



- (51) 국제특허분류:
G01N 21/80 (2006.01) G01N 33/88 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/013130
- (22) 국제출원일: 2014년 12월 31일 (31.12.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (71) 출원인: 아주대학교 산학협력단 (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 443-749 경기도 수원시 영통구 월드컵로 206, Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김환명 (KIM, Hwan Myung); 442-754 경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 104-1005, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 137-130 서울시 서초구 바우피로 225 한마음빌딩 4층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

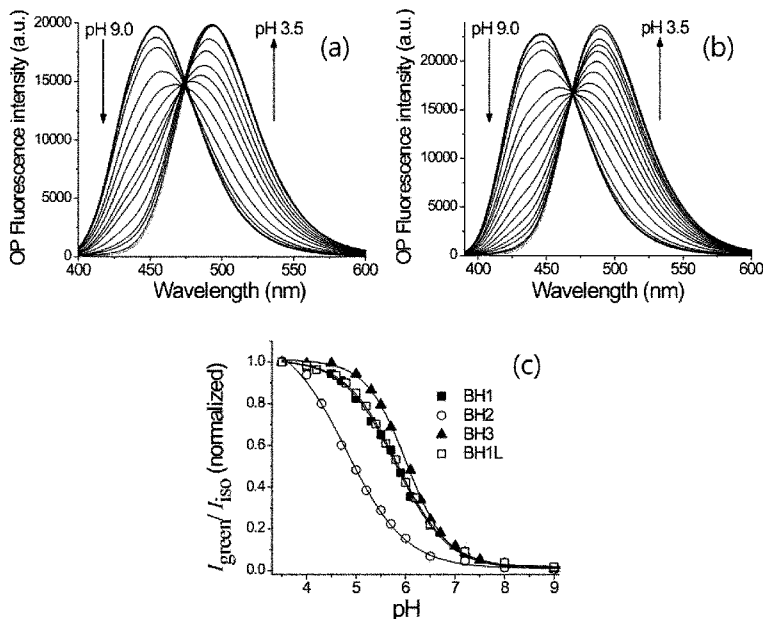
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: TWO-PHOTON FLUORESCENT PROBE, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND PH IMAGING METHOD USING SAME

(54) 발명의 명칭 : 이광자 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 PH 이미지화 방법



(57) Abstract: The present invention relates to a two-photon fluorescent probe for imaging pH. The two-photon fluorescent probe of the present invention senses the pH in an acidic region and a variation thereof on the basis of a benzimidazole-structured derivative. The probe has an intrinsic isotropic point, low toxicity and high photostability, and can measure the pH in thousands of a pH unit while exhibiting a color change of two-photon fluorescence at a pH of 4-7. According to the present invention, the two-photon fluorescent probe is selectively dyed inside living cells and biotissue and simultaneously exhibits a color change (blue-green) of strong fluorescence by a reaction with an acidic pH. In addition, the two-photon fluorescent probe can be easily loaded on cells due to a high water solubility and a low molecular weight. Additionally, the distribution of pH in biological cells or gentle biotissue and the activity thereof can be investigated by a ratio image since the pH can be selectively detected in biological cells and biotissue of a depth of 100-200 μm for at least 60 minutes. Therefore, the present invention can greatly contribute to pH-associated life science research, the early

diagnosis of diseases, the development of a diagnostic reagent and a therapeutic agent, and the like since the pH can be quantitatively analyzed and different samples can be compared and analyzed.

(57) 요약서:

[다음 쪽 계속]



본 발명은 pH를 이미지화하는 이광자 형광 프로브에 관한 것으로서, 본 발명의 이광자 형광 프로브는 벤즈이미다졸 구조 유도체를 기반으로 하여 산성 영역의 pH 및 그 변화량을 감지한다. 상기 프로브는 고유 등방사성 점, 적은 독성 및 높은 광안정성을 가지며, pH 4-7에서 이광자 형광의 색 변화를 나타내면서 pH를 0.001 단위로 측정할 수 있다. 본 발명에 따른 이광자 형광 프로브는 살아있는 세포와 생체 조직 내부에 선택적으로 염색됨과 동시에 산성 pH와 반응하여 강한 형광의 색 변화(청색-녹색)를 나타낸다. 또한 물에 대한 높은 용해도와 적은 분자량으로 인하여 세포에 쉽게 로딩될 수 있다. 또한, 60분 이상의 시간에 걸쳐 생체 세포 및 100-200 μm 깊이의 생체 조직에서 선택적으로 pH를 탐지할 수 있으므로 생체 세포 또는 온전한 생체 조직 내의 pH의 분포 및 활성을 비율영상으로 조사할 수 있다. 이에 따라 pH의 정량적인 분석이 가능하고 서로 다른 시료의 비교 분석이 가능하게 됨으로써 pH와 관련된 생명과학 연구와 질병의 조기 진단, 진단 시약과 치료제의 개발 등에 크게 기여할 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 이광자 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 PH 이미지화 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 pH를 이미지화하는 이광자 형광 프로브에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 세포 내 또는 세포 조직 내 산성 영역의 수소 이온 농도를 정량화하여 pH를 측정 및 이미지화하는 이광자 형광 프로브, 이의 제조방법 및 이를 이용한 pH 이미지화 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 세포 내식 작용(endocytic processes), 신호, 세포 사멸 및 방어 등의 수많은 세포 물질 대사는 산성 환경과 관련이 있다. 산성 환경은 효소의 기능 및 단백질의 분해를 활성화한다. 진핵 세포에서, 리소좀(pH 4.5-5.5) 및 엔도솜(pH 4.5-6.8) 등의 산성 기관은 다양한 활성 및 기능을 가진 많은 효소들과 단백질을 포함한다. 반면, 이러한 기관이 중성 pH를 가지면 세포의 기능에 장애가 발생하여 암이나 퇴행성 질환 등 많은 질병을 야기한다. 따라서, 생리학 및 병리학적으로 산성 환경의 역할을 이해하기 위하여, 세포, 조직 및 기관 수준에서 세포 내 pH 값을 측정할 필요성이 있다.
- [3] 이러한 기능을 이해하기 위하여, 녹색 형광 단백질(green fluorescent proteins; GFPs) 또는 Lyso Sensor DND-160 등과 같은 수많은 단일광자 형광 프로브가 개발되어 왔으나 짧은 여기 파장(< 500 nm)으로 인해 얇은 투과 깊이(< 100 μm), 광표백(photobleaching) 및 세포 자가 형광 등으로 인하여 조직 이미지화에 대한 적용을 제한한다. 이러한 문제에 대한 해결책으로 제시된 것이 이광자 형광 현미경(two-photon microscopy; TPM)이다. 이광자 현미경은 낮은 여기 에너지를 갖는 2개의 근적외선 광자들을 여기원으로 사용하기 때문에 단일광자 현미경에 비해서 여러 가지 장점들을 제공하는데, 구체적으로는 증가된 투과 깊이, 국소화된 여기 및 장시간 이미지화 등의 장점을 가지고 있다.
- [4] 최근, 2-아미노플로렌을 포함하는 가변색 이광자 형광 프로브를 pH 7에 가까운 영역에서 사용할 수 있다는 연구가 보고되었다(비특허문헌1). 또한, DND-160과 같은 작은 분자 이광자 형광 프로브 역시 가변색 이광자 형광 현미경을 통해서 살아있는 조직 내 pH를 측정할 수 있다는 연구가 보고되었다. 그러나, 프로톤 결합부위인 피리딘을 포함하는 이광자 형광 프로브는 특히, 산성 영역에서 0.1 이하로 형광 발현율이 낮다는 문제점이 있다. 또한, 산성 영역의 pH를 측정하기 위해 이광자 형광 프로브는 반드시 4.5 내지 6.5 pH에서 pKa값을 가져야 한다. 또한, 특정 세포기관 내의 pH를 측정하기 위해 표적 물질과 결합하기 위해 쉽게 개질될 수 있어야 하고, pH에 민감한 염료를 찾아야 하는 불편함도 있다.

- [5] [선행기술문헌]

[6] [비특허문헌]

[7] Yao, S.; Schafer-Hales, K. J.; Belfield, K. D. Org. Lett. 2007, 9, 5645.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 따라서, 본 발명이 해결하려는 첫 번째 과제는 세포 내 산성 영역의 pH, 특히 살아있는 세포 내에 존재하는 엔도솜 또는 리소솜의 산성 소기관과 올리고머 또는 단백질의 내/외부에 선택적으로 위치하여 pH를 직접적이고 실시간으로 측정하고, 이를 구체적이고 선명하게 이미지화하는 이광자 형광 프로브를 제공하는 것이다.

[9] 또한, 본 발명이 해결하려는 두 번째 과제는 상기 이광자 형광 프로브의 제조방법을 제공한다.

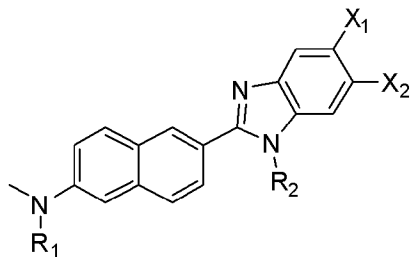
[10] 또한, 본 발명이 해결하려는 마지막 과제는 상기 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 내 pH를 이광자 형광 현미경을 통해 정량화하여 이미지화하는 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

[11] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브를 제공한다:

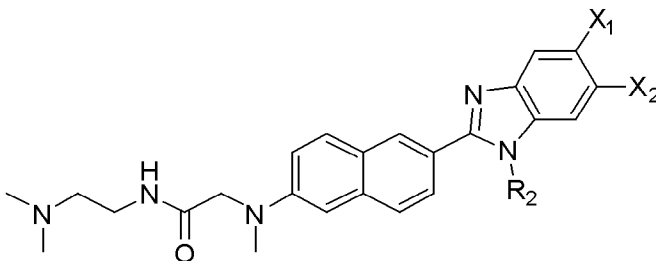
[12] [화학식 1]

[13]



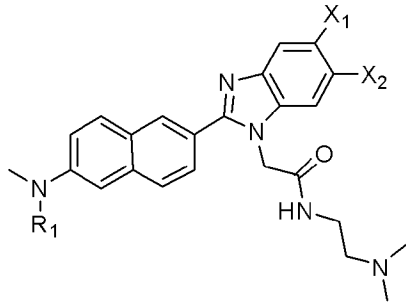
[14] [화학식 2]

[15]



[16] [화학식 3]

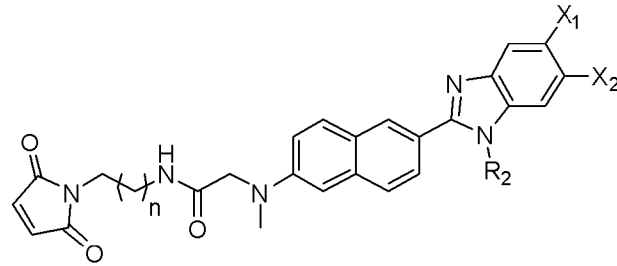
[17]



[18]

[화학식 4]

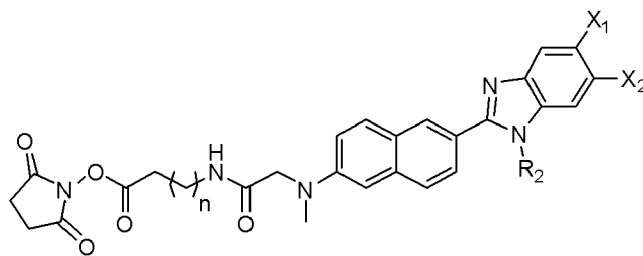
[19]



[20]

[화학식 5]

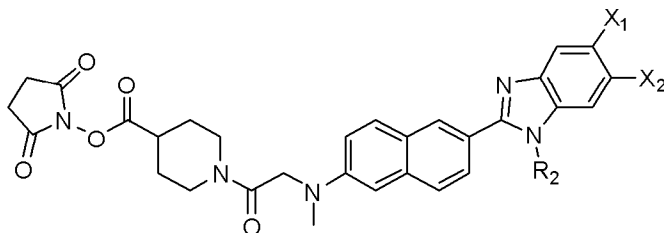
[21]



[22]

[화학식 6]

[23]



[24]

여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이고, n 은 0-10의 정수이며, 이하에서도 동일하다.

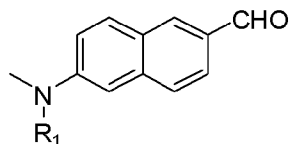
[25]

또한, 본 발명은 상기 화학식 1로 표시되는 이광자 형광 프로브의 제조방법으로서, 하기 화학식 A로 표시되는 화합물, 하기 화학식 B로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔설폰산 일수화물을 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[26]

[화학식 A]

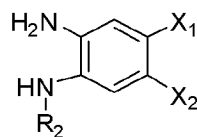
[27]



[28]

[화학식 B]

[29]



[30]

여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이며, 이하에서도 동일하다.

[31]

또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 상기 화학식 2로 표시되는 이광자 형광 프로브의 제조방법을 제공한다:

[32]

(a) 하기 화학식 B로 표시되는 화합물, 하기 화학식 C로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔술폰산 일수화물을 혼합하여 반응시켜 하기 화학식 D로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

[33]

(b) 상기 (a) 단계의 화학식 D로 표시되는 화합물과 LiOH 수용액을 혼합하여 반응시켜 하기 화학식 E로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및

[34]

(c) 상기 (b) 단계의 화학식 E로 표시되는 화합물과 N,N-다이메틸에틸렌다이아민을 혼합하여 반응시키는 단계.

[35]

[화학식 B]

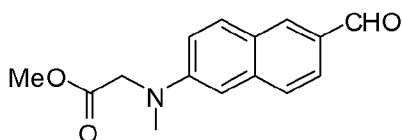
[36]



[37]

[화학식 C]

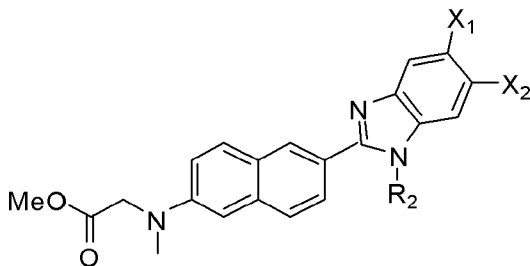
[38]



[39]

[화학식 D]

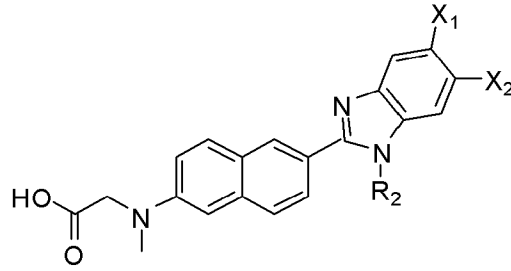
[40]



[41]

[화학식 E]

[42]



[43]

여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이며, 이하에서도 동일하다.

[44]

또한, 본 발명은 상기 이광자 형광 프로브를 이용하여 세포 내 pH를 이미지화하는 방법을 제공한다.

[45]

상기 이미지화가 가능한 깊이는 100-200 μm 일 수 있다.

[46]

상기 세포는 pH 4-7의 생세포, 세포소기관 또는 세포 조직일 수 있다.

[47]

발명의 효과

[48]

본 발명에 따른 이광자 형광 프로브는 살아있는 세포와 생체 조직 내부에 선택적으로 염색됨과 동시에 프로톤과 반응하여 강한 형광의 색 변화를 나타낸다. 물에 대한 용해도가 크고 적은 분자량으로 인하여 세포에 쉽게 로딩될 수 있으며 또한, 60분 이상의 시간에 걸쳐 생체 세포 및 100-200 μm 깊이의 생체 조직에서 선택적으로 pH를 탐지할 수 있으므로 생체 세포 또는 생체 조직 내의 pH의 분포 및 활성을 이광자 현미경을 통해 이미지화하여 관측할 수 있다. 이에 따라 pH의 정량적인 분석이 가능하고 서로 다른 시료의 비교 분석이 가능하게 됨으로써 pH와 관련된 생명과학 연구와 질병의 조기 진단, 진단 시약과 치료제의 개발 등에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[49]

도 1. (a) 및 (b)는 표준 버퍼에서 BH1(a) 및 BH1L(b)의 일광자 형광 스펙트럼의 pH 변화에 따른 강도이고, (c)는 일광자 모드에서 BH1, BH2, BH3 및 BH1L의 pH 대 I_{green}/I_{iso} 를 나타낸 그래프이다 (여기파장은 360 nm).

[50]

도 2. (a)는 표준 버퍼(pH 3.5, 7.2 및 10)에서 BH1의 이광자 활성 스펙트럼이고, (b)는 pH에 따른 BH1의 이광자 여기 형광 스펙트럼 변화를 나타낸 그래프이고, (c)는 이광자 모드에서 BH1, BH2, BH3 및 BH1L의 pH 대 I_{green}/I_{iso} 를 나타낸 그래프이다 (여기파장은 470 nm).

[51]

도 3. MTS(Micro Technology Services) 분석을 통한 헬라 세포의 생존 그래프이다. (a) BH1, (b) BH2, (c) BH3, 및 (d) BH1L.

[52]

도 4. (a)는 BH1 3 μM 로 처리한 이온투과담체-헬라 세포의 이광자 여기 형광 스펙트럼이고, (b)는 헬라 세포의 pH에 따른 이광자 I_{green}/I_{IR} 적정 곡선이며, (c)는 BH1 3 μM 로 처리한 헬라 세포의 가변색 TPM 이미지이고, (d)는

- 확대사진이다(화살표의 숫자는 측정 부위의 pH, 스케일바는 (c) 30 μm , (d) 5 μm).
- [53] 도 5. (a) 및 (b)는 BH1L와 LysoTracker Red를 처리한 헬라 세포의 이광자 형광 현미경(a), 일광자 형광 현미경(b) 이미지이다. (c)는 (a)와 (b)의 합성 사진이다(여기 파장은 이광자 형광 현미경에서 740 nm, 일광자 형광 현미경에서 543 nm, 스케일바는 20 μm).
- [54] 도 6. (a)는 BH1 3 μM 로 처리한 이온투과담체-헬라 세포의 이광자 여기 형광 스펙트럼이다. (b)는 헬라 세포의 pH에 따른 이광자 $I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$ 적정 곡선이다. (c) 및 (d)는 BH1 3 μM 로 처리한 헬라(HeLa) 세포의 가변색 TPM 이미지(c) 및 확대사진(d)이다. (화살표의 숫자는 측정 부위의 pH, 스케일바는 (c)에서 30 μm , (d)에서 5 μm) (c) 및 (e)는 BH1 3 μM 로 처리한 헬라 세포의 가변색 TPM 이미지로 (c)는 NH_4Cl 첨가 전, (e)는 첨가 후 이다. (d) 및 (f)는 DIC 이미지에 대응하는 합성사진이다. (g)는 시간에 따른 pH 변화량을 나타낸 (c)의 확대사진이다 (여기 파장 740 nm, 스케일 바는 (c)에서 20 μm , (g)에서 8 μm).
- [55] 도 7. 쥐의 해마 절편 슈도화된 가변색(pseudocolored Ratiometric) 이광자 형광 현미경 이미지이다. (a) 및 (b)는 BH1L으로 처리한 것이, (c) 및 (d)는 BH1으로 처리한 것이다. (a) 및 (c)는 투과 깊이 90-180 μm 에서 Z-방향에 따른 pH를 시각화하기 위해 축적한 120 TPM 이미지이다. (b) 및 (d) DG 영역의 63배 확대사진이다(여기 파장은 740 nm, 스케일바는 (a) 및 (c)에서 300 μm , (b) 및 (d)에서 47 μm).
- [56] 도 8. 이광자 형광 프로브의 형광 색 변화를 나타낸 모식도 및 세포 내 pH를 나타낸 이미지이다.
- [57] 도 9. 표준 버퍼 (pH 7.2, 3 mL)에서 일광자 스펙트럼(왼쪽) 및 프로브 농도에 따른 흡수 강도(오른쪽)를 나타낸 그래프이다. (a) 및 (b)는 BH1, (c) 및 (d)는 BH2, (e) 및 (f)는 BH3, (g) 및 (h)는 BH1L 및 (i) 및 (j)는 P1 이다.
- [58] 도 10. 표준 버퍼 pH에 따른 일광자(a, d 및 g), 이광자(b, e 및 h) 형광 스펙트럼 및 pH에 따른 $I_{\text{green}}/I_{\text{iso}}$ 플롯(c, f 및 i)이다. (a), (b) 및 (c)는 BH2, (d), (e) 및 (f)는 BH3, (g), (h) 및 (i)는 BH1L이다. 여기 파장은 (a), (d) 및 (g)은 360 nm, (b), (e) 및 (h)은 740 nm이고, (c), (f) 및 (i)에서의 결과가 최대 $I_{\text{green}}/I_{\text{iso}}$ 에서 표준화된다.
- [59] 도 11. 표준 버퍼(pH 3.5, 7.2 및 10)에서 P1의 일광자 흡수(a) 및 방출(b) 스펙트럼이다.
- [60] 도 12. 표준 버퍼(pH 3.5, 7.2 및 10)에서 BH2, BH3 및 BH1L의 이광자 활성 스펙트럼이다. (a)는 BH2, (b)는 BH3 및 (c)는 BH1L이다(이광자 활성 단면적($\delta\Phi$)의 오차율은 15%).
- [61] 도 13. (a), (c), (e) 및 (g)은 BH1(a), BH2(c), BH3(e), 및 BH1L(g)로 처리한 헬라 세포의 TPM 이미지이다. (b), (d), (f) 및 (h)는 (a), (c), (e) 및 (g)에 표시한 A-C 영역의 시간에 따른 상대적 이광자 여기 형광(TPEF; two-photon excited fluorescence) 강도 강도를 나타낸 그래프이다(수치화된 강도는 xyt 모드에서 1시간 동안 2초 마다 측정한 값이며, 이광자 여기 형광은 여기 파장 740 nm일 때,

400-600 nm에서 펄스 초 펄스로 수집되었다. 스케일바는 75 μm).

