(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0139527
(43) 공개일자 2016년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/52 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
A61K 49/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/52 (2013.01)
A61K 49/0084 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0074572
(22) 출원일자 2015년05월28일
심사청구일자 2015년05월28일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
에스에프씨 주식회사
충청북도 청원군 오창읍 과학산업5로 89
(72) 발명자
조봉래
서울특별시 성동구 성수일로4길 26 103동 504호(성수동2가,서울숲힐스테이트아파트)
(74) 대리인
정은열

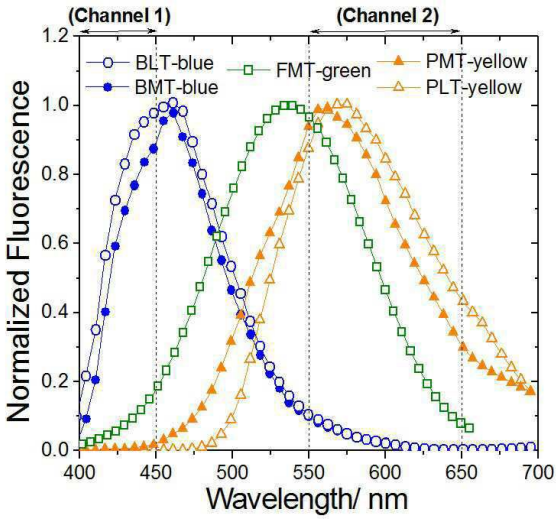
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **미토콘드리아 및 리소좀 영상화용 이광자 프로브 화합물 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미토콘드리아 및 리소좀에 대한 특이적 영상화가 가능한 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것으로서, 리소좀 및 미토콘드리아에 대해서 높은 선택성을 갖고, 상기 두 가지 세포기관을 동시에 검출하는 것이 가능하며, 현저한 이광자 활성 단면을 갖기 때문에 낮은 농도에서도 밝은 이광자 영상을 얻을 수 있고, 낮은 분자량을 갖는 관계로 염색이 용이할 뿐만 아니라, 낮은 세포독성, 높은 광안정성, 및 pH 독립성을 보유한 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 49/10 (2013.01)
G01N 31/22 (2013.01)

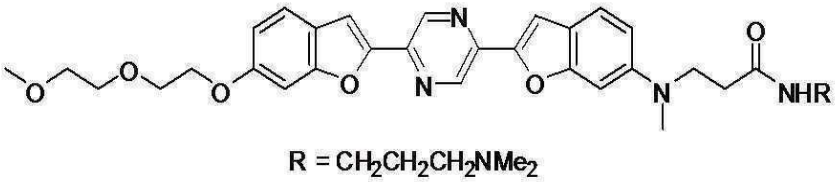
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 3으로 표시되는 리소좀 영상화용 이광자 프로브 화합물:

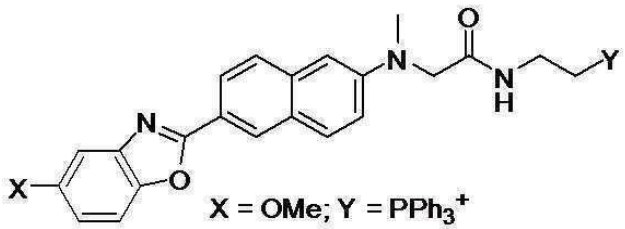
<화학식 3>



청구항 2

하기 화학식 4로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물:

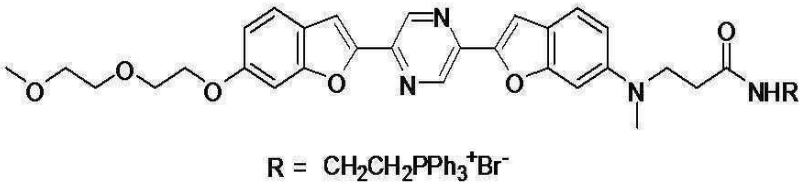
<화학식 4>



청구항 3

하기 화학식 5로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물:

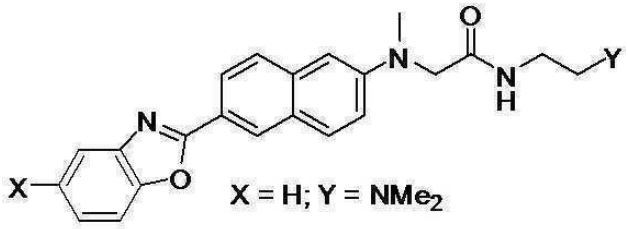
<화학식 5>



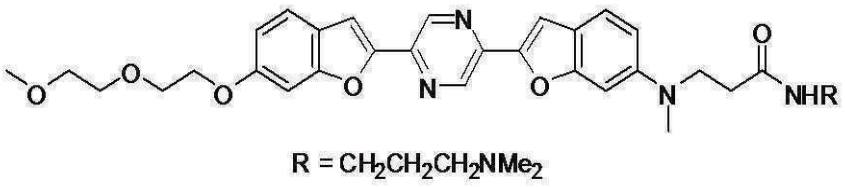
청구항 4

하기 화학식 1의 화합물 및 하기 화학식 3의 화합물을 포함하는 리소좀 영상화용 이광자 프로브 조성물:

<화학식 1>



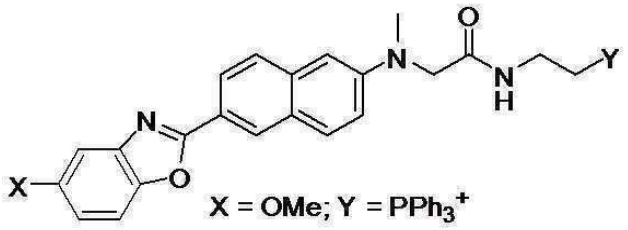
<화학식 3>



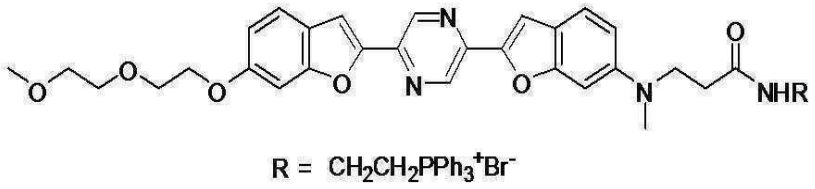
청구항 5

하기 화학식 4의 화합물 및 하기 화학식 5의 화합물을 포함하는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 조성물:

<화학식 4>



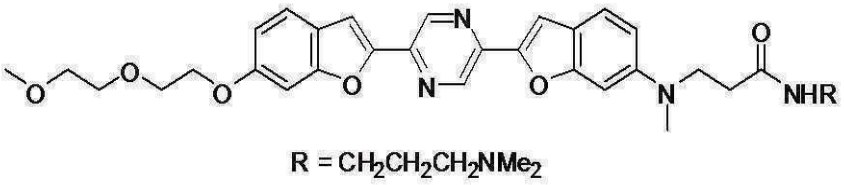
<화학식 5>



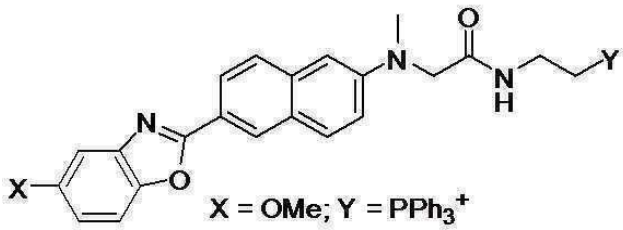
청구항 6

하기 화학식 3의 화합물 및 하기 화학식 4의 화합물을 포함하는 리소좀 및 미토콘드리아 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물:

<화학식 3>



<화학식 4>



발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아 및 리소좀에 대한 특이적 영상화가 가능한 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 소분자 형광 프로브를 사용한 실시간 영상화는 생체 시스템에서 다양한 현상들을 연구하는데 결정적인 도구이다. 지난 수십 년간 pH 및 금속 이온 농도의 변화, 효소 반응, 및 리소좀, 미토콘드리아, DNA 및 세포막과 같은 기관들의 활성을 포함하는 다양한 생물학적 과정들을 시각화하기 위해서 몇몇 형광 프로브들이 개발된 바 있다 (a) C. Bucci, P. Thomsen, P. Nicoziani, J. McCarthy, B. DeursMol. *Mol. Biol. Cell* **2000**, *10*, 47-61; b) P. Bernardi, V. Petronilli, F. D. Lisa, M. Forte, *Trends Biochem. Sci.* **2001**, *26*, 112-117; c) J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R, Y. Tsien, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 906-918; d) *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (Ed.: R. P. Haugland), Molecular Probes, Eugene, **2005**, 10th ed. e) B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, R. Y. Tsien, *Science* **2006**, *312*, 217-224; f) D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang, *Nat. Chem. Bio.* **2008**, *4*, 168-175; g) H. Kobayashi, M. Ogawa, R Alford, P. L. Choyke, Y. Urano. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2620-2640; h) J. Han, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 2709-2728; i) D. T. Quang, J. S. Kim, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6280-6301.).

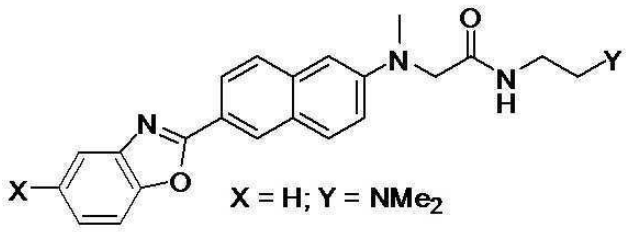
[0003] 그러나, 이러한 프로브들 중 대부분은 일광자 현미경법 (one-photon microscopy, OPM)에 최적화되어 있으며, 이는 상대적으로 짧은 여기 파장을 사용한다 (λ < 500 nm). 이로 인해서, 얕은 투과 깊이 (< 100 nm), 자가-형광 (auto-fluorescence), 및 프로브에 대한 광퇴색 (photobleaching)과 같은 현상들이 나타나는 바, 조직 영상화에 한계점을 나타낸다. 이러한 문제점들을 극복하기 위한 매력적인 접근방법이 이광자 현미경법 (two-photon microscopy, TPM)인 바, 이는 여기를 위해서 2개의 근적외선 광자들을 사용한다. OPM에 비해서, TPM은, 적절한 이광자 (two-photon, TP) 프로브들을 사용할 경우, 온전한 조직 내에서 더 깊은 깊이로 생물학적으로 관련성 있는 종들을 검출하고, 공간적 해상도가 높으며, 이는 장시간 유지된다 (a) F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 932-940; b) H. M. Kim, B. R. Cho, *Acc. Chem. Res.* **2009**, *42*, 863-872.).

[0004] 한편, 리소좀은 단백질과 폐기 물질들을 분해할 수 있는 능력을 지닌 산성 소기관이며 (pH 4.5-5.5); 미토콘드리아는 세포의 발전기관으로서, 활성 산소종의 주된 발생원이다. 생물학에서, 리소좀과 미토콘드리아의 역할은 생체 세포 및 조직들 중에서 TPM을 사용하여 그 활성을 모니터링함으로써 밝혀낼 수 있다. 이를 위해서는 소기관 특이적인 TP 프로브들이 필요하다.

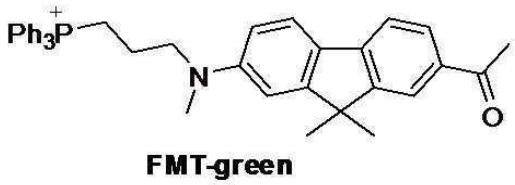
[0005] 리소좀 및 미토콘드리아에서의 생물학적 활성을 확인하는 가장 일반적인 방법은 공동-영역화 실험 (co-localization experiment)이며, 이는 특정 표적들 및 소기관들에 대한 형광 프로브들로 공동-표지된 세포들을 사용한다. 이러한 실험들은 특정 소기관들 및 표적들에 대한 TP 프로브들을 사용함으로써 TP 모드에서 수행될 수 있으며, 상기 TP 프로브들은 넓게 분리된 파장 영역들에서 TP 여기된 형광을 발광한다. 현재까지, 미토콘드리아 및 리소좀에 대한 TP 프로브로서 10종 미만의 프로브들이 보고된 바 있다 (S. K. Lee, W. J. Yang, J. J. Choi, C. H. Kim, S. J. Jeon, B. R. Cho, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 323-326.). 그러나, 전술한 용도로 사용될 수 있는 TP 프로브들은 거의 보고된 바가 없다.

[0006] 최근에, 본 발명의 발명자들은 Raw 264.7 세포들 중에서, 각각 458 nm 및 540 nm의 파장에서 TPEF를 방출하는 리소좀에 대한 TP 프로브 (하기 화학식 1, 이하 "BLT-blue"로 명명) 및 미토콘드리아에 대한 TP 프로브 (하기 화학식 2, 이하 "FMT-green"으로 명명)에 대한 TP 프로브들을 개발한 바 있다 (J, H, Han, S, K, Park, C, S, Lim, M, K, Park, H, J, Kim, H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15246-15249):

화학식 1

[0007] 

화학식 2

[0008] 

[0009] 상기 프로브들은 이중-색상 TPM 영상화에 의해서 자기소화 (autophagy)의 시각화를 용이하게 하는 바, 자기소화란 오래되고, 손상되거나 도는 잉여의 미토콘드리아를 제거하는 것을 용이하게 하는 자가-분해 과정이다.

[0010] 관련하여, 이러한 TPM의 유용성은, 넓게 분리된 파장 영역들에서 TPEF를 방출하는 각 세포기관에 대한 TP 프로브들을 개발함으로써 더욱 향상될 수 있을 것이다 (이는 세포기관 모니터링을 용이하게 하고, 공동-영역화 실험들을 보조할 수 있다).

