(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0039532
(43) 공개일자 2013년04월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/127 (2006.01) *A61K 31/35* (2006.01)
A61K 49/18 (2006.01) *A61K 49/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0104149
(22) 출원일자 2011년10월12일
심사청구일자 2012년10월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
조봉래
서울특별시 성동구 성수동 843 서울숲 힐스테이트 103동 504호
(74) 대리인
특허법인충현

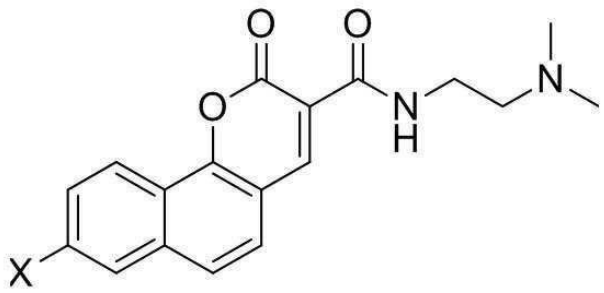
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 리소좀 영상화 방법**

(57) 요 약

본 발명은 하기 화학식 1을 갖는 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 리소좀 영상화 방법에 관한 것이다:

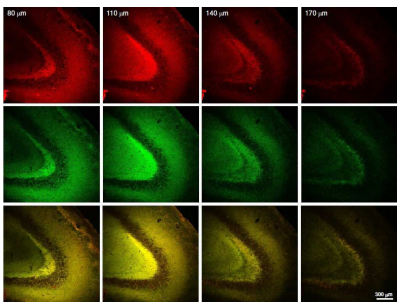
<화학식 1>



상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

본 발명에 따른 이광자 리소좀 표지자는 세포 및 조직 박편 내로 용이하게 로딩되어 이광자 현미경법에 의해서 장시간 동안 생체 세포 및 조직 내의 리소좀을 검출할 수 있으며, 충분한 수용성, 세포 투과도, 밝은 이광자 영상들을 얻기 위한 높은 $\Phi\delta_{max}$ 수치, 및 높은 광안정성을 갖고, 다른 표적들에 대한 이광자 표지자들과 함께 공배치 실험을 수행하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도10



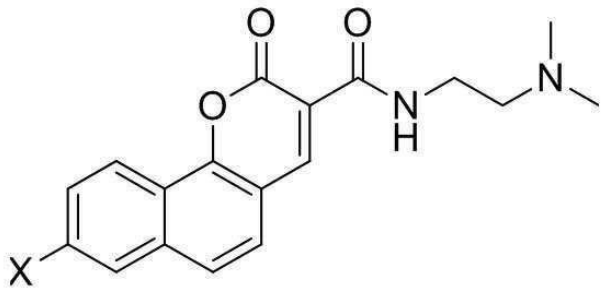
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20110020477
부처명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원_도약연구
연구과제명 이광자 표지자의 합성과 생체 영상
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2011.07.01 ~ 2012.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

화학식 1의 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 화학식 1에서 X가 $-OCH_3$인 경우, 470nm에서 발광 최대값을 갖는 것을 특징으로 하는 이광자 리소좀 표지자.

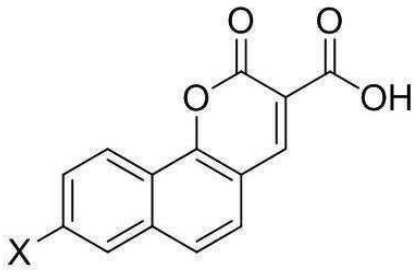
청구항 3

제1항에 있어서, 상기 화학식 1에서 X가 $-N(CH_3)_2$인 경우, 550nm에서 발광 최대값을 갖는 것을 특징으로 하는 이광자 리소좀 표지자.

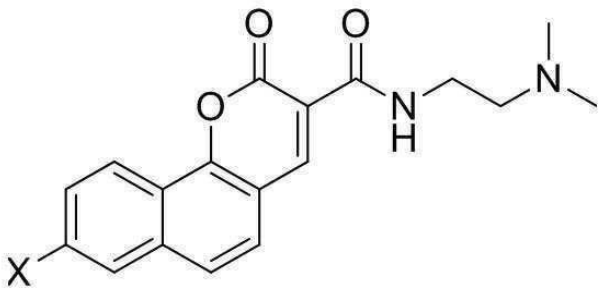
청구항 4

화학식 2의 화합물과 *N,N*-디메틸에틸렌디아민을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자의 제조방법:

<화학식 2>



<화학식 1>

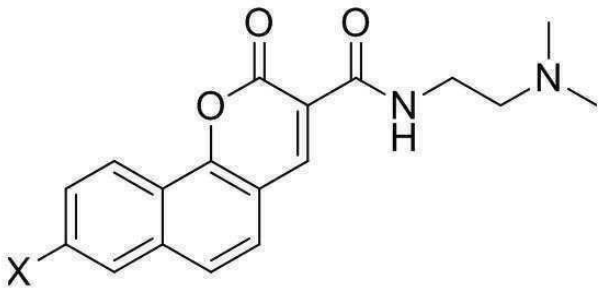


상기 화학식 1 및 2에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

청구항 5

화학식 1의 화합물을 생체 내로 주입하고, 이를 여기시킨 후, 방출되는 이광자 형광을 검출하는 단계를 포함하는 생체 내 리소좀 영상화 방법:

<화학식 1>



상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 X가 $-OCH_3$인 화학식 1의 화합물 및 상기 X가 $-N(CH_3)_2$인 화학식 1의 화합물을 동시에 생체 내로 주입하는 것을 특징으로 하는 생체 내 리소좀 영상화 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자, 그 제조방법 및 이를 이용한 생체 내 리소좀 영상화 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리소좀은 산성 세포소기관으로서, 포유류 세포들의 말단 분해성 부위를 구성한다. 리소좀들은 포식, 식균, 및 자가소화 경로를 통하여 거대분자들을 수용하고 분해하며, 다양한 생리 과정에서 중요한 역할을 수행한다. 생리적 측면에서 리소좀의 역할을 이해하기 위해서, 다양한 리소좀 표지자들이 개발되었으며, 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**).

[0003] 그러나, 이러한 표지자들을 일광자 현미경법에 사용할 때에는 단파장광 (~350-550nm)으로 여기시켜야 하며, 따라서 얕은 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 리소좀을 검출할 수 있는 이광자 표지자가 필요하다. 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).

[0004] 리소좀 내에서 생물학적 활성이 나타나는지 여부를 확인하는 가장 일반적인 방법은 공배치 (colocalization) 실험인데, 이는 세포들을 리소좀 뿐만 아니라 특정 표적들에 대한 형광 표지자로 함께 표지하는 것이다. 이러한 실험들을 이광자 모드에서 수행하기 위해서는, 리소좀 및 다른 표적들에 대한 이광자 표지자들이 다양한 파장 영역들에서 형광을 방출할 수 있어야 한다 (Wang, X.; Nguyen, D. M.; Yanez, C. O.; Rodriguez, L.; Ahn, H.-Y.; Bonder, M. V.; Belfield, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12237: Yao, S.; Ahn, H.-Y.; Wang, X.; Fu, J.; Van Stryland, E. W.; Hagan, D. J.; Belfield, K. D. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3965: Kim, H. M.; An, M. J.; Hong, J. H.; Jeong, B. H.; Lee, K. J.; Kwon, O.; Cho, B. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2231). 더욱이, 이들 모두는 500nm 근방에서 이광자 여기 형광 (TPEF)을 방출하는데, 이러한 파장대는 다른 유용한 표적들에 대한 기존 이광자 표지자들에 대한 방출 영역과 너무 가까운 것이다. 따라서, 500nm 근방이 아닌 단파장 또는 장파장 영역에서 발광할 수 있는 리소좀용 이광자 표지자에 대한 개발이 절실한 실정이다.