[62] 도 14. BH1(a), BH1L(b)로 처리한 헬라 세포에서 획득한 이광자 여기 형광 스펙트럼이다.

[63] 도 15. BH1 3 μM 처리한 헬라 세포의 TPM 이미지이다. 이광자 여기 형광은 여기 파장 740 nm일 때, (a) 440-460 nm(I_{IR}) 및 (b) 500-550 nm (I_{green})에서 펄스 초 펄스로 수집되었다. (c)는 슈도화색(pseudocolored) 가변색 이광자 형광 현미경 이미지($I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$)이다 (스케일바는 30 μm).

[64] 도 16. NH_4Cl 첨가하기 전(a, b 및 c)과 후(e, f 및 g)의 BH1L로 처리한 헬라 세포의 TPM 이미지이다. 이광자 여기 형광은 여기 파장 740 nm일 때, (a) 및 (e)는 440-460 nm(I_{IR})에서, (b) 및 (f)는 500-550 nm (I_{green})에서 펄스 초 펄스로 수집되었다.

[65] 도 17. NH_4Cl 첨가하기 전(a)과 후(b)의 BH1L로 처리한 헬라 세포의 실시간 가변색 이광자 형광 현미경 이미지 ($I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$)이다 (스케일바는 8 μm).

[66] 도 18. 쥐 해마 절편의 TPM 이미지이다. (a), (c) 및 (e)는 BH1L으로 1시간 처리한 것이고, (b), (d) 및 (f)는 BH1으로 1시간 처리한 것이다. 이광자 여기 형광은 여기 파장 740 nm일 때, (a) 및 (b)는 440-460 nm(I_{IR}), (c) 및 (d)는 500-550 nm(I_{green})에서 펄스 초 펄스로 수집되었다. 투과 깊이 90-180 μm 에서 Z-방향에 따른 pH를 시각화하기 위해 120 TPM 이미지를 축적하였다.

[67] 도 19. 쥐 해마 절편의 TPM 이미지이다. (a), (b) 및 (c)는 30 μM BH1L으로 1시간 처리한 것이고, (d), (e) 및 (f)는 BH1으로 1시간 처리한 것이다. 이광자 여기 형광은 여기 파장 740 nm일 때, (a) 및 (b)는 440-460 nm(I_{IR})에서, (c) 및 (d)는 500-550 nm(I_{green})에서 펄스 초 펄스로 수집되었다. (c) 및 (f)는 슈도화색(pseudocolored) 가변색 이광자 형광 현미경 이미지($I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$)이다 (스케일바는 47 μm).

[68]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[69] 본 발명은 세포 내 pH를 측정하는 이광자 형광 프로브에 관한 것으로서, 낮은 에너지 여기원을 사용하므로 세포를 파괴하지 않고, 세포 내 pH를 실시간으로 정량화하여 측정할 수 있다.

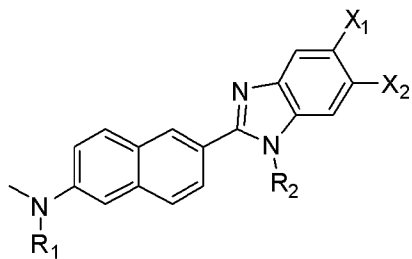
[70] 히스티딘은 생체계에서 완충 능력을 가지는 이미다졸기를 포함하는 필수 아미노산이며, 벤즈이미다졸은 산성 세포 소기관에서 pKa 약 5.5를 가지는 이미다졸의 유도체이다. 본 발명은 벤즈이미다졸기를 양성자 수용체로 하여, 형광체인 2-아미노나프탈렌의 6번 위치에 도입시켜 수소 이온과의 반응에 따른 색 변화(청색-녹색)를 통해 세포 내 pH 4-7 영역을 0.001 pH 단위로 정량적으로 측정하고 실시간 모니터링 할 수 있는 이광자 형광 프로브를 제공한다.

[71] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[72] 본 발명은 하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브를 제공한다.

[73] [화학식 1]

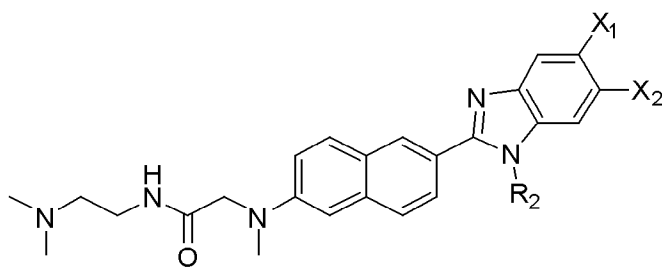
[74]



[75]

[화학식 2]

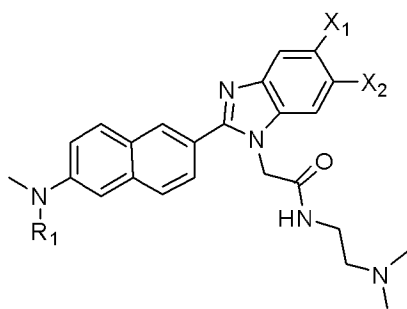
[76]



[77]

[화학식 3]

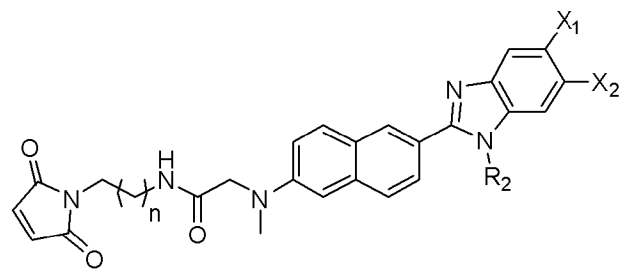
[78]



[79]

[화학식 4]

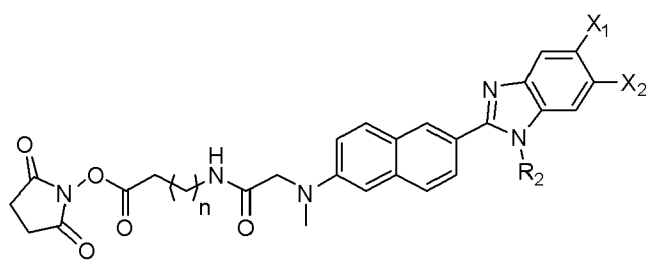
[80]



[81]

[화학식 5]

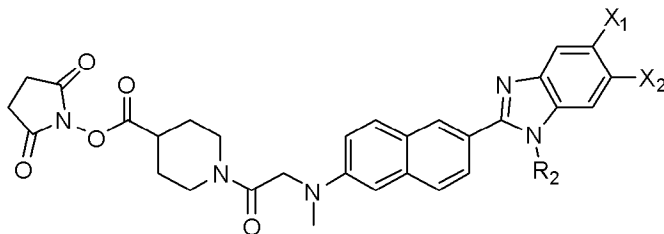
[82]



[83]

[화학식 6]

[84]



[85] 여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이고, n 은 0-10의 정수이며, 이하에서도 동일하다.

[86] 상기 화학식 1로 표시되는 이광자 형광 프로브는 세포, 세포 소기관 또는 생체 조직 등의 내부 pH 4-7 영역에서 수소 이온과 반응하여 형광을 나타내면서 pH를 이미지화할 수 있다. 상기 프로브는 벤즈이미다졸기에 전자 주개(electron donor) 또는 전자받개(electron acceptor)를 치환시켜 pKa 4-6.5 범위를 가진다. 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 이광자 형광 프로브의 형광 색 변화를 나타낸 모식도 및 이광자 형광 현미경을 통해 관측한 세포 내 pH를 나타낸 이미지이다. 낮은 여기 파장(740 nm)을 세포에 조사하면 이광자 형광 프로브가 프로톤화되면서 청색에서 녹색으로의 색변화가 일어나게 되고 이광자 형광 현미경을 통해 상기 변화를 관측하고 pH를 정량화 시킬 수 있다.

[87] 또한, 상기 화학식 2 및 화학식 3으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 삼차아민기를 도입하여 산성 기관에서 프로톤과 반응하여 4차 아민염을 형성하며, 약 pKa 10을 가진다. 특히, 엔도솜 또는 리소솜 내부에 선택적으로 위치하여 pH를 감지할 수 있다.

[88] 또한, 상기 화학식 4 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 말레이미드(maleimide)기를 도입하여 생체 분자의 티올기와 선택적인 공유결합을 하거나 숙신이미딜 에스터(succinimide ester)기를 도입하여 아민기와 선택적인 공유결합을 함으로써 올리고머 또는 단백질을 선택적으로 표식시켜 pH를 측정할 수 있다.

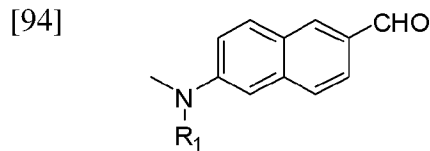
[89] 도 2a에서 볼 수 있는 바와 같이, pH 3.5, 7.2 및 10의 버퍼에서 본 발명의 일 실시예에 따른 이광자 형광 프로브의 여기 파장에 대한 이광자 활성 단면적($\delta\Phi$)을 나타낸 그래프이다. pH 3.5에서 단면적이 가장 큰 것을 알 수 있으며, 이는 산성 영역에서 본 발명의 이광자 형광 프로브가 pH 측정 활성이 높은 것을 의미한다.

[90] 도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른 이광자 형광 프로브를 pH에 따라 등방사성 점(I_{green}) 기준 방출(I_{iso}) 비(I_{green}/I_{iso})를 나타낸 칼리브레이션 그래프이다. 도 2c에 나타난 바와 같이, 각 플롯(plots)들을 연결하면 pH 4.5 내지 pH 7에서 선형을 나타내는데, 이는 I_{green}/I_{iso} 를 통해 선형 구간을 나타내는 pH 4.5 내지 pH 7 영역에서의 pH를 구할 수 있음을 의미한다.

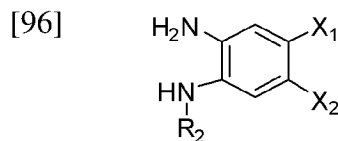
[91] 본 발명의 이광자 형광 프로브는 세포 내 pH가 4-7인 영역에 대해 높은 형광 강도의 이광자 방출 스펙트럼을 나타낸다(도 4,6). 따라서, 세포 내 pH 4-7 영역에서 실시간으로 pH를 이미지화할 수 있다. 더 바람직하게는 pH 4.5-7 영역에서 pH를 실시간으로 정량적으로 측정하여 이미지화할 수 있다.

[92] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 본 발명은 하기 화학식 A로 표시되는 화합물, 하기 화학식 B로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔술폰산 일수화물을 혼합하여 반응시켜 제조되는 상기 화학식 1로 표시되는 이광자 형광 프로브의 제조방법을 제공한다.

[93] [화학식 A]



[95] [화학식 B]



[97] 여기서, X₁ 및 X₂는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH₃, OH, NH₂, N(CH₃)₂, NHCH₃, NCS, 또는 CO₂H이고, R₁ 및 R₂는 각각 독립적으로 H, CH₃, CH₂(CH₂)_nCH₃, CH₂(CH₂)_nCO₂H, CH₂(CH₂)_nOH 또는 CH₂(CH₂)_nSO₃H이며, 이하에서도 동일하다.

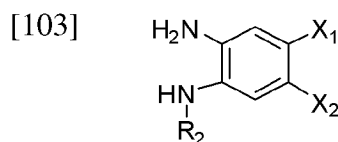
[98] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 상기 화학식 2로 표시되는 이광자 형광 프로브의 제조방법을 제공한다:

[99] (a) 하기 화학식 B로 표시되는 화합물, 하기 화학식 C로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔술폰산 일수화물을 혼합하여 반응시켜 제조되는 하기 화학식 D로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

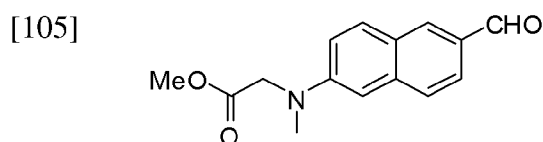
[100] (b) 상기 (a) 단계의 화학식 D로 표시되는 화합물과 LiOH 수용액을 혼합하여 반응시켜 하기 화학식 E로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및

[101] (c) 상기 (b) 단계의 화학식 E로 표시되는 화합물과 N,N-다이메틸에틸렌다이아민을 혼합하여 반응시키는 단계.

[102] [화학식 B]

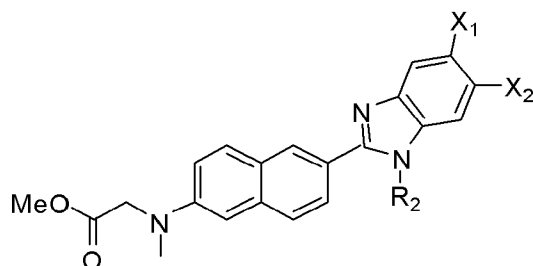


[104] [화학식 C]



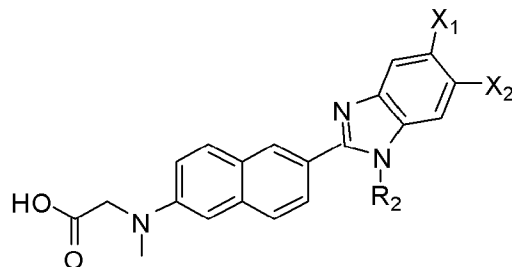
[106] [화학식 D]

[107]



[108] [화학식 E]

[109]



[110] 여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이며, 이하에서도 동일하다.

[111] 본 발명의 상기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 낮은 에너지의 여기 파장($740\text{ }\mu\text{m}$)을 세포에 조사하므로 세포 파괴 없이 생체 세포 및 $100\text{--}200\text{ }\mu\text{m}$ 깊이의 생체 조직까지 선택적으로 pH의 분포를 알 수 있고, 60분 이상 동안 실시간으로 측정이 가능하므로 pH 변화 및 활성을 이광자 형광 현미경을 통하여 이미지화할 수 있다.

[112]

발명의 실시를 위한 형태

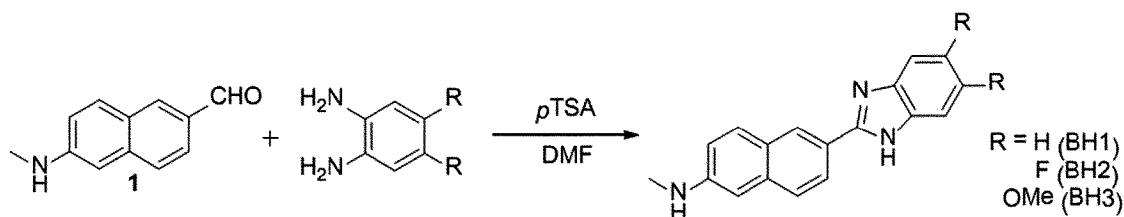
[113] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[114] <실시예>

[115] 본 발명의 화학식 1로 표시되는 이광자 형광 프로브는 하기 반응식 1에 나타나는 바와 같이 제조할 수 있으며, 이에 의해 한정되지 않는다.

[116] [반응식 1]

[117]



- [118] 하기 화합물 1은 문헌 1에 기재된 방법으로 제조하였다(문헌 1: Kim, H. M.; Jeong, B. H.; Hyon, Ju-Y.; An, M. J., Seo, M. S.; Hong, J. H.; Lee, K. J.; Kim, C. H.; Joo, T.; Hong, Seok-C.; Cho, B. R. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 4246).
- [119]
- [120] 실시예 1. 이광자 형광 프로브의 제조(BH1)
- [121] DMF 10 mL에 화합물 1 0.35 g, 1.9 mmol, o-페닐렌다이아민(o-phenylenediamine; 0.31 g, 22.9 mmol) 및 p-톨루엔설폰산 일수화물(p-toluenesulfonic acid monohydrate 0.072 g, 0.38 mmol)을 120 °C, 질소분위기 하에서 6시간 동안 혼합 교반하였다. 실온에서 식힌 후, 혼합물에 물 50 mL를 첨가하여 여과하였다. 침전물을 증류수로 세척하고, 진공에서 건조시켰다. 조생성물(crude product)를 용리액(eluent)인 EtOAc/hexane(에틸렌아세테이트/헥산, 1 : 1 v/v)을 사용하여 컬럼 크로마토그래피(실리카 젤)로 정제하여 밝은 갈색 고형물을 수득하였다. 이하 BH1이라 한다.
- [122] 수득률: 0.16 g (31%); 녹는점: 214-216 °C; ¹H NMR (d6-DMSO): δ 12.82 (br s, 1H), 8.46 (s, 1H), 8.09 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.72-7.70 (m, 2H), 7.56 (br s, 2H), 7.18-7.16 (m, 2H), 7.02 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 6.70 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.27 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.80 (d, J = 4.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 151.9, 148.6, 135.8, 128.9, 125.7, 125.6, 123.9, 122.3, 121.6, 118.7, 101.4, 29.6 ppm; HRMS (FAB⁺): m/z calcd for [C₁₈H₁₅N³⁺H⁺]: 274.1344, found: 274.1343.
- [123] 실시예 2. 이광자 형광 프로브의 제조(BH2)
- [124] 실시예 1과 동일하되 o-페닐렌다이아민(o-phenylenediamine) 대신 4,5-다이플루오로-1,2-페닐렌다이아민을 사용하였으며, 밝은 노란색 고형물을 수득하였다. 이하 BH2이라 한다.
- [125] 수득률: 33%; 녹는점: 237-240 °C; ¹H NMR (d6-DMSO): δ 13.01 (br s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.04 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.71-7.69 (m, 2H), 7.60 (br s, 2H), 7.02 (d, J = 8.8, 1H), 6.70 (s, 1H), 6.29 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.80 (d, J = 4.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 153.9, 148.7, 147.6, 147.5, 145.1, 136.0, 128.9, 125.8, 125.7, 125.6, 123.7, 121.7, 118.8, 101.4, 29.6 ppm; HRMS (FAB⁺): m/z calcd for [C₁₈H₁₃N₃F₂H⁺]: 310.1156, found: 310.1156.
- [126] 실시예 3. 이광자 형광 프로브의 제조(BH3)
- [127] 실시예 1과 동일하되 o-페닐렌다이아민(o-phenylenediamine) 대신 4,5-다이메톡시-1,2-페닐렌다이아민을 사용하였으며, 옅은 노란색 고형물을 수득하였다. 이하 BH3이라 한다.
- [128] 수득률: 36%; 녹는점: 235-238 °C; ¹H NMR (d6-DMSO): δ 12.56 (br s, 1H), 8.34 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 8.02 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 7.69-7.67 (m, 2H), 7.09 (br s, 2H), 7.00 (dd, J = 8.8, 1.6 Hz, 1H), 6.69 (d, J = 1.6 Hz, 1H), 6.20 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.81 (s, 6H), 2.80 (d, J = 4.4 Hz, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 150.4, 148.3, 146.2, 135.5, 128.8, 125.8, 125.7, 124.7, 123.7, 122.9, 118.7, 101.5, 55.9, 29.7 ppm;

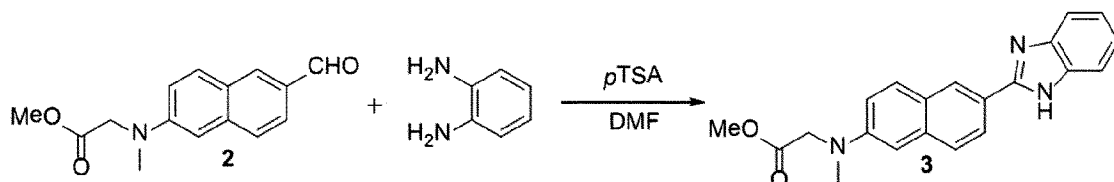
HRMS (FAB⁺): m/z calcd for [C₂₀H₁₉O₂N³⁺H⁺]: 334.1556, found: 334.1555.