발명의 내용

해결하려는 과제

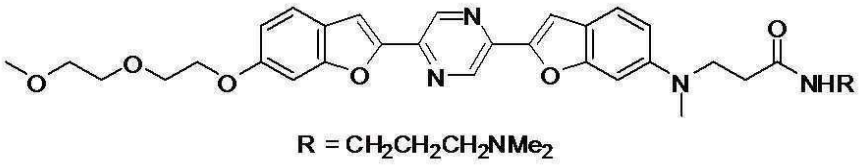
[0011] 따라서, 본 발명에서는 세포기관들 중, 미토콘드리아 및 리소좀에 대한 특이적 영상화가 가능하며, 더 나아가 상기 두 기관의 동시 영상화도 가능한 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 따라서, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0013] 하기 화학식 3으로 표시되는 리소좀 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

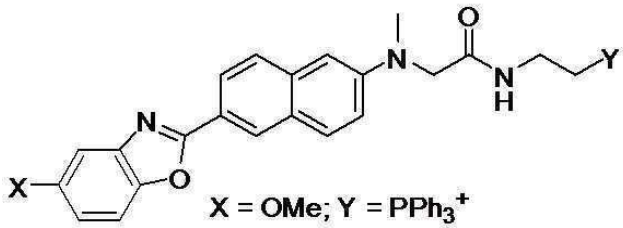
화학식 3



[0014]

[0015] 또한, 하기 화학식 4로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

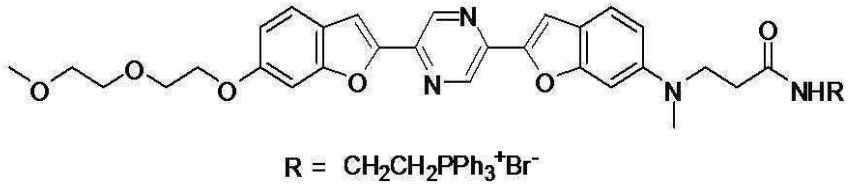
화학식 4



[0016]

[0017] 또한, 하기 화학식 5로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

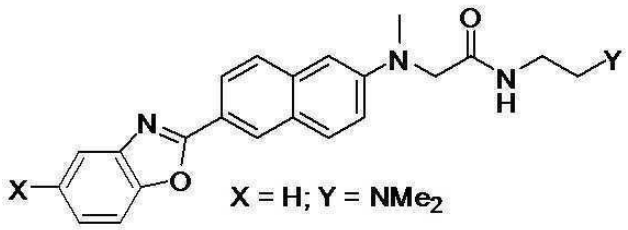
화학식 5



[0018]

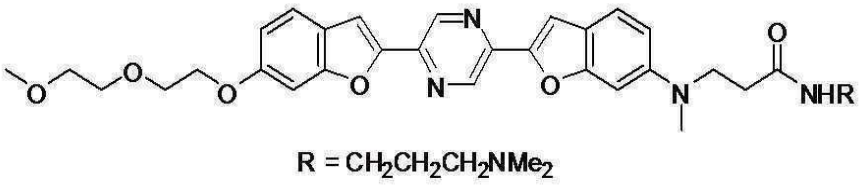
[0019] 또한, 하기 화학식 1의 화합물 및 하기 화학식 3의 화합물을 포함하는 리소좀 영상화용 이광자 프로브 조성물을 제공한다:

[0020] <화학식 1>



[0021]

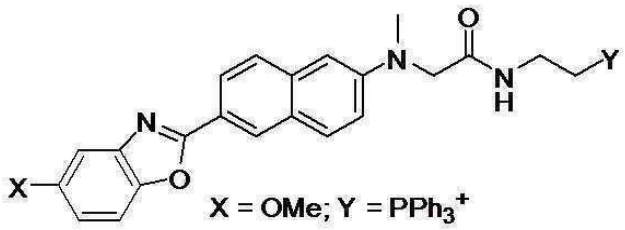
[0022] <화학식 3>



[0023]

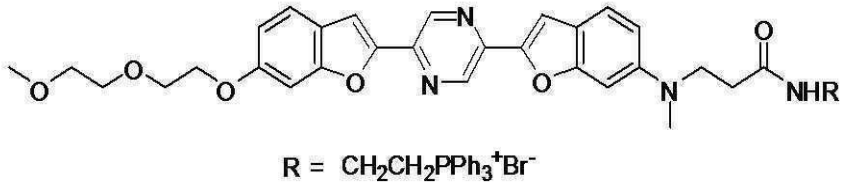
[0024] 또한, 하기 화학식 4의 화합물 및 하기 화학식 5의 화합물을 포함하는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 조성물을 제공한다:

[0025] <화학식 4>



[0026]

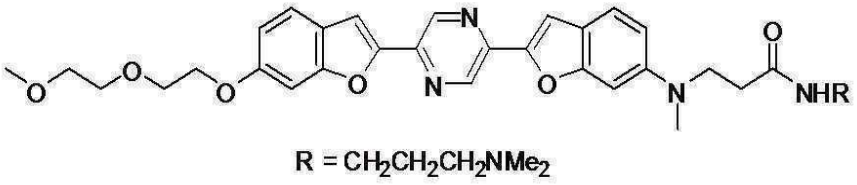
[0027] <화학식 5>



[0028]

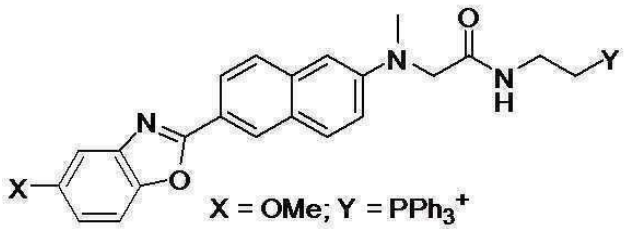
[0029] 또한, 하기 화학식 3의 화합물 및 하기 화학식 4의 화합물을 포함하는 리소좀 및 미토콘드리아 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물을 제공한다:

[0030] <화학식 3>



[0031]

[0032] <화학식 4>



[0033]

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따르면, 리소좀 및 미토콘드리아에 대해서 높은 선택성을 갖고, 상기 두 가지 세포기관을 동시에 검출하는 것이 가능하며, 현저한 이광자 활성 단면을 갖기 때문에 낮은 농도에서도 밝은 이광자 영상을 얻을 수 있고, 낮은 분자량을 갖는 관계로 염색이 용이할 뿐만 아니라, 낮은 세포독성, 높은 광안정성, 및 pH 독립성을 보유한 이광자 프로브들을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 1 mM의 BLT-blue (청색 빈 원), BMT-blue (청색 채워진 원), FMT-green (녹색 빈 사각형), PLT-yellow (황색 빈 삼각형), 및 PMT-yellow (황색 채워진 삼각형) 프로브들로 표지된 HeLa 세포들의 정규화된 이광자 여기 형광 스펙트럼을 도시한 그래프이다. 세포들은 750 nm 파장에서 여기되었다.

도 2a는 각각 EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (4/1), 1,4-디옥산/H_2O (20/1), 및 1,4-디옥산/H_2O (180/1) 중에서 BMT-blue, BLT-blue, FMT-green, PMT-yellow, 및 PLT-yellow의 이광자 여기 스펙트럼을 도시한 것이고, 도 2b는 HeLa 세포들 중에서 BMT-blue, BLT-blue, FMT-green, PMT-yellow, 및 PLT-yellow 프로브들의 유효 이광자 활성 단면들을 도시한 것이다.

도 3은 LTB 및 PLT-yellow (3a 및 3b), 및 BLT-blue 및 PLT-yellow (3d 및 3e)로 공동-표지된 HeLa 세포들의 OPM (3a) 및 TPM (3b, 3d 및 3e) 영상들이며, 통합된 영상들 (3c 및 3f)이다. OPM 영상은 λ = 380-450 nm (LTB)에서 얻어졌으며 (3a), TPM 영상은 각각 λ = 550-650 nm (PLT-yellow)에서 얻어졌고 (3b 및 3e); λ = 400-450 nm (BLT-blue)에서 얻어졌다 (3d). 세포들은 1 μM의 프로브들로 표지되었다. 일광자 및 이광자 여기에 대한 파장들은 각각 λ = 373 및 750 nm였다. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다. 축적, 30 ㎛.

도 4는 BMT-blue 및 MTR (4a 및 4b), 및 BMT-blue 및 FMT-green (4d 및 4e)로 공동-표지된 HeLa 세포들의 TPM (4a, 4d 및 4e) 및 TPM (4b) 영상들이며, 통합된 영상들 (4c 및 4f)이다. TPM 영상은 λ = 400-450 nm (BMT-blue)(4a 및 4d); λ = 550-650 nm (FMT-green)(4e)에서 얻어졌으며, OPM 영상은 λ = 600-700 nm (MTR)에서 얻어졌고 (4b)에서 얻어졌다. 세포들은 1 μM의 프로브들로 표지되었다. 일광자 및 이광자 여기에 대한 파장들은 각각 λ = 543 및 750 nm였다. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다. 축적, 30 ㎛.

도 5는 MTG 및 PMT-yellow (5a 및 5b), 및 BMT-blue 및 PMT-yellow (5d 및 5e)로 공동-표지된 HeLa 세포들의 OPM (5a) 및 TPM (5b, 5d 및 5e) 영상들이며, 통합된 영상들 (5c 및 5f)이다. OPM 영상은 λ = 475-525 nm (MTG)(5a), TPM 영상은 λ = 550-650 nm (PMT-yellow)(5b 및 5e); λ = 400-450 nm (BMT-blue)(5d)에서 얻어졌다. 세포들은 2 μM 및 1 μM의 BMT-blue 및 PMT-yellow로 표지되었다. 일광자 및 이광자 여기에 대한 파장들은 각각 λ = 488 및 750 nm였다. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다. 축적, 30 ㎛.

도 6은 각각 검출 윈도우 400-450 nm (BMT-blue)(6a) 및 550-650 nm (PMT-yellow)(6b)를 사용하여, BMT-blue 및 PLT-yellow로 공동-표지된 미처리된 HeLa 세포들의 TPM 영상들이며, 도 6a 및 6b의 통합된 영상 (6c)이다. 또한, 도 6e는 세포들을 6-히드록시도파민 (40 μM)으로 처리한지 4 시간 경과 후에 두 가지 검출 윈도우들에서 얻어진 TPM 영상들의 통합 영상이며, 도 6d 및 6f는 도 6c 및 6f 중의 점선을 따라서 수집된 BMT-blue 및 PLT-yellow의 TPEF 강도들이다. 세포들은 1 μM의 프로브들로 표지되었다. 여기 파장은 각각 λ = 750 nm였다. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다. 축적, 30 ㎛.

도 7은 대략 120 ㎛의 깊이에서 얻어진, 각각 10 μM의 BMT-blue 및 PLT-yellow로 공동-표지된 래트 해마 박편에 대한 이중-색상 TPM 영상들이다. 영상들은 각각 20ㅅ (7a-7c), 100ㅅ (7d-7f) 및 500ㅅ (7g-7i)의 배율로 얻어졌으며, 7c, 7f, 및 7i는 통합된 영상들이다. 도 7a-7c 영상들 중의 백색 박스는 CA3 영역의 피라미드성 뉴런층을 나타낸다. TPM 영상들은 λ = 400-450 (BMT-blue)(7a, 7d, 7g) 및 λ = 550-650 nm (PLT-yellow)(7d, 7e, 7h)에서 얻어졌으며, 7g-7i는 확대된 영상을 나타낸다. 백색 점선 원들 내부의 녹색 및 적색 점들은 각각 조직 내부 세포 중의 미토콘드리아 및 리소좀을 나타낸다. 영상들은 *A* 수치가 0.16으로서, 거의 중첩되지 않았다. 이광자 여기에 대한 파장은 λ = 750 nm였다. 축적: 150 (7c), 30 (7f), 및 6 ㎛ (7i).

도 8은 다양한 용매들 중에서 BMT-blue (8a, 8d), PMT-yellow (8b, 8e), 및 PLT-yellow (8c, 8f)의 흡수 (8a-

8c) 및 방출 (8d-8f) 스펙트럼을 도시한 것이다.

도 9는 2 mL 범용 완충용액 중의 BMT-blue (9a, 9d), PMT-yellow (9b, 9e), 및 PLT-yellow (9c, 9f)의, 형광 (9a) 및 흡수 스펙트럼 (9b-9c), 또한 프로브 농도에 대한 형광 강도 (9d) 및 흡수 (9e, 9f) 플롯을 도시한 것이다. 여기 파장은 355 nm였다.

도 10은 1 μM의 BMT-blue, BLT-blue, PMT-yellow, PLT-yellow, 및 FMT-green으로 공동-표지된 HeLa 세포들의 TPM 영상들이다 (10a-10e). TPEF 강도들은 유효 TPA를 계산하기 위해서 명 도메인 (점선 원형) 중의 5개 관심 영역들로부터 수집되었다. 여기 파장은 750 nm였다. 축적: 30 ㎛

도 11은 HeLa 세포들 중, LTB, MTG, 및 MTR의 일광자 여기 형광 스펙트럼, 및 BLT-blue, BMT-blue, FMT-green, PLT-yellow, 및 PMT-yellow의 이광자 여기 형광 스펙트럼이다. 일광자 및 이광자 여기 파장들은 각각 373 (LTB), 488 (MTG), 543 (MTR), 및 750 (BLT-blue, BMT-blue, FMT-green, PLT-yellow, 및 PMT-yellow) nm였다.

도 12는 CCK-8 키트를 사용하여 측정한, BMT-blue, PMT-yellow, 및 PLT-yellow 프로브들의 존재 하에서 HeLa 세포들의 생존도이다. 세포들은 1-10 μM 프로브들로 16 시간 동안 배양하였다.

도 13a 내지 13c는 400-650 nm에서 수집된 BMT-blue, PMT-yellow, 및 PLT-yellow-표지된 (1 μM) HeLa 세포들의 TPM 영상들 (13a-13c)을 도시한 것이다. 도 13d 내지 13f는 시간에 대한 함수로서 상대 TPEF 강도를 나타낸 그래프이다. 수치화된 강도는 *xyt* 모드 (λ_{ex} = 750 nm, ~200 fs)를 사용하여 2-s 간격으로 1 시간 동안 기록하였다. 이광자 여기는 펨토초 펄스를 사용하여 750 nm에서 제공되었다. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다. 축적, 30 ㎛.

도 14는 에탄올/범용 완충용액 (1/1) 중 2 μM의 BMT-blue, PMT-yellow, 및 PLT-yellow의 일광자 형광 강도에 대한 pH (4.0-9.0)의 효과를 도시한 그래프이다. 사용된 여기 파장은 각각 360, 455, 및 440 nm였다.

도 15는 각각 400-450 (BMT-blue)(15a-15c) 및 550-650 nm (PLT-yellow)(15d-15f)에서 수집된, 1 μM의 BMT-blue 및 PLT-yellow로 공동-표지된 HeLa 세포들의 이중-색상 TPM 영상들, 및 통합된 영상들 (15g-15i)을 도시한 것이다. 세포들은 자기소화를 유도하기 위해서 6-히드록시도파민 (40 μM)으로 0-4 시간 동안 처리되었다. 아래 컬럼의 수치들은 공동-영역화 계수 (*A* 수치)를 나타낸다. 여기 파장은 750 nm였다. 축적 15 ㎛. 도시된 세포들은 반복된 실험들 (n = 5)로부터 얻어진 대표 영상들이다.

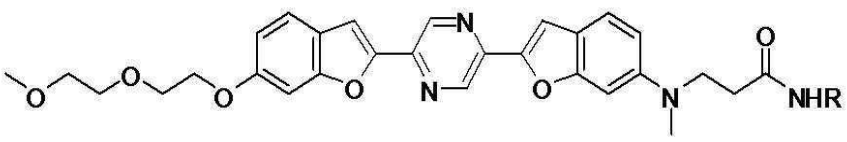
도 16은 10 μM의 BMT-blue 및 PLT-yellow로 공동-염색된 래트 해마 박편의 명 필드 영상 (상단) 및 TPM 영상들 (하단)을 도시한 것이다. 병합된 영상들은 20ㅅ의 배율로 90~165 ㎛에서 얻어진 것들이다. TPEF는 펨토초 펄스로 여기되어 400-450 nm (BMT-blue) 및 550-600 nm (PLT-yellow)에서 수집되었다. 축적 150 ㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 이하, 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0037] 본 발명자들은 리소좀에 대한 TP 프로브 (하기 화학식 3, 이하 "PLT-yellow"로 명명) 및 미토콘드리아에 대한 TP 프로브 (하기 화학식 4 및 5, 이하 "BMT-blue" 및 "PMT-yellow"로 명명)를 새롭게 개발하였으며, 하기 실시예의 다양한 실험 결과로부터도 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 프로브들은 하기 요건을 충족시킨다: i) 각 세포기관에 대한 높은 선택성; ii) 두 가지 세포기관을 동시에 검출하기 위해서, 세포 중에서 넓게 분리된 TPEF 스펙트럼; iii) 낮은 프로브 농도에서도 밝은 TPM 영상을 얻기 위해서 현저한 TP 활성 단면; iv) 염색을 용이하게 하기 위해서 낮은 분자량; v) 낮은 세포독성, 높은 광안정성, 및 pH 독립성.