[0005] 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. 또한, 대한민국 공개특허번호 제2011-0086461호에서는 이광자 흡수 활성을 갖는 플루오렌계 화합물 및 이의 제조방법을 개시하고 있는데, 세포 내 특정 소기관 또는 세포에 특이적인 반응성을 갖는 이광자 염료가 아닌, 일반적인 이광자 형광 발산 특성을 갖는 플루오렌계 화합물에 관한 것이다. 따라서, 유용한 발광 특성을 나타내면서도 세포 내 리소좀에만 특이적으로 반응할 수 있는 이광자 표지자에 대한 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명이 이루고자 하는 첫 번째 기술적 과제는, 세포 및 조직 박편 내로 용이하게 로딩되어 이광자 현미경법에 의해서 장시간 동안 생체 세포 및 조직 내의 리소좀을 검출할 수 있으며, 특히, 이광자 현미경법에 의한 공배치 실험을 용이하게 하는 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자를 제공하는 것이다.

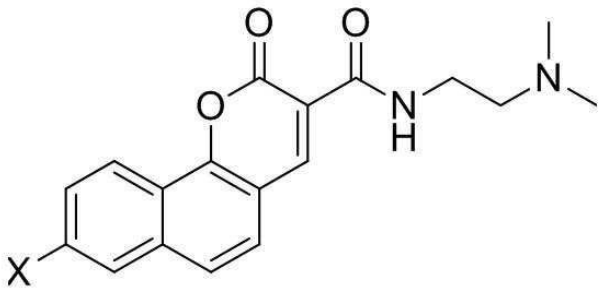
[0007] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 이광자 리소좀 표지자의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명이 이루고자 하는 세 번째 기술적 과제는 상기 이광자 리소좀 표지자를 이용한 생체 내 리소좀 영상화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 상기 첫 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여, 화학식 1의 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자를 제공한다:

화학식 1



[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

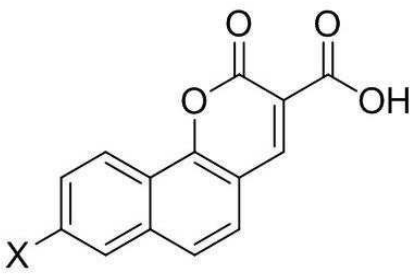
[0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 1에서 X가 $-OCH_3$인 경우, 상기 표지자는 470nm에서 발광 최대값을 갖는다.

[0013] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 1에서 X가 $-N(CH_3)_2$인 경우, 상기 표지자는 550nm에서 발광 최대값을 갖는다.

[0014] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

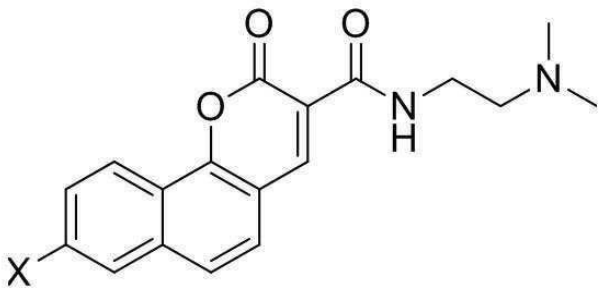
[0015] 화학식 2의 화합물과 *N,N*-디메틸에틸렌디아민을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자의 제조방법을 제공한다:

화학식 2



[0016]

[0017] <화학식 1>



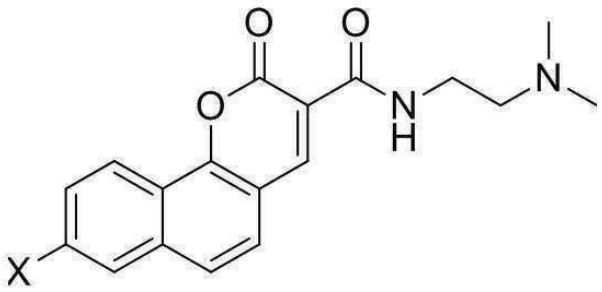
[0018]

[0019] 상기 화학식 1 및 2에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

[0020] 본 발명의 상기 세 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

[0021] 화학식 1의 화합물을 생체 내로 주입하고, 이를 여기시킨 후, 방출되는 이광자 형광을 검출하는 단계를 포함하는 생체 내 리소좀 영상화 방법을 제공한다:

[0022] <화학식 1>



[0023]

[0024] 상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 X가 $-OCH_3$인 화학식 1의 화합물 및 상기 X가 $-N(CH_3)_2$인 화학식 1의 화합물을 동시에 생체 내로 주입할 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 이광자 리소좀 표지자는 세포 및 조직 박편 내로 용이하게 로딩되어 이광자 현미경법에 의해서 장시간 동안 생체 세포 및 조직 내의 리소좀을 검출할 수 있으며, 충분한 수용성, 세포 투과도, 밝은 이광자 영상들을 얻기 위한 높은 $\Phi\delta_{max}$ 수치, 및 높은 광안정성을 갖고, 다른 표적들에 대한 이광자 표지자들과 함께 공배치 실험을 수행하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1a 및 1b는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, 및 일반 완충용액 중에서 측정한 화합물 3의 정규화된 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 2a 및 2b는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, 및 일반 완충용액 중에서 측정한 화합물 4의 정규화된 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 3은 에탄올/완충용액 (1/1) 및 에탄올 중에서 화합물 3 및 화합물 4의 이광자 활성 스펙트럼을 도시한 그래프이다.

도 4a 내지 4c는 각각 화합물 3 및 LTR로 표지된 이광자 형광 영상 (4a), 일광자 형광 영상 (4b), 및 도 4a 및 4b의 병합 영상 (4c)을 도시한 사진이다.

도 5a 내지 5c는 각각 화합물 3 및 BTC로 표지된 이광자 형광 영상 (5a), 일광자 형상 영상 (5b), 및 도 5a 및 5b의 병합 영상 (5c)을 도시한 사진이다.

도 6a 내지 6c는 각각 화합물 3 및 MTR로 표지된 이광자 형광 영상 (6a), 일광자 형상 영상 (6b), 및 도 6a 및 6b의 병합 영상 (6c)을 도시한 사진이다.

도 7a 내지 7c는 각각 화합물 4 및 LTB로 표지된 이광자 형광 영상 (7a), 일광자 형광 영상 (7b), 및 도 7a 및 7b의 병합 영상 (7c)을 도시한 사진이다.

도 8a 내지 8c는 각각 화합물 3으로 표지된 이광자 형광 영상 (8a), 화합물 4로 표지된 이광자 형광 영상 (8b), 및 도 8a 및 8b의 병합 영상 (8c)을 도시한 사진이다.

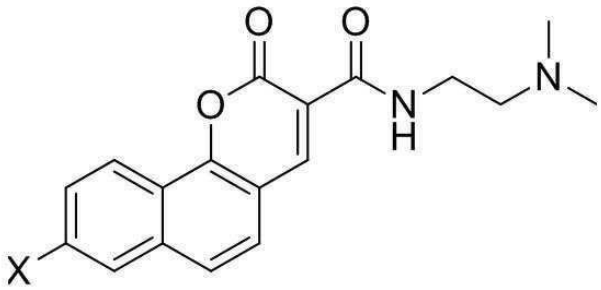
도 9는 37℃에서 30분 동안 20μM 농도의 화합물 3 및 4로 배양된 생후 2주된 쥐의 해마 박편에 대한 명시야 영상 (bright field image) 사진이다.

도 10은 도 9의 해마 박편에 대해서 80-170㎛의 깊이에서 얻어진 이광자 영상들을 도시한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 하기 화학식 1을 갖는 생체 내 영상화를 위한 이광자 리소좀 표지자를 제공한다:

[0029] <화학식 1>



[0030]

[0031] 상기 화학식 1에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

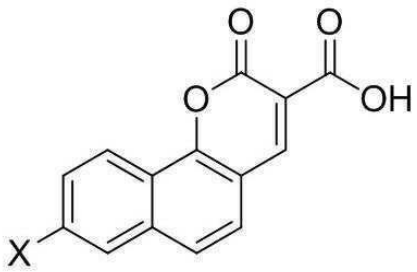
[0032] 본 발명에서는 형광원 (fluorophore)로서 크로멘 (chromene)을 사용하였는데, 이는 크로멘이 높은 수준의 이광자 단면 (TP cross section)을 갖기 때문이다 (Kim, H. M.; Fang, X. Z.; Yang, P. R.; Yi, J.-S.; Ko, Y.-G.; Piao, M. J.; Chung, Y. D.; Park, Y. W.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2791: Kim, H. M.; Yang, P. R.; Jung, C.; Kim, B. R.; Jung, S.-Y.; Ko, Y.-G.; Cho, B. R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2088). 본 발명에서는 또한 발광 파장을 조절하기 위해서 다른 공여기들을 사용하였으며, 수소화 부위로서 에틸렌디아민 잔기를 사용하였는데, 이는 표지자들이 수소화된 형태로 산성 소포 (acidic vesicles) 내에 축적됨으로써 리소좀 내에서 강한 이광자 형광을 발산하도록 하기 위함이다.

