



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0000044
(43) 공개일자 2010년01월06일

(51) Int. Cl.

C09B 29/095 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0059380

(22) 출원일자 2008년06월24일

심사청구일자 2008년06월24일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자

조봉래

서울 송파구 송파동 151 한양아파트 23동 207호

(74) 대리인

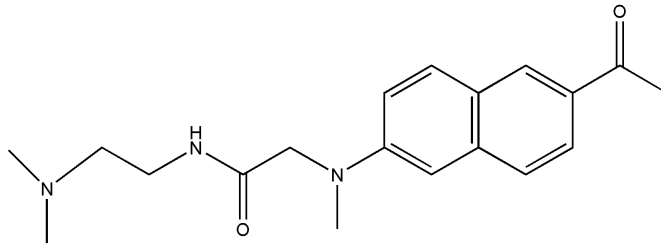
현종철

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법

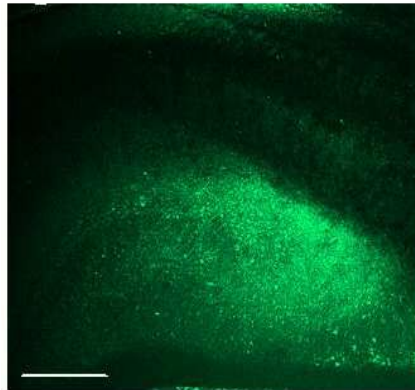
(57) 요약

생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법이 제
공된다. 본 발명에 따른 산성 소포체 영상용 이광자 염료는 하기의 구조를 가지며,



시토줄에 존재하는 산성 소포체와 선택적으로 결합하여 높은 강도의 이광자 여기 형광을 발광할 수 있으므로, 산성 소포체의 효과적인 영상화가 가능하다.

대표도 - 도8



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 ROA20070002002702007

부처명 한국과학재단

연구사업명 국가지정연구실사업(NRL)

연구과제명 이광자 표지자의 합성과 생체영상

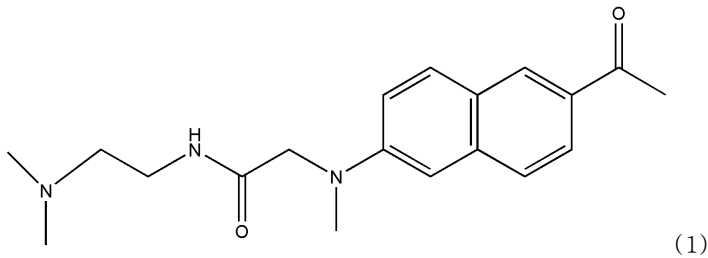
주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2007년 07월 01일 ~ 2008년 06월 30

특허청구의 범위

청구항 1

하기 식 1의 구조를 가지는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료:



청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료는 780nm의 파장대의 빛에 의하여 여기될 수 있으며, 이때 92GM 이상의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta$)을 갖는 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료는 pK_a 가 4 내지 5인 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료의 물에 대한 용해도는 $5.0 \mu M$ 이상인 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료는 용매의 극성이 클수록 흡수 스펙트럼이 적색파장으로 이동하는 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료는 $250 \mu m$ 의 투과깊이까지 산성 소포체를 영상화할 수 있는 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 이광자 염료는 산성 소포체의 이동을 시각화시킬 수 있는 것을 특징으로 하는 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료.

청구항 8

제 1항 내지 제 7항 중 어느 한 항에 따른 이광자 염료를 영상화하고자 하는 세포질 내로 주입하는 단계; 및 상기 이광자 염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 생체 내 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 깊은 투과깊이를 가지며, 산성 조건의 소포체를 선택적으로 명확하게 영상화할 수 있