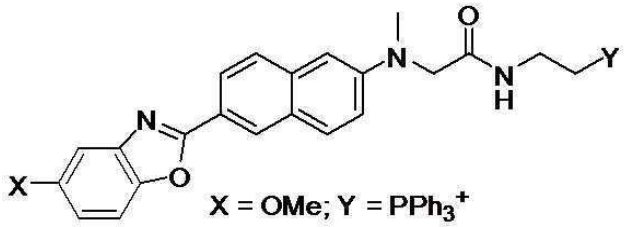
[0038] <화학식 3>



R = $CH_2CH_2CH_2NMe_2$

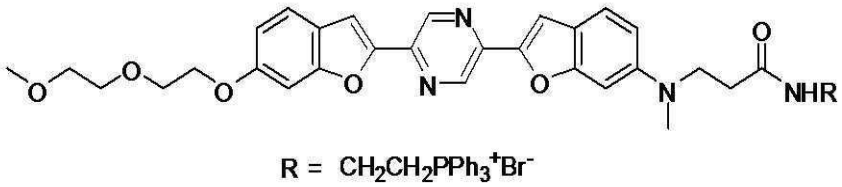
[0039]

[0040] <화학식 4>



[0041]

[0042] <화학식 5>



[0043]

[0044] 상기 화학식 4의 화합물, 즉 BMT-blue는 전술한 화학식 1의 화합물, 즉 BLT-blue의 NMe_2 기 자리에 PPh_3^+ 기를 도입함으로써 제조되었는 바, 양으로 대전된 이온에 의해서 미토콘드리아 내에 위치하는 것이 용이해진다. PMT-yellow 및 PLT-yellow는 비스-1,4-(*p*-디부틸아미노스티릴)피라진 (Pyr-2D)으로부터 유래되었는 바, 이는 톨루엔 중에서 긴 발광 최대값 (λ_{fl} = 518 nm) 및 큰 $\Phi\delta_{max}$ 수치 (770 nm에서 1250 GM)를 갖는다 (M. Rum, S. J. K. Pond, T. Meyer-Friedrichsen, Q. Zhang, M. Bishop, Y. Zhang, S. Barlow, S. R. Marder, J. W. Perry, *J. Phys. Chem. C,* **2008**, *112*, 8061-8071).

[0045] 용매의 변화 (물로의 변화)에 따라서 λ_{fl}은 적색-편이되고, Φ 수치는 감소할 것으로 예상되기 때문에, 이러한 λ_{fl} 및 Φ 수치를 조절하기 위해서 아미노기들 중 하나를 더 약한 전자 공여기인 알콕시기로 치환하였다. 더 나아가, 헤테로사이클릭 고리 중에 C=C 결합을 포함시켰는 바, 이는 광안정성을 향상시키기 위한 것이며, 각각 미토콘드리아 및 리소좀 표적화 잔기들로서 트리페닐포스포늄 이온 및 삼차 아미노기를 도입하였다.

[0046] 하기 실시예를 통해서 본 발명에 따른 프로브 및 종래 통상적인 프로브들 (BLT-blue 및 FMT-green)의 광물리적 특성들을 동일한 조건들 하에서 평가함으로써, 이중-색상 영상화에 가장 최적인 TP 프로브들의 조합을 결정하였다. 그 결과, BLT-blue 및 PLT-yellow의 조합, 또한 BMT-blue 및 PMT-yellow의 조합이 각각 리소좀 및 미토콘드리아에 대한 청색 및 황색 발광 TP 프로브들로서, 전술한 요건들을 모두 만족시키는 것을 알 수 있었다. 더 나아가, BMT-blue 및 PLT-yellow의 조합에 의해서, 이중-색상 TPM 영상화를 통해서, 살아있는 조직 내에서 리소좀 및 미토콘드리아를 동시에 검출하는 것이 가능했다.

[0047] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0048] 합성

[0049] BLT-블루 및 FMT-그린 프로브들은 종래 보고된 바에 따라서 제조하였다 (J, H, Han, S, K, Park, C, S, Lim, M, K, Park, H, J, Kim, H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 15246-15249). 화합물 1, 2, 6, 및 7도 종래 문헌에 서술된 바에 따라서 제조하였다 (a)K. Rathore, C. S. Lim, Y. Lee, B. R. Cho, *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 3406-3412; b) T. Hirayama, S. Iyoshi, M. Taki, Y. Maedab, Y. Yamamoto, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2040-2045; c) M. G. Gichinga, S. Striegler, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 4917-4922; d) A. Aditya,T. Kodadek, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 164-169.). 한편, PLT-옐로우, PMT-옐로우, 및 BMT-블루는 하기 서술한 바에 따라서 합성하였다.

[0050] **BMT-블루**

[0051] CF_3CO_2H (1 mL)를 CH_2Cl_2 (4 mL) 중 0.24 mmol의 화합물 **1** (100 mg) 용액에 첨가하였으며; 혼합물을 Ar 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 용매를 진공 중에서 제거하였다. 더 이상의 정제 없이 조생성물을 다음 단계에 사

용하였다. 조생성물들의 혼합물, 즉 CH_2Cl_2 (10 mL) 중의 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보다이이미드·HCl (68 mg, 0.36 mmol), 및 4-디메틸아미노피리딘 (2.9 mg, 0.024 mmol)의 혼합물을 20분 동안 교반하였다. (2-아미노에틸)트리페닐포스포늄 브로마이드 (0.71 g, 2.1 mmol)를 상기 혼합물에 첨가하고, Ar 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 산물을 에틸 아세테이트로 추출하고, $MgSO_4$ 상에서 건조하였다. 용매를 진공 중에서 제거하였다. 산물을 CH_2Cl_2/MeOH (19:1)를 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해서 정제하였다. 수율 120 mg (73%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.02 (1H, t, *J* = 5.9 Hz), 8.55 (1H, s), 8.10 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.5 Hz), 7.82-7.65 (17H, m), 7.45 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 7.15 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 6.93 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.92 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 4.10 (2H, s), 3.88 (3H, s), 3.88-3.84 (2H, m), 3.75-3.68 (2H, m), 3.30 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 170.1, 164.4, 156.9, 148.3, 145.0, 142.8, 136.2, 135.0, 133.2, 133.1, 130.4, 130.2, 129.8, 127.4, 126.6, 125.8, 123.8, 119.8, 117.8, 116.6, 116.3, 112.5, 110.1, 105.8, 102.4, 56.3, 55.6, 40.4, 33.0, 22.0; HRMS(FAB$^+$): m/z calcd for [$C_{41}H_{37}N_3O_3P^+$]: 650.2567, found : 650.2567.

[0052] **화합물 3**

[0053] 화합물 **2** (7.3 mmol) 1g을, $(CF_3)_2CHOH$ (8 mL) 중의 에틸 아크릴레이트 (2.2 g, 22 mmol)에 첨가하였다. 혼합물을 60 ℃에서 2 시간 동안 교반하였다. 결과물인 혼합물을 진공 중에서 농축시킴으로써 순수한 산물을 수득하였다. 수율: 1.7 g (정량적); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 7.15 (1H, t, *J* = 8.2 Hz), 6.37 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz), 6.31 (1H, dd, *J* = 8.2, 2.3 Hz), 6.28 (1H, d, *J* = 2.3 Hz), 4.14 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.80 (3H, s), 3.67 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.94 (3H, s), 2.57 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.26 (3H, t, *J* = 7.1 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 172.1, 160.6, 149.8, 129.7, 105.3, 101.2, 98.8, 60.3, 54.8, 48.4, 38.1, 31.6, 14.0 ppm.

[0054] **화합물 4**

[0055] $POCl_3$ (0.97 g, 6.3 mmol)를 0 ℃에서 DMF (5 mL)에 적가하였으며, 30 분 동안 교반하였다. DMF (5 mL) 중의 화합물 **3** (4.2 mmol) 1g을 상기 혼합물에 첨가하고; 결과물인 혼합물을 실온에서 3 시간 동안 교반하였다. 상기 용액을 1 N NaOH로 중화시키고, 밤새도록 교반하였다. 잔류물을 CH_2Cl_2로 추출하였다. 조합된 유기층을 $MgSO_4$ 상에서 건조하였으며, 진공 중에서 농축하였다. 조생성물을 헥산/EtOAc (3:1)을 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해서 정제하였다. 수율: 0.59 g (53%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 10.17 (1H, s), 7.73 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.32 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.10 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 4.14 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.91 (3H, s), 3.77 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.08 (3H, s), 2.62 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.26 (3H, t, *J* = 7.1 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 186.9, 171.3, 163.5, 154.3, 130.0, 114.5, 104.1, 92.8, 60.4, 54.9, 47.8, 38.2, 31.8, 13.8 ppm.

[0056] **화합물 5**

[0057] CH_2Cl_2 (10 mL) 중의 화합물 **4** (0.50 g, 1.9 mmol) 및 $AlCl_3$ (1.5 g, 11 mmol)의 혼합물을 Ar 하에서 2 시간 동안 환류시켰다. 결과물인 혼합물을 NH_4Cl로 퀀칭시키고, CH_2Cl_2로 추출하였다. 조합된 유기층을 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 진공 중에서 농축시켰다. 잔류물을 헥산/EtOAc (3:1)을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 수율: 0.45 g; (98%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 11.56 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 9.51 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.28 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 6.29 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz), 6.07 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 4.12 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.71 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.03 (3H, s), 2.59 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.24 (3H, t, *J* = 7.1 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 192.0, 170.9, 163.6, 154.4, 134.8, 111.4, 104.2, 96.8, 60.3, 47.5, 38.1, 31.6, 13.7 ppm.

[0058] **화합물 8**

[0059] 화합물 **6** (1.0 g, 4.2 mmol) 및 화합물 **7** (0.96 g, 4.2 mmol)을 포함하는 혼합물, 및 DMF (10 mL) 중의 K_2CO_3 (2.9 g, 21 mmol)를 Ar 하에서 12 시간 동안 교반하였다. 결과물인 혼합물을 여과하였으며, 여과물을 진공 중에서 농축하였다. 조생성물을 헥산/EtOAc (1:1)을 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해서 정제하였다. 수율: 1.22 g (78%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.28 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 9.16 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.62 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.14 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.98 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.25-4.21 (2H, m), 4.07 (3H, s), 3.95-3.3.91 (2H, m), 3.78-3.74 (2H, m), 3.63-3.59 (2H, m), 3.41 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 164.3, 159.2, 157.2, 151.0, 147.0, 145.9, 140.3, 140.0, 122.6, 121.6, 114.2, 109.8, 96.5, 72.1, 70.9, 69.7, 68.0, 59.2, 53.1 ppm.

[0060] **화합물 9**

[0061] THF (20 mL) 중의 화합물 **8** (1.00 g, 2.7 mmol) 및 $NaBH_4$ (0.76 g, 20 mmol)의 혼합물을 30 분 동안 환류시켰다. 메탄올 (1 mL)을 적가하고, 혼합물을 70 ℃에서 1 시간 동안 교반하였다. 반응물을 실온까지 냉각시켰으며 NH_4Cl 용액 (15 mL)으로 퀀칭하였다. 유기층을 분리하였으며, 수성상을 CH_2Cl_2 (2 ㅅ 30 mL)로 추출하였다. 조합된 유기층을 $MgSO_4$ 상에서 건조시키고, 농축시킴으로써 생성물을 수득하였다. 잔류물은 헥산/EtOAc (1:1)을 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔)에 의해서 정제하였다. 수율: 0.60 g (65%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.97 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.61 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.48 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.39 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.07 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.93 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.86 (2H, s), 4.22-4.18 (2H, m), 3.93-3.89 (2H, m), 3.77-3.73 (2H, m), 3.62-3.58 (2H, m), 3.41 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 157.9, 156.1, 153.3, 151.4, 143.2, 142.0, 139.0, 121.7, 121.5, 113.1, 106.2, 96.2, 71.6, 70.4, 69.4, 67.6, 62.9, 58.8 ppm.

[0062] **화합물 10**

[0063] CH_2Cl_2 (5 mL) 중의 화합물 **9** (0.30 g, 0.74 mmol)의 용액을, 캐뉼라를 통해서 CH_2Cl_2 (10 mL) 중의 DDQ (0.33 g, 1.5 mmol), PPh_3 (0.39 g, 1.5 mmol), 및 $Bu_4N^+Br^-$ (0.47 g, 1.5 mmol)를 함유하는 용액에 첨가하였다. 혼합물을 Ar 하에서 1 시간 동안 교반하였다. 결과물인 혼합물을 진공 중에서 농축하였다. 조생성물을 헥산/EtOAc (3:1)을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼에 의해서 정제하였다. 수율: 0.19 g (64%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.02 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.67 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.51 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.45 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.11 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.60 (2H, s), 4.24-4.20 (2H, m), 3.94-3.90 (2H, m), 3.77-3.73 (2H, m), 3.62-3.58 (2H, m), 3.41 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 158.3, 156.5, 151.3, 150.1, 143.8, 143.8, 139.9, 121.9, 121.5, 113.5, 107.2, 96.4, 71.7, 70.6, 69.5, 67.7, 58.9, 30.3 ppm.

[0064] **화합물 11**

[0065] 화합물 **5** (0.12 g, 0.49 mmol) 및 **10** (0.20 g, 0.49 mmol)을 함유하는 혼합물, 또한 DMF (3 mL) 중의 K_2CO_3 (0.34 g, 2.5 mmol)를 Ar 분위기, 100 ℃에서 8 시간 동안 교반하였다. 결과물인 혼합물을 여과하고, 여과물을 진공 중에서 농축하였다. 조생성물을 헥산/EtOAc (1:1)을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼에 의해서 정제하였다. 수율: 1.22 g (78%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.05 (2H, m), 7.53 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.50 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.43 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.42 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.15 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.80 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.26-4.22 (2H, m), 4.16 (2H, q, *J* = 7.1 Hz), 3.95-3.91 (2H, m), 3.81-3.75 (4H, m), 3.63-3.60 (2H, m), 3.42 (3H, s), 3.05 (3H, s), 2.63 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 1.27 (3H, t, *J* = 7.1 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 172.0, 158.2, 157.8, 156.5, 152.1, 150.5, 148.2, 143.0, 142.0, 140.1, 140.0, 121.9, 121.8, 118.6,

113.3, 110.5, 107.2, 106.9, 106.2, 96.6, 94.4, 71.9, 70.7, 69.6, 67.8, 60.6, 59.0, 48.9, 38.7, 31.8, 14.1 ppm.