[129] 실시예 4. 이광자 형광 프로브의 제조(BH1L)

[130] 화학식 2로 표시되는 이광자 형광 프로브는 하기 반응식 2 내지 4에 나타나는 바와 같이 제조할 수 있으며, 이에 의해 한정되지 않는다.

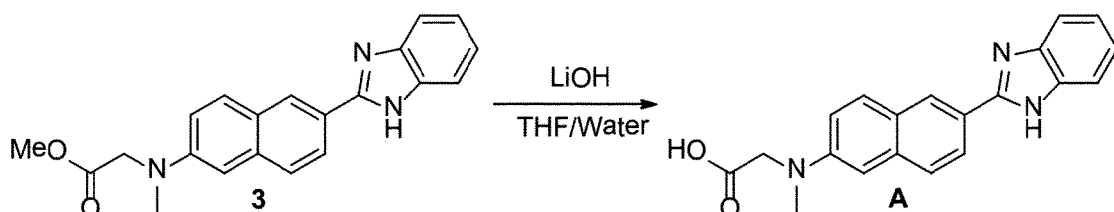
[131] [반응식 2]

[132]



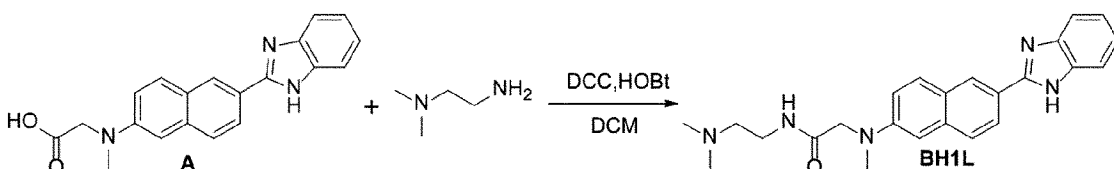
[133] [반응식 3]

[134]



[135] [반응식 4]

[136]



[137] 상기 화합물 2는 문헌 2에 기재된 방법으로 제조하였다(문헌 2: Masanta, G.; Lim, C. S.; Kim, H. J.; Han, J. H.; Kim, H. M.; Cho, B. R. J. Am. Chem.Soc. 2011, 133, 5698).

[138] 상기 화합물 3은 실시예 1과 동일하되 화합물 1 대신 상기 화합물 2를 사용하였으며, 수득률 51%로 옅은 노랑색 고형물을 수득하였다.

[139] 수득률: 51%; 녹는점: 163-165 °C; ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 12.87 (br s, 1H), 8.54 (s, 1H), 8.16 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.84 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.8 Hz, 1H), 7.60 (br s, 2H), 7.23-7.19 (m, 3H), 7.00 (s, 1H), 4.40 (s, 2H), 3.65 (s, 3H), 3.12 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, d₆-DMSO): δ 170.6, 151.7, 147.6, 135.0, 129.2, 126.3, 125.6, 125.4, 124.0, 123.3, 116.0, 105.4, 53.1, 51.6, 39.0 ppm.

[140] 화합물 A는 화합물 3(0.03 g, 0.91 mmol)을 THF 5 mL에 용해하여 LiOH(0.22 g, 9.2 mmol) 수용액 3 mL를 관(cannula)을 통해 첨가하였다. 상기 반응 혼합물을 25 °C에서 6시간 동안 교반하였다. 용매를 증발시키고, 증류수 5 mL를 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 pH가 3이 될 때까지 37%의 HCl용액으로 산성화하였다. 침전물을 필터로 정제하고 증류수, 다이에틸 에터 순으로 세척하고 진공관에서 건조하였다. 더 이상의 정제없이 노란색의 고형물인 화합물 A를 얻었다.

[141] 수득률: 0.27 g (90 %); 녹는점: 205-208 °C; ¹H NMR (d₆-DMSO): δ 12.80 (br s,

1H), 8.51 (s, 1H), 8.12 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.82 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.58 (br s, 2H), 7.22-7.16 (m, 3H), 6.96 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.24 (s, 2H), 3.11 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 171.7, 151.8, 147.9, 135.2, 129.1, 126.3, 125.5, 124.0, 123.0, 121.7, 116.1, 105.1, 53.5, 39.1 ppm.

[142] 화합물 A(0.2 g, 0.06 mmol), 1,3-다이클로로헥실 카보다이어미드(1,3-dicyclohexyl carbodiimide, 0.14 g, 0.66 mmol) 및 1-하이드록시벤조트리아졸(0.089 g, 0.66 mmol)을 10 mL CH₂Cl₂ 첨가하여 질소 분위기하에서 실온에서 1 시간동안 교반하였다. 혼합물에 N,N-다이메틸에틸렌다이아민((N,N-dimethyl)ethylenediamine, 0.058 g, 0.66 mmol)을 첨가하여 질소 분위기하에서 12시간 동안 교반하였다. 침전물을 정제하고, 감압농축하였다. 수득물을 컬럼 크로마토그래피 (실리카 겔, CHCl₃/MeOH (10:1 - 4:1))로 여과하여 밝은 노란색의 고형물을 얻었다. 이하 BH1L라고 한다.

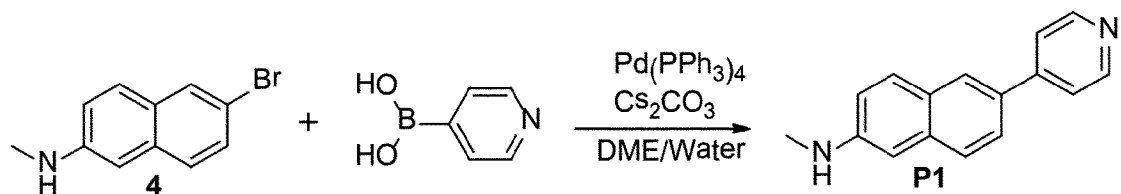
[143] 수득물: 0.17 g (71 %); 녹는점. 235-240 °C; ¹H NMR (d6-DMSO): δ 12.84 (br s, 1H), 8.52 (s, 1H), 8.13 (dd, J = 8.4, 1.6 Hz, 1H), 7.89(br t, J = 6.0 Hz, 1H, amide-NH), 7.83 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.76 (d, J = 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 7.2 Hz, 1H), 7.51 (d J = 7.2 Hz, 1H), 7.19-7.15 (m, 3H), 6.95 (d, J = 2.4 Hz, 1H), 4.06 (s, 2H), 3.18 (q, J = 6.4 Hz, 2H), 3.12 (s, 3H), 2.29 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 2.13 (s, 6H). ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 169.0, 151.7, 147.9, 135.1, 129.0, 126.2, 125.5, 125.4, 124.0, 123.1, 116.2, 105.2, 58.1, 55.7, 45.1, 39.1, 36.6 ppm HRMS (FAB⁺): m/z calcd for [C₂₄H₂₇O₁N⁵⁺H⁺]: 402.2294, found: 402.2293.

[144] 비교예 1. 피리딘기를 포함하고 있는 이광자 형광 프로브의 제조(P1)

[145] 하기 화학식 P1으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 하기 반응식 5에 나타나는 바와 같이 제조하였다.

[146] [반응식 5]

[147]



[148] 화합물 4(6-브로모-N-메틸-2-나프틸아민)는 문헌 1에 기재된 방법으로 제조하였다(문헌 1: Kim, H. M.; Jeong, B. H.; Hyon, Ju-Y.; An, M. J., Seo, M. S.; Hong, J. H.; Lee, K. J.; Kim, C. H.; Joo, T.; Hong, Seok-C.; Cho, B. R. J. Am. Chem. Soc. 2008, 130, 4246).

[149] 화합물 4(0.2 g, 0.85 mmol), 4-피리디닐보린 산(0.16 g, 1.28 mmol), 키스(트리페닐포스핀)팔라듐(0)(Tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0), 0.093 g, 0.034 mmol)을 10 mL N,N-다이메틸아세트아마이드에 용해하였다. 상기 혼합물에 Cs₂CO₃ (0.55 g, 1.69 mmol) 수용액 1 mL를 진공에서 첨가하였다.

혼합물에서 질소로 15분 동안 가스를 제거하고, 질소 분위기하에서 18시간 동안 120 °C에서 교반하였다. 실온으로 식힌 후, 혼합물을 물 50 mL로 여과하였다. 침전물을 증류수로 세척하고 진공에서 건조하였다. 수득물을 CH₂Cl₂로 재결정하여 밝은 갈색의 고형물을 얻었다.

[150] 수득물: 0.11 g (55 %); 녹는점: 223-226 °C; ¹H NMR (d6-DMSO): δ 8.60-8.59 (m, 2H), 8.15 (s, 1H), 7.77-7.69 (m, 5H), 7.00 (dd, J = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 6.69 (s, 1H), 6.19 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.80 (d, J = 4.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, d6-DMSO): δ 149.8, 148.4, 147.0, 135.4, 128.9, 128.7, 126.1, 125.7, 124.0, 120.4, 118.6, 101.1, 29.6 ppm HRMS (FAB⁺): m/z calcd for [C₁₆H₁₄N²⁺H⁺]: 235.1236, found: 235.1235.

[151] <재료의 준비 및 시험 방법>

[152] 1. 분광기 장치

[153] 흡수 스펙트럼은 S-3100 UV-Vis 스펙트로미터, 형광 스펙트럼은 FluoroMate FS-2 형광 스펙트로미터로 1 cm 표준 퀴츠 세포에서 측정하였다. 형광 양자 효율은 9,10-다이페닐안트라센 (Φ = 사이클로헥산에서 0.93)으로 구하였다.

[154] 2. pH 값

[155] DMSO(디메틸설폭사이드, 1.0 × 10⁻³ M)에 이광자 형광 프로브 3 μL를 표준 용액 3 mL가 들어있는 큐벳에 첨가하였다. 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 이광자 형광 프로브, BH 1-3 및 BH1L의 pH는 하기 식에 의해 구하였다.

$$[156] \quad \text{pH} = \text{pK}_a + c \left[\log \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right] + \log \frac{I_a}{I_b}$$

[157] R은 주어진 pH에서 등방사성 점(I_{iso}) 및 500-550 nm (I_{green})의 관측된 비이다. R_{max} 및 R_{min}는 R의 최대, 최소 한계 값이고, C는 기울기이다. I_a/I_b는 R의 분모를 구하기 위해 선택된 파장에서의 pH 10에 대한 pH 3.5의 형광 강도 비이다. 이 경우, 상기 정정은 정확한 등방사성 점을 이용하여 소멸된다. 이광자 모드에서의 pK_a 값을 구하기 위해, 이광자 여기 형광 스펙트럼을 DDC 측정기(Monora 320 spectrograph set with Andor iDus DV401A-BV)로 나타내었다. 이광자 형광 프로브들은 모델-잠금 티타늄-사파이어 레이저 광원 장치(Mai Tai HP, Spectra Physics, 초당 80 MHz 펄스, 100 fs 펄스 폭)에 740 nm 파장, 2510 mW(초점 양상에서 200 mW에 상응) 출력에서 여기되었다.

[158] 3. 이광자 형광 단면적 측정

[159] 이광자 단면적(δ)은 펨토 초단위(femto second, fs) 형광 측정법을 이용하여 측정하였다. 프로브(1.0×10⁻⁶ M)를 각각 표준 버퍼(pH 3.5, 7.2 및 10)에 용해하고, 형광 강도를 나타내는 이광자를 720-880 nm에서 로다민(rhodamine) 6G를 사용하여 측정하였다. 레퍼런스와 샘플의 이광자 여기 형광 스펙트럼 강도는 동일한 여기상태 파장에서 결정되었다. 이광자 형광 프로브의 단면은 하기 수학적 식 1을 이용하여 계산하였다.

[160] [수학적 식 1]

[161] $\delta = \delta r(Ss\Phi rfrer)/(Sr\Phi sfses)$

[162] 상기 수학적 식 1에서, s 및 r은 샘플 및 레퍼런스 분자를 나타내고, S는 CCD 검출기로부터 수집된 신호 강도를 나타내며, Φ 는 형광 양자 수율을 나타내고, f는 실험기기의 전체 형광 수집 효율을 나타내며, c는 용액 내 분자밀도를 나타내고, δr 는 레퍼런스 분자의 이광자 형광 프로브 단면적을 나타낸다.

[163] **4. 세포 배양**

[164] 헬라(HeLa) 자궁경부암 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 DMEM(WelGene Inc, 서울, 한국)에서 10% FBS(WelGene), 페니실린(100 units/mL) 및 스트렙토마이신(100 μ g/mL)을 공급하면서 배양하였다. 이미지화하기 이틀 전, 세포를 유리바닥 디쉬(NEST)에 옮겼다. 모든 세포들이 37 °C에서 공기/CO₂ 비율이 95 : 5인 가습환경에서 성장되었다. 라벨링을 하기위해 성장 매체를 제거하였고, 무세럼(serum-free) DMEM으로 변경하였다. 상기 세포에 3 μ M 프로브를 주입하여 37 °C에서 30분 동안 배양하였다.

[165] **5. 이광자 형광 현미경(TPFM; Two-Photon Fluorescence Microscopy)**

[166] 세포 및 조직에 주입(labeled)된 이광자 형광 프로브의 현미경 이미지는 스펙트럼 공 초점 및 다중광자 현미경(spectral confocal and multiphoton microscopes, Leica TCS SP8 MP)을 사용하였다. 이광자 형광 프로브 현미경 이미지는 이광자 형광 프로브를 모델-잠금 티타늄-사파이어 레이저 광원 장치(Mai Tai HP, Spectra Physics, 초당 80 MHz 펄스, 100 fs 펄스 폭)를 이용하여 740 nm 파장에서 2510 mW 출력으로 여기시켜 DMI6000B 현미경 (Leica)으로 관측하였다. 440-460 nm(IR) 및 500-550 nm(green) 범위에서 이미지를 얻기 위해, 내부 PMTs가 신호를 수집하기위해 사용하였다. 가변색(Ratiometric) 이미지 프로세싱 및 분석은 MetaMorph 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[167] **6. 세포 pH 칼리브레이션**

[168] pH 칼리브레이션 곡선은 이온투과담체 및 BH1 또는 BH1L로 처리한 헬라 세포의 $I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$ 에 의해 나타내었다. 세포를 3.0 μ L의 1 mM BH1 또는 1 mM BH1L가 포함된 DMSO 저장액에서 37 °C, 5% CO₂ 하에 30분 동안 배양하였고, 세포 미디어(extracellular media)는 1 mL 칼리브레이션 버퍼(125 mM KCl, 20 mM NaCl, 0.5 mM CaCl₂, 0.5 mM MgCl₂, 5 μ M nigericin, 5 μ M monensin, 및 25 mM buffer; pH 3.5, 4.0, 4.3, 5.0, 5.2의 아세트이트; pH 5.5, 6.0의 MES; pH 6.5, 7.0, 8.0의 HEPES)에 두었다. 그 후 상온에서 세포를 칼리브레이션 버퍼에 15-20분 동안 처리하였다. BH1 또는 BH1L의 440-460 nm (I_{IR}) 및 500-550 nm (I_{green}) 에서의 이광자 형광 프로브 강도는 pH에 따라 변하는데, pH 대 $I_{\text{green}}/I_{\text{IR}}$ 의 플롯(plots)들을 pH 칼리브레이션 곡선에 나타내었다.

[169] **7. 광안정성**

[170] BH 1-3 및 BH1L의 광안정성은 프로브가 라벨링된 헬라 세포의 지정된 세 지점에서 시간에 따라 이광자 여기 형광 강도의 변화를 모니터링하면서 나타내었다(도 13). 이광자 여기 형광 강도는 한 시간 동안 거의 같은 값을

유지하면서 높은 광 안정성을 나타내었다.

[171] **8. 세포 독성**

[172] 본 발명의 이광자 형광 프로브의 헬라 세포에 대한 독성을 측정하기 위해, MTS 분석(Cell Titer 96H; Promega, Madison, WI, USA)방법을 사용하여, 도 3에 나타내었다.

[173] **9. 쥐 해마 조직의 제조 및 착색**

[174] 2주된 쥐의 해마로부터 해마 단편을 준비하였다. 관상 단편은 인공뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid, ACSF; 138.6 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 21 mM NaHCO₃, 0.6 mM NaH₂PO₄, 9.9 mM D-glucose, 1 mM CaCl₂, 및 3 mM MgCl₂) 내에서 진동 블레이드 절단기(vibrating-blade microtome)를 이용하여 400 μ m 두께로 절단하였다. 조각들을 37 °C에서 40분 동안 95% O₂ 및 5% CO₂를 내뿜는 ACSF 내에서 10 mM의 BCa1 및 20 mM의 BH1 및 BH1L로 배양시켰다. 그 후, 단편들을 ACSF로 3회 세척하고, 유리 바닥 디쉬(glass-bottomed dishes)로 이동시키고, 이를 전자현미경으로 관찰하였다. 이광자 현미경 이미지는 90-180 μ m 깊이에서 관측하였다.

[175] **시험예 1. 용해도 측정**

[176] 상기 실시예에서 제조한 이광자 형광 프로브 일정 양을 DMSO(디메틸설폭사이드, 1.0×10^{-2} M)에 용해하여 저장하였다. 상기 용액을 6.0×10^{-3} 내지 6.0×10^{-5} 로 희석하고, 버퍼 용액((0.1 M citric acid, 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂B₄O₇, 0.1 M Tris, 0.1 M KCl, pH 7.2) 3 mL가 들어있는 큐벳(cuvette)에 마이크로 주사(micro syringe)로 첨가하였다. 버퍼 용액에서 DMSO의 농도는 0.2%로 유지하였다.

