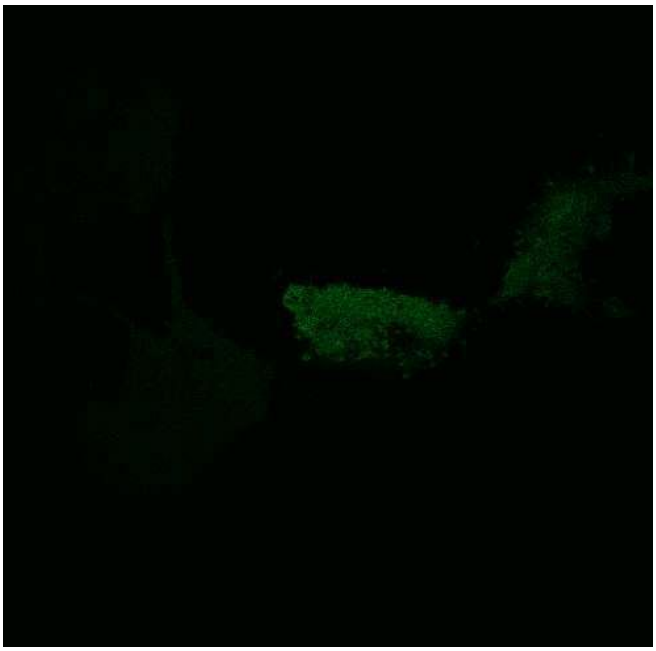
도면8d



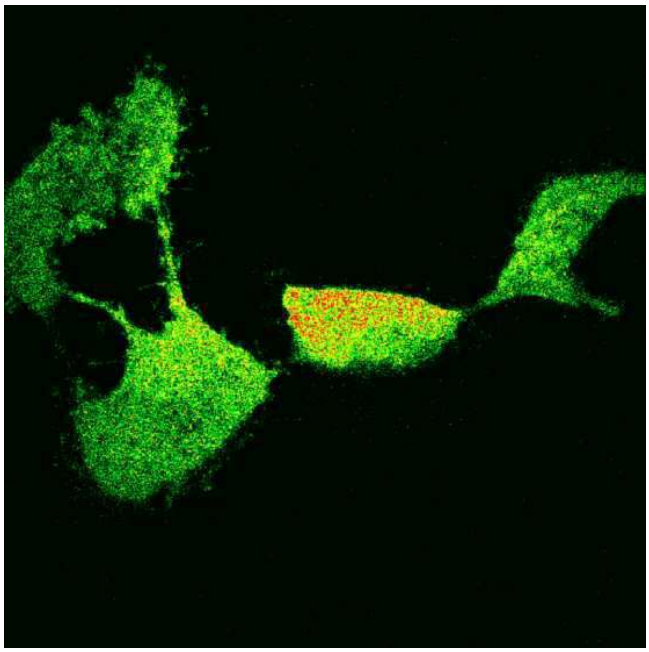
도면9a



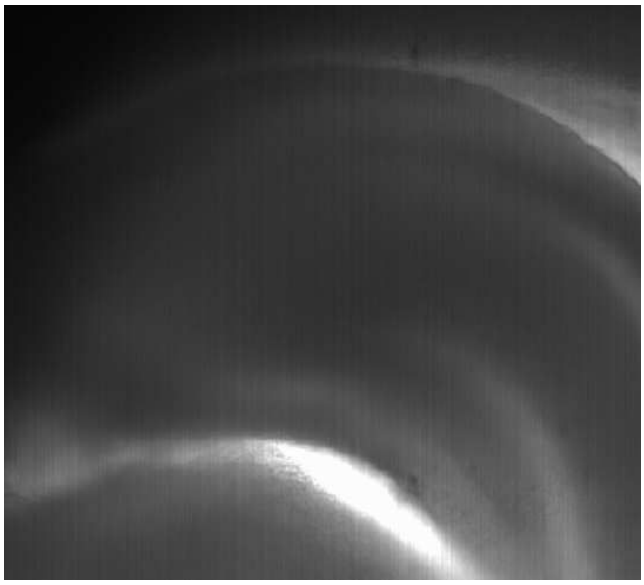
도면9b



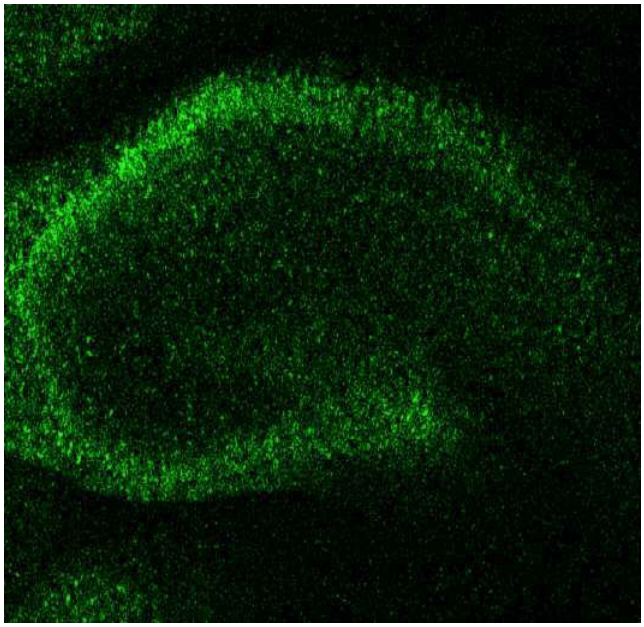
도면9c



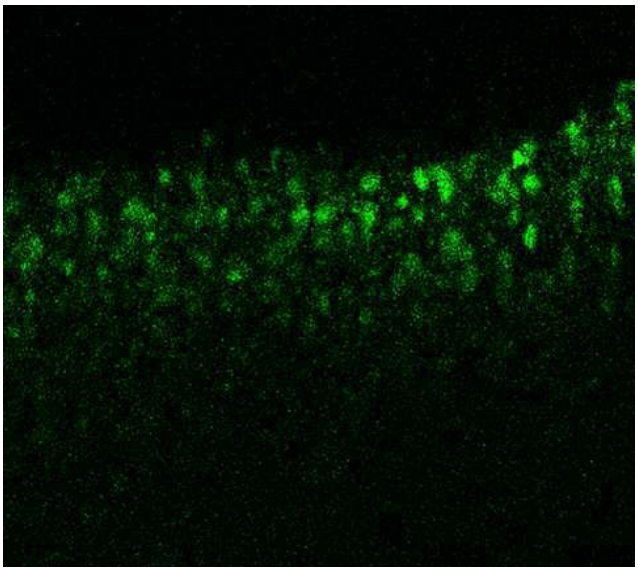
도면10a



도면10b



도면10c



도면10d