[0066] **화합물 12**

[0067] 화합물 **11** (0.10 g, 0.18 mmol)을 EtOH/THF/H_2O (1:1:1) 중의 KOH 용액에 첨가하고, 6 시간 동안 교반하였다. 부피가 절반이 될 때까지 용액을 증발시켰다. 희석 HCl (*aq*)을 상기 용액에 서서히 첨가하여 pH 3-4가 되게 하였다. 산물은 오렌지색 고체로서 침전되었다. 산물을 수집하고, 증류수로 세척한 다음, CH_2Cl_2/MeOH (20:1)을 용리액으로 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 수율: 42 mg (44%); ^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6): δ 8.95-8.92 (2H, m), 7.53 (1H, s), 7.50 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.46 (1H, s), 7.41 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.20 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.81 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.72 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.09-4.05 (2H, m), 3.70-3.66 (2H, m), 3.58 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 3.53-3.50 (2H, m), 3.40-3.37 (2H, m), 3.17 (3H, s), 2.87 (3H, s), 2.44-2.40 (2H, m). ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): δ 174.0, 158.7, 158.1, 156.8, 152.3, 150.5, 149.1, 143.2, 142.2, 140.7, 140.4, 122.9, 122.1, 118.4, 114.0, 111.3, 108.1, 107.3, 97.2, 94.5, 72.0, 70.4, 69.5, 68.4, 58.8, 49.0, 39.0, 32.0 ppm.

[0068] **PLT-yellow.**

[0069] CH_2Cl_2 (3 mL) 중에 화합물 **12** (50 mg, 0.094 mmol), 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드.HCl (27 mg, 1.4 mmol), 및 4-디메틸아미노피리딘 (1.1 mg, 9.4 μmol)을 함유하는 혼합물을 20 분 동안 교반하였다. 12 mg의 3-(디메틸아미노)-1-프로필아민 (0.11 mmol)을 상기 혼합물에 첨가하고 N_2 분위기에서 12 시간 동안 교반하였다. 결과물인 혼합물을 CH_2Cl_2로 추출하고, $MgSO_4$ 상에서 건조하였다. 용매를 진공 중에서 제거하였다. 산물을 CH_2Cl_2/MeOH (10:1)을 용리액으로 사용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해서 정제하였다. 수율: 31 mg (58%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.04-9.01 (2H, m), 7.53 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.49 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.43 (1H, s), 7.42 (1H, s), 7.16-7.12 (2H, m), 6.96 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.81 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.25-4.21 (2H, m), 3.95-3.91 (2H, m), 3.82-3.77 (4H, m), 3.63-3.59 (2H, m), 3.42 (3H, s), 3.37-3.31 (2H, m), 3.05 (3H, s), 2.46 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.31 (2H, t, *J* = 7.1 Hz), 2.18 (6H, s), 1.66-1.62 (2H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 171.0, 152.3, 157.9, 156.6, 152.1, 150.4, 148.3, 143.0, 142.1, 140.3, 140.0, 122.0, 121.8, 118.5, 113.4, 110.6, 107.9, 107.0, 106.2, 96.7, 94.2, 71.9, 70.8, 69.6, 67.9, 59.1, 58.6, 49.7, 45.3, 39.5, 39.0, 34.0, 25.9 ppm; HRMS(FAB$^+$): m/z calcd. for [$C_{34}H_{41}N_5O_6$+H$^+$]: 616.3130, found : 616.3129.

[0070] **PMT-yellow**

[0071] PLT-yellow에 대해서 서술된 바와 같은 동일한 과정을 사용하여 화합물 **12** 및 (2-아미노에틸)트리페닐포스포늄 브로마이드로부터 PMT-yellow를 합성하였다. 수율: 55 mg (65%); ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 8.99 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 8.97 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.80-7.64 (16H, m), 7.52 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.41 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.35 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (1H, d, *J* = 0.7 Hz), 7.13 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.95 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 6.92 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.85 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz), 4.24-4.20 (2H, m), 3.94-3.90 (2H, m), 3.77-3.69 (4H, m), 3.66-3.58 (4H, m), 3.54-3.47 (2H, m), 3.41 (3H, s), 3.07 (3H, s), 2.51 (2H, t, *J* = 7.1 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 172.3, 158.2, 157.8, 156.5, 152.1, 150.1, 148.9, 143.0, 141.9, 140.1, 139.9, 135.1, 133.4, 133.3, 130.5, 130.4, 121.9, 121.8, 118.0, 117.9, 117.1, 113.4, 110.8, 107.0, 96.6, 94.1, 71.8, 70.6, 69.6, 67.8, 59.0, 49.2, 38.2, 33.7, 33.0, 22.5 ppm; HRMS(FAB$^+$): m/z calcd. for [$C_{49}H_{48}N_4O_6P^+$]: 819.3306, found : 819.3306.₩

[0072] 스펙트럼 측정

[0073] Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 스펙트로미터 상에서 흡수 스펙트럼을 기록하였다; 형광 스펙트럼은 1-cm 표준 석영 셀을 구비한 Aminco-Bowman 시리즈 2 발광 스펙트로미터를 사용하여 측정하였다. 쿠마린 307 및

로다민 B를 참조물질로서 사용하여, 종래 연구에서 서술된 방법으로 (A. Aditya,T. Kodadek, *ACS Comb. Sci.* **2012**, *14*, 164-169) 형광 양자 수율을 측정하였다. 다양한 조건들 하에서 얻어진 스펙트럼 데이터들을 도 8 및 하기 표 1에 도시하였다.

표 1

[0074]

Solvent (E_T^N)[a]	BMT-blue			PMT-yellow			PLT-yellow		
	λ_{max}^{abs}[b]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]	λ_{max}^{abs}[a]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]	λ_{max}^{abs}[a]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]
Cell	-/458	-	-	-/562	-	-	-/572	-	-
1,4-dioxane (0.164)	359/432	0.26	22	453/555	0.58	483	446/534	0.84	427
EtOH (0.654)	353/445	1.00	18	446/-	-	-	448/-	-	-
EtOH/H_2O (2:1)	355/455	1.00	28	-	-	-	-	-	-
Dioxane/H_2O (180:1)	-	-	-	451/564	0.43	444	-	-	-
Dioxane/H_2O (20:1)	-	-	-	-	-	-	447/572	0.21	483
buffer (1.000)[e]	355/469	0.85	15	444/-	-	-	440/-	-	-

[0075] [a] 괄호 안의 숫자들은 용매 극성에 대한 정규화된 실험적 패러미터들이다 (C. Reichardt, *Chem. Rev.* **1994**, *94*, 2319).

[0076] [b] nm로 표시한 일광자 흡광 및 발광 스펙트럼의 λ_{max}.

[0077] [c] 형광 양자 수율. 불확실성은 ㅁ 15%로 세팅됨.

[0078] [d] 10^{-50} cm^4 s/광자 (GM)에서 이광자 단면. 불확실성은 ㅁ 15%로 세팅됨.

[0079] [e] 범용 완충용액 (0.1 M 시트르산, 0.1 M KH_2PO_4, 0.1 M $Na_2B_4O_7$, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl), 물에 대한 E_T^N 수치. BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow에 대한 몰 소멸 계수 (ε)는 각각 18200, 24800, 및 22800 $cm^{-1}M^{-1}$.

[0080] 수용성

[0081] 소량의 염료를 디메틸 설폭사이드 (DMSO)에 용해시킴으로써 스톡 용액 (1.0 ㅅ 10^{-3} M)을 제조하였다. 상기 용액을 (6.0 ㅅ 10^{-3} ~ 6.0 ㅅ 10^{-5}) M로 희석하고, 마이크로 주사기를 사용하여 3.0 mL H_2O를 함유하는 큐베트에 첨가하였다. 모든 경우에 H_2O 중의 DMSO 농도는 0.2%로 유지하였다. 형광 강도는 염료의 농도가 낮은 경우에는 선형으로 관찰되었으며, 염료의 농도가 높아짐에 따라서 하향 곡선을 나타내었다 (도 9). PLT-yellow 및 PMT-yellow의 용해도는 전술한 바와 동일한 방법으로 흡광도를 측정함으로써 계산하였다. 두 경우 모두에 있어서, 선형 영역 중 최대 농도를 용해도로 간주하였다.

[0082] 이광자 단면의 측정

[0083] 이광자 단면 (δ)은 종래 보고된 펨토초 (fs) 형광 측정 기술을 사용하여 측정하였다 (S. K. Lee, W. J. Yang, J. J. Choi, C. H. Kim, S. J. Jeon, B. R. Cho, *Org. Lett.* **2005**, *7*, 323-326). BMT-blue, BLT-blue, FMT-green, PMT-yellow, 및 PLT-yellow (3.0 ㅅ 10^{-6} M)를 각각 EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (4/1), 디옥산/H_2O (180/1), 및 디옥산/H_2O (20/1) 중에 용해시켰다. 이광자 유도된 형광 강도는 로다민 6G를 사용함으로써 740-940 nm에서 측정하였는 바, 로다민 6G의 이광자 특성은 이미 기존의 연구들에서 잘 특성화되어 있다 (H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2009**, 153-164). 참조 물질 및 샘플에 의해서 방출되는 이광자 유도된 형광 스펙트럼의 강도들 (동일한 여기 파장)을 측정하였다. TPA 단면은 식 $\delta = \delta_r(S_s\Phi_r\phi_r C_r)/(S_r\Phi_s\phi_s C_s)$를

사용하여 계산하였는 바: 여기에서 첨자 s 및 r은 샘플 및 참조 분자를 나타내고, S는 CCD 검출기에 의해서 얻어진 신호의 강도를 나타내며, Φ는 형광 양자 수율을, ϕ는 실험 장치의 전반적인 형광 수집 효율을, c는 용액 중 분자들의 수 밀도를, δ_r은 참조 분자의 TPA 단면을 나타낸다.

[0084] 유효 TP 작용 ($\Phi\delta_{eff}$)은 각 세포기관의 TPEF 강도들을, TPM 셋업 중 델타 T-디쉬 내의 MeOH (5.0 mM, 1.0 mL) 중 로다민 6G의 TPEF 강도와 비교함으로써 측정하였다. 도 10a 내지 10e에는 각각 1 μM의 BMT-blue, BLT-blue, PMT-yellow, PLT-yellow, 및 FMT-green으로 공동-표지된 HeLa 세포들의 TPM 영상들을 도시하였으며, 밝은 도메인들 중 관심 대상이 되는 5개 선택된 영역들 (ROI)에서 측정된 TPEF 강도들의 평균 수치를 이러한 계산에 사용하였다. $\Phi\delta_{eff}$ 수치는 식 $\Phi\delta_{eff} = \Phi\delta_{ref}(I_{probe}/I_{ref})$를 사용하여 계산하였는 바, 여기에서 $\Phi\delta_{ref}$는 메탄올 중 로다민 6G의 $\Phi\delta$ 수치를, I_{probe}, 및 I_{ref}는 각각 세포 기관 중 프로브의 TPEF 강도와 메탄올 중 로다민 6G의 TPEF 강도를 나타낸다.

[0085] 검출 윈도우

[0086] 프로브들의 검출 윈도우는 발광 밴드가 잘 분리되고 비교 대상이 되는 두 가지 프로브들로부터의 발광 강도들이 거의 동일하게 되도록 확인되었다. 프로브-표지된 세포들을 사용한 공동-영역화 실험들을 위한 발광 강도들은 각각 400-450 nm (Ch1, BMT-blue, BLT-blue, 및 LTB), 475-525 nm (MTG), 550-650 nm (Ch2, PLT-yellow, PMT-yellow, 및 FMT-green,), 및 600-700 nm (MTR)였다 (도 11).

[0087] 세포 생존도

[0088] 배양된 HeLa 세포들의 생존도에 대한 프로브의 가능한 효과를 CCK-8 키트 (Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)를 사용하여 제조사 프로토콜에 따라서 측정하였으며, 그 결과를 도 12에 도시하였다.

[0089] 광안정성

[0090] BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow 프로브들의 광안정성을, 시간에 따른 TPEF 강도 변화를 모니터링함으로써 측정하였는 바, 이러한 측정은 아무런 편견 없이 프로브로 표지된 (1 mM) HeLa 세포들에서 정해진 3개의 위치들에서 수행하였다. 모든 경우에서, TPEF 강도는 1 시간 동안 변하지 않고 유지되었는 바, 이는 프로브들이 높은 광안정성을 보유한다는 점을 나타낸다 (도 13).

[0091] pH 의존성

[0092] BMT-blue, PMT-yellow, 및 PLT-yellow의 형광 강도를 EtOH/범용 완충 용액 (0.1 M 시트르산, 0.1 M KH_2PO_4, 0.1 M $Na_2B_4O_7$, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl) 중에서, pH 조건을 변화시켜가면서 측정하였다. 모든 프로브들은 pH 범위 4.0-9.0에 걸쳐서 pH 비민감성인 것으로 관측되었다 (도 14).

[0093] 세포 배양

[0094] HeLa 인간 자궁암 세포 (ATCC, Manassas, VA, USA)를, 10% 우태아 혈청 (FBS; WelGene), 페니실린 (100 U/mL) 및 스트렙토마이신 (100 ug/mL)으로 보충된 Dulbecco's modified Eagle's 배지 (DMEM; WelGene Inc, Seoul, Korea) 중에서 배양하였다. 모든 세포들은 37 ℃에서, 5/95 (v/v) CO_2/공기로 이루어진 습윤 대기 중에서 보관하였다. 세포들을 영상화 2일 전에 유리 바닥 접시 (MatTek Corp., Ashland, MA, USA) 상에 통과 및 플레이팅하였다. 표지 실험을 위해서, 성장 배지를 제거하고, FBS가 없는 DMEM으로 대체하였다. 세포들을 1 μM BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow와 함께 37 ℃에서 20 분 동안 배양하고, FBS가 없는 DMEM으로 3회 세척하였다.

[0095] 래트 해마 및 시상하부 박편의 제조 및 염색

[0096] 2 일된 래트 (SD)의 해마 및 시상하부로부터 박편들을 제조하였다. 진동-블레이드 마이크로톰을 사용하여 관상 박편들 (coronal slices)을 400 ㎛ 두께의 박편들로 잘랐으며, 인공 뇌척수액 (ACSF; 138.6 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 21 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4, 9.9 mM D-글루코오스, 1 mM $CaCl_2$, 및 3 mM $MgCl_2$) 중에 보관하였다. 박편들을, 95% O_2 및 5% CO_2로 기포를 발생시키는 ACSF 중의 20 mM ACCu2로, 37 ℃에서, 30 분 동안 배양하였다. 이어서, 박편들을 ACSF로 3회 세척하고, 유리-바닥 접시 (MatTek Corp.)로 옮겼다. 박편들을 스펙트럼 공초점 다광자 현미경 하에서 관찰하였다.