[177] 도 9는 본 발명의 본 발명의 실시예 및 비교예에 따라 제조된 이광자 형광 프로브의 농도에 따른 흡수율을 나타낸 그래프이다. 상기 그래프에서 플롯(plots)은 낮은 농도에서는 선형을 나타내며, 농도가 높아질수록 하향 곡선을 나타냈다.

[178] 직선 구간의 최대점은 용해도를 의미한다. 본 발명의 실시예(BH1, BH2, BH3, BH1L) 및 비교예(P1)의 용해도는 pH 7.2 버퍼 용액에서 각각 6, 2, 10, 10 및 2 μ M이며, 이는 세포 염색을 하기에 충분한 값이다.

[179] **시험예 2. pH, pKa 및 광물리적 특성 평가**

[180] 실시예 및 비교예에서 제조한 이광자 형광 프로브의 pKa 및 광물리적 실험 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 모든 측정은 표준 버퍼 용액(0.1 M citric acid, 0.1 M KH₂PO₄, 0.1 M Na₂B₄O₇, 0.1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane, 0.1 M KCl)에서 수행하였다.

[181] 표 1

[Table 1]

Probe	pH	$\lambda_{max}^{(1)} (10^{-4} \epsilon)^b$	$\lambda_{max}^{fl}{}^c$	Φ^d	pK_a^e	$\lambda_{max}^{(2)}{}^f$	δ^g	$\Phi\delta^h$
BH1	pH 3.5	368(1.94)	494	0.76	5.91 (5.89)	750	185	140
	pH 7.2	337(2.53)	455	1.00		740	40	40
	pH 10	337(2.76)	453	1.00		740	35	35
BH2	pH 3.5	370(1.96)	499	0.76	4.92 (4.88)	750	200	155
	pH 7.2	339(2.84)	457	1.00		740	50	50
	pH 10	338(2.84)	457	1.00		740	45	45
BH3	pH 3.5	365(2.25)	488	0.79	6.11 (6.10)	750	80	65
	pH 7.2	345(2.98)	451	0.93		750	20	20
	pH 10	345(2.96)	448	0.94		750	20	20
BH1L	pH 3.5	368(2.98)	490	0.72	5.82 (5.86)	750	390	280
	pH 7.2	341(3.03)	448	1.00		750	95	95
	pH 10	341(3.05)	446	1.00		750	80	80
P1	pH 3.5	395(1.61)	nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ
	pH 7.2	333(1.52)	485	0.008		nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ
	pH 10	330(1.67)	492	0.009		nd ⁱ	nd ⁱ	nd ⁱ

[182] b: 일광자 흡수 스펙트럼 최대 파장 (단위: nm).

[183] c: 일광자 방출 스펙트럼 최대 파장 (단위: nm).

[184] d: 형광 양자 효율(Fluorescence quantum yield).

[185] e: 일광자 모드에서 측정한 pKa. 괄호 안은 이광자 모드에서 측정한 pKa.

[186] f: 이광자 흡수 스펙트럼 최대 파장 (단위: nm).

[187] g: $10^{-50} \text{ cm}^4\text{s/photon}$ 에서의 광자당 피크 이광자 단면적 (단위: GM).

[188] h: 이광자 동작 단면적(two photon action cross-section) (단위: $10^{-50} \text{ cm}^4\text{s}$, 오차 범위: $\pm 15\%$).

[189] (1) 일광자 모드에서의 광물리적 특성

[190] pH 7.2에서, BH1은 337 nm에서 최대 흡수를, 118 nm에서 최대 형광 방출을 나타내 스톡스 이동(Stokes shift)이 118 nm로 비교적 큰 값을 나타냈다(표 1). pH 10에서도 거의 유사한 결과가 나타났다. 반면, pH가 7.2에서 3.5로 변화하면서, BH1의 최대 흡수 및 최대 형광 방출은 더 긴 파장인 368, 494 nm로 이동하였다(도 1a 및 표 1). 이와 같은 적색 이동은 벤즈이미다졸기의 질소가 양이온화되기 때문인 것으로 보인다. 따라서, 분자 전하 이동(intramolecular charge transfer; ICT)을 강화시킨다. 이는 BH1 및 BH1-H⁺의 형광 양자 효율(Φ)이 각각 1 및 0.76으로 가장 큰 값을 가지며, 생체 버퍼에서 pH 프로브로서 적합한 것임을 의미한다. 또한, λ_{if} 인 455 nm 및 494 nm 사이에서 등방사성 점(isoemission point, 474 nm)이 관측되었다. 이와 유사한 결과가 BH2 및 BH3에서도 나타났다(도 10 및 표 1). 예상대로, BH1L의 스펙트럼 역시 BH1과 거의 동일하게 나타났다(도 1b 및 표 1). 반면, P1은 pH 2에서 무시할만한 형광 양자 효율($\Phi=0.008$)이 관측되었고, pH 3.5에서는 형광이 나타나지 않았다. 반면, 최대 흡수(λ_{abs}

)는 점진적으로 333 nm에서 395 nm로 이동하였다(표 1 및 도 11). 따라서, BH1 내지 BH3은 pH가 중성에서 산성으로 변화하면서 청색에서 녹색으로의 방출 색 변화 및 생체 버퍼에서 가장 큰 형광 양자 효율을 보였다.

[191] (2) pH 및 pKa

[192] BH1 내지 3의 짝산의 pKa는 등방사성 점(I_{iso})과 500-550 nm(I_{green})의 방출비(emission; I_{green}/I_{iso})의 적정 곡선으로부터 구하였다. pKa 4.92-6.11 범위는 산성 영역을 감지할 수 있음을 의미한다. pKa 이동은 이온화 부위의 전자 받개(electron withdrawing, BH2에서 F) 또는 전자 주개(electron donating, BH3에서 OMe) 때문이다. 또한, BH1L의 pKa 값은 BH1과 거의 동일한 것으로 나타났다.

[193] (3) 이광자 모드에서의 광물리적 특성

[194] 본 발명의 이광자 형광 프로브의 이광자 모드에서의 pH 측정능력을 평가하였다. pH 7.2 및 3.5에서 BH1의 이광자 형광 스펙트럼($\Phi\delta$)는 각각 40 및 140 GM을 나타냈다(표 1 및 도 2a). 전자 끄는 기를 가지고 있는 BH1-H⁺의 최대 이광자 형광 스펙트럼($\Phi\delta_{max}$)은 BH1 보다 3.5 배 더 크므로 전자 받개 및 전자 주개 사이에서 분자전하이동(ICT)을 강화할 수 있다. 이와 유사한 결과가 BH2 및 이의 양이온에서도 나타났으며, BH3은 BH1 보다 약 2배 더 작은 최대 $\Phi\delta$ 를 나타냈다(표 1 및 도 12). 특히, BH1L과 이의 양이온은 BH1 보다 2배 더 큰 최대 $\Phi\delta$ 를 나타냈다(표 1 및 도 12). 아마도 이는 주변에 치환된 작용기 때문인 것으로 보인다. 또한, pH에 대한 BH1의 이광자 여기 형광(TPEF) 스펙트럼의 특성은 일광자 모드의 결과와 유사하게 나타났다(표 1 및 도 2의b,c) 반면, 이광자 형광 방출 비(I_{green}/I_{iso})는 pH 값이 7.2에서 3.5로 변화함에 따라 10배 정도 증가하였고, 이 값은 일광자 모드에서 얻은 값 보다 2배 이상 높다. BH1-H⁺의 $\Phi\delta_{max}$ 이 BH1 보다 3배 크기 때문에(도 2a), 이와 같은 결과는 일광자 모드와 비교해서 500-550 nm(I_{iso})에서 더 큰 이광자 여기 형광 강화에 기여할 수 있음을 나타낸다(도 1a 및 2b). 유사한 결과가 BH2, BH3 및 BH1L에서도 나타났다(도 10).

[195] 시험예 3. 세포 독성 평가

[196] BH1을 사용하여 TPM으로 세포 내 pH를 측정하였다. 740 nm 이광자 여기(TP excitation)에서 이온투과담체(ionophore)로 처리한 헬라 세포에 BH1을 주입하였다. 그 결과 각각 λ_{ex} 값이 445 및 490 nm에서 이광자 방출 형광 스펙트럼을 방출했다. 이 값은 버퍼와 이동 값이 10 nm 차 내외로서 거의 일치한다. BH1의 방출 스펙트럼이 용매 극성 증가에 따라 점진적인 이동을 나타내는데 이는 본 발명의 프로브가 세포 내가 버퍼 내에서 보다 더 균질하고 소수성임을 의미한다. 상기 가변색 이미징(I_{green}/I_{IR}) 결과는 내부 기준 창(internal reference window)인 440-460 nm(I_{IR}) 및 pH 인식 창(pH recognition window)인 500-550 nm(I_{green})를 이용하여 구하였다(도 4a). 또한, BH1으로 처리한 헬라 세포의 이미지화 값(I_{green}/I_{IR})은 세포 내 여러 구획에 걸쳐 pH 5.6-7.4 범위에서 나타났다(도 4d 및 S7). 도 4b에 나타난 바와 같이, 그래프의 기울기가 거의 선형에 가까우며 이는 pH 4-7 영역에서 가변색 이미징(I_{green}/I_{IR})를 이용하여 pH를

정량화할 수 있는 것을 의미한다.

[197] 실시예 5. 리소솜 내 pH 이미지화

[198] 리소솜 표적 이광자 형광 프로브인 BH1L을 이용하여 리소솜 내 pH를 측정하였다. BH1L이 리소솜 내 특정 부위에 위치하는지 알아보기 위해, 헬라(HELA) 세포에 각각 BH1L 및 리소솜 일광자 형광 프로브로 알려진 Lysotracker Red DND-99 (LTR)를 처리하였다. 도 5는 이광자 형광 현미경 이미지(도 5a) 및 일광자 형광 현미경 이미지(도 5b) 및 각 이미지를 겹친 사진(도 5c)이다(피어슨 colocalization 계수: 0.095). 또한, 이온투과담체로 처리한 헬라 세포에 pH 8 및 3.5에서 BH1L을 주입하여 이미지화한 결과, λ_{fl} 이 445 및 485 nm에서 이광자 여기 형광 스펙트럼이 방출되었다(도 6a). 이는 버퍼에서 측정한 결과와 거의 유사하다(도 10). 따라서 이온투과담체 및 BH1L로 처리한 헬라 세포의 pKa는 버퍼에서와 비슷한 5.63 ± 0.08 임을 알 수 있다.

[199] BH1L로 처리한 헬라 세포의 가변색 이미징(I_{green}/I_{IR})은 리소솜 내에서 다양한 pH 값을 나타낸다(도 6). 이는 BH1L을 이용하여 pH 4.6-5.9 범위에서 각 구역에서의 pH를 측정할 수 있음을 의미한다(도 16).

[200] 또한, 실시간으로 리소솜 내의 pH 변화를 관측하였다. 리소솜 내 pH를 서서히 증가시키기 위해 약염기인 NH_4Cl 5 mL를 첨가하였고, pH 값이 올라가기 시작하면서 4분 내에 pH 6.5-6.7 까지 도달하였다(도 6g 및 S9). 가장 특징적인 것은 0.1 pH마다 작은 파동이 눈에 띄게 관찰되었다(도 17). 이는 BH1L이 살아있는 세포에서 리소솜 내 pH 값을 측정할 수 있음을 의미한다.

[201] 실시예 6. 쥐의 뇌 조직 pH 이미지화

[202] 본 발명의 이광자 형광 프로브를 이용하여 학습과 기억을 담당하는 부분인 쥐의 해마 돌기의 미세 박편을 모니터링하였다. 뇌 조직의 구조는 비균질하기 때문에 90-180 μm 깊이에서 120개의 가변색 이미징(I_{green}/I_{IR})을 측정하였다(도 18). 조직 내 세포의 영상화에 있어서 본 발명의 BH1L이 갖는 유용성을 증명하기 위하여, 쥐의 해마상 돌기의 미세박편을 모니터링하였다.

[203] 산성 pH 영역인 CA1, CA3 및 DG(dentate gyrus) 구역에서 전체적인 pH 분포가 나타났다(도 7a). 특히 신경과 유전자 발현을 담당하는 세포 유형 및 기능면에서 DG 구역과 CA 구역의 구별이 잘 나타났다. DG에서의 산성 pH는 상기 구역에서 세포 대사과정과 관련이 있는 것으로 보이며, 이는 생물학적 기능을 조사하기 위한 연구의 필요성을 나타낸다. 또한, 고배율의 이미지는 투과깊이 약 100 μm 에서 DG 내 각 세포의 산성 부분을 명확히 나타낼 수 있다(도 7b 및 S11). 이와 비슷한 결과가 BH1로 처리한 조직에서 관측되었다(도 7c,d).

[204]

산업상 이용가능성

[205] 따라서, 이상의 실험 결과들은 본 발명의 이광자 형광 프로브가 이광자 현미경을 이용하여 살아있는 세포 및 조직에서 세포 내 산성 구획의 pH 값을

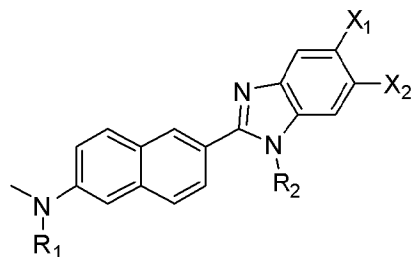
명확하게 측정할 수 있음을 나타낸다.

청구범위

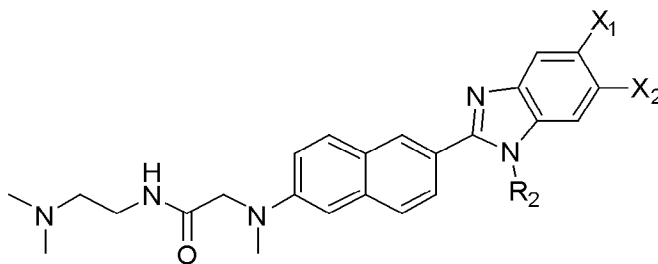
[청구항 1]

하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브:

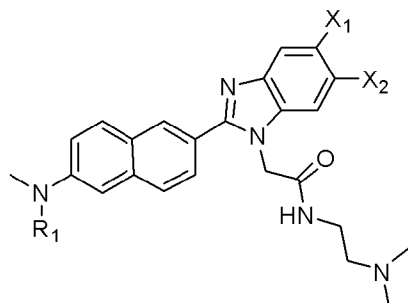
[화학식 1]



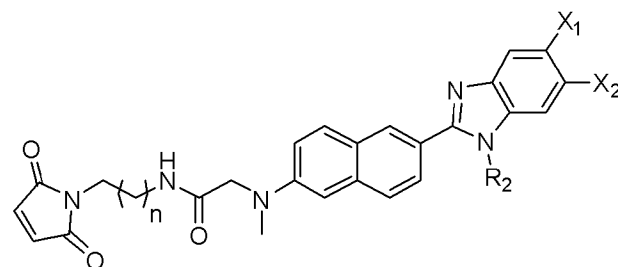
[화학식 2]



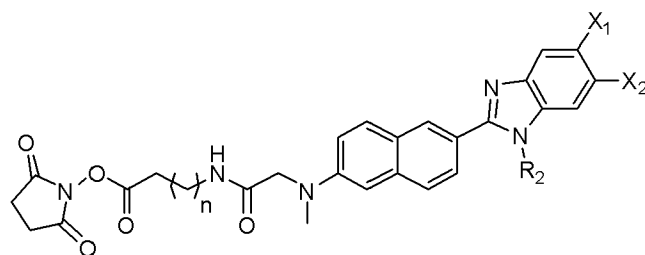
[화학식 3]



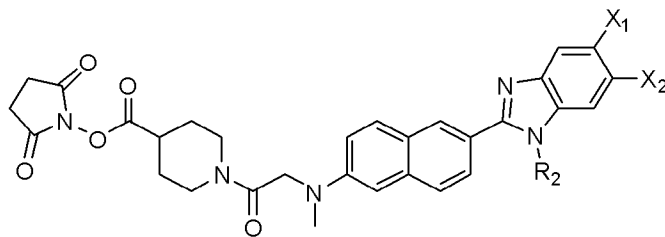
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이고, n 은 0-10의 정수이다.

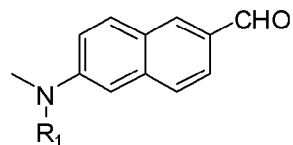
[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 이광자 형광 프로브는 세포, 세포 소기관 또는 생체 조직의 pH 4-7 영역에서 수소 이온과 반응하여 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 프로브.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 화학식 2 및 화학식 3으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 엔도솜 내 또는 리소솜 내 수소 이온과 반응하여 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 프로브.

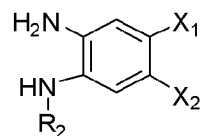
[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 화학식 4 내지 화학식 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브는 올리고머 또는 단백질의 수소 이온과 반응하여 형광을 나타내는 것을 특징으로 하는 이광자 형광 프로브.

[청구항 5] 하기 화학식 A로 표시되는 화합물, 하기 화학식 B로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔술폰산 일수화물을 혼합하여 반응시켜 제조되는 하기 화학식 1로 표시되는 이광자 형광 프로브의 제조방법:

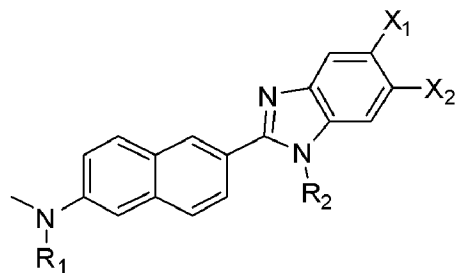
[화학식 A]



[화학식 B]



[화학식 1]



여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이다.

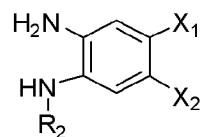
[청구항 6]

(a) 하기 화학식 B로 표시되는 화합물, 하기 화학식 C로 표시되는 화합물 및 p-톨루엔술폰산 일수화물을 혼합하여 반응시켜 하기 화학식 D로 표시되는 화합물을 제조하는 단계;

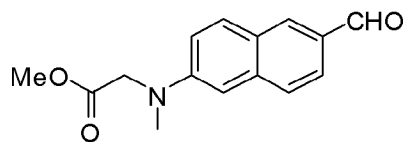
(b) 상기 (a) 단계의 화학식 D로 표시되는 화합물과 LiOH 수용액을 혼합하여 반응시켜 하기 화학식 E로 표시되는 화합물을 제조하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 화학식 E로 표시되는 화합물과 N,N-다이메틸에틸렌디아민을 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는 하기 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법:

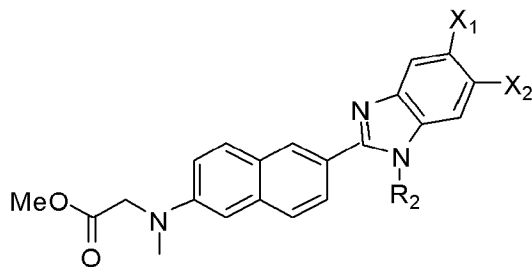
[화학식 B]



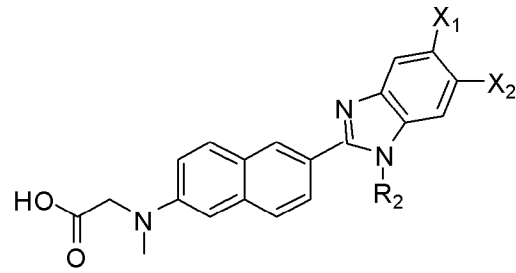
[화학식 C]



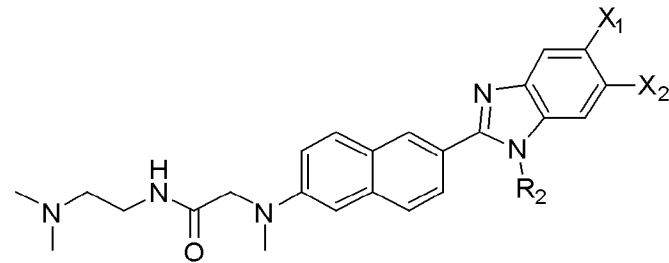
[화학식 D]



[화학식 E]



[화학식 2]

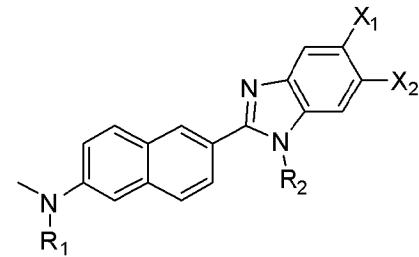


여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_2 는 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이다.