는 산성 소포체 영상용 이광자 염료 및 이를 이용한 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 리소솜과 리소솜-연관 세포기관은 산성의 분획 시스템(pH 4.0-5.0)을 이루고 있으며, 이 시스템은 다양한 기능을 보여주는 많은 수의 효소와 분비 단백질을 함유한다. 이러한 기능을 분석하기 위하여, 다양한 멤브레인-투광성의 형광 pH 및 리소솜 표지자가 개발되었으며, 이중 몇몇은 상업적으로 이용가능하다.
- <3> 하지만, 일광자 현미경(one-photon microscopy, OPM)을 위한 이들 표지자의 사용은 짧은 파장의 빛(~350-550nm)에 의한 여기가 필요하며, 또한 얇은 투과깊이(<80 μ m), 광표백(photobleaching) 및 세포의 자가-형광 등과 같은 문제가 있다.
- <4> 따라서, 일광자 현미경 사용에 따라 발생하는 이러한 문제를 해결하기 위하여, 이광자 현미경(two-photon microscopy, TPM)이 그 대안으로 대두되었다.
- <5> 상기 이광자 현미경은 여기를 위해서 2개의 NIR 광자들을 채용하고 있으며, 현재 생체조직의 영상화에 있어서 많은 관심을 끌고 있다 (Denk, W.; Strickler, J. H.; Webb, W. W. *Science*, 1990, 248, 73.; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. *Nat. Biotechnol.* 2003, 21, 1369).
- <6> 이러한 이광자 현미경은 1932년 Maria Gopper-Mayer(*Ann. Phys.* 9(1931) 273)에 의한 두 개의 광자의 자발적 흡수현상을 기초하며, 이러한 이광자 여기(two photon excitation) 현상은 강한 레이저 광원이 개발되기 전까지는 장시간 실용화되어 있지 않았다. 여기에서, 이광자 여기란 센 광원을 조사하는 것에 의해, 단위 부피 및 단위 시간당의 광자 밀도가 충분히 높은 동일한 발광 부위에 2개의 광자가 동시에 흡수되는 현상을 말한다. 이때 흡수되는 에너지는 2개의 광자의 에너지의 합이며, 이광자 여기의 가능성은 광자밀도의 제곱에 의존한다.
- <7> 따라서, 2개의 광자 흡수는 2차의 비선형(non-linear) 광학성질을 가진다. 한편, 이러한 여기상태에서 기저상태(ground state)로 전이하며 밴드 갭 에너지에 해당하는 에너지를 형광으로 방출하게 되는데, 이를 이광자 형광(two photon fluorescence)이라 하며 상기 방출되는 광자의 에너지는 상기 조사 광원의 광자 에너지보다 당연히 크다. 이러한 이광자 여기에 의해 형광 발광을 수반하는 물질을 통상 이광자 염료라고 하는데, 이광자 염료는 물론 상기 밴드 갭 에너지에 해당하는 광자 에너지를 제공할 수 있는 광원에 의해서도 여기될 수 있는데, 이를 일광자 여기라 하며, 일광자 여기에 의한 형광 발광 스펙트럼은 이광자 여기에 의한 형광발광의 스펙트럼과 동일한 스펙트럼 특성을 가진다.
- <8> 이러한 이광자 여기의 첫 번째 특징은 여기가 광조사점의 제한된 3차원 영역 근방에서만 일어나며, 따라서 상기 여기에 의한 형광 발광이 3차원 공간 편재화(localization)되기 때문에 백그라운드 형광(background fluorescence)이 최소화될 수 있다는 것이고, 조사되는 빛의 파장과 발광 형광의 파장이 서로 다르다는 것이 두 번째 특징이 된다. 특히, 상기 이광자 여기는 여기 체적(excitation volume)이 상당히 작기 때문에 작은 체적의 시료를 관찰하는데 적합하다.
- <9> 한편, 상기에서 언급한 바와 같은 특징으로 인하여, 근적외선 영역의 빛을 조사함으로써 이광자 여기를 일으킬 수 있는 이광자 현미경(Two Photon Microscopy)은 상술한 바와 같이 생체 영상(bio imaging) 분야에 있어 많은 주목을 받고 있는데, 그 이유는 근적외선을 조사하기 때문에 생체 분자에 대한 손상이 적어서 살아 있는 세포에 적용할 수 있으며, 근적외선의 투과 깊이(penetration depth)가 깊고, 세포 자발 형광(tissue auto-fluorescence)을 최소화할 수 있기 때문이다. 이러한 이광자 현미경에 사용되는 이광자 염료는 i) 근적외선 영역에서의 이광자 단면적(two photon cross section: δ_{TPA})이 커야하고, ii) 물에 대한 적당한 용해도를 가질 것, ii) 광안정성(photostability)이 클 것 및 iv) 생체에 대한 선택적 결합력이 우수할 것 등의 요건을 만족해야 한다.
- <10> 하지만, 현재 이광자 현미경에 사용되는 대부분의 형광 표지자(이광자 염료)들은 작은 이광자 동작 단면적(two photon action cross-section, $\Phi \delta$)을 가지는데, 이는 이광자 현미경의 사용을 제한하는 요소로 작용하며, 특히 살아있는 세포 및 조직에서 발견되는 산성 조건은 종래의 이광자 염료의 효율을 극도로 제한하게 하며, 상술한 바와 같이 산성 조건의 소포체를 영상화할 수 있는 효과적인 표지자로서 이광자 염료는 아직까지 보고되거나 개발되지 못하고 있다.
- <11> 더 나아가, 산성 소포체를 염색하기 위한 이광자 염료는 세포질을 분획하는 멤브레인을 염색하지 않고, 선택적으로 세포질(시토솔)내로 침투하여 소포체만을 선택적으로 염색하여 이를 형광 발광시켜야 한다. 하지만, 기존의 시토솔을 영상화하기 위한 이광자 염료는 시토솔 뿐만 아니라 멤브레인까지 염색시킴으로써 오-표적화(mis-