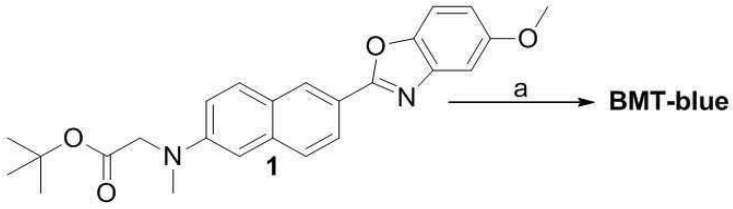
[0097] 이광자 형광 현미경

[0098] 프로브로 표지된 HeLa 세포들 및 조직들의 이광자 형광 현미경 영상들을 스펙트럼 공초점 및 다광자 현미경을 사용하여 얻었으며 (Leica TCS SP2; Leica Camera, Solms, Germany), 이는 1.30의 수치 천공 (numerical aperture, NA)을 갖는 100㎛ 오일 대상, 및 0.50의 NA를 갖는 20㎛ 건조 대상을 사용하였다. 이광자 형광 현미경 영상들은 DM IRE2 현미경 (Leica Camera)을 사용하여 얻었으며, 이는 모드-고정된 티타늄-사파이어 레이저 광원을 사용하여 프로브들을 여기시키고 (Chameleon, 90 MHz, 200 fs; Coherent Inc., Santa Clara, CA, USA), 이때 광원은 각각 750 nm의 파장 및 1305 mW의 출력에 세팅되는 바, 이는 초점면에서 6.26 ㎛ 10^8 mW/cm^2 (㎛ 20) 및 3.80 ㎛ 10^9 mW/cm^2 (㎛100)의 출력에 해당되는 것이다. 영상들은 400-450 nm (채널 2) 및 550-650 nm (채널 2) 범위에서, 내부 PMTs를 사용하여, 400 Hz의 스캔 속도로, 8-비트 미표시된 512 ㎛ 512 픽셀 포맷으로 신호를 수집함으로써 얻었다.

[0099] **결과 검토**

[0100] BMT-blue는 화합물 1을 가수분해시키고, 2-(아미노에틸)트리페닐포스포늄 이온과 커플링시킴으로써 73%의 수율로 합성하였다 (반응식 1).

[0101] <반응식 1>

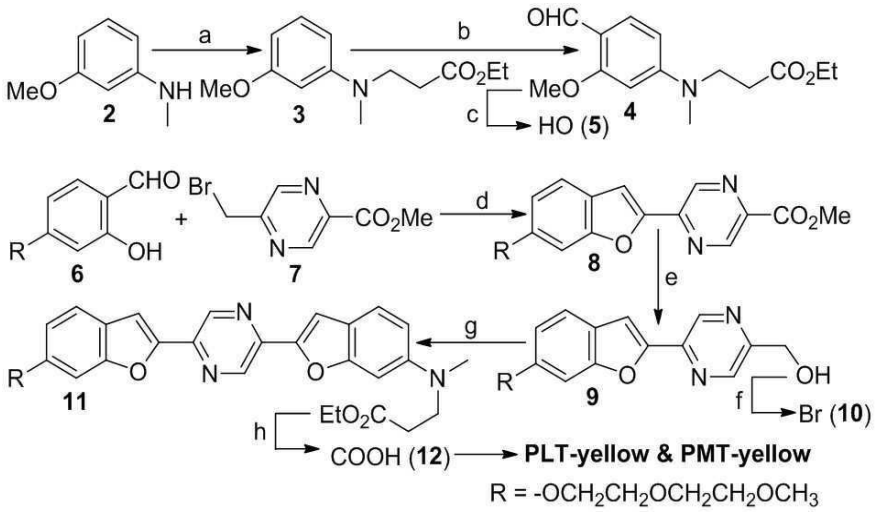


[0102]

[0103] a) i) TFA, CH_2Cl_2, rt; ii) $H_2NCH_2CH_2PPh_3^+Br^-$, EDCI, DMAP, CH_2Cl_2, rt.

[0104] PMT-yellow 및 PLT-yellow의 합성은 하기 반응식 2에 요약하였다. 화합물 3은 화합물 2를 에틸 아크릴레이트와 반응시킴으로써 정량적으로 제조하였다. 화합물 3을 제조한 다음, 디메틸화반응에 의해서 화합물 5를 전체 수율 49%로 제조하였다. 화합물 6을 화합물 7과 반응시킴으로써 화합물 8을 78%의 수율로 제조하였다. 화합물 8을 환원시키고, 브롬화시킴으로써, 화합물 10을 전체 수율 42%로 제조하였다. 화합물 11은 화합물 5와 화합물 10 사이의 반응의 결과로서 78%의 수율로 제조하였다. 화합물 11을 가수분해하여 화합물 12를 78%의 수율로 제조하였다. PLT-yellow 및 PMT-yellow는, 화합물 12를 각각 3-(디메틸아미노)-1-프로필아민 및 (2-아미노아텔)트리페닐포스포늄 브로마이드와 반응시킴으로써, 각각 58% 및 65%의 수율로 제조하였다.

[0105] <반응식 2>



[0106]

[0107] a) CH_2=$CHCO_2Et$, $(CF_3)_2CHOH$, 60◎; b) $POCl_3$, DMF; c) $AlCl_3$, CH_2Cl_2, reflux; d) K_2CO_3, DMF, 100◎; e) $NaBH_4$,

THF-MeOH, reflux; f) DDQ, PPh_3, $Bu_4N^+Br^-$, CH_2Cl_2, rt; g) **5**, K_2CO_3, DMF, 100◎; h) KOH, EtOH/THF/H_2O (1:1:1), rt; i) $H_2N(CH_2)_3NMe_2$ or $H_2NCH_2CH_2PPh_3^+Br^-$, EDCI, DMAP, CH_2Cl_2, rt.

[0108] 스펙트럼 특성

[0109] BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow는 각각 물에서 수행된 스펙트럼 연구 결과, 몰 흡광 계수 (ε)가 각각 18200, 24800, 및 22800 $cm^{-1}M^{-1}$로서, 355, 440, 및 444 nm의 최대 흡광도 (λ_{max})를 나타내었다.

표 2

[0110]

Solvent (E_T^N)[a]	BMT-blue			PMT-yellow			PLT-yellow		
	λ_{max}^{abs}[b]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]	λ_{max}^{abs}[a]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]	λ_{max}^{abs}[a]/λ_{max}^{fl}[b]	Φ[c]	δ_{max}[d]
Cell	-/458	-	-	-/562	-	-	-/572	-	-
1,4-dioxane (0.164)	359/432	0.26	22	453/555	0.58	483	446/534	0.84	427
EtOH (0.654)	353/445	1.00	18	446/-	-	-	448/-	-	-
EtOH/H_2O (2:1)	355/455	1.00	28	-	-	-	-	-	-
Dioxane/H_2O (180:1)	-	-	-	451/564	0.43	444	-	-	-
Dioxane/H_2O (20:1)	-	-	-	-	-	-	447/572	0.21	483
buffer (1.000)[e]	355/469	0.85	15	444/-	-	-	440/-	-	-

[0111] BMT-blue는 형광 양자 수율 (Φ) 0.85로서, 469 nm에서 강한 형광을 발광하였다. 반면에, PLT-yellow 및 PMT-yellow에 의해서 발광되는 형광은 발광 최대값을 정확히 측정하기에는 너무 약했다 (λ_{fl}). 물에서 BMT-blue의 용해도는, 형광 방법에 의해서 측정한 결과 (H. M. Kim, H. J. Choo, S. Y. Jung, Y. G. Ko, W. H. Park, S. J. Jeon, C. H. Kim, T. Joo, B. R. Cho, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 553-559), 10 ㎛ 였다 (도 9). PLT-yellow 및 PMT-yellow의 용해도는 해당 화합물들이 물에서 거의 형광을 나타내지 않는 바, 흡광법을 사용하여 측정하였다. PLT-yellow 및 PMT-yellow의 수용해도는 12 ㎛ 보다 컸다. 따라서, 모든 개발된 프로브들이 세포를 염색하기에 충분한 수용해도를 나타내었다. 흡광법에 의해서 측정된 용해도 데이터는 형광법을 사용하여 측정한 값들에 비해서 약간 더 큰 것으로 관측되었는 바, 이는 응집 소광의 가시도가 발광 스펙트럼에서 더 크기 때문이다.

[0112] BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow는 1,4-디옥산 매질에서 각각 359, 446, 및 453 nm의 λ_{max} 및 432, 534, 및 555 nm의 λ_{fl}을 나타내었으며 (표 2), 이러한 매질 중에서 모든 프로브들이 강한 형광을 발광하였다. PLT-yellow 및 PMT-yellow에 대해서 더 큰 스토크스 시프트 (Stokes shifts)가 관찰된다는 사실은, 공여체 및 수용체 사이에서 더욱 효율적인 분자내 전하 수송 (intramolecular charge transfer, ICT)이 이루어진다는 것을 의미한다. 더 나아가, 모든 프로브들은 극성 용매들에서 λ_{fl}이 점진적인 적색 편이를 나타내었다. 이 역시, PLT-yellow 및 PMT-yellow에서 그 효과가 크고 뚜렷하였다 (도 8 및 표 2). 이러한 프로브들에 대해서 관찰되는 더 큰 변색 효과 (solvatochromic effects)는 향상된 ICT에 대한 추가적인 근거이다.

[0113] BLT-blue, BMT-blue, FMT-green, PLT-yellow, 및 PMT-yellow로 표지된 HeLa 세포들은, 스캐닝 람다 모드에서 750 nm TP 여기 파장이 사용되는 경우, 각각 458, 458, 535, 572, 및 562 nm의 λ_{fl} 값을 나타내었다 (도 1). 상기 수치들은 EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (2/1), EtOH/H_2O (4/1), 1,4-디옥산/H_2O (20/1), 및 1,4-디옥산/H_2O (180/1) (도 8)에서 측정된 값들과 유사하였으며, 이는 이러한 혼합 용매들이 그 소포 환경의 극성을 적절히 나타낸다는 것을 의미한다.

[0114] 이광자 밝기

[0115] 로다민-6G (메탄올 중)를 참조 물질로 사용하여 (N. S. Makarov, M. Drobizhev, A. Rebane, *Opt. Express* **2008**, *6*, 4029-4047), 형광법 (S. K. Lee, W. J. Yang, J. J. Choi, C. H. Kim, S. J. Jeon, B. R. Cho, *Org.*

Lett. **2005**, *7*, 323-326)에 의해서 TP 단면 (δ_{max})을 측정하였다. BLT-blue, BMT-blue, PLT-yellow, PMT-yellow, 및 FMT-green (모델 용매 중에서 측정)의 δ_{max} 값들은 각각 21, 28, 483, 445, 및 45 GM이었다 (도 2a 및 표 1). 다른 프로브들에 비해서 PLT-yellow 및 PMT-yellow가 더 큰 δ_{max} 값을 나타내는 것은 향상된 ICT 때문일 것이다 (H. M. Kim, B. R. Cho, *Chem. Commun.* **2009**, 153-164).

[0116] 비록 TP 활성 단면 값 ($\Phi\delta_{max}$)이 용액 중 TP 밝기에 대한 좋은 척도이지만, 프로브들 사이의 염색 정도의 차이로 인해서 이는 세포 환경에 적용될 수 없다. 프로브-표지된 세포들에서 세포기관으로부터 방출되는 TPEF 강도를 측정함으로써 세포들에서 TP 밝기에 대한 정량적 측정값들을 제시할 수 있다. 밝은 도메인 중에 5개 관심 영역들에서 측정된 TPEF 강도들의 평균을 계산에 사용하였다 (도 10). 유효 $\Phi\delta$ ($\Phi\delta_{eff}$) 수치들을, 평균 TPEF 강도들을 동일한 조건 하에서 측정된 메탄올 중 로다민 6G의 강도들과 비교함으로써 계산하였다. HeLa 세포들 중 BLT-blue, BMT-blue, FMT-green, PLT-yellow, 및 PMT-yellow 프로브들의 $\Phi\delta_{eff}$ 수치들은 (본 방법에 의해서 계산) 각각 2120, 1860, 1480, 2110, 및 1950 GM이었다 (도 2b). $\Phi\delta_{max}$와 $\Phi\delta_{eff}$ 수치들을 비교한 결과, 소포체 내부 프로브들의 농도는 10-100 mM인 것으로 측정되었다. 이러한 수치들은 의심할 여지 없이 다소 과대측정된 것이며, 아마도 BLT-blue 및 PLT-yellow에 대해서 더욱 그러한데, 이는 TPEF 강도들이 밝은 지점들로부터 측정된 것이고, 관심대상이 되는 영역들에서 미토콘드리아에 비해서 리소좀이 더 밀집되어 분포하기 때문이다 (도 10 중 큰 점 형태의 원들을 참조). 그럼에도 불구하고, 염색 매체 중에서의 프로브들의 농도에 비해서 각 세포기관 중의 프로브들의 농도가 10-100 배 더 높다는 사실은, 미토콘드리아막 내부에 프로브들이 분포하거나, 또는 리소좀 내부에 가수분해 효소 혼합물이 분포하는 점에 의해서 설명될 수 있는데, 이에 의해서 응집체의 형성 없이 TPEF 발광이 용이해진다. 흥미롭게도, BLT-blue 및 BMT-blue의 $\Phi\delta_{eff}$ 수치들은, 훨씬 더 작은 δ_{max} 수치에도 불구하고, 다른 프로브들의 수치와 유사한 것이었다 (표 1). 이러한 결과는 더 작은 분자 크기 때문일 수 있으며, 이는 염색능을 향상시킴으로써, 소기관 중 프로브의 함량을 증가시키게 된다.

[0117] 검출 윈도우

[0118] 프로브들의 검출 윈도우를 측정함으로써, 비교대상이 되는 두 가지 프로브들로부터의 발광 밴드들 및 유사한 발광 강도들이 잘 분리되는지를 확인하였다. 프로브-표지된 세포들을 사용한 공동-영역화 (co-localization) 실험들을 위해서, 400-450 nm (Ch1, BMT-blue, BLT-blue, 및 LTB), 475-525 nm (MTG), 550-650 nm (Ch2, PLT-yellow, PMT-yellow, 및 FMT-green,), 및 600-700 nm (MTR)의 파장들에서 발광 강도들을 측정하였다 (도 11). 이러한 조건들 하에서, PLT-yellow, PMT-yellow, 및 FMT-green의 TPEF 강도들은 Ch1에서 BLT-blue 및 BMT-blue의 강도들에, 각각 0%, 1%, 및 10% 기여하였으며; BLT-blue 및 BMT-blue의 TPEF 강도들은 Ch2에서 PLT-yellow, PMT-yellow, 및 FMT-green의 강도들에 각각 4%, 4%, 및 6% 기여하였다. 따라서, BMT-blue/PLY-yellow 및 BLT-blue/PMTY-yellow 쌍들의 TPEF는 서로에 대해서 최소한의 간섭도를 나타내며 프로브-표지된 세포들에서 측정될 수 있다.