[0033] 본 발명에 따른 리소좀 표지자는, 화학식 1에서 치환기 X가 $-OCH_3$인 경우에는 470nm 부근에서 발광 최대값을 가지며, 치환기가 $-N(CH_3)_2$인 경우에는 550nm 부근에서 발광 최대값을 갖는다. 하기 실시예로부터 알 수 있는 바와 같이, 상기 2가지 종류의 리소좀 표지자는 공히 생체 세포 및 조직 내에서 이광자 현미경법에 의해서 100㎛ 이상의 깊이까지 검출이 가능하다.

[0034] 본 발명에 따른 리소좀 표지자는 하기 화학식 2의 화합물과 *N,N*-디메틸에틸렌디아민을 반응시킴으로써 제조될

수 있는데,

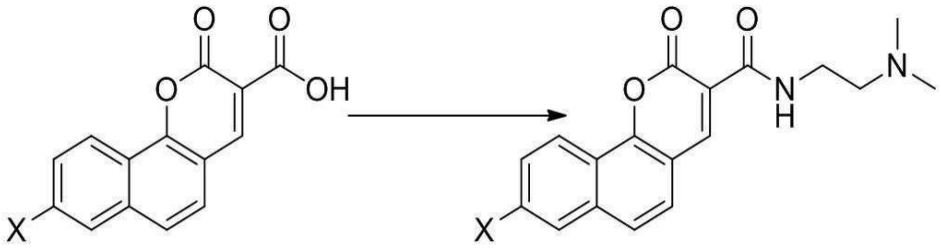
[0035] <화학식 2>



[0036]

[0037] 상기 화학식 1 및 2에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

[0038] 참고로, 하기 반응식에는 화학식 2의 화합물로부터, 화학식 1의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.



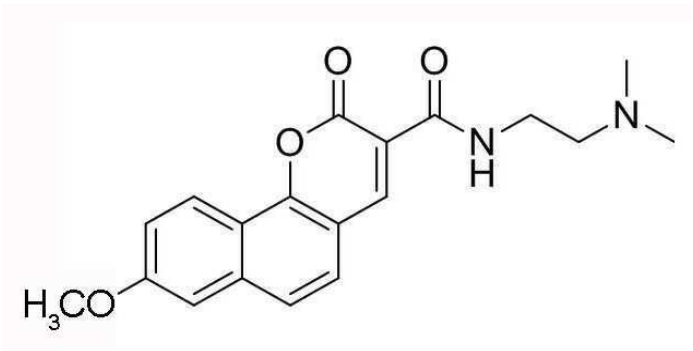
[0039]

[0040] 상기 반응식에서, X는 $-OCH_3$ 또는 $-N(CH_3)_2$이다.

[0041] 본 발명에 따른 리소좀 표지자들은 이광자 현미경법에 의해서 세포 내 여기되는 경우, 장시간 동안 특정 파장의 광을 방출하므로, 리소좀 표지용 이광자 표지자로서 매우 유용하다. 따라서, 본 발명에서는 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내로 주입하고, 이를 여기시킨 후, 방출되는 이광자 형광을 검출하는 단계를 포함하는 생체 내 리소좀 영상화 방법을 제공한다.

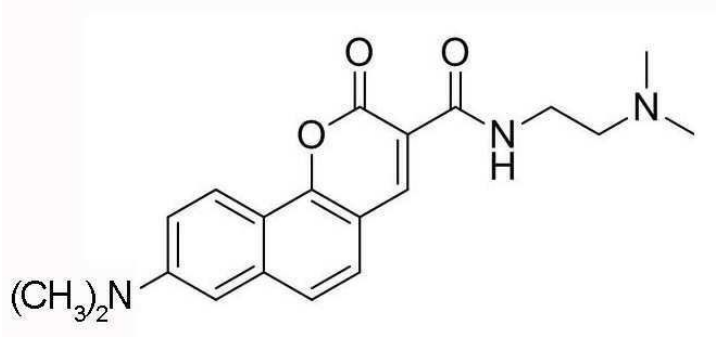
[0042] 특히, 본 발명에 따른 리소좀 표지자들은, 하기 실시예를 통하여 설명되는 바와 같이, 상기 화학식 1에서 X가 $-OCH_3$인 화학식 1의 화합물 (하기 화학식 3의 화합물) 및 상기 X가 $-N(CH_3)_2$인 화학식 1의 화합물 (하기 화학식 4의 화합물)을 동시에 생체 내로 주입할 수 있다.

화학식 3



[0043]

화학식 4

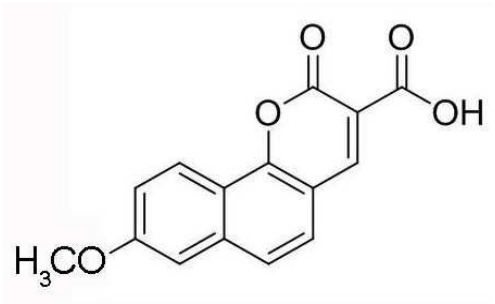
[0044] 

[0045] 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.

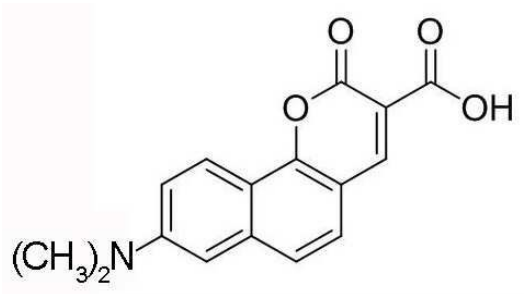
[0046] 제조예 1. 본 발명에 따른 리소좀 표지자의 제조

[0047] 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 이광자 리소좀 표지자인 화합물 1을 제조하였다. 상기 화학식 2의 화합물로서 X가 $-OCH_3$인 화합물 (8-메톡시-2-옥소-2*H*-벤조[*h*]크로멘-3-카르복실산; 화학식 5) 및 X가 $-N(CH_3)_2$인 화합물 (8-디메틸아미노 유도체; 화학식 6)은 참고문헌에 기재된 방법에 의해서 합성하였다 (Kim, H. M.; Fang, X. Z.; Yang, P. R.; Yi, J.-S.; Ko, Y.-G.; Piao, M. J.; Chung, Y. D.; Park, Y. W.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 2791: Kim, H. M.; Yang, P. R.; Jung, C.; Kim, B. R.; Jung, S.-Y.; Ko, Y.-G.; Cho, B. R. *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 2088).