targeting)라는 문제를 발생시킨다. 따라서, 산성 조건에 놓여진 시토졸 내의 소포체만을 선택적으로 염색하고, 이를 영상화할 수 있는 이광자 염료의 개발은 절실한 상황이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

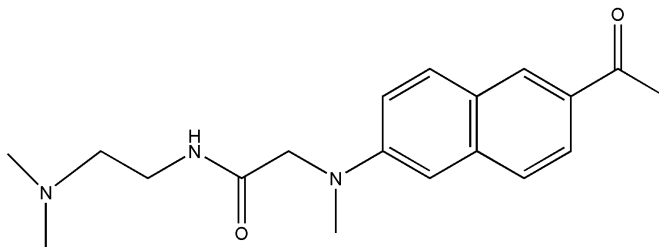
<12> 따라서, 본 발명의 첫 번째 과제는 산성 조건의 소포체를 영상화할 수 있는 이광자 염료를 제공하는 데 있다.

<13> 본 발명의 두 번째 과제는 상기 이광자 염료를 이용한 산성 조건의 소포체를 영상화하는 방법을 제공하는 데 있다.

과제 해결수단

<14> 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 해결하기 위하여 하기 화학식 1의 구조를 가지는 생체 내 산성 소포체의 영상용 이광자 염료를 제공한다.

화학식 1



<15>

<16> 상기 이광자 염료는 780nm의 파장대의 빛에 의하여 여기될 수 있는데, 이때 92GM 이상의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta$)을 갖는다.

<17> 본 발명에 따른 상기 이광자 염료의 물에 대한 용해도는 $5.0 \mu\text{M}$ 이상이고, 용매의 극성이 커질수록 흡수 스펙트럼이 장파장, 즉 적색파장 쪽으로 이동한다. 또한, 본 발명에 따른 이광자 염료는 $250 \mu\text{m}$ 의 투과깊이까지 산성 소포체를 영상화할 수 있고, 산성 소포체의 이동을 시각화시킬 수 있다.

<18> 본 발명은 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여, 본 발명에 따른 생체 내 산성 소포체의 실시간 영상용 이광자 염료를 영상화하고자 하는 세포질 내로 주입하는 단계; 및 상기 이광자 염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법을 제공한다.

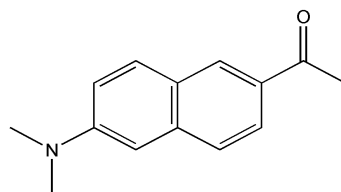
효과

<19> 본 발명의 이광자 염료는 산성 조건에서 효과적으로 살아있는 세포 및 조직과 결합하여 높은 강도의 이광자 여기 형광 영상을 발생시킬 수 있으므로, 산성 소포체의 영상화가 가능하고, 이를 이용한 효과적인 실시간 모니터링 또한 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<20> 본 발명은 산성 조건의 세포 또는 조직의 실시간 영상화를 위하여, 상기 화학식 1의 화합물을 생체 내 산성 소포체의 실시간 영상용 이광자 염료로 제공한다.