[0119] 세포독성, 광안정성, 및 pH 의존성

[0120] CCK-8 키트를 사용하여 수행된 분석을 통해서 BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow가 낮은 세포독성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다 (도 12). 또한, BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow로 표지된 HeLa 세포들 상의 주어진 지점에서 TPEF 강도는 fs-펄스로 1 시간 동안 지속적으로 조사한 이후에도 거의 동일하게 유지되었는 바, 이러한 프로브들의 높은 광안정성을 보여준다 (도 13). 더 나아가, EtOH/버퍼 (1/1) 용액 중에서 각 프로브들로부터 측정된 TPEF 강도들은 pH 4-9에서 거의 동일하였다 (도 14). 이러한 결과들은 BMT-blue, PLT-yellow, 및 PMT-yellow가, 세포독성, 광안정성 및 pH로부터 최소한의 간섭을 받으며, TPM을 사용하여 표적 세포기관들을 검출하는데 사용될 수 있다는 것을 의미한다.

[0121] 이중-컬러 영상을 위한 TP 프로브

[0122] 복합된 결과들로부터, BMT-blue/PLT-yellow 또는 BLT-blue/PMT-yellow 프로브 쌍들이 생체 시스템 내에서 TPM에 의해서 미토콘드리아 및 리소좀을 동시에 검출하는데 사용가능하다는 것을 알 수 있는 바, 이는 이러한 쌍들이 세포 중에서, 서로에 대해서 최소한의 간섭으로 검출될 수 있는 강한 TPEF를 발광하기 때문이다. BLT-blue 및 PLT-yellow 프로브들은, 리소좀의 발광 파장에 따라서, 특정 표적들 및 리소좀들에 대한 TP 프로브들을 사용한 공동-영역화 실험들에 사용될 수 있다. BMT-blue 및 PMT-yellow 또한 미토콘드리아에서 해당 실험들을 수행하는데 사용될 수 있다.

[0123] 리소좀에 대한 TP 프로브로서 PLT-yellow의 유용성

[0124] 먼저, 본 실시예에서는 PLT-yellow가 생체 세포 내에서 리소좀들을 검출하는지 여부를 분석하였다. 본 실험을 위해서, HeLa 세포들을, PLT-yellow, 및 리소좀에 대해서 잘 알려진 OP 프로브들인 LTB로 공동표지하였다. 이러한 분석의 결과는, PLT-yellow의 TPM 영상이 LTB의 OPM 영상과 중첩되는 것을 나타내었다 (도 3a-3c). 채널들 사이의 강도 분포를 연관시키는 Pearson's co-localization coefficient (*A*)는, AutoQuant X2 software를 사용하여 계산하였다. LTB에 대한 PLT-yellow의 *A* 수치는 0.87이었다. 더 나아가, PLT-yellow 및 BLT-blue로 공동 표지된 세포들의 TPM 영상들은 거의 완벽한 중첩을 보였는 바, 그 *A* 수치는 0.92였다 (도 3d-f).

[0125] 상기 결과들은 리소좀에 대한 PLT-yellow의 TP 프로브로서의 유용성을 확인해 주는 것이다. 상기 두 가지 TPM 영상들 사이의 공동-영역화 결과는 OPM 및 TPM 영상들 사이의 결과에 비해서 우수한 것을 알 수 있었다. 유사한 결과들이 보고된 바 있으며, 이는 하기 두 가지 요인들에 기인하는 것이다: (i) 상기 두 가지 TPM 영상들은 동일한 x-y 평면 중에서 동시에 얻어진 것임에 반해서, OPM 및 TPM 영상들은 순서대로 얻어진 것이므로, 리소좀의 이동이 가능하였고; (ii) OPM 영상은 세포 깊이 전체에 걸쳐서 리소좀 분포를 나타낸다 (J. H. Son, C. S. Lim, J. H. Han, I. A. Danish, H. M. Kim, B. R. Cho, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 8113-8116). 이러한 결과들은 공동-영역화 실험들에서 두 가지 TP 프로브들을 사용하는 중요성을 강조해준다.

[0126] 미토콘드리아에 대한 TP 프로브로서 BMT-blue 및 PMT-yellow의 유용성

[0127] 이어서, 본 실시예에서는 BMT-yellow 및 PMT-yellow가 생체 세포 내에서 미토콘드리아를 검출하는데 적용될 수 있는지 여부를 평가하였다. BMT-blue, 및 미토콘드리아에 대한 OP 프로브인 MTR (*A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies* (Ed.: R. P. Haugland), Molecular Probes, Eugene, **2005**, 10th ed.)로 공동-표지된 세포들의 TPM 영상은 미토콘드리아에 대한 OPM 영상과 0.79의 *A* 값으로 중첩되었다 (도 4a-c). 더 나아가, BMT-blue 및 FMT-green으로 공동 표지된 세포들의 두 가지 TPM 영상들은 0.91의 *A* 값으로 우수한 중첩도를 나타내었다 (도 4d-f). 유사한 결과가 PMT-yellow, 및 미토콘드리아에 대한 또 다른 OP 프로브인 MTG로 공동 표지된 세포들에 대해서도 관찰되었는 바, 그 *A* 값은 0.75였다 (도 5a-c). 또한, BMT-blue 및 PMT-yellow로 공동 표지된 세포들의 공동-영역화 실험 (TPM에 의해서 검출) 결과, 0.93의 *A* 값으로 거의 완벽한 중첩도를 나타내었다 (도 5d-f). 두 가지 TPM 영상들 사이에서 우수한 공동-영역화가 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과들은 BMT-blue 및 PMT-yellow가 미토콘드리아에 대한 TP 프로브로서 유용하다는 것을 의미한다.

[0128] TPM에 의한 자기소화 (autophagy)의 이중-색상 영상화

[0129] 본 실시예에서는 또한 자기소화의 가시화에 BMT-blue 및 PLT-yellow를 적용할 수 있는지 여부를 평가하였는 바, 자기소화란 영양분 섭취에 반응하여 에너지원의 균형을 조절하는데 중요한 자기-분해 과정이며, 상기 평가는 이중-색상 TPM 영상화에 의해서 수행하였다. 자기소화는 오토파고좀 (autophagosome)을 통해서 진행되는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포질 (미토콘드리아를 포함)의 일부분이, 파고포어 (phagophore) 또는 분리막에 의해서 함입됨으로써 생성된다. 오토파고좀의 외막은 엔도좀과 융합되며, 이어서 리소좀과 융합되어 그 내용물이 분해된다.

[0130] HeLa 세포들을 BMT-blue 및 PLT-yellow로 공동-표지시킴으로써 자기소화를 연구하였는 바; 두 가지 세포기관으로부터 방출되는 TPEF 강도들을 세포 자극 이전 및 이후에 모니터링하였다. 미처리된 세포들의 TPM 영상들은 명백하게 미토콘드리아 (녹색 점들; 도 6a) 및 리소좀들 (적색 점들; 도 6b)을 나타내었다. 이에 더해서, 점선을 따라서 미처리된 세포들로부터 수집된 TPEF 강도들은 부분적인 중첩을 나타내었으며, 그 *A* 수치는 0.25였다 (도 6c, 6d). 자기소화를 유도하는 약학 제제인 6-히드록시도파민 (40 mM)을 처리하는 경우, 400-450 nm에서의 TPEF 강도가 감소한 반면 (BMT-blue), 550-650 nm에서의 TPEF 강도 (PLT-yellow)는 시간 경과에 따라서 증가하였는 바, (도 6e, 6f 및 도 15); 이러한 결과는 자기소화 도중에 리소좀이 활성화되고, 미토콘드리아가 분해되는 결과와 일치하는 것이다. 더 나아가, 점선을 따라서 처리된 세포들로부터 수집된 적색 및 녹색 도메인들의 *A* 수치는, 각각 0, 2, 3 및 4 시간 경과 후에, 0.25로부터 0.31, 0.42, 및 0.67로 증가하였다 (도 6e, 6f 및 도 15). 4시간 경과 후에, 적색 도메인의 TPEF 강도는 녹색 도메인의 강도에 비해서 항상 더 강했다 (도 6f). 이러한 결과는 자기소화 도중에 미토콘드리아의 분해를 수반하는 오토파고좀과 리소좀 사이의 융합과 일치되는 결과이지만, 6-히드록시도파민 자극에 따라서 리소좀 수준이 증가하는 점이 적색 도메인의 TPEF 강도 향상에 일정부분 기여했을 수도 있다. 따라서, BMT-blue 및 PLT-yellow 프로브들은, 단일 여기원을 사용하여 이중-색상 TPM 영상화에 의해서 생체 세포 내에서 자기소화를 모니터링하는데 적용될 수 있다.

[0131] 이중-색상 TPM 영상화에 의한 생체 조직들 내에서 리소좀 및 미토콘드리아의 동시 검출

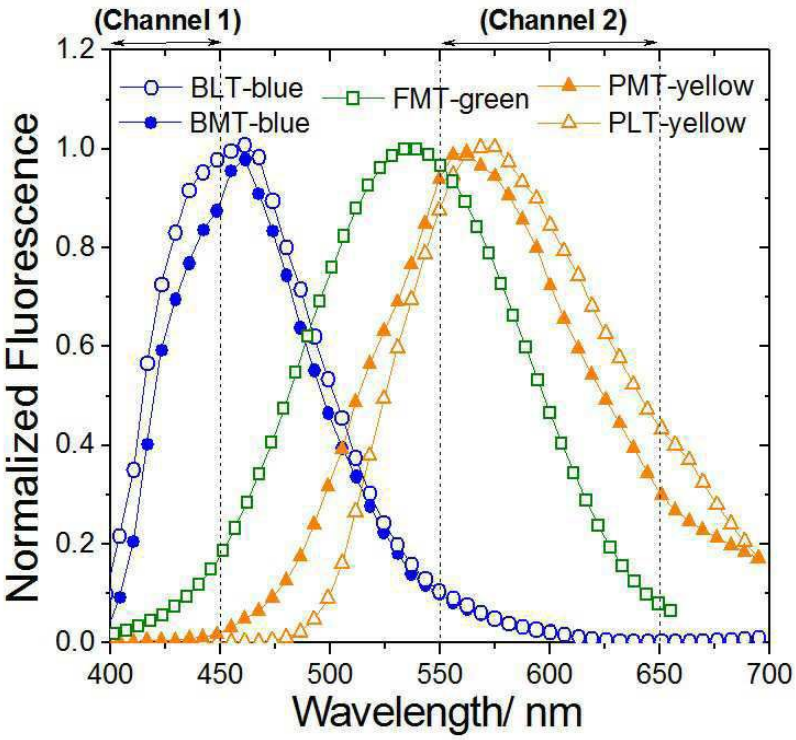
[0132] 조직 영상화에 있어서 BMT-blue 및 PLT-yellow 프로브들의 유용성을 더욱 조사하였다. BMT-blue 및 PLT-yellow (10 mM)로 37 ℃에서 1 시간 동안 배양된 출생 후 2 주된 래트로부터 얻어진 래트 해마 단면의 명-필드 (bright-field) 영상을 통해서 CA3 영역의 존재를 확인하였다 (도 16). 90-165 ㎛의 깊이에서 얻어진 TPM 영상들은 그 전체 깊이에 걸쳐서 x-y 평면을 따라 두 가지 세포기관들이 고르게 분포되는 것을 보여준다 (도 16). 이중-채널 TPM 영상들 및 합쳐진 영상은 리소좀들 및 미토콘드리아가 120 ㎛ 깊이의 동일한 영역에 존재하는 것을 나타내었다 (도 7). 더 나아가, 더 높은 배율로 얻어진 영상들로부터 CA3 영역의 피라미드성 뉴런층에 리소좀들 및 미토콘드리아가 분포되는 것이 명확히 나타났다 (도 7g-i). 이에 더해서, 백색 점선으로 표시된 원들 내부의 두 가지 영상들은 거의 중첩되지 않았는 바, 그 *A* 수치는 0.16이었다 (Figure 7g-i). 이러한 결과들은 BMT-blue 및 PLT-yellow가 TPM을 사용하여 90-165 ㎛ 깊이에서 생체 조직들 중 미토콘드리아 및 리소좀들을 (서로에 대해서 최소의 간섭도로) 검출할 수 있다는 것을 보여준다.

[0133] 결론

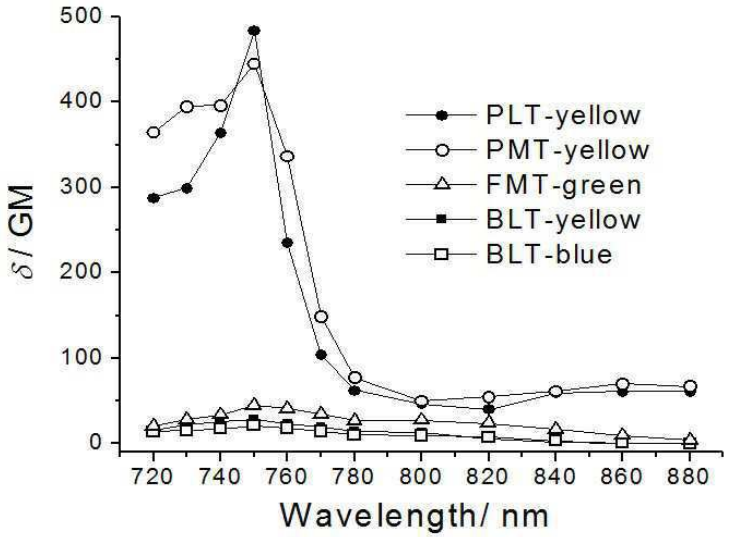
[0134] 종합하면, 본 발명에서는 리소좀들 (PLT-yellow) 및 미토콘드리아 (BMT-blue 및 PMT-yellow)에 대한 새로운 TP 프로브들을 제공하며, 이러한 프로브들은 750 nm fs 레이저 펄스에 의해서 여기될 수 있고, 현저한 TP 활성 단면을 나타내며, 세포 및 조직 내부로 용이하게 로딩이 가능할 뿐만 아니라, 세포 내에서 강한 TPEF를 발산하며, 세포독성 및 pH로부터 최소한의 간섭을 받으며 TPM을 사용하여 장시간 동안 살아있는 세포들 및 조직들 내의 리소좀들 및 미토콘드리아를 가시화할 수 있다. BMT-blue 및 PLT-yellow는 이중-색상 TPM 영상에 의해서 생체 조직 내부 깊은 곳의 리소좀들 및 미토콘드리아를 동시에 가시화하는데 적용될 수 있다. 상기 결과들은 두 가지 쌍의 TP 프로브들, 즉 BLT-blue/PLT-yellow 및 BMT-blue/PMT-yellow가 두 가지 세포기관들 내에서 세포기관들의 모니터링 및 공동-영역화 실험들에 유용하게 사용될 수 있다는 점을 보여준다.