화학식 5

[0048] 

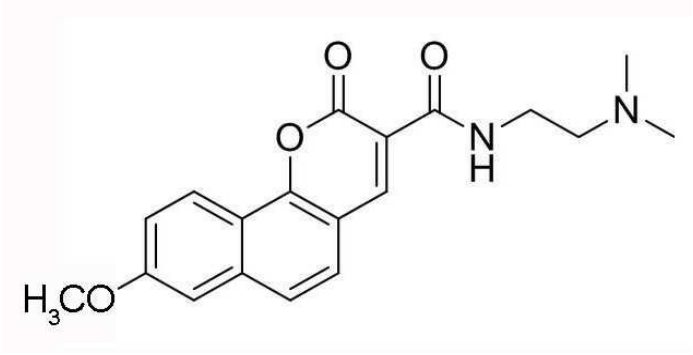
화학식 6

[0049] 

[0050] 제조예 1.1 화합물 3의 제조

[0051] 상기 화합물 5를 사용하여 하기 화학식 3의 화합물을 제조하였다:

[0052] <화학식 3>



[0053]

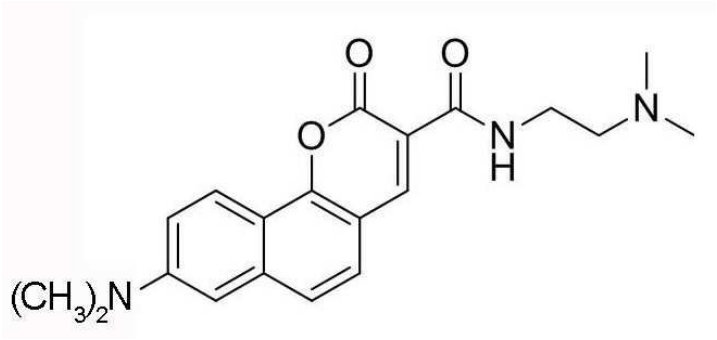
[0054] 화합물 5 (0.50g, 1.9mmol), N,N'-디시클로헥실카르보디이미드 (0.42g, 2.0mmol) 및 부탄올 (0.30g, 2.2mmol)을 CH_2Cl_2 (20mL) 중에서 *N,N*-디메틸에탄-1,2-디아민 (0.18g, 2.0mmol)에 서서히 첨가하고, 혼합물을 4시간 동안 환류시켰다. 용매를 증발시킨 후, 조생성물을 $CHCl_3$/MeOH (4:1)을 용출액으로 사용하는 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제하였다.

[0055] 수율 0.41 g (65 %); 융점 179-180 ℃; IR (KBr): 1750, 1680 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 9.05 (s, 1H), 8.96 (s, 1H), 8.46 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz), 7.63 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.56 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz), 7.32 (dd, 1H, *J* = 2.4, 9.2 Hz), 7.19 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz), 3.97 (s, 3H), 3.60 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.56 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.31 (s, 6H); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) d 162.3, 162.3, 161.1, 153.0, 149.0, 138.3, 125.5, 124.5, 124.4, 120.1, 117.6, 116.5, 113.1, 106.9, 58.2, 55.8, 45.6, 37.9 ppm; HRMS (FAB^+): [$C_{19}H_{20}N_2O_4$+H^+]에 대해서 계산된 m/z: 341.1501, 실제값: 341.1503.

[0056] 제조예 1.2 화합물 4의 제조

[0057] 화합물 5 대신에 화합물 6을 사용하였다는 점을 제외하고는, 상기 제조예 1.1과 동일한 방법에 의해서 하기 화학식 4의 화합물을 제조하였다:

[0058] <화학식 4>



[0059]

[0060] 수율, 64 %; 융점 230-231 ℃; IR (KBr): 1740, 1675 cm^{-1}; ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) d 9.05 (s, 1H), 8.86 (s, 1H), 8.35 (d, 1H, *J* = 9.4 Hz), 7.45 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.40 (d, 1H, *J* = 9.1 Hz), 7.18 (dd, 1H, *J* = 2.2, 9.4 Hz), 6.82 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz), 3.60 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 3.14 (s, 6H), 2.57 (t, 2H, *J* = 6.3 Hz), 2.32 (s, 6H); ^{13}C-NMR (100 MHz, $CDCl_3$) d 162.8, 162.3, 153.8, 151.2, 149.0, 138.6, 125.1, 124.5, 124.9, 116.0, 114.3, 114.1, 111.7, 105.8, 58.3, 45.6, 40.5, 37.9 ppm; HRMS (FAB^+): [$C_{19}H_{20}N_2O_4$+H^+]에 대해서 계산된 m/z: 354.1818, 실제값 : 354.1816.

[0061] 실시예 1. 흡수 및 형광 스펙트럼 측정

[0062] 참고문헌에 기재된 형광법 (Kim, H. M.; Seo, M. S.; An, M. J.; Hong, J. H.; Tian, Y. S.; Choi, J. H.; Kwon, O.; Lee, K. J.; B. R. Cho, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 5167)에 의해서 측정된 화합물 3 및 4의 용해도는 pH 7.0의 일반 완충용액 (universal buffer) 중에서 각각 3.0 및 2.5 μM로서, 이는 세포들을 염색하는 데에 충분한 수준이었다.

[0063] 흡수 스펙트럼은 diode array spectrophotometer를 사용하여, 형광 스펙트럼은 1cm 표준 쿼츠 셀을 구비한 luminescence spectrometer를 사용하여 측정하였으며, 형광 양자 수율은 Coumarin 307을 참조 화합물로 사용하는 참고 문헌의 방법에 따라서 측정하였다 (J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* **1971**, *75*, 991).

[0064] 도 1a 및 1b에는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, 및 일반 완충용액 중에서 측정한 화합물 3의 정규화된 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시하였으며, 마찬가지로, 도 2a 및 2b에는 화합물 4의 정규화된 흡수 및 형광 스펙트럼을 도시하였다. 도면들을 참조하면, 일반 완충용액의 경우를 예로 들면, 흡수 스펙트럼의 경우 화합물 3은 389 nm (ε = 22,000 $M^{-1}cm^{-1}$)에서 최대 흡수값을 나타내었고, 화합물 4는 이와는 60 nm 분리된 곳, 즉 449 nm (ε = 19,100 $M^{-1}cm^{-1}$)에서 최대 흡수값을 나타내었다. 한편, 형광 스펙트럼의 경우에는 분리 정도가 더욱 컸는데, 화합물 3은 477 nm (Φ = 0.88)에서, 화합물 4는 580 nm (Φ = 0.20)에서 최대 형광값을 나타내었다.

[0065] 도면들을 참조하면, 화합물 3 및 4의 형광 스펙트럼 최대값은 용매 극성에 따라서 높은 수준의 적색 이동을 나타내었는데 (1,4-디옥산 < DMF < 에탄올 < 일반 완충용액), 이러한 적색 이동 정도는 화합물 4 (81nm)가 화합물 3 (43nm)보다 더 컸으며, 이는 화합물 4가 더 강한 주게기를 가져서 분자간 전하 수송능력이 더 뛰어나기 때문으로 판단된다.

[0066] 또한, 참고문헌에 기재된 형광측정법에 의해서 이광자 활성 단면을 측정하였다 (Lee, S. K.; Yang, W. J.; Choi, J. J.; Kim, C. H.; Jeon, S.-J.; Cho, B. R. *Org. Lett.* **2005**, *7*, 323). 도 3에는 세포내 환경에 대한 우수한 모델이 되는 에탄올/완충용액 (1/1) 및 에탄올 중에서 화합물 3 및 화합물 4의 이광자 활성 스펙트럼을 도시하였다. 도 3을 참조하면, 화합물 3은 750nm에서 50GM의 이광자 활성 단면값 ($\Phi\delta_{max}$)을, 화합물 4는 840nm에서 47GM의 이광자 활성 단면값을 나타내었다 (이하, 도면들에서 CLT-blue는 화합물 3을, CLT-yellow는 화합물 4를 나타낸다). 이러한 수치들을 참고문헌들에 기재된 종래의 표지자들 (Kim, H. M.; An, M. J.; Hong, J. H.; Jeong, B. H.; Lee, K. J.; Kwon, O.; Cho, B. R. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, 47, 2231: Wang, X.; Nguyen, D. M.; Yanez, C. O.; Rodriguez, L.; Ahn, H.-Y.; Bonder, M. V.; Belfield, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 12237 및 Yao, S.; Ahn, H.-Y.; Wang, X.; Fu, J.; Van Stryland, E. W.; Hagan, D. J.; Belfield, K. D. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 3965)과 비교할 때에, 화합물 3 및 4의 이광자 활성 단면값은 이광자 현미경법에 의해서 생체 세포 및 조직 내에서 밝은 이광자 현미경 영상들을 얻기에 충분한 수준이었다.