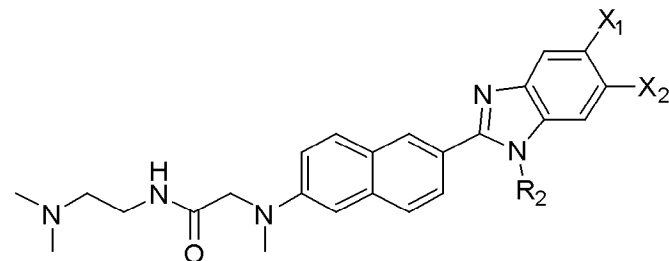
[청구항 7]

하기 화학식 1 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브 중 어느 하나를 이용하여 이광자 형광 현미경을 통해 세포 내 pH를 이미지화하는 방법:

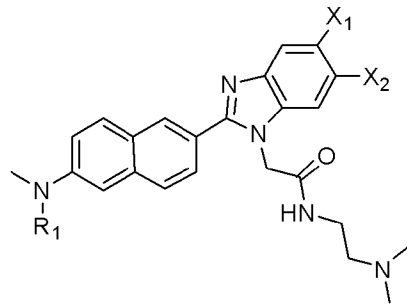
[화학식 1]



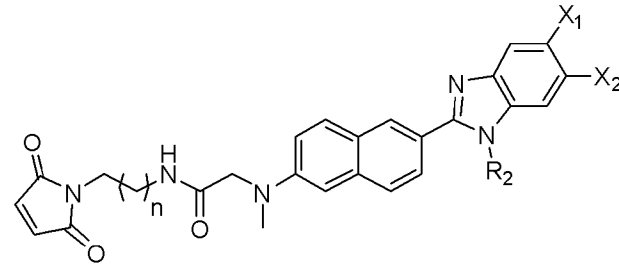
[화학식 2]



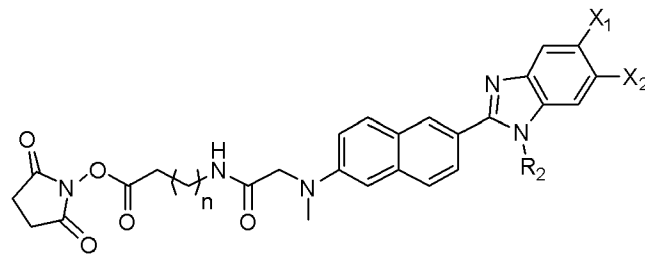
[화학식 3]



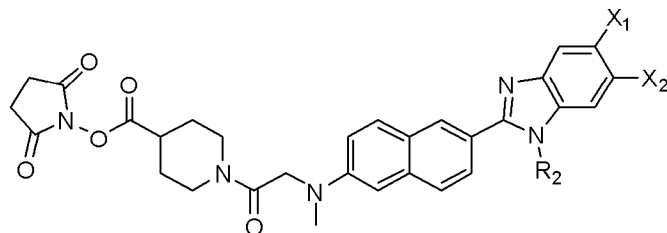
[화학식 4]



[화학식 5]



[화학식 6]



여기서, X_1 및 X_2 는 각각 독립적으로 H, F, Cl, Br, OCH_3 , OH, NH_2 , $N(CH_3)_2$, $NHCH_3$, NCS, 또는 CO_2H 이고, R_1 및 R_2 는 각각 독립적으로 H, CH_3 , $CH_2(CH_2)_nCH_3$, $CH_2(CH_2)_nCO_2H$, $CH_2(CH_2)_nOH$ 또는 $CH_2(CH_2)_nSO_3H$ 이고, n 은 0-10의 정수이다.

[청구항 8]

제7항에 있어서, 상기 이미지화의 깊이는 100-200 μm 인 것을 특징으로 하는 세포 내 pH를 이미지화하는 방법.

[청구항 9]

제7항에 있어서, 상기 세포는 pH 4-7의 생세포, 세포소기관 또는 세포 조직인 것을 특징으로 하는 세포 내 pH를 이미지화하는 방법.

[청구항 10]

제9항에 있어서, 상기 세포소기관은 엔도솜 또는 리소솜인 것을 특징으로 하는 세포 내 pH를 이미지화하는 방법.

[청구항 11]

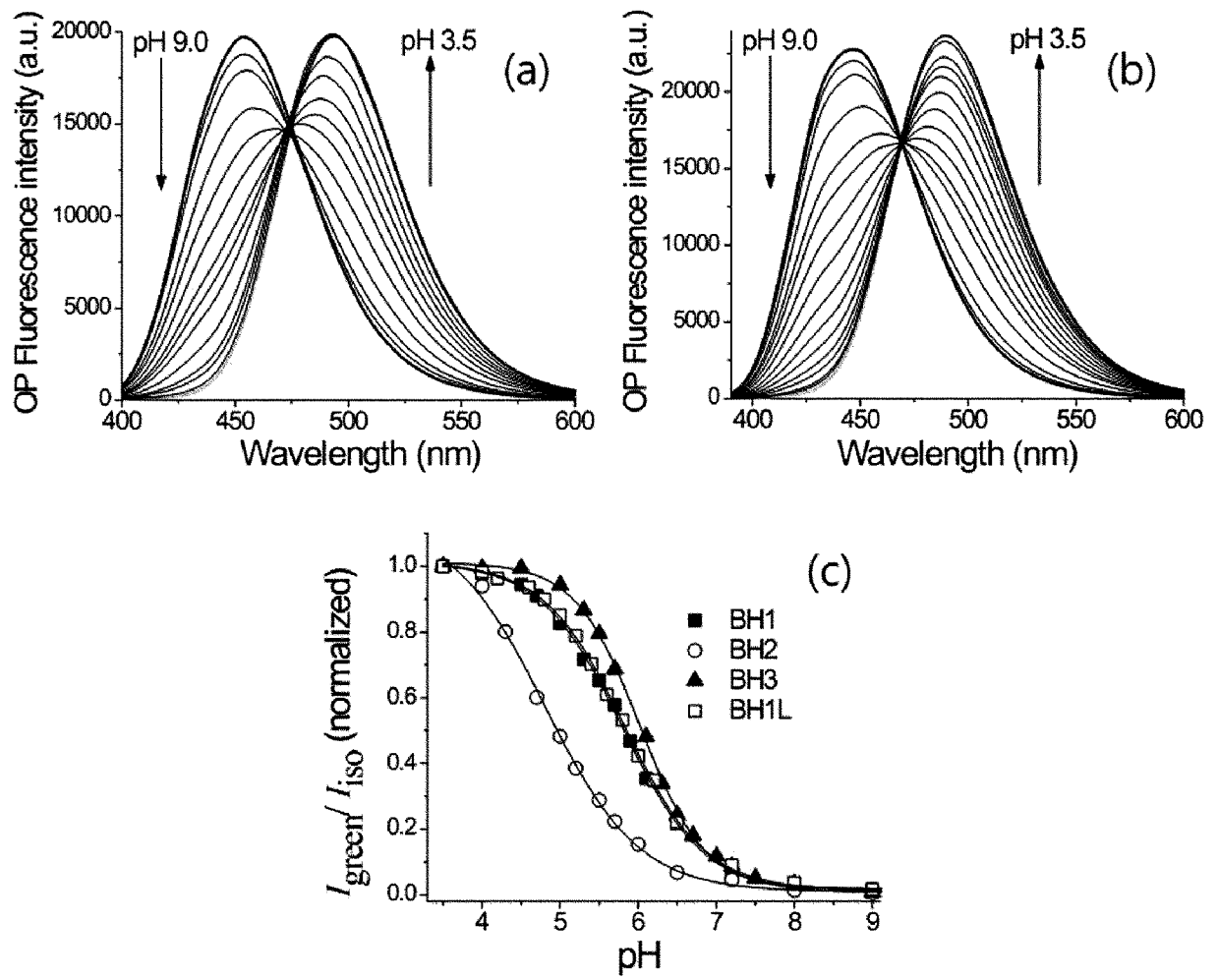
제10항에 있어서, 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는

이광자 형광 프로브를 이용하는 것을 특징으로 하는 세포 내 pH를 이미지화하는 방법.

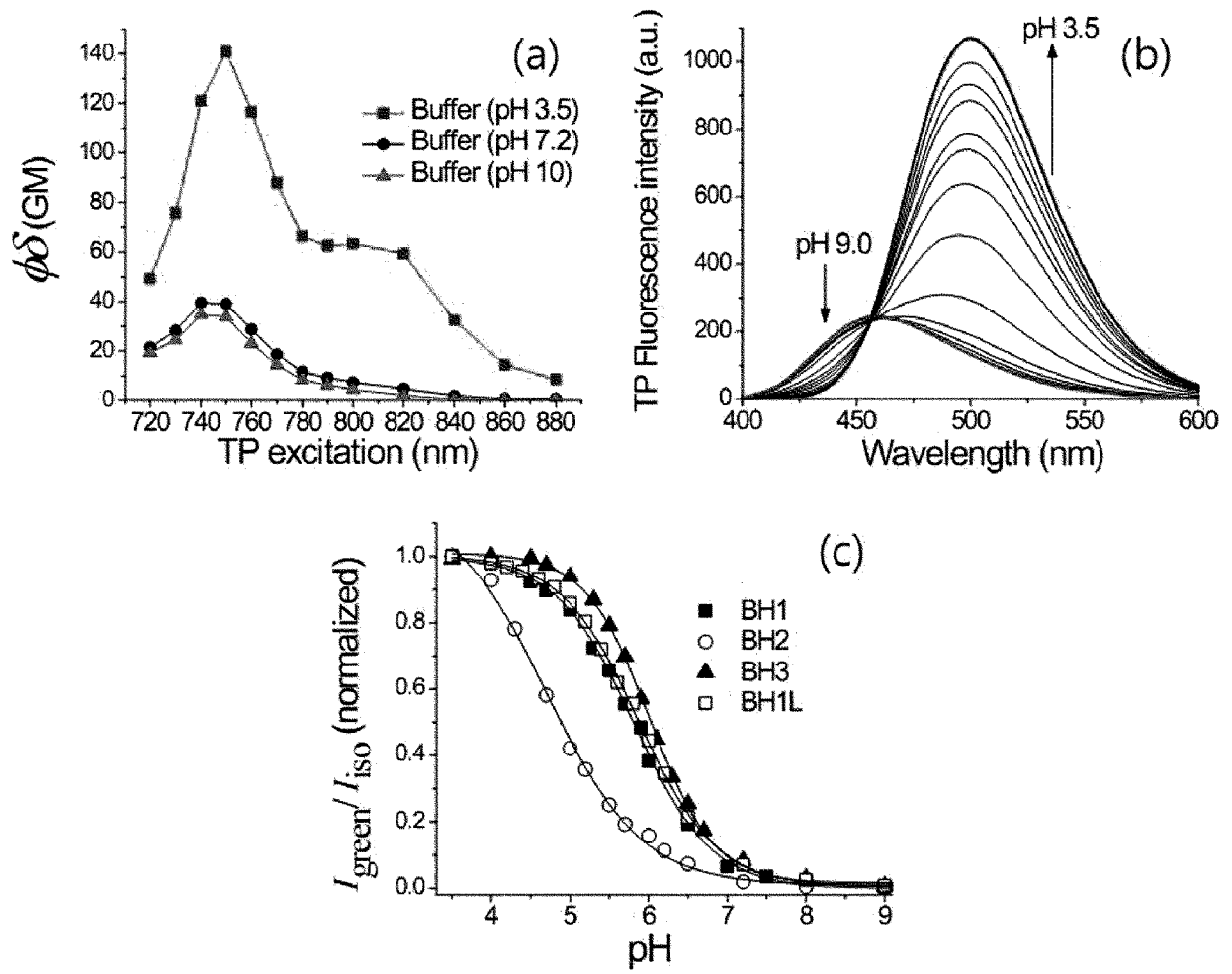
[청구항 12]

제7항에 있어서, 상기 화학식 4 내지 6으로 표시되는 이광자 형광 프로브 중 어느 하나를 이용하여 올리고머 또는 단백질 포함하는 세포 내 pH를 이미지화하는 방법.

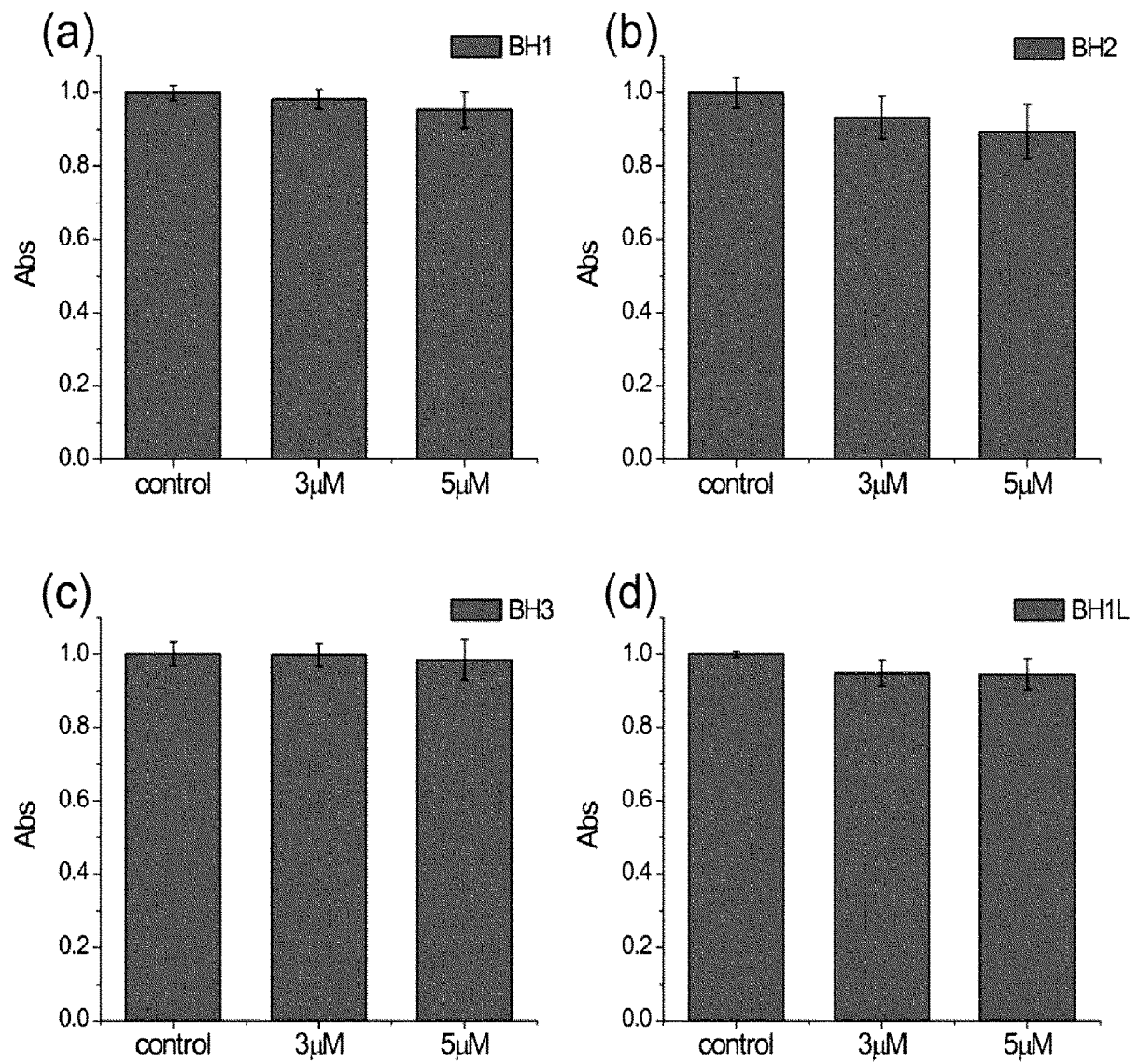
[Fig. 1]



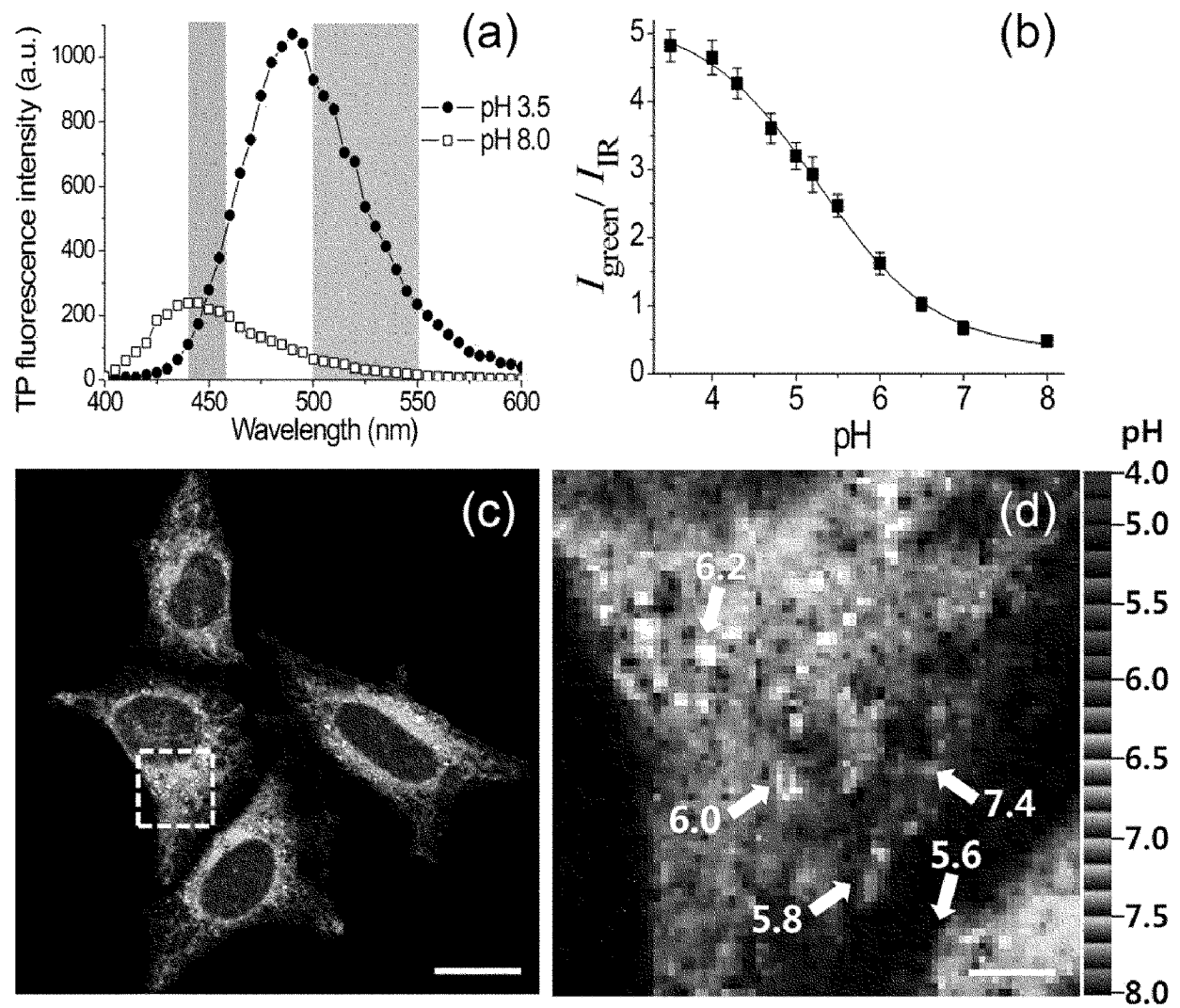
[Fig. 2]