<21> 여기에서, 상기 구조중 *tert*-아민은 형광물질(발광단)과의 아마이드 결합을 통하여 이광자 염료의 양자 결합 부위



를 제공하고, 상기 이광자 염료의 tert -아민 부위는 형광 부위를 제공한다. 따라서 본 발명에 따른 상기 이광자염료는 양자(H^+)가 존재하는 산성 조건에서 양자-결합 부위(*tert*-아민)를 포함하고 있으므로, 다양한 pH 조건에도 불구하고 동일한 파장 대의 발광 스펙트럼을 갖게 한다. 또한 본 발명에 따른 이광자 염료

는 산성 소포체 내에서 양자화된 형태로 존재하면서 이광자 여기 형광(two-photon emitted fluorescence)을 방출하며, 하기 실험예에서 나타내는 바와 같이 CA3 영역에서 산성 소포체의 이동을 시각화시킬 수 있다.

<22> 상기 구조의 이광자 염료는 상대적으로 적은 분자량을 가지므로 종래의 이광자 염료와 같이 멤브레인을 염색시키지 않고, 시토솔에 존재하는 소포체만을 선택적으로 염색하므로, 오-표적화(mis-targeting) 등의 문제없이 소포체만을 선명하게 형광시켜, 이를 영상화할 수 있게 한다.

<23> 본 발명에 따른 상기 이광자 염료는 780nm의 파장대의 빛에 의하여 여기될 수 있는데, 이는 종래의 350 내지 550nm의 빛에 의하여 여기되는 형광물질에 비하여 상당한 수준의 장파장이라 할 수 있다. 따라서, 이러한 장파장에 의한 여기는 본 발명에 따른 이광자 염료가 보다 깊은 투과깊이에서 세포를 영상화하여 사용자가 실시간으로 모니터링할 수 있다는 것을 의미한다. 따라서, 이러한 투과 깊이(250 μ m)의 증가는 본 발명에 따른 산성 소포체의 실시간 영상용 이광자 염료가 갖는 중요한 효과 중 하나이다.

<24> 또한, 본 발명에 따른 이광자 염료는 780nm에서 여기될 때 92GM 이상의 이광자 동작 단면적($\Phi \delta$)을 가지는데, 이는 종래의 10GM 수준의 이광자 동작 단면적에 비하여 상당히 높은 수준이며, 이는 하기 비교예를 통하여 상세히 설명된다.

<25> 더 나아가, 본 발명에 따른 상기 이광자 염료는 물에 대하여 용해도는 5.0 μ M 내지 9.0 μ M 수준이므로, 본 발명에 따른 이광자 염료는 세포를 충분한 수준으로 염색할 수 있다.

<26> 또한, 상기 이광자 염료는 용매의 극성이 커질수록 흡수 스펙트럼이 적색 파장쪽으로 이동하는 특징이 있는데, 이것은 산성이 강한 환경에서 파장이 장파장 쪽으로 이동하여, 종래 기술에 비하여 긴 파장에 의하여 여기될 수 있다. 따라서, 이러한 보다 긴 파장에서의 여기는 본 발명에 따른 이광자 염료를 이용하여 조직 내의 보다 깊은 영역을 모니터링 할 수 있게 한다.

<27> 상기 두 번째 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 상기 이광자 염료를 영상화하고자 하는 세포질 내로 주입하는 단계; 및 상기 이광자 염료로부터 방출되는 이광자 여기 형광 영상을 관찰하는 단계를 포함하는 생체 내 산성 소포체의 영상화 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 상기 영상 방법은 종래의 기술에 비하여 표면으로부터 깊이 존재하는 세포의 영상까지 얻을 수 있고, 산성 조건에서는 높은 형광강도로 이미지를 얻을 수 있으므로, 정확한 세포 모니터링이 가능하다는 장점을 갖는다.

<28> 이하, 실시예 및 도면 등을 이용하여 보다 상세히 설명한다. 하지만, 하기의 실시예 등은 본 발명을 보다 상세히 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명을 정의하거나 한정하지 않는다.

<29> 실시예 1

<30> 이광자 염료의 제조

<31> 6-아세틸-2-[N-메틸-N-(카르복시메틸)아미노]나프탈렌(0.2g, 0.78), *N,N'*-디시클로헥실카르보디이미드(0.18g, 0.86mmol) 및 1-히드록시벤조트리아졸(0.13g, 0.94mmol)의 혼합물을 CH_2Cl_2 (20mL)에서 30분간 교반하였다. 이 혼합물에 *N,N'*-디메틸에틸렌아민 $\cdot$ 2HCl(0.50g, 2.72mmol) 및 CH_2Cl_2 (5mL)의 Et_3N (0.16g, 1.56mmol)을 첨가하여 질소 조건하에서 3시간동안 교반하였다. 얻어진 혼합물을 여과한 후, 여과물을 포화 NaHCO_3 (aq)로 추출하고, Na_2SO_4 상에서 건조시켜 여과한 후 진공 내에서 농축하였다. $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (10:1)을 용리액(eluent)으로 사용하는 칼럼 크로마토그래피를 이용, 얻어진 생성물을 정제하여 본 발명에 따른 이광자 염료를 제조하였다.