[0067] 실시예 2. 세포 내 리소좀 표지 실험

[0068] 실시예 2.1 화합물 3의 세포 내 리소좀 표지 실험

[0069] 생체 세포 내에서 화합물 3이 리소좀을 검출할 수 있는지 여부를 분석하기 위해서, HeLa 세포들을, 화합물 3 및 각각 리소좀, 골지체, 및 미토콘드리아에 대해서 일광자 형광 리소좀 표지자로 잘 알려진 Lysotracker Red DND-99 (LTR), 우혈청 알부민 (BSA)과 복합체를 형성한 BODIPY-TR 세라마이드 (BTC), 또는 Mitotracker Red FM (MTR) (각각 *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th ed. (Ed.: R. P. Haugland), Molecular Probes, Eugene, OR, **2005** 참조)으로 함께 표지하였다. 이러한 실험을 위해서, 표지자들의 검출창 (detection window)은 비교 대상이 되는 2개의 표지자들로부터의 발광 강도가 거의 같은 수준이 되도록 맞추었다.

[0070] 도 4a 내지 4c에는 각각 화합물 3 및 LTR로 표지된 이광자 형광 영상 (4a), 일광자 형광 영상 (4b), 및 도 4a 및 4b의 병합 영상 (4c)을 도시하였다. 도 4c를 참조하면, 화합물 3에 의한 리소좀에 대한 이광자 형상 영상은, LTR에 의한 일광자 형상 영상과 매우 잘 중첩된다는 사실을 알 수 있다. 비교를 위해서 도 5a 내지 5c에는 각각 화합물 3 및 BTC (공지된 골지체 표지자)로 표지된 이광자 형광 영상 (5a), 일광자 형상 영상 (5b), 및 도 5a 및 5b의 병합 영상 (5c)을 도시하였으며, 도 5c를 참조하면, 화합물 3에 의한 골지체에 대한 이광자 형상 영상은, BTC에 의한 일광자 형광 영상과는 잘 중첩되지 않는다는 사실을 알 수 있다. 더 나아가, 도 6a 내지 6c에는 유사한 실험을 공지된 미토콘드리아 표지자인 MTR에 대해서 수행한 결과를 도시하였으며, 도 6c를 참조하면, 화합물 3에 대한 미토콘드리아에 대한 이광자 형광 영상 역시 MTR에 의한 일광자 형광 영상과는 잘

중첩되지 않는다는 사실을 알 수 있다.

[0071] 또한, 채널들 사이의 형광 강도 분포의 상관관계를 나타내주는 Pearson 공배치 계수 *A* (Pearson's colocalization coefficient, *A*; Adler, J.; Parmryd, I. *Cytometry Part A.* **2010**, *77A*, 733 참조)를 Autoquant X2 소프트웨어를 사용하여 계산하였다. 계산 결과, 화합물 3과 LTR 사이의 *A*값은 0.89로서 각각 MTR 및 BTC에 대한 값은 0.17 및 0.035보다는 훨씬 큰 값을 나타내었다. 따라서, 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 화합물 3이 세포 내에서 리소좀을 특이적으로 표지할 수 있는 유용한 이광자 형광 표지자가 된다는 사실을 알 수 있다.

[0072] 실시예 2.2 화합물 4의 세포 내 리소좀 표지 실험

[0073] 생체 세포 내에서 화합물 4가 리소좀을 검출할 수 있는지 여부를 분석하기 위해서, 실시예 2.1과 유사한 실험을 수행하였다. 리소좀에 대한 공지 표지자로는 Lysotracker-blue (LTB) (*A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 10th ed. (Ed.: R. P. Haugland), Molecular Probes, Eugene, OR, **2005** 참조)를 사용하였다.

[0074] 도 7a 내지 7c에는 각각 화합물 4 및 LTB로 표지된 이광자 형광 영상 (7a), 일광자 형광 영상 (7b), 및 도 7a 및 7b의 병합 영상 (7c)을 도시하였다. 도 7c를 참조하면, 화합물 4에 의한 리소좀에 대한 이광자 형상 영상은, LTB에 의한 일광자 형상 영상과 매우 잘 중첩된다는 사실을 알 수 있다. 또한, 화합물 4와 LTB 사이의 *A*값은 0.87-0.91로서, 본 발명에 따른 화합물 4가 세포 내에서 리소좀을 특이적으로 표지할 수 있는 유용한 이광자 형광 표지자가 된다는 사실을 알 수 있다.

[0075] 실시예 2.3 화합물 3 및 4의 세포 내 리소좀 공표지 실험

[0076] 이광자 모드에서 리소좀을 검출하는데 있어서 화합물 3 및 화합물 4를 이광자 표지자로 동시에 함께 사용하였다. 도 8a 내지 8c에는 각각 화합물 3으로 표지된 이광자 형광 영상 (8a), 화합물 4로 표지된 이광자 형광 영상 (8b), 및 도 8a 및 8b의 병합 영상 (8c)을 도시하였다. 도 8a 내지 8c를 참조하면, 화합물 3 및 4로 함께 표지된 세포들에 대한 이광자 형광 영상은 서로 거의 완벽하게 중첩됨을 알 수 있으며, 두 화합물 간의 *A* 값은 0.92-0.94로서 매우 큰 값을 나타내었다.

[0077] 화합물 3 및 4가 우수한 공배치 결과를 나타내는 이유는 크게 두 가지 요인에 의한 것으로 판단된다. 먼저, 일광자 현미경법에 의해서만 영상화가 가능한 다른 종래의 표지자들과는 달리 화합물 3 및 4는 2개의 이광자 영상을 동시에 얻는 것이 가능하므로, 일광자 영상과 이광자 영상을 얻는 사이에 리소좀이 이동되는 것을 방지할 수 있다. 다음으로, 화합물 3 및 4에 의한 이광자 영상들은 동일한 xy 평면 상에서 리소좀 배치를 비교할 수 있는데 반해서, 다른 종래의 표지자들은 세포의 전 깊이에 걸쳐서 일광자 영상들을 나타내기 때문에, 화합물 3 및 4에 의한 이광자 영상들이 더욱 우수한 공배치 결과들을 갖는 것으로 판단된다.

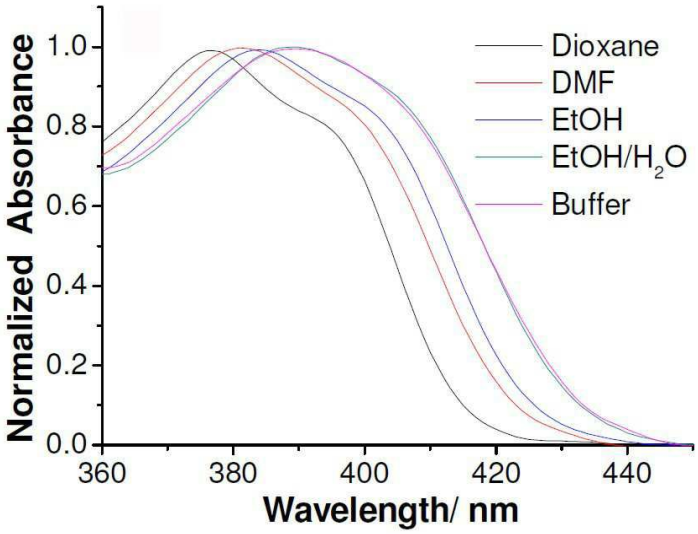
[0078] 실시예 3. 조직 영상화 실험

[0079] 한편, 화합물 1의 생체 조직 내 깊은 곳에서의 검출 가능 여부를 알아보기 위해서, 37℃에서 30분 동안 20 μM 농도의 화합물 3 및 4로 배양된 생후 2주된 쥐의 해마 박편에 대한 명시야 영상 (bright field image)을 얻었으며, 이를 도 9에 도시하였다. 도 9를 참조하면, 화합물 3 및 4는 CA1 및 CA3 영역에서뿐만 아니라, 치상회 (dentate gyrus)에서도 관찰되었으며, 80-170㎛의 깊이에서 얻어진 이광자 영상들은 리소좀들이 전체 깊이에 걸쳐서 거의 고르게 분포되어 있다는 것을 보여준다 (도 10 참조, 도면에서 첫 번째 행은 각각의 깊이에서 화합물 4에 의해 형성된 이광자 형광 영상들을, 두 번째 행은 각각의 깊이에서 화합물 3에 의해 형성된 이광자 형광 영상들을, 세 번째 행은 첫 번째 행과 두 번째 행의 병합 영상들을 나타낸다).