도면

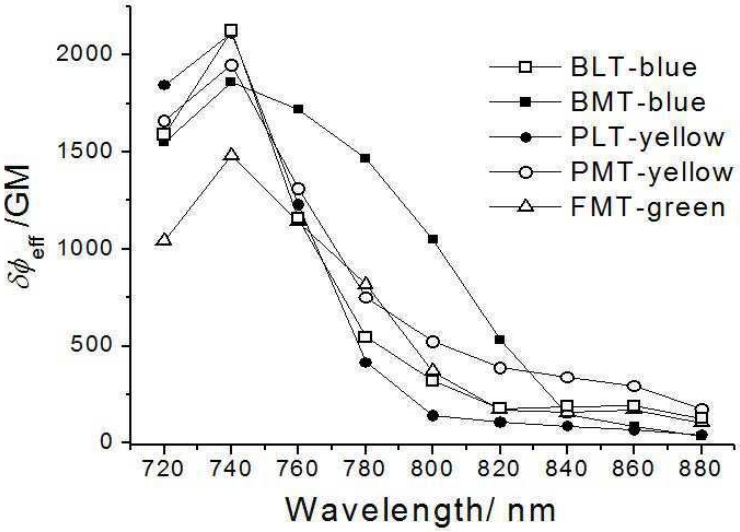
도면1



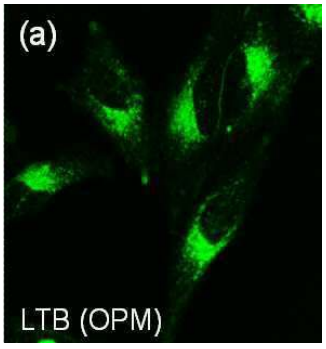
도면2a



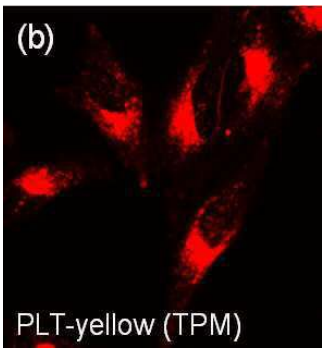
도면2b



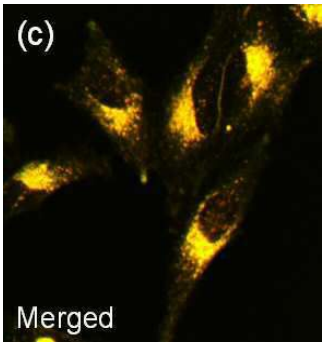
도면3a



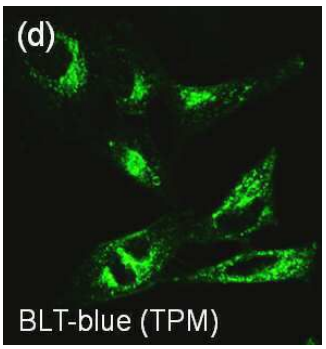
도면3b



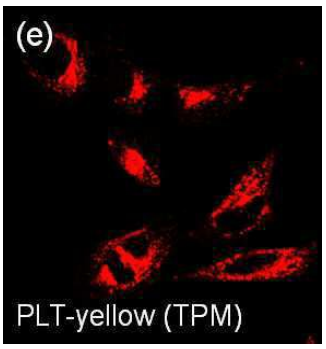
도면3c



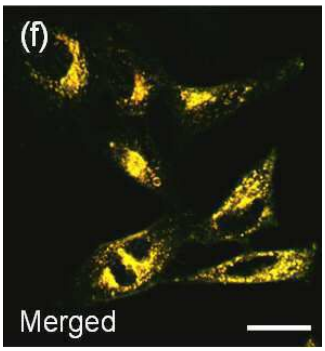
도면3d



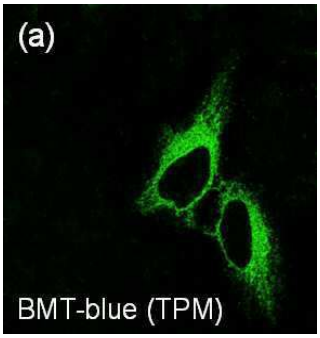
도면3e



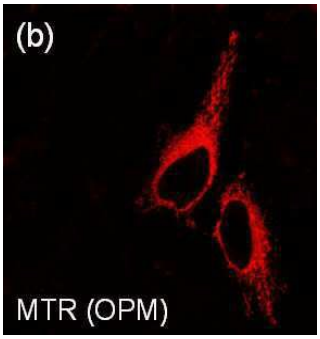
도면3f



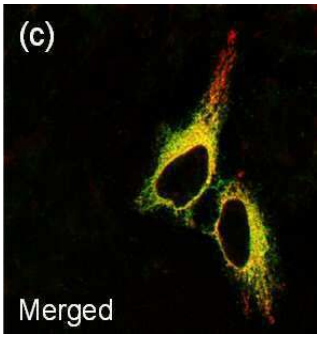
도면4a



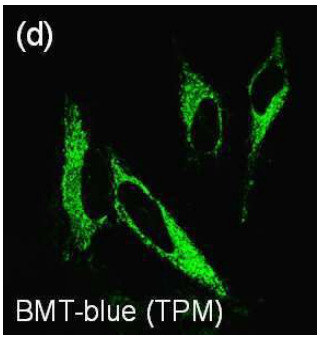
도면4b



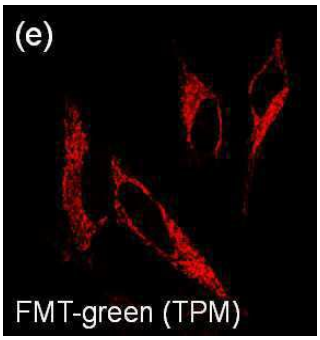
도면4c



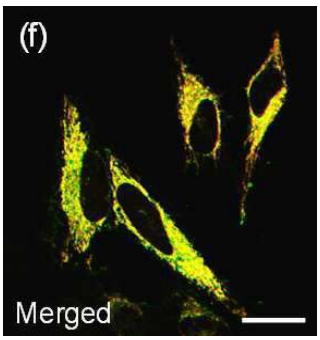
도면4d



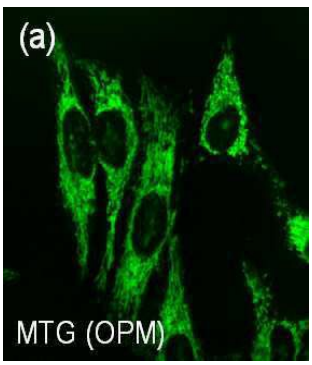
도면4e



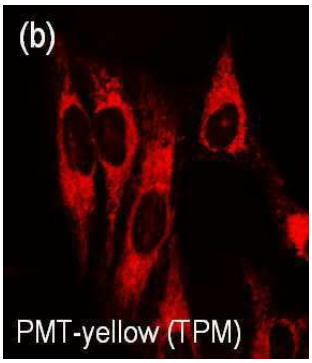
도면4f



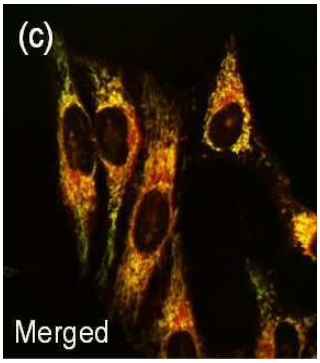
도면5a



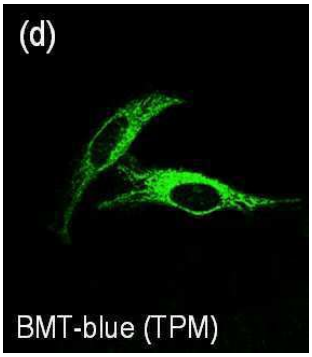
도면5b



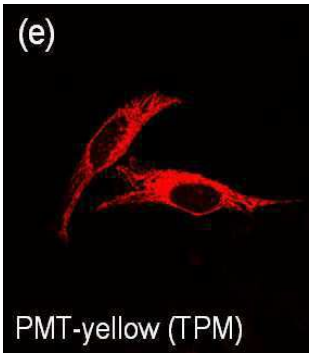
도면5c



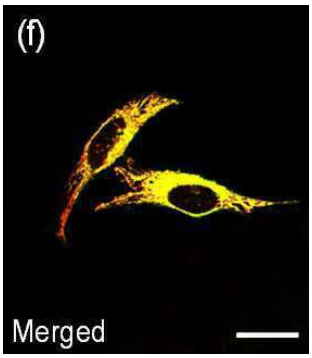
도면5d



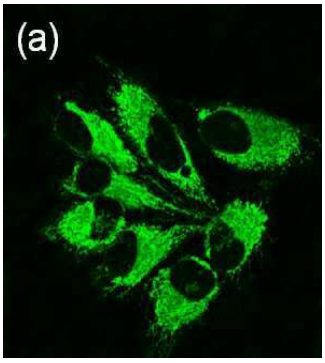
도면5e



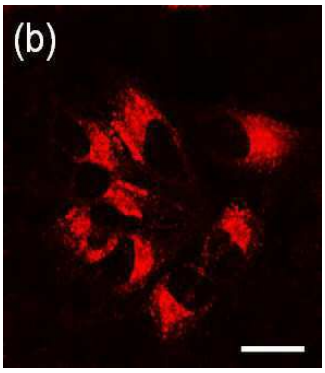
도면5f



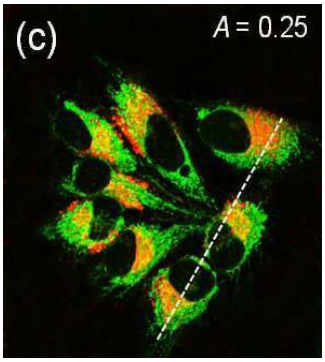
도면6a



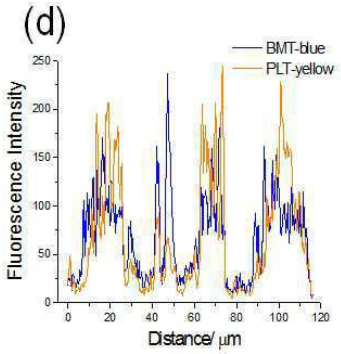
도면6b



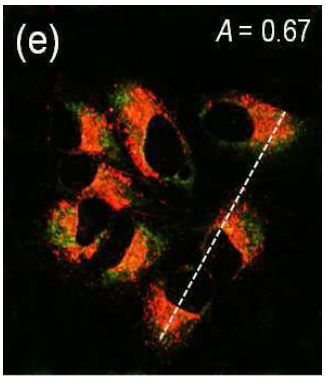
도면6c



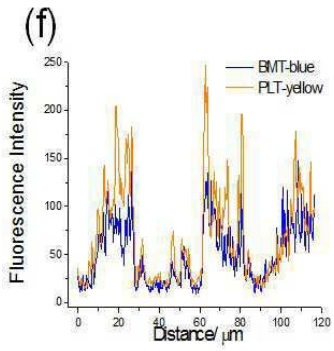
도면6d



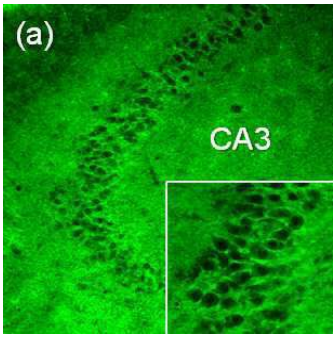
도면6e



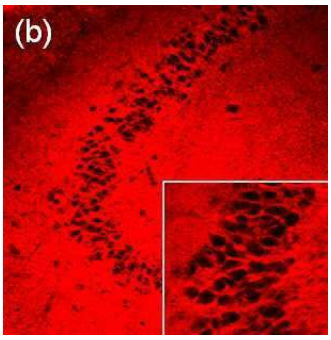
도면6f



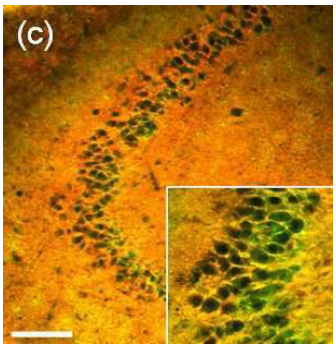
도면7a



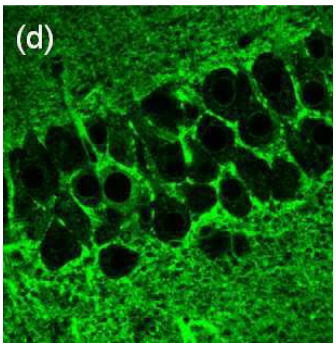
도면7b



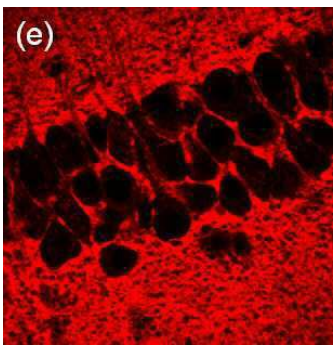
도면7c



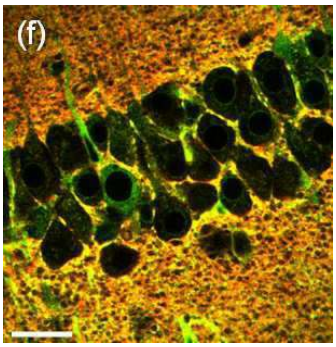
도면7d



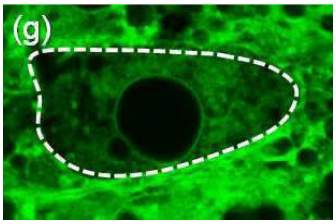
도면7e



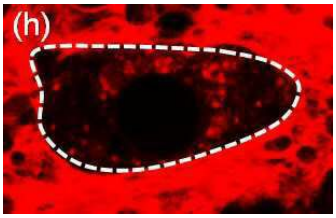
도면7f



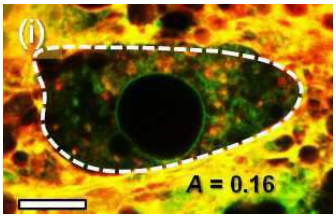
도면7g