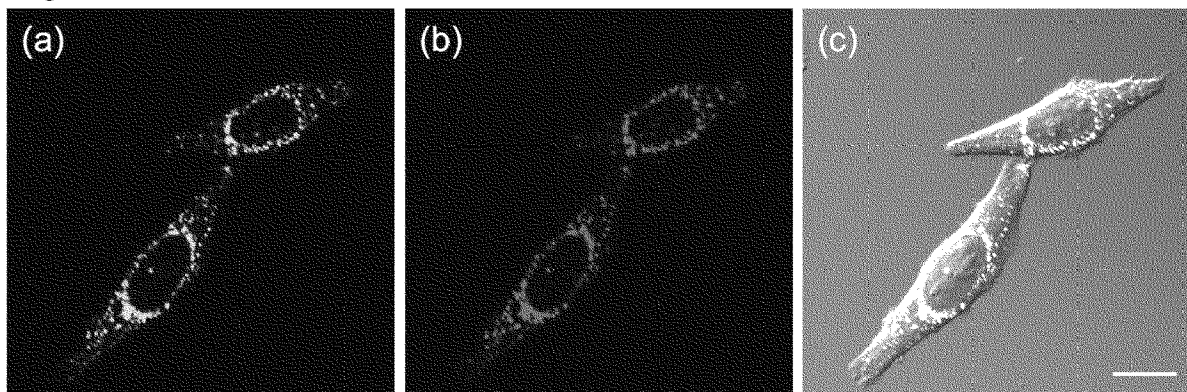
[Fig. 3]



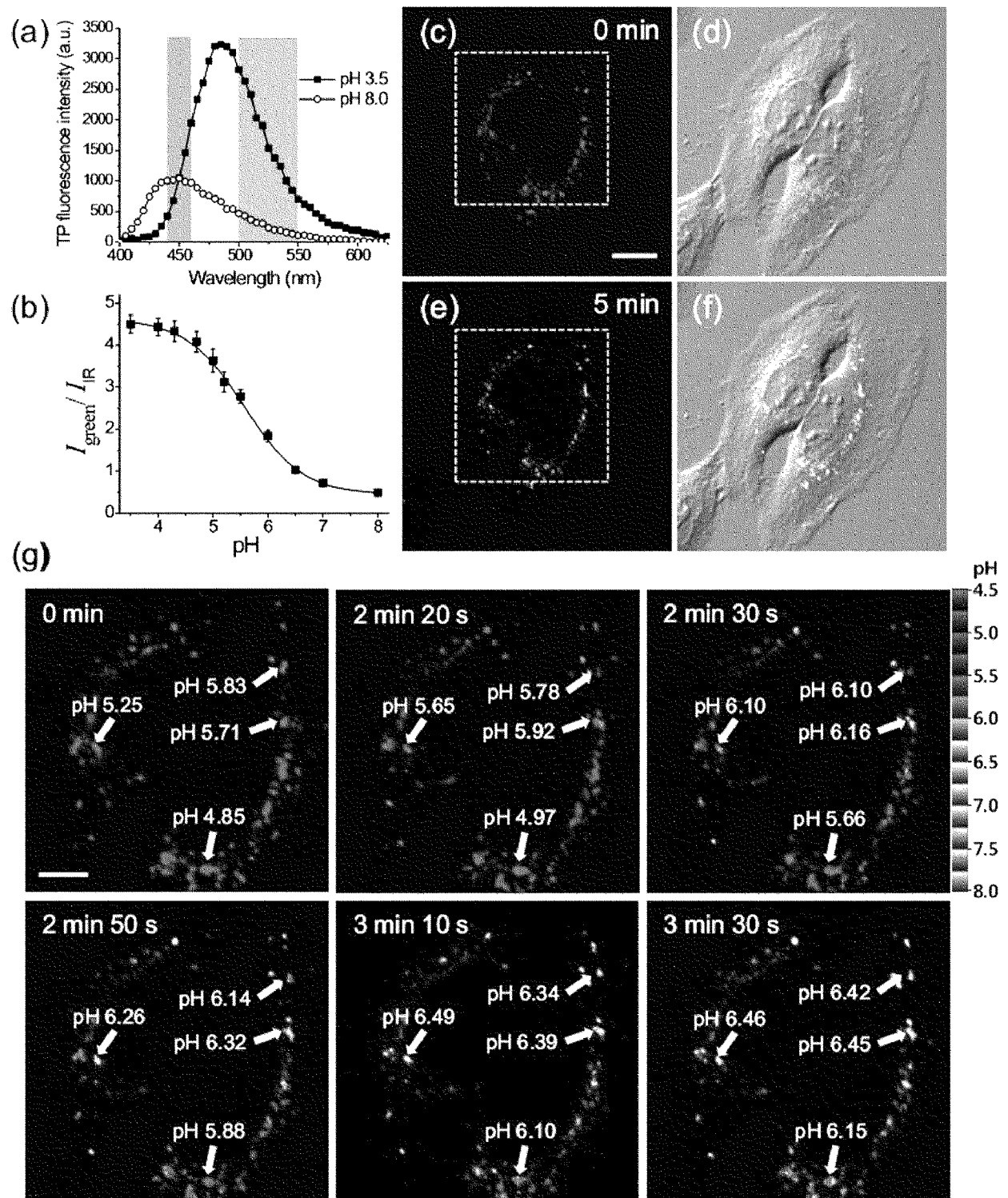
[Fig. 4]



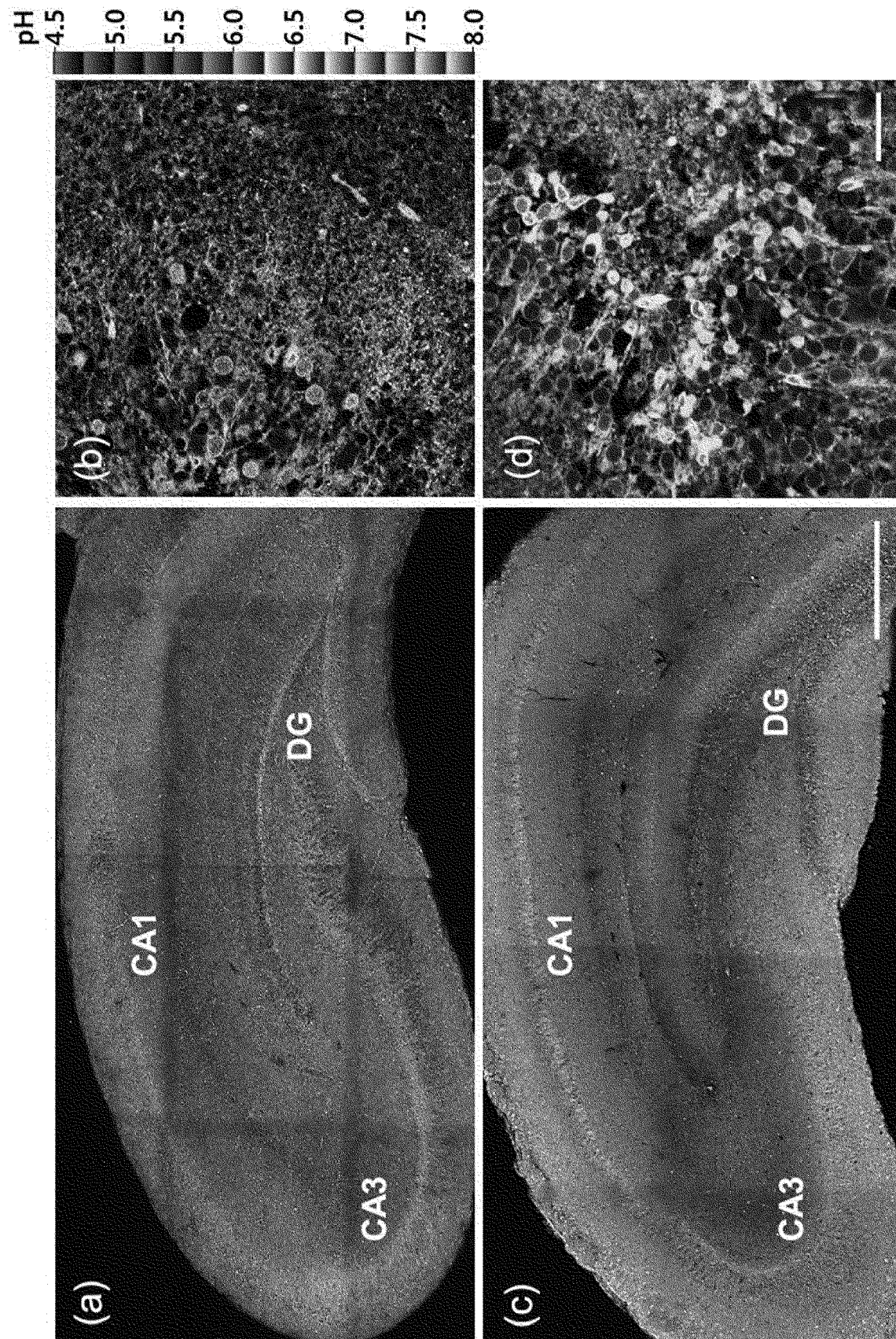
[Fig. 5]



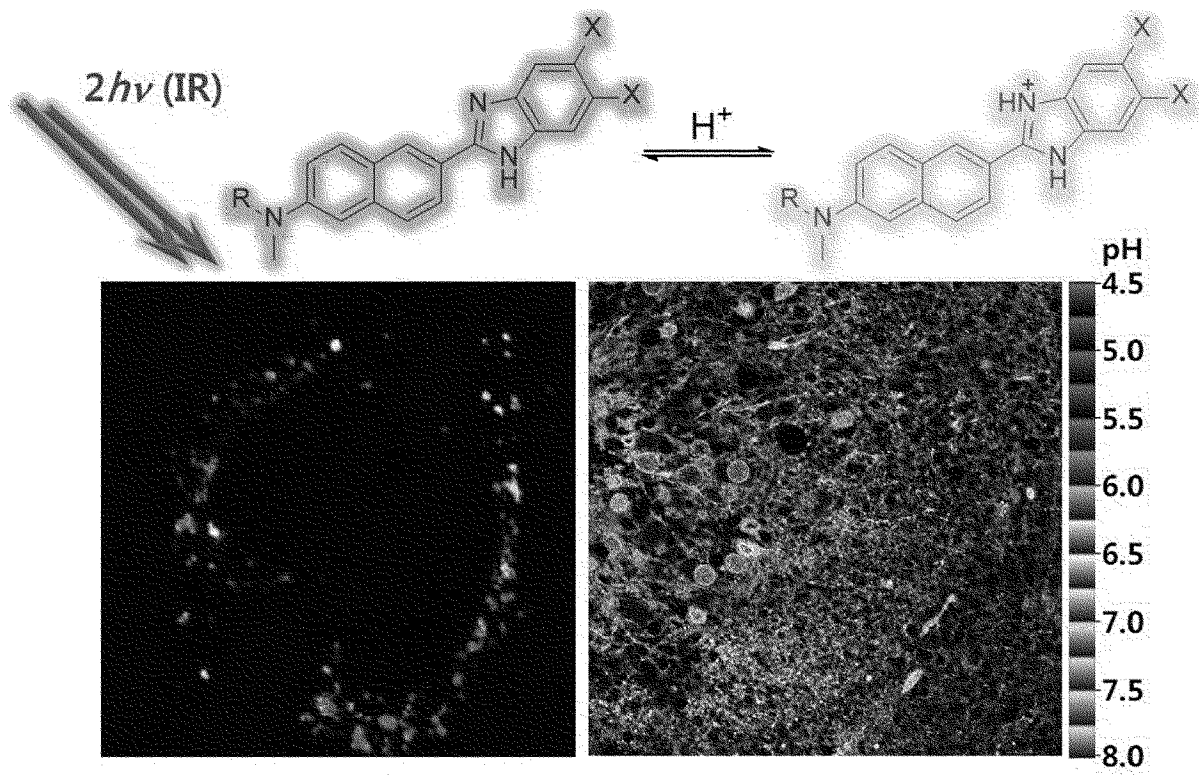
[Fig. 6]



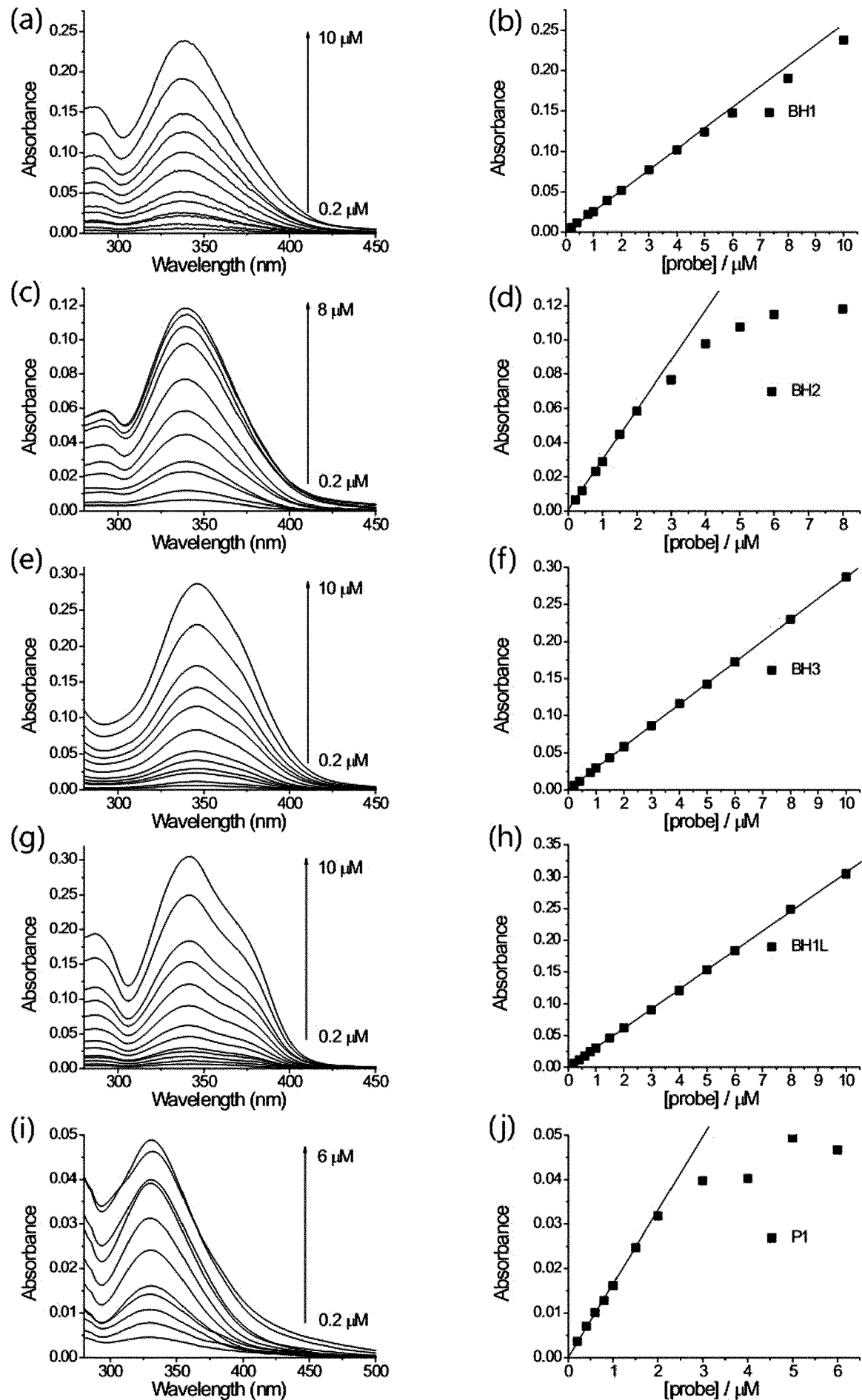
[Fig. 7]



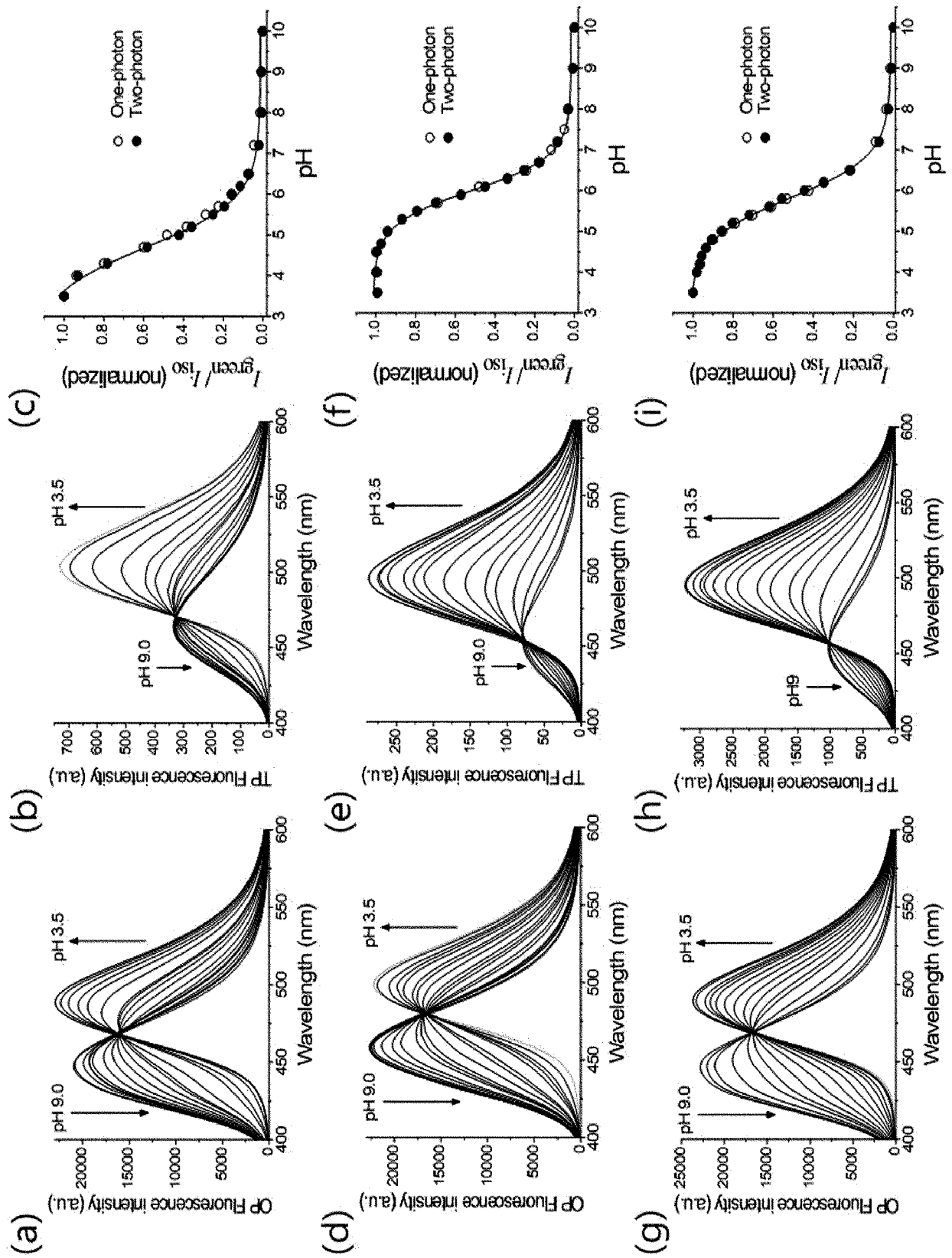
[Fig. 8]