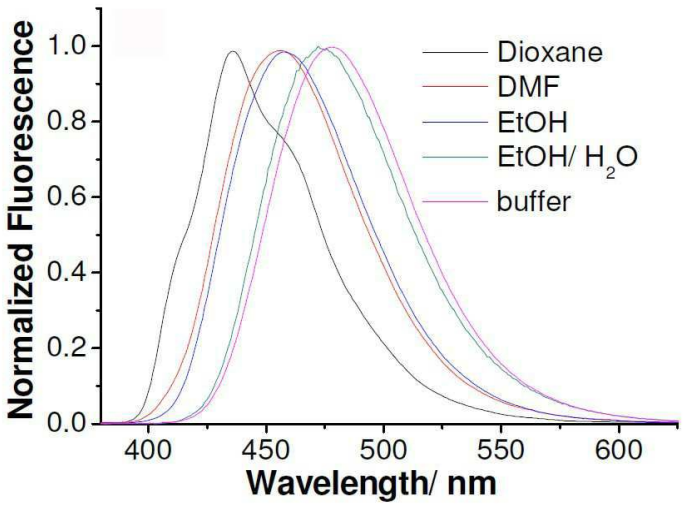
[0080] 특히, 본 발명에 따른 이광자 표지자인 화합물 3 및 4는 다른 리소좀 이광자 표지자들에 비해서, 생체 세포 및 조직 내에서 공배치 실험들을 수행하는데 더욱 유용하다는 점은 주목할 만하다. 이는, 기존의 종래 문헌들에 기재된 이광자 표지자들의 방출 최대값이 500nm 근방이며, 이러한 수치들은 공배치에 유용한 다른 표적들에 대한 이광자 표지자들의 수치와 매우 근사치이기 때문이다. 더 나아가, 본 발명에 따른 화합물 3 및 4는 충분한 수용성, 세포 투과도, 밝은 이광자 영상들을 얻기 위한 높은 $\Phi\delta_{max}$ 수치, 및 높은 광안정성을 가지며, 더욱 중요하게는, 그 방출 최대값이 기존의 이광자 표지자들과는 매우 다른 값을 가지므로, 다른 표적들에 대한 이광자 표지자들과 함께 공배치 실험을 수행하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면

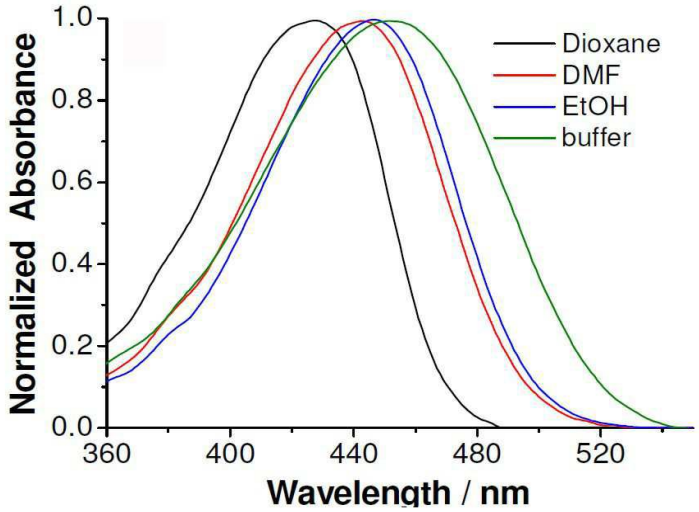
도면1a


Normalized Absorbance
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
360
380
400
420
440
Wavelength/ nm
Dioxane
DMF
EtOH
EtOH/H2O
Buffer

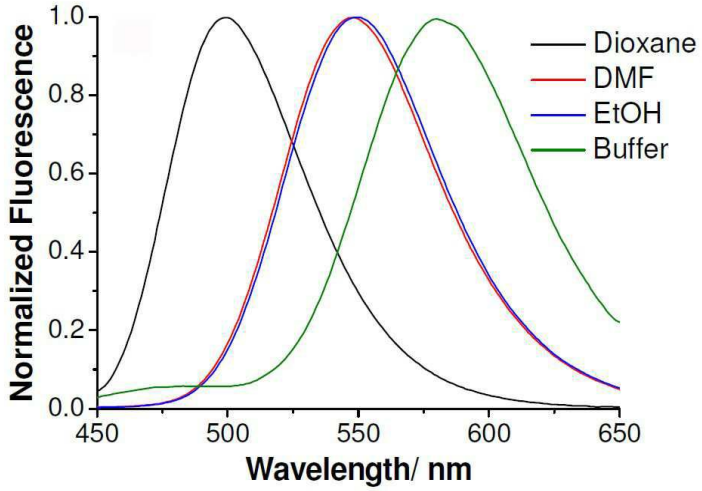
도면1b


Normalized Fluorescence
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
400
450
500
550
600
Wavelength/ nm
Dioxane
DMF
EtOH
EtOH/ H2O
buffer