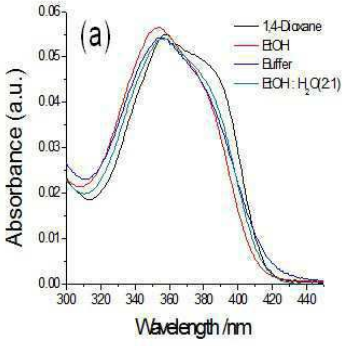
도면7h



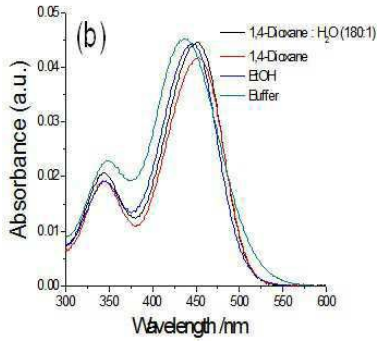
도면7i



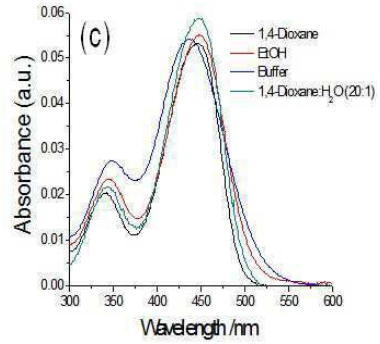
도면8a



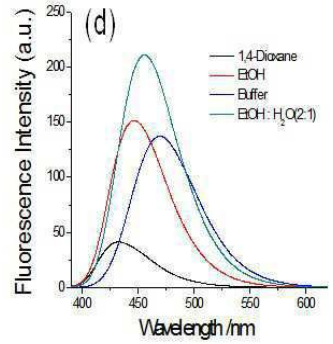
도면8b



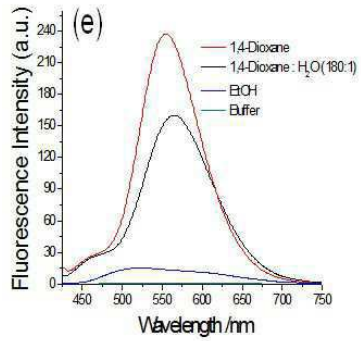
도면8c



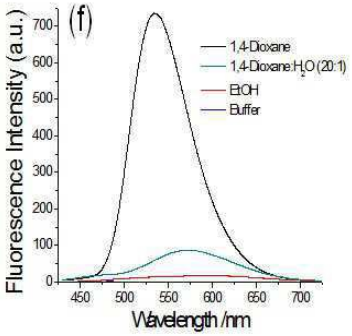
도면8d



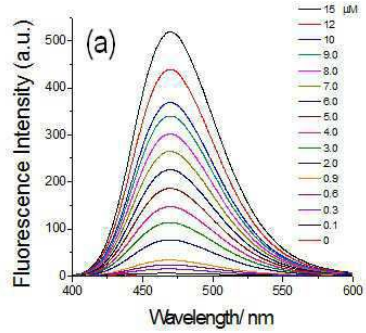
도면8e



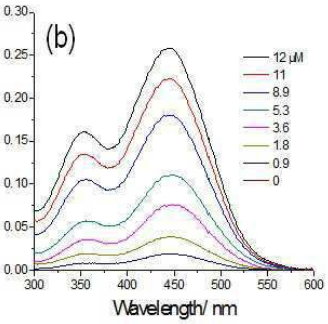
도면8f



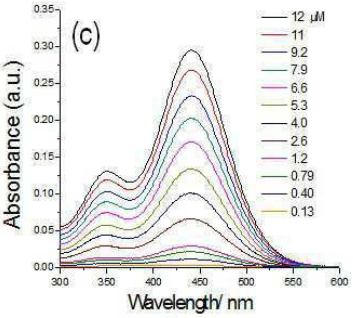
도면9a



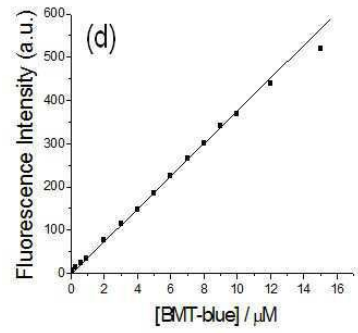
도면9b



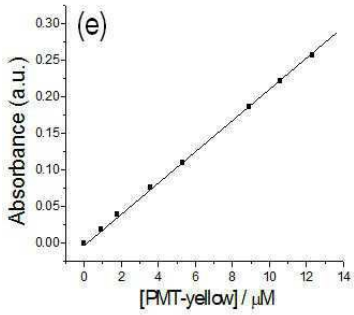
도면9c



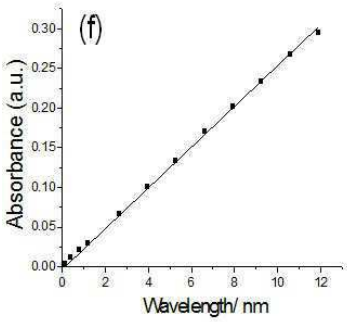
도면9d



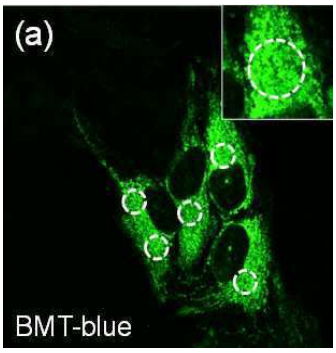
도면9e



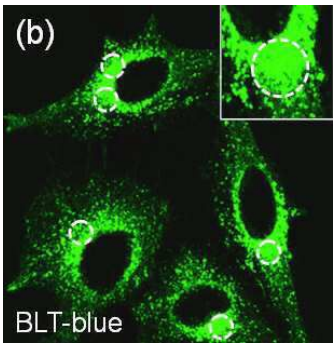
도면9f



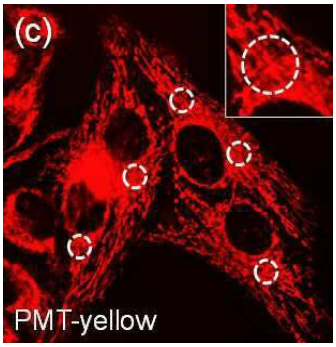
도면10a



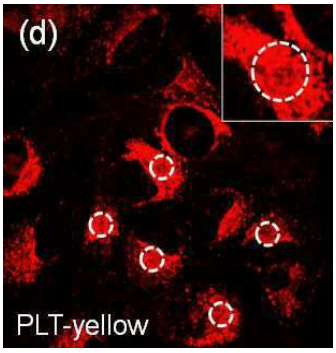
도면10b



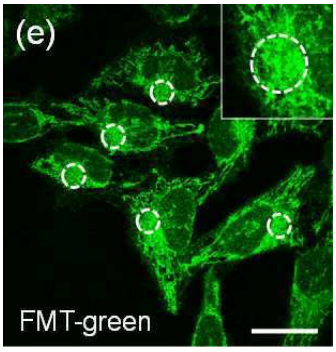
도면10c



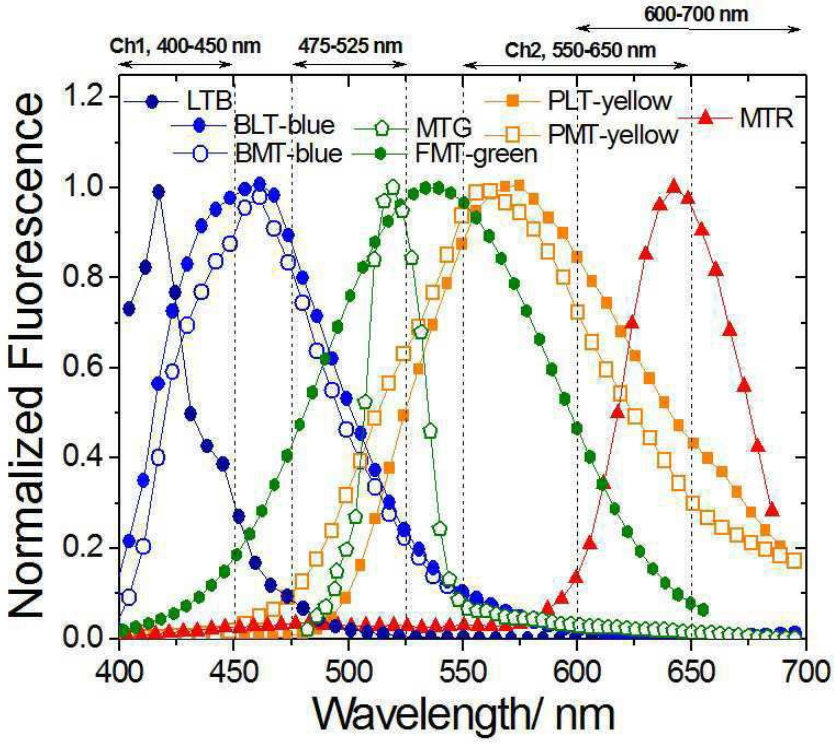
도면10d



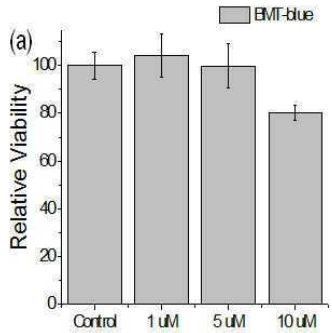
도면10e



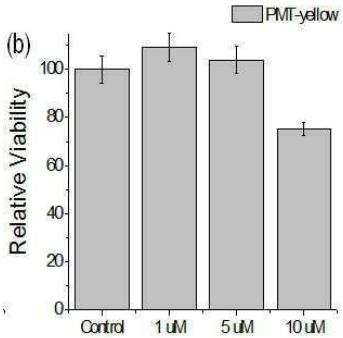
도면11



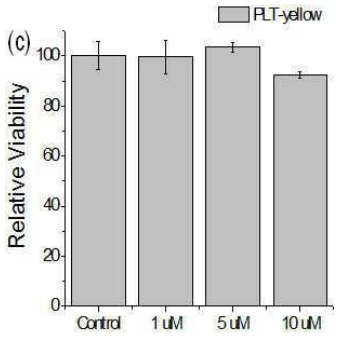
도면12a



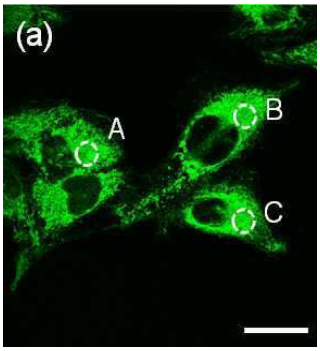
도면12b



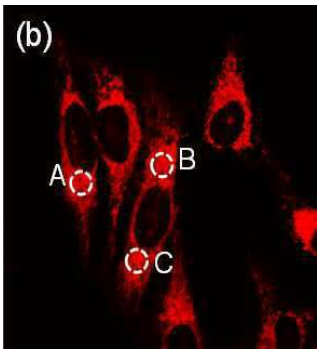
도면12c



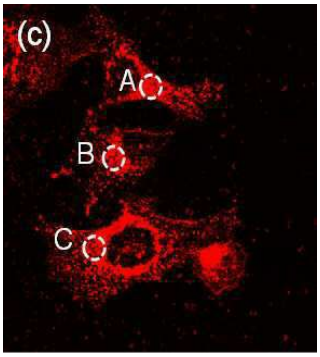
도면13a



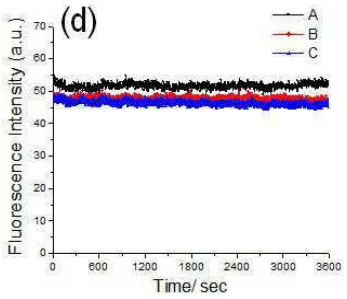
도면13b



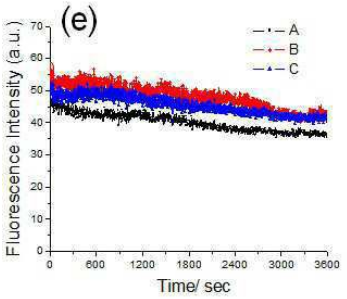
도면13c



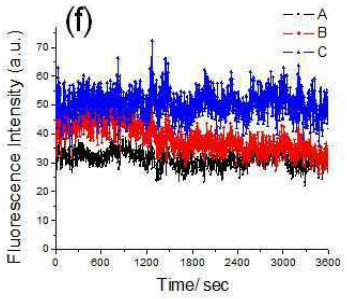
도면13d



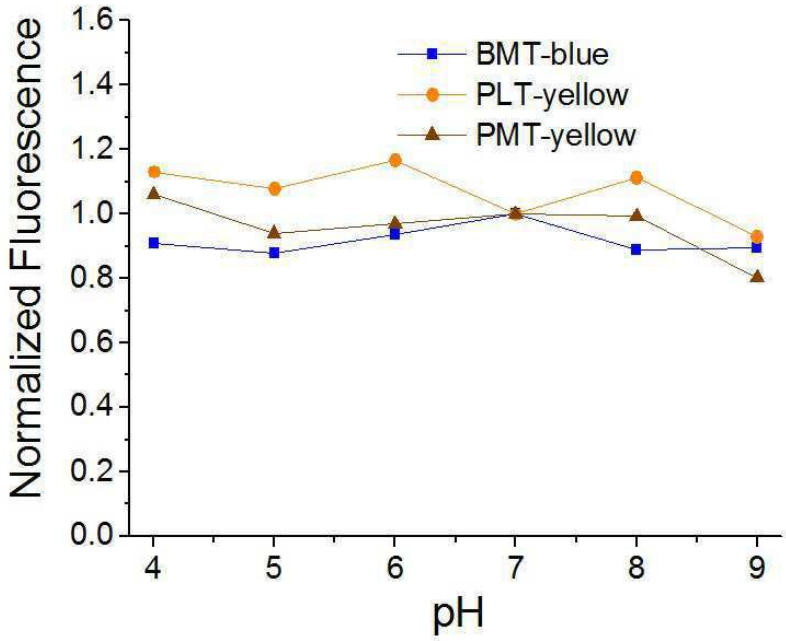
도면13e



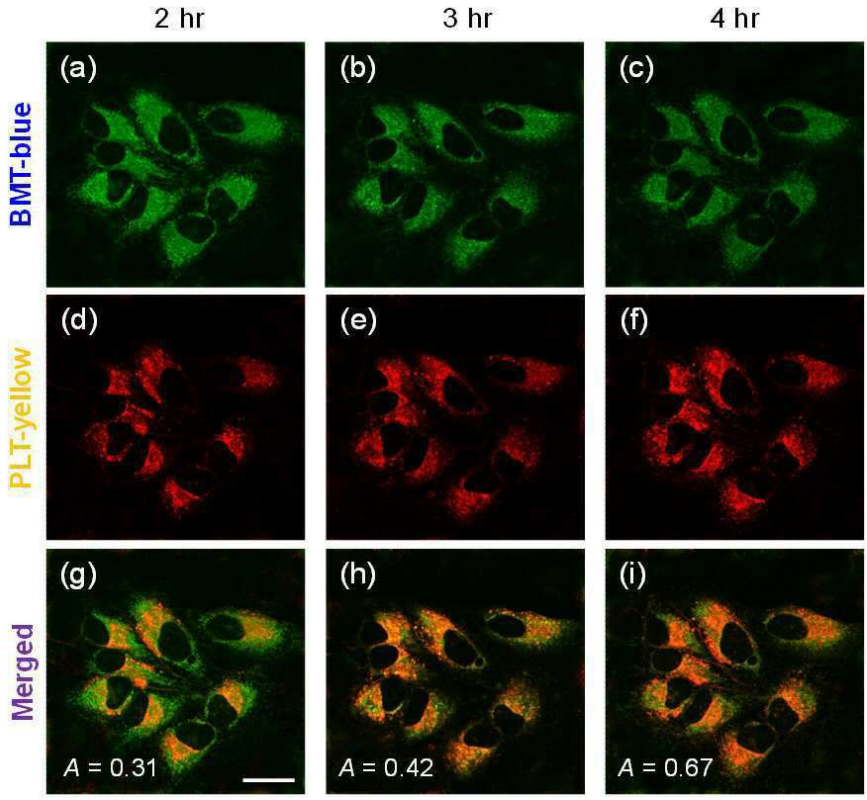
도면13f



도면14


Normalized Fluorescence
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
4
5
6
7
8
9
pH
BMT-blue
PLT-yellow
PMT-yellow

도면15


2 hr
3 hr
4 hr
BMT-blue
PLT-yellow
Merged
(a)
(b)
(c)
(d)
(e)
(f)
(g)
(h)
(i)
A = 0.31
A = 0.42
A = 0.67

도면16