<32> 수율: 47%

<33> mp: 69 $^{\circ}$ C

<34> ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): d 8.34 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 7.96 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz), 7.84 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.68 (d, 1H, $J = 9$ Hz), 7.11 (dd, 1H, $J = 9$, $J = 2$ Hz), 6.96 (d, 1H, $J = 2$ Hz), 6.92 (t, 1H, $J = 7$ Hz), 4.05 (s, 2H), 3.35 (q, 2H, $J = 7$ Hz), 3.18 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 2.34 (t, 2H, $J = 7$ Hz), 2.05 (s, 6H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): d 197.8, 169.8, 148.9, 137.3, 131.6, 131.0, 130.2, 126.5, 124.8, 116.2, 106.6, 58.0, 57.8, 45.0, 39.9, 36.6, 33.98, 26.5 ppm; Anal. Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_2$: C, 69.70; H, 7.70; N, 12.83. Found: C, 69.78; H, 7.56; N, 12.77.

- <35> 실험예 1
- <36> 물 용해도 측정
- <37> 본 발명에 따른 이광자염료를 DMSO에 용해시켜 스톡 용액($1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$)을 준비하였다. 용액을 $6.0 \times 10^{-3} \sim 6.0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 까지 희석시키고, 마이크로 주사기를 이용하여 3.0ml의 물을 함유하는 큐벳에 첨가하였다. 모든 경우 물에서의 DMSO 농도를 0.2%로 유지하면서, 염료농도에 대한 형광강도를 측정하여, 도 1 및 2에 나타내었다.
- <38> 도 1 및 2를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료의 농도가 증가할수록, 모든 파장대에서 형광강도가 커지는 것을 알 수 있다. 특히 도 2를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 염료 농도가 일정수준에 이를 때까지 형광 강도가 선형으로 증가하지만, 일정수준을 넘는 경우 아래쪽으로 기울어지는 완만한 곡선 프로파일을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 이광자 염료의 용해도는 선형의 프로파일을 나타내는 농도로 계산하였고, 계산 결과 본 발명에 따른 이광자 염료의 물에서의 용해도는 $5.0 \mu\text{M}$ 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료가 세포를 염색하기에 충분한 수준의 용해도를 갖는다는 것을 의미한다.
- <39> 실험예 2
- <40> 용매 극성에 따른 특성(적색파장 이동) 분석
- <41> 본 발명에 따른 이광자염료가 1,4-디옥산, DMF, EtOH 및 H_2O 이라는 용매 조건에서 가지는 흡수 스펙트럼을 Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 스펙트로포토미터 상에서 기록하였고, 또한 동일 조건에서의 형광 스펙트럼을 Amico-Bowman series 2 루미네센스 스펙트로미터(luminescence spectrometer)를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 3 및 4에 나타내었다.
- <42> 도 3 및 4를 참조하면, 본 발명에 따른 실시예 1 및 2의 이광자 염료는 용매의 극성이 증가하는 순서에 따라 흡수 및 형광 스펙트럼 모두 적색파장 이동(bathochromic shift)을 보여준다. 이를 상세히 설명하면, $\text{H}_2\text{O} > \text{EtOH} > \text{DMF} > \text{디옥산}$ 의 순서로 본 발명의 이광자 염료는 적색파장 이동을 나타내며, 이로부터 산성조건과 같은 극심한 극성조건에서도 본 발명에 따른 이광자 염료가 장파장의 빛을 흡수하여 여기될 수 있다는 것을 알 수 있다.
- <43> 실험예 3
- <44> 대식세포에 대한 이광자 현미경 이미지
- <45> 실험예 3-(1)
- <46> 본 발명에 따른 이광자염료로 표지화된 대식세포에 대한 이광자 현미경 이미지를 얻은 후, 이를 도 5a 내지 5b에 나타내었다.
- <47> 종래의 연구에서 시토졸 염색 이광자 염료는 500-620nm 및 360-460nm의 파장영역에서 이광자 여기 형광을 발광하는 것으로 보고되었으며, 이것은 각각 시토졸 및 맴브레인에 결합한 염료에 기인하는 것이었다. (H. M. Kim, C. Jung, B. R. Kim, S.Y. Jung, J. H. Hong, Y.G. Ko, K. J. Lee, B. R. Cho, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 3460-3463; H. M. Kim, B. R. Kim, J. H. Hong, J.S. Park, K. J. Lee, Cho, B. R. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 7445-7448). 이와 같이 맴브레인에 일부 결합하여 이를 형광 발광시키는 종래의 이광자염료는 시토졸의 소포체만을 영상화하고자 할 때 오폭적화라는 문제를 야기시키며, 이는 결국 정확한 소포체의 영상화를 방해하게 된다.
- <48> 반면, 도 5a 내지 5b를 참조하여 본 발명의 이광자염료로 표지화된 대식세포를 살펴보면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 500-620nm에서 이광자 여기 형광을 발광시키고 있으나(도 5b), 맴브레인에 결합된 염료에 기인한 360-460nm 파장대의 이광자 여기 형광 이미지는 얻을 수 없었다(도 5a).
- <49> 또한, 도 5b에 나타난 강한 적색 이미지가 실제 산성 소포체를 영상화하는 지를 확인하기 위하여, 대식세포를 종래의 알려진 일광자 현미경 표지자인 LysoTracker Red(LTR)로 염색한 후, 일광자 형광 이미지를 얻은 후(도 5c), 얻어진 두 이미지(도 5b, 5c)를 함께 중첩시켰다. 중첩된 이미지는 도 5d에 나타나는데, 도 5d를 참조하면, 두 염료로 염색한 후 얻어진 이미지(도 5b, 5c)는 서로 일치하는 것을 알 수 있으며, 이러한 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료가 산성 소포체를 정확하게 영상화하는 것을 나타낸다.
- <50> 360-460nm 파장대의 이광자 여기 형광 이미지를 나타내지 않는 이 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료가 맴브레