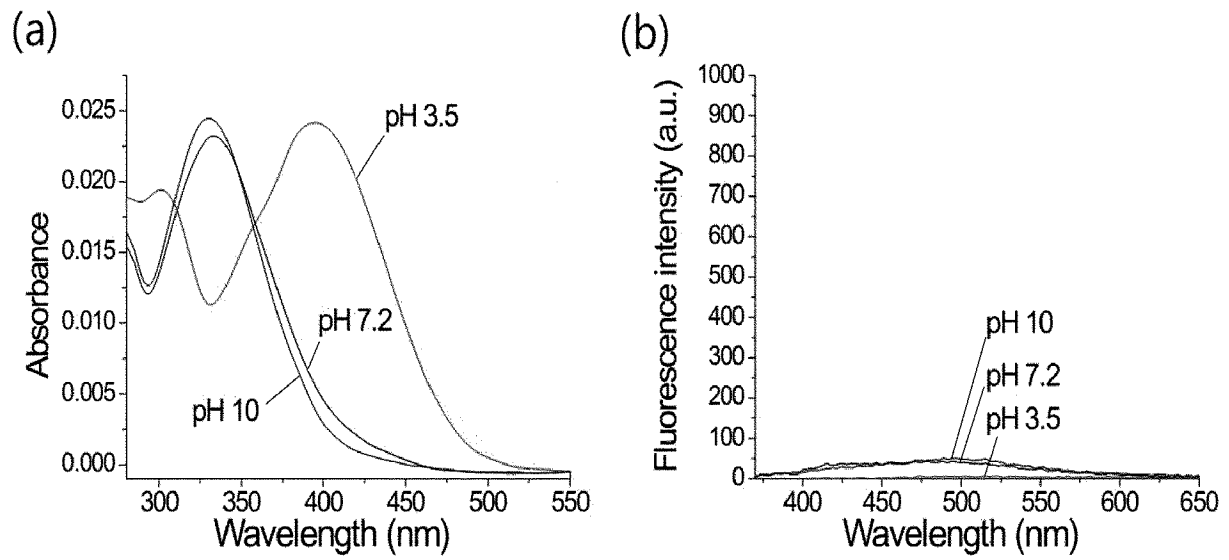
[Fig. 9]



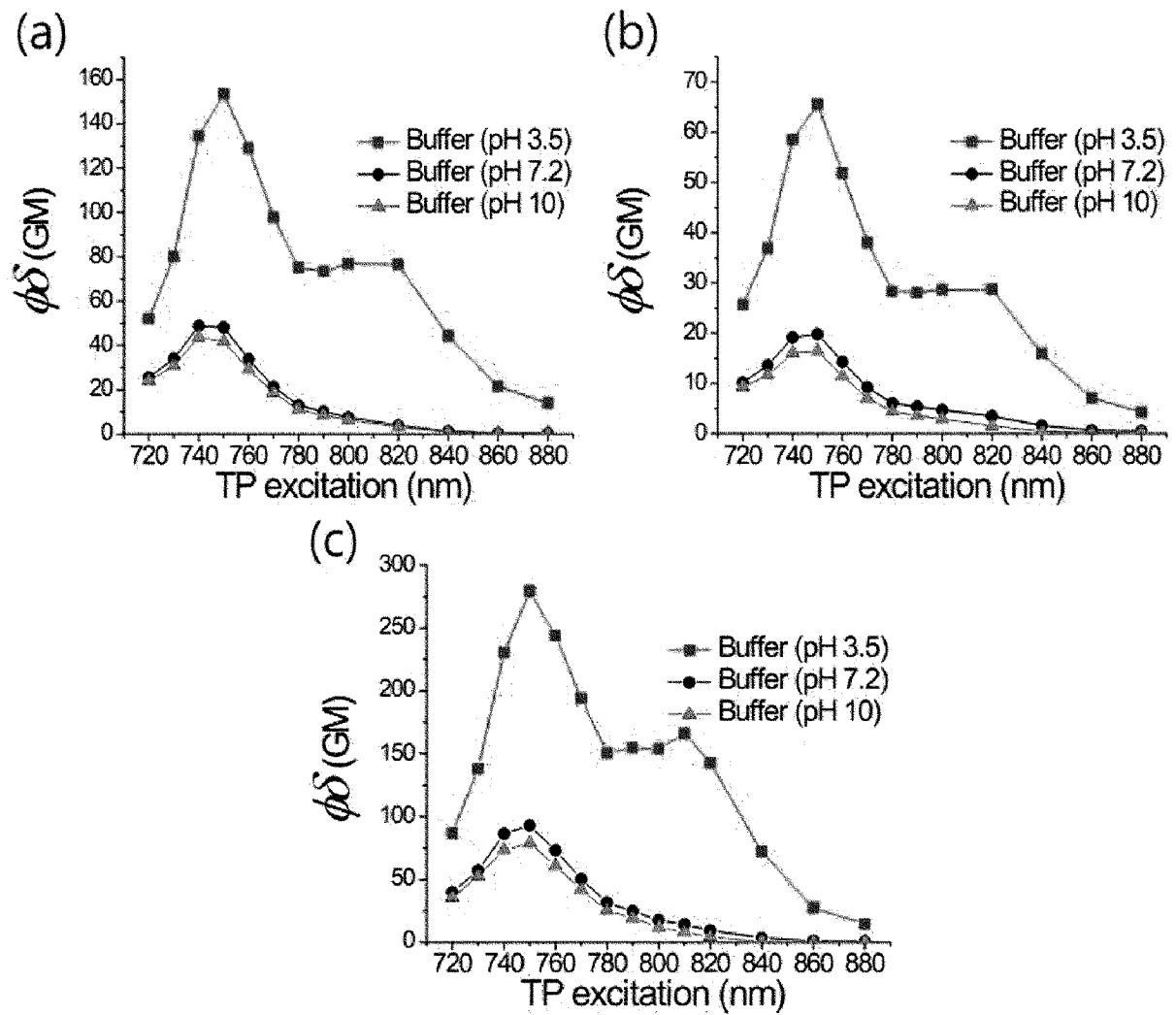
[Fig. 10]



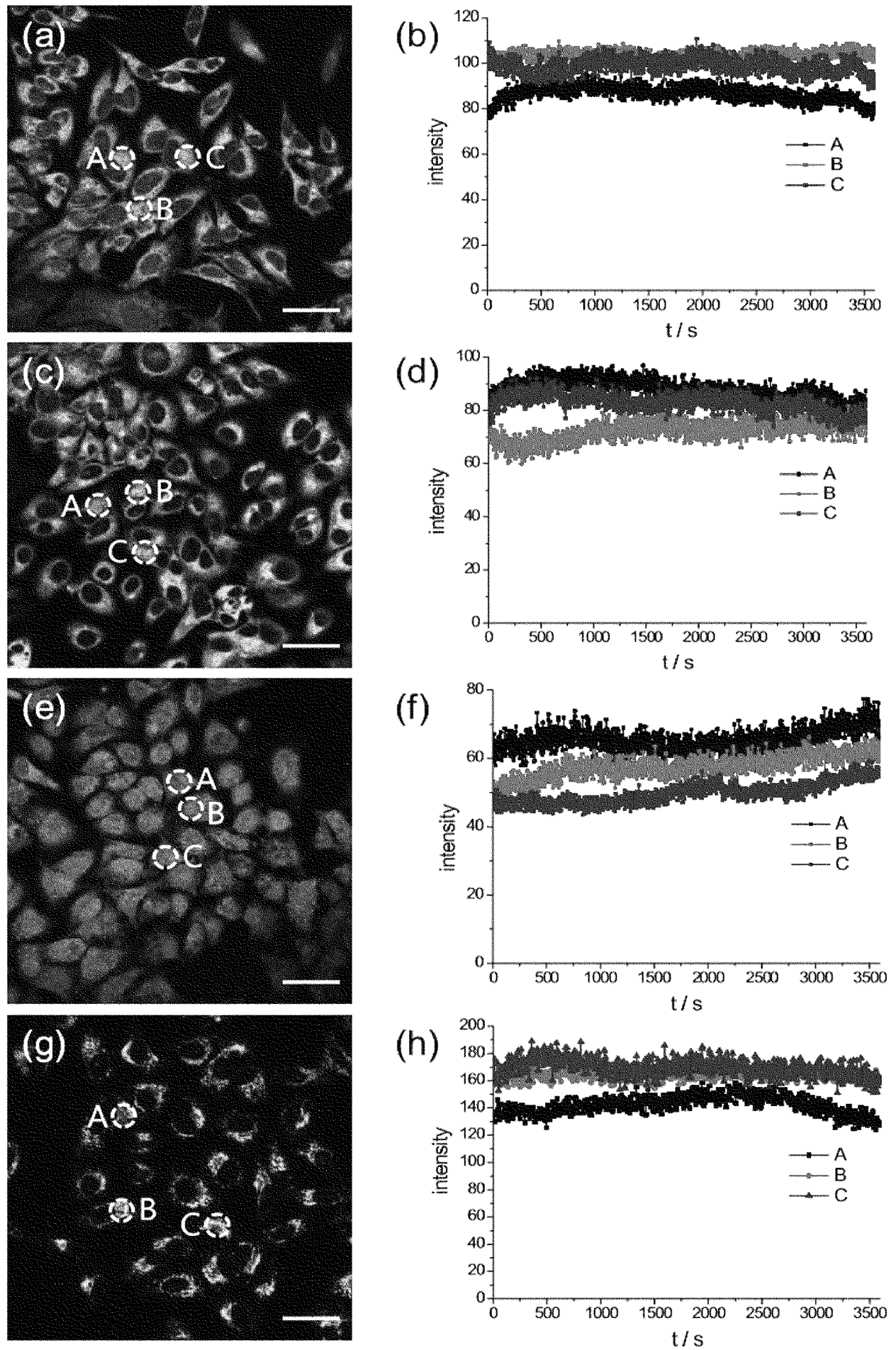
[Fig. 11]



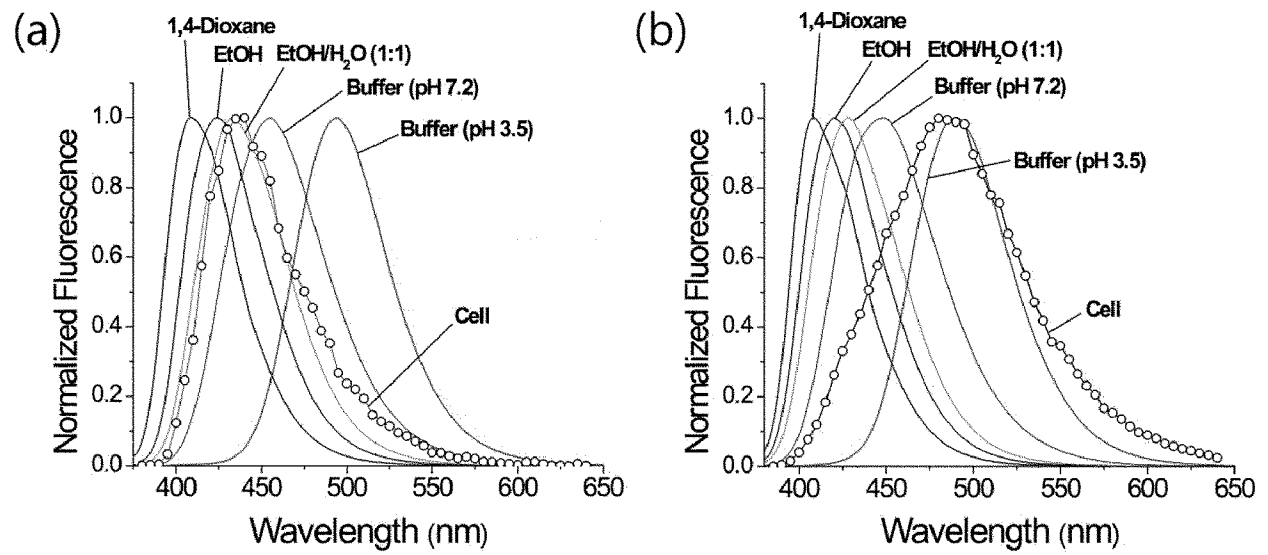
[Fig. 12]



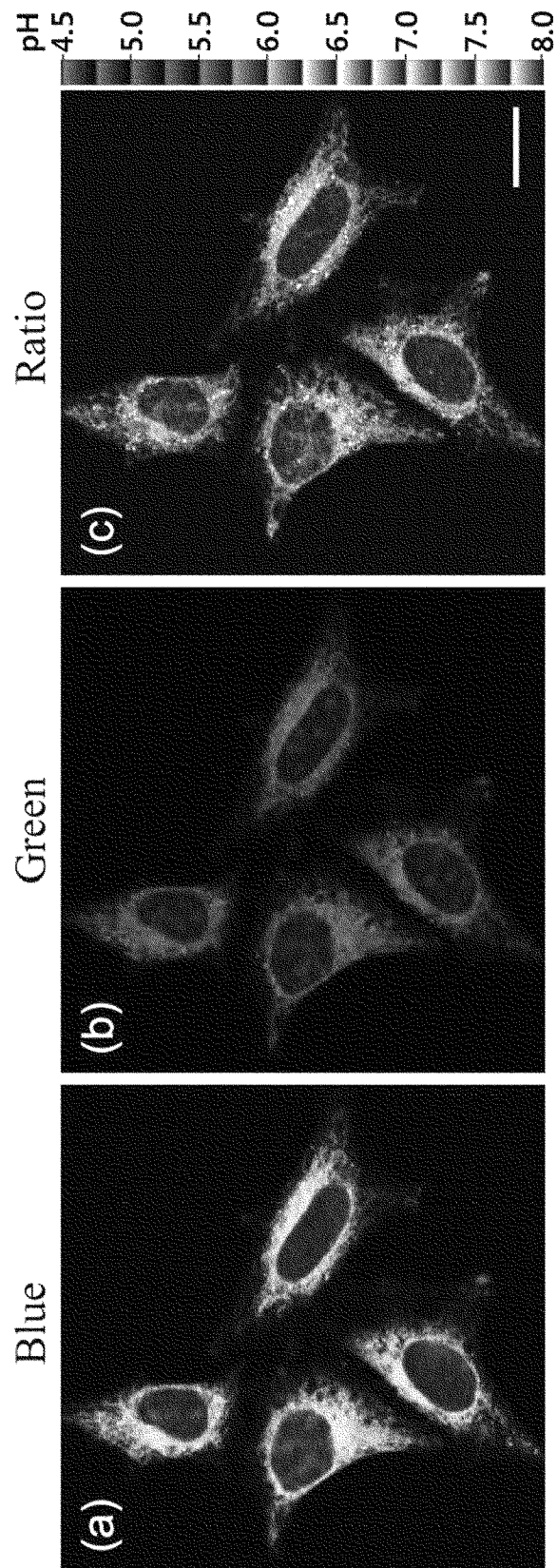
[Fig. 13]



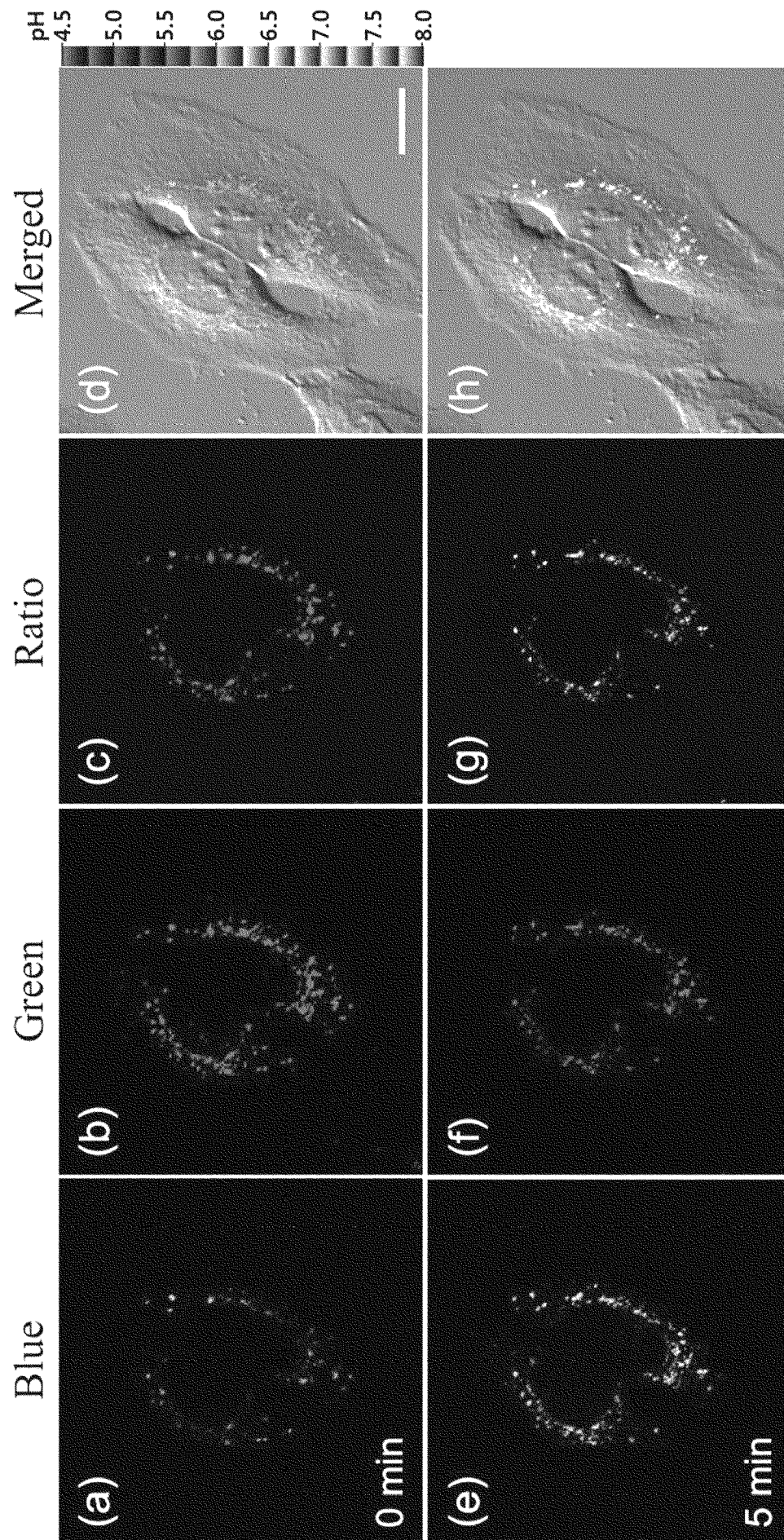
[Fig. 14]



[Fig. 15]

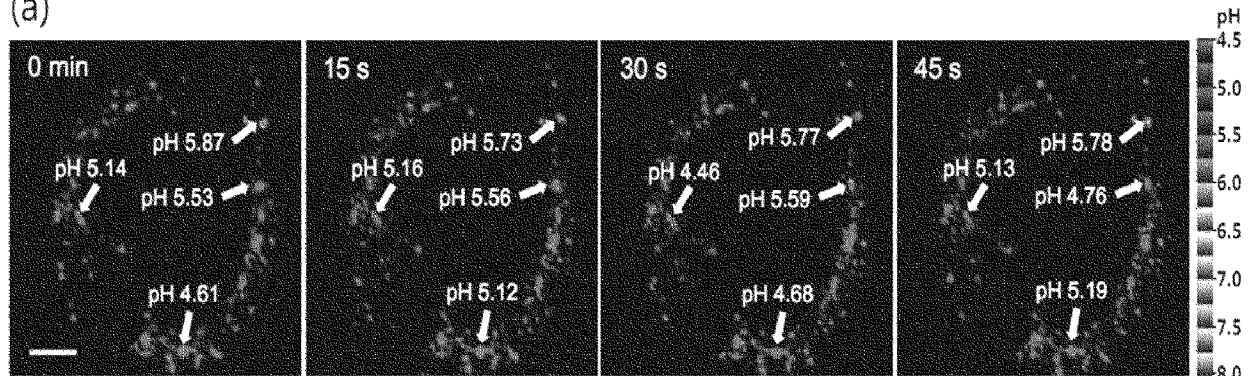


[Fig. 16]