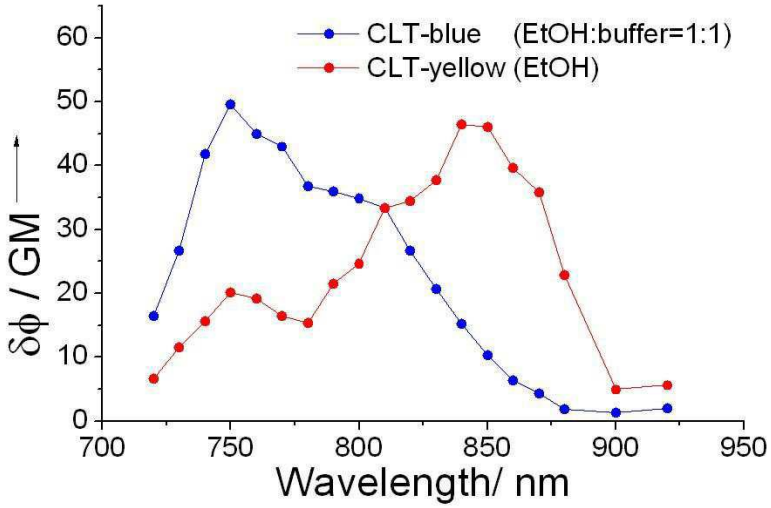
도면2a



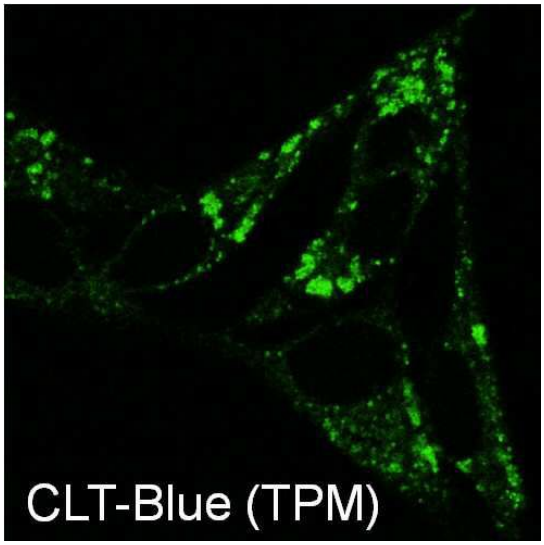
도면2b



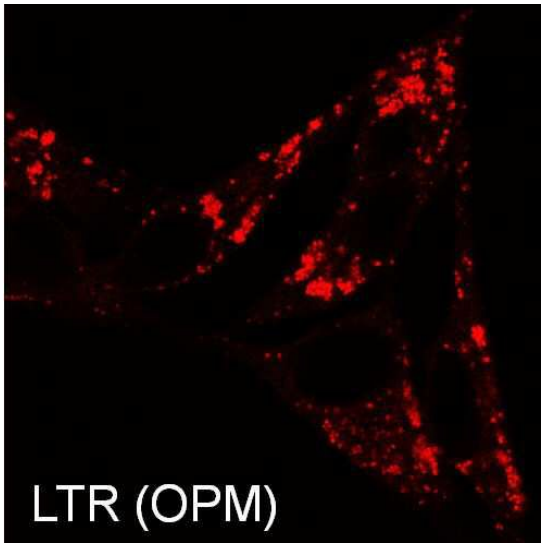
도면3



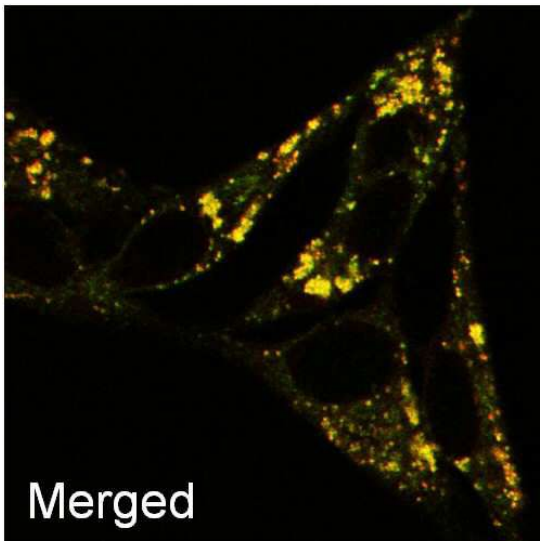
도면4a



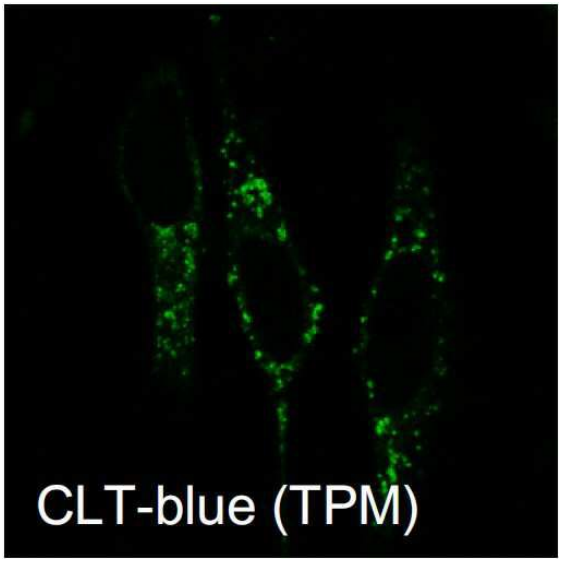
도면4b



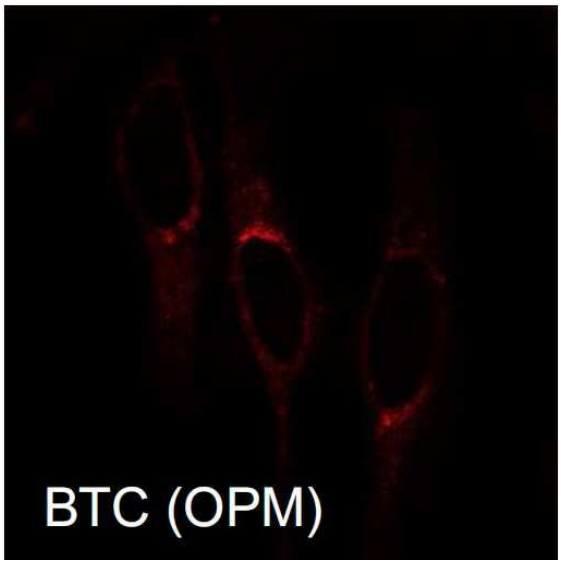
도면4c



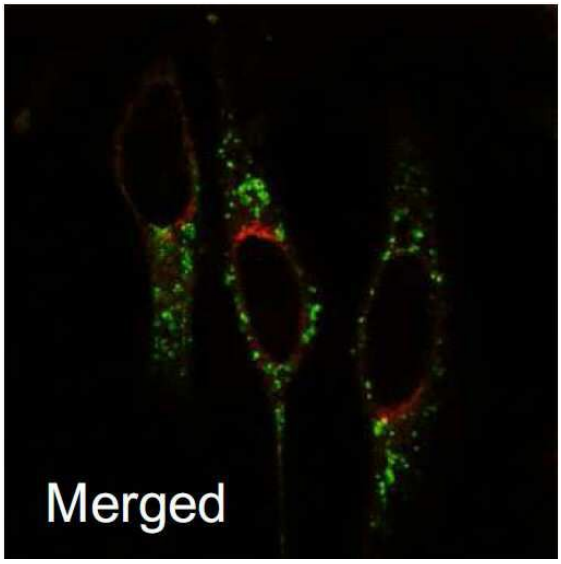
도면5a



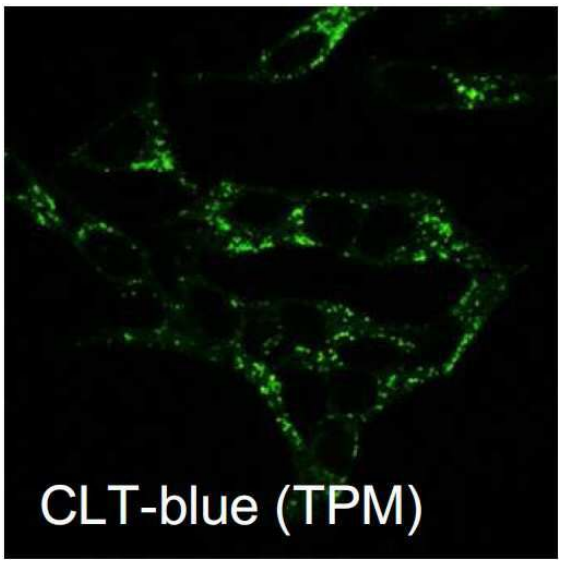
도면5b



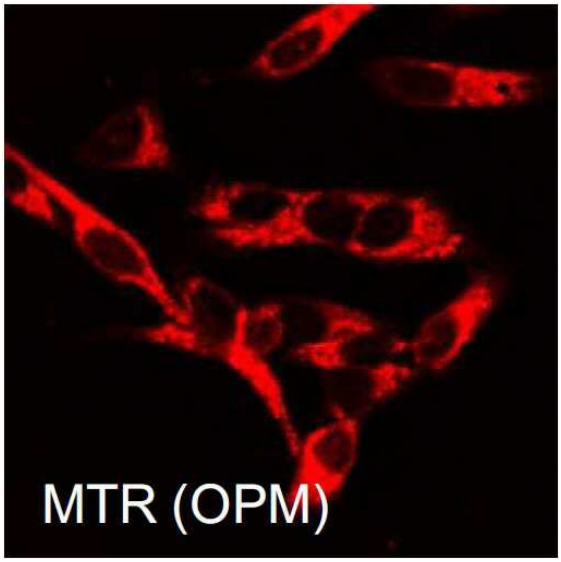
도면5c



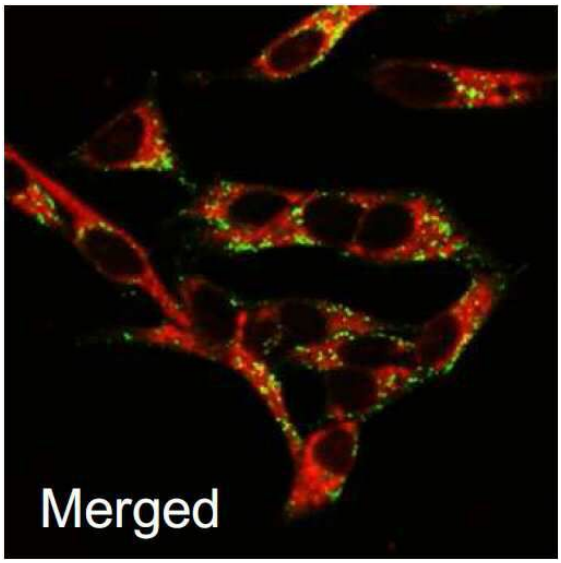
도면6a



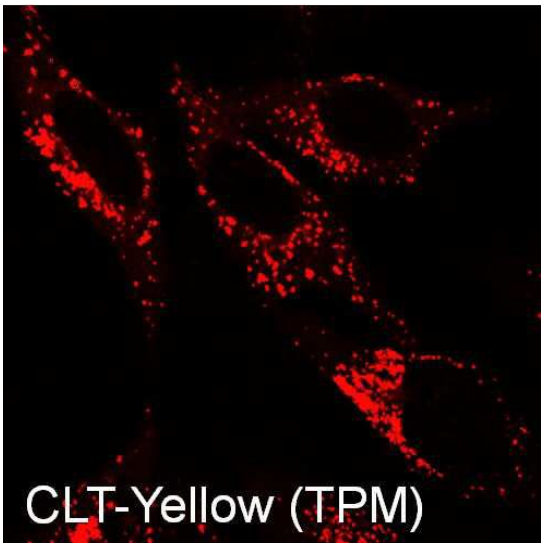
도면6b



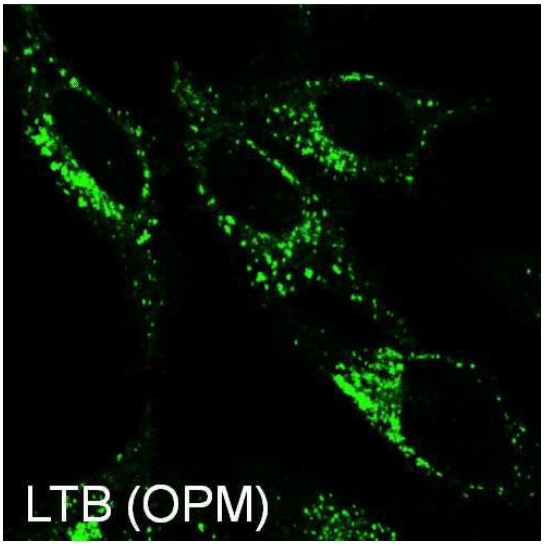
도면6c



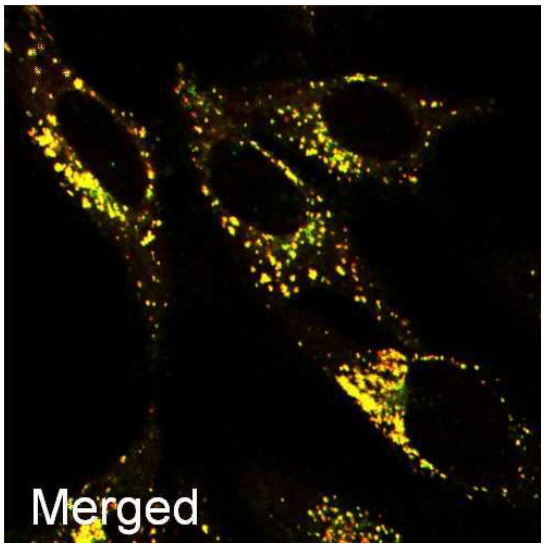
도면7a



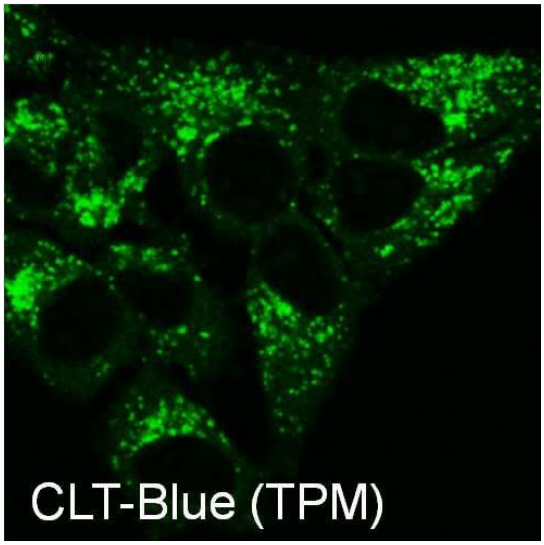
도면7b



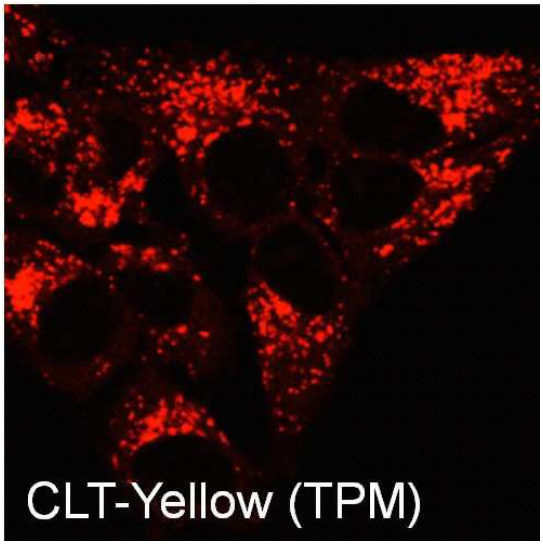
도면7c



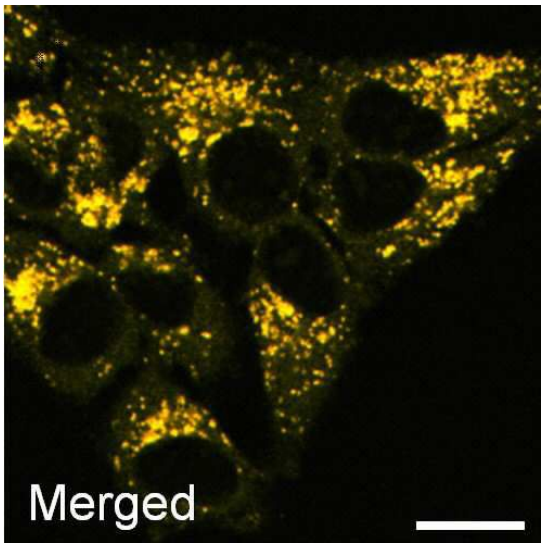
도면8a



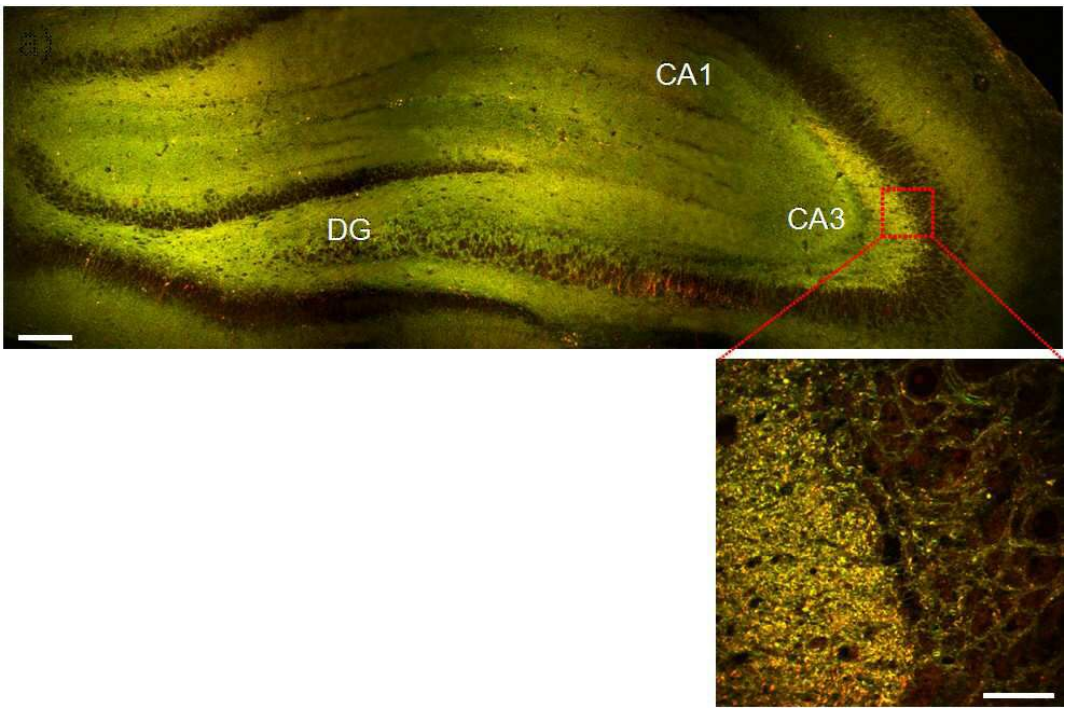
도면8b



도면8c



도면9



도면10