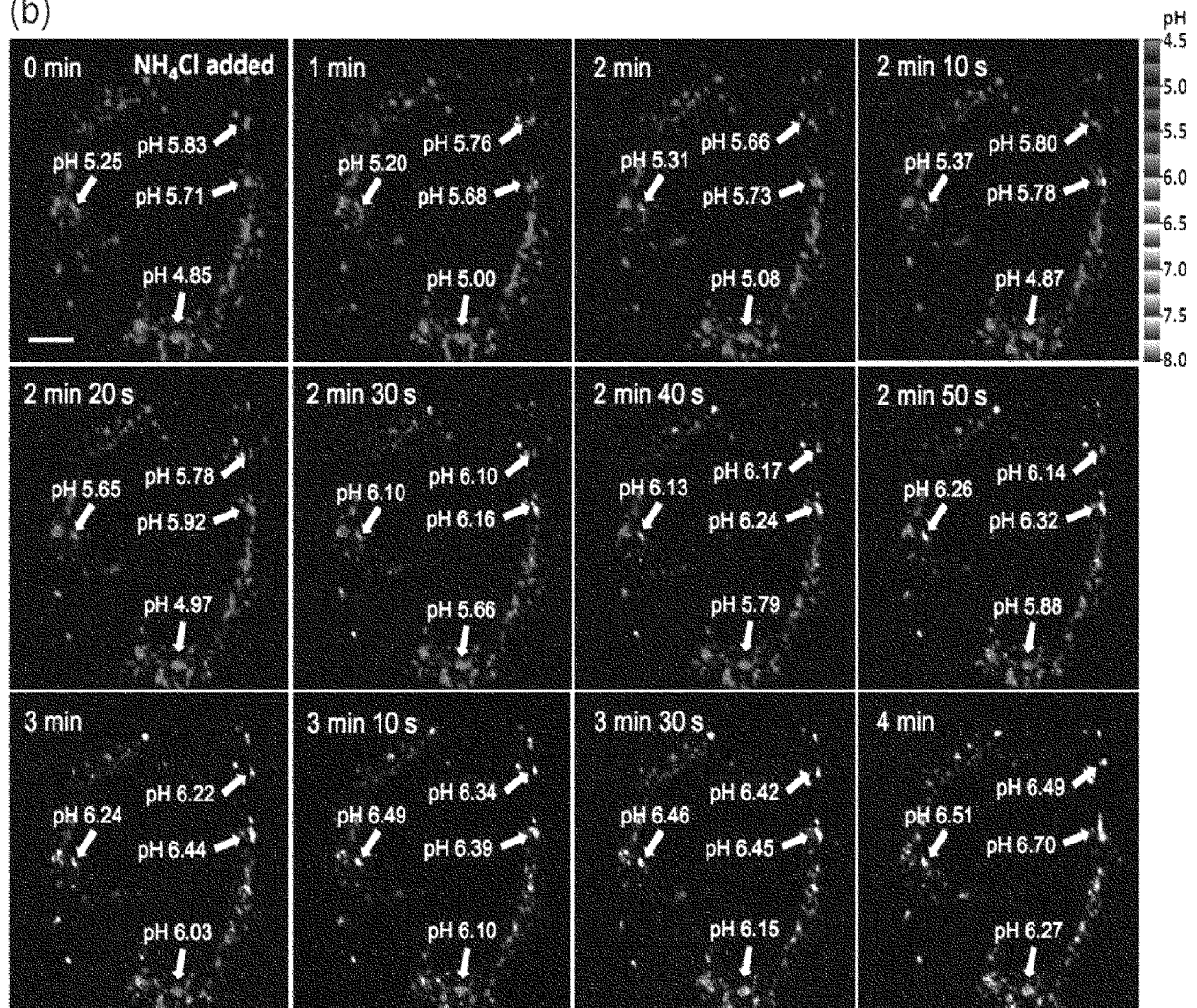


[Fig. 17]

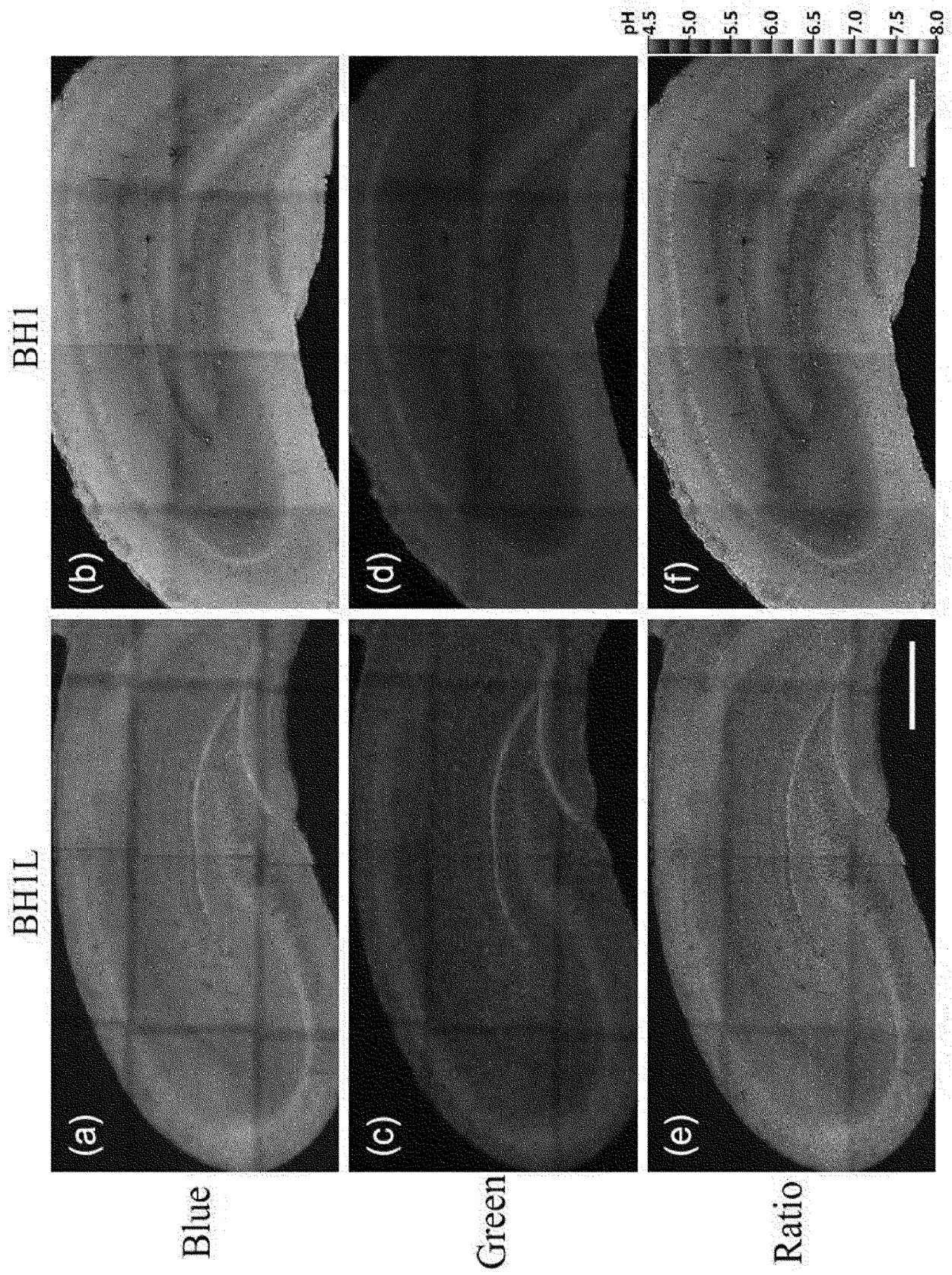
(a)



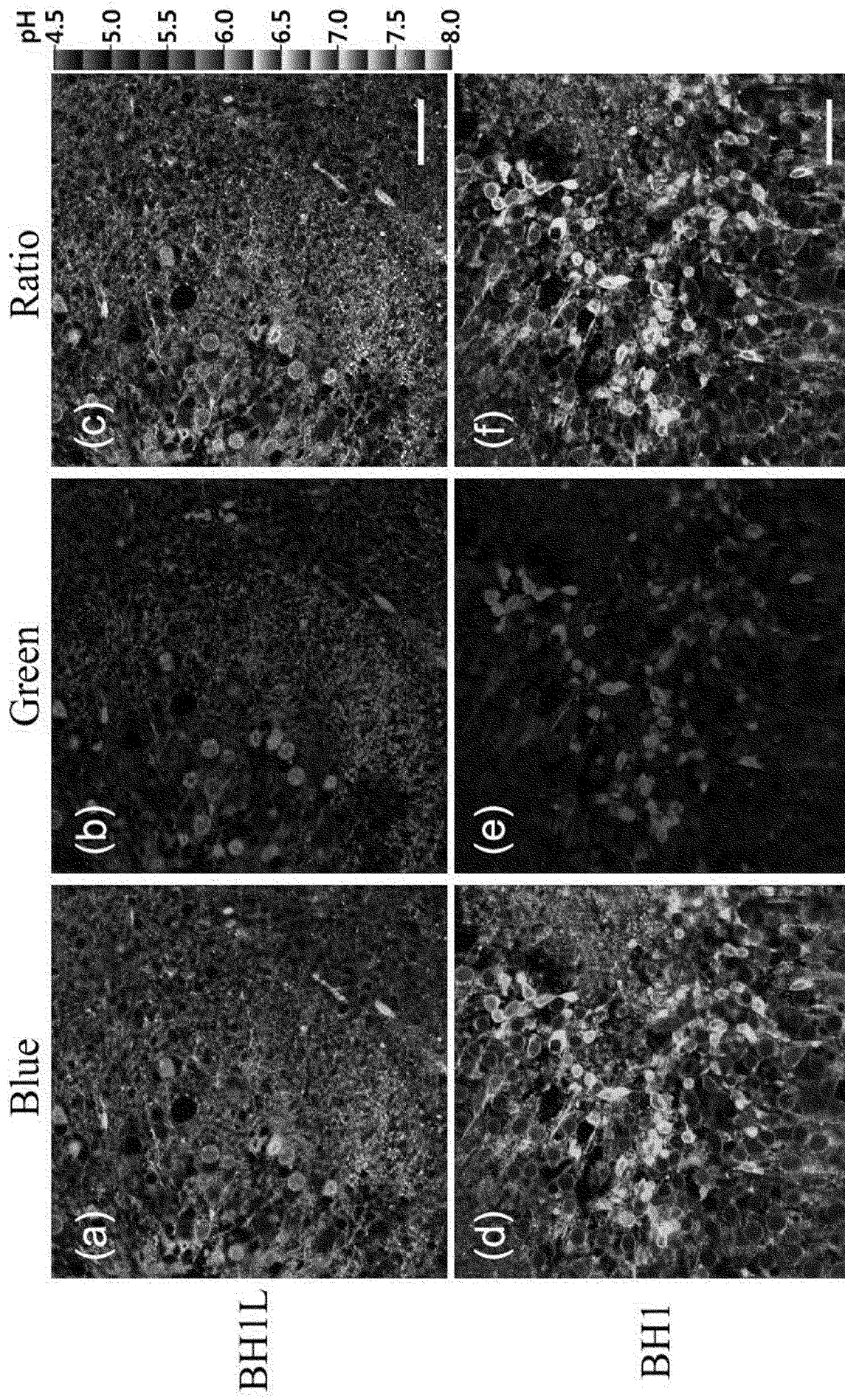
(b)



[Fig. 18]



[Fig. 19]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/013130**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER****G01N 21/80(2006.01)i, G01N 33/88(2006.01)i**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 21/80; A61K 31/4178; C12Q 1/02; C07C 211/48; A61K 49/00; C12Q 1/16; A61K 31/5375; C09K 11/06; A61K 49/10; C07D 235/18; G01N 33/88

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: two-photon, fluorescent, probe, benzoamidazole, phenylenediamine, succinimide

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, H. J. et al. "Benzimidazole-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Acidic pH in Live Cells and Tissues," Journal of the American Chemical Society, 06 November 2013 (Online), vol. 135, pages 17969-17977 See abstract; pages 17970 to 17974, Supporting Information (additional attachment).	1-3,5-11
X	KR 10-2012-0013627 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 15 February 2012 See paragraphs [0037], [0040]; and claim 4.	1,2,5
X	JP 2004-250411 A (BF KENKYUSHO:KK.) 09 September 2004 See paragraphs [0010]-[0012]; and table 1.	1,2
X	WO 2004-035522 A1 (BF RESEARCH INSTITUTE, INC. et al.) 29 April 2004 See abstract; and page 38.	1,2
A	KR 10-2013-0100620 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 11 September 2013 See paragraphs [0057]-[0066]; and claims 1, 5.	1-3,5-11
E	KR 10-2015-0051009 A (AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION) 11 May 2015 See claims 1-3, 5-11.	1-3,5-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 SEPTEMBER 2015 (16.09.2015)

Date of mailing of the international search report

18 SEPTEMBER 2015 (18.09.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/013130

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: **4, 12**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
Claims 4 and 12 comprise compounds about which it cannot be determined whether the compounds exhibit fluorescence after reacting with hydrogen ions of oligomers or proteins in real biological tissue since the compounds are not synthesized or measured as a fluorescent probe in the description. Therefore, claims 4 and 12 are not supported by the description.

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/013130

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2012-0013627 A	15/02/2012	JP 2012-037498 A JP 5422803 B2 KR 10-1233679 B1 US 2012-0035360 A1 US 8557811 B2	23/02/2012 19/02/2014 15/02/2013 09/02/2012 15/10/2013
JP 2004-250411 A	09/09/2004	NONE	
WO 2004-035522 A1	29/04/2004	AU 2003-261834 A1 CA 2496633 A1 EP 1547996 A1 EP 1547996 A4 US 2005-0260126 A1	04/05/2004 29/04/2004 29/06/2005 02/08/2006 24/11/2005
KR 10-2013-0100620 A	11/09/2013	KR 10-1381767 B1	07/04/2014
KR 10-2015-0051009 A	11/05/2015	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 21/80(2006.01)i, G01N 33/88(2006.01)i																							
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 21/80; A61K 31/4178; C12Q 1/02; C07C 211/48; A61K 49/00; C12Q 1/16; A61K 31/5375; C09K 11/06; A61K 49/10; C07D 235/18; G01N 33/88 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 이광자, 형광, 프로브, 벤조아미다졸, 페닐렌디아민, 숙신이미딘																							
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>KIM, H. J. 등 "Benzimidazole-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Acidic pH in Live Cells and Tissues," Journal of the American Chemical Society, 2013.11.06 (온라인), 135권, 페이지 17969□17977 요약; 페이지 17970 내지 17974, Supporting Information (추가첨부) 참조.</td> <td>1-3,5-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>KR 10-2012-0013627 A (아주대학교산학협력단) 2012.02.15 단락 [0037], [0040]; 및 청구항 4 참조.</td> <td>1,2,5</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2004-250411 A (BF KENKYUSHO:KK) 2004.09.09 단락 [0010]-[0012]; 및 표 1 참조.</td> <td>1,2</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2004-035522 A1 (BF RESEARCH INSTITUTE, INC. 등) 2004.04.29 요약; 및 페이지 38 참조.</td> <td>1,2</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2013-0100620 A (아주대학교산학협력단) 2013.09.11 단락 [0057]-[0066]; 및 청구항 1, 5 참조.</td> <td>1-3,5-11</td> </tr> <tr> <td>E</td> <td>KR 10-2015-0051009 A (아주대학교산학협력단) 2015.05.11 청구항 1-3, 5-11 참조.</td> <td>1-3,5-11</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	KIM, H. J. 등 "Benzimidazole-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Acidic pH in Live Cells and Tissues," Journal of the American Chemical Society, 2013.11.06 (온라인), 135권, 페이지 17969□17977 요약; 페이지 17970 내지 17974, Supporting Information (추가첨부) 참조.	1-3,5-11	X	KR 10-2012-0013627 A (아주대학교산학협력단) 2012.02.15 단락 [0037], [0040]; 및 청구항 4 참조.	1,2,5	X	JP 2004-250411 A (BF KENKYUSHO:KK) 2004.09.09 단락 [0010]-[0012]; 및 표 1 참조.	1,2	X	WO 2004-035522 A1 (BF RESEARCH INSTITUTE, INC. 등) 2004.04.29 요약; 및 페이지 38 참조.	1,2	A	KR 10-2013-0100620 A (아주대학교산학협력단) 2013.09.11 단락 [0057]-[0066]; 및 청구항 1, 5 참조.	1-3,5-11	E	KR 10-2015-0051009 A (아주대학교산학협력단) 2015.05.11 청구항 1-3, 5-11 참조.	1-3,5-11
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																					
X	KIM, H. J. 등 "Benzimidazole-Based Ratiometric Two-Photon Fluorescent Probes for Acidic pH in Live Cells and Tissues," Journal of the American Chemical Society, 2013.11.06 (온라인), 135권, 페이지 17969□17977 요약; 페이지 17970 내지 17974, Supporting Information (추가첨부) 참조.	1-3,5-11																					
X	KR 10-2012-0013627 A (아주대학교산학협력단) 2012.02.15 단락 [0037], [0040]; 및 청구항 4 참조.	1,2,5																					
X	JP 2004-250411 A (BF KENKYUSHO:KK) 2004.09.09 단락 [0010]-[0012]; 및 표 1 참조.	1,2																					
X	WO 2004-035522 A1 (BF RESEARCH INSTITUTE, INC. 등) 2004.04.29 요약; 및 페이지 38 참조.	1,2																					
A	KR 10-2013-0100620 A (아주대학교산학협력단) 2013.09.11 단락 [0057]-[0066]; 및 청구항 1, 5 참조.	1-3,5-11																					
E	KR 10-2015-0051009 A (아주대학교산학협력단) 2015.05.11 청구항 1-3, 5-11 참조.	1-3,5-11																					
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																							
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																							
국제조사의 실제 완료일 2015년 09월 16일 (16.09.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 09월 18일 (18.09.2015)																					
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 조한솔 전화번호 +82-42-481-5580 																					

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 4, 12
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 제 4항 및 제12항은 명세서에서 합성되거나 형광 프로브로서 측정된 바 없어 실제 생체 조직 내에서 올리고머 또는 단백질의 수소 이온과 반응하여 형광을 나타내는지 전혀 알 수 없는 화합물로만 구성되어 있으므로, 명세서로부터 뒷받침되지 아니합니다.
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2014/013130

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2012-0013627 A	2012/02/15	JP 2012-037498 A JP 5422803 B2 KR 10-1233679 B1 US 2012-0035360 A1 US 8557811 B2	2012/02/23 2014/02/19 2013/02/15 2012/02/09 2013/10/15
JP 2004-250411 A	2004/09/09	없음	
WO 2004-035522 A1	2004/04/29	AU 2003-261834 A1 CA 2496633 A1 EP 1547996 A1 EP 1547996 A4 US 2005-0260126 A1	2004/05/04 2004/04/29 2005/06/29 2006/08/02 2005/11/24
KR 10-2013-0100620 A	2013/09/11	KR 10-1381767 B1	2014/04/07
KR 10-2015-0051009 A	2015/05/11	없음	