인이 아닌 시토졸 분획조직(compartment)에 대부분 존재하여 산성 소포체를 선택적으로 영상화하는 것을 의미하는데, 이것은 멤브레인을 통과하여 시토졸로 유입될 수 있는 이광자 염료의 낮은 분자량에 기인하는 것으로 추측된다. 따라서, 상기 실험 결과는 본 발명에 따른 이광자 염료가 멤브레인과의 결합 및 이를 염색함으로써 발생하는 오-표적화(mis-targeting) 없이 정확하게 산성 소포체만을 염색하여, 이를 영상화하므로 사용자가 산성 소포체를 명확하게 모니터링할 수 있게 한다.

<51> 실험예 4

<52> 쥐 해마조직 분석

<53> 2일된 쥐의 해마로부터 채취한 세포조직을 준비하고, 400 μ m의 두께로 잘랐다. 이후 상기 조직을 본 발명에 따른 이광자염료(10 μ M)로 30분간 37 $^{\circ}$ C에서 인큐베이션하였다.

<54> 다음 상기 조각을 세정하고, 하부에 유리를 가진 접시에 옮긴 후 상기 조각에 대한 이광자 여기 형광 영상을 얻었다.

<55> 도 6은 본 실험예에서 얻은 이광자 여기 형광 영상의 이미지이다.

<56> 도 6을 참조하면, 10배율로 확대한 상기 이미지의 밝은 부분은 CA1 및 CA3 영역뿐만 아니라, 해마 치아이랑(dentate gyrus, DG)을 보여준다.

<57> 도 7은 z축을 기준으로 ~ 100 내지 250 μ m 범위에서의 깊이(100, 150, 200, 250 μ m)에서 얻어진 상기 조직의 이광자 현미경 이미지이다(10배율). 뇌 구조는 전체에 있어 비-균질(non-homogenous)하다고 공지되었기 때문에, 상이한 깊이에서 얻어진 TPM 이미지(40개)를 중첩시켜, 이를 도 8에 나타내었다. 도 8을 참조하면, 산성 소포체의 평균적인 분포를 알 수 있다.

<58> 실험예 5

<59> 산성 소포체 이동 분석

<60> 도 9는 $\sim 120 \mu$ m의 깊이의 CA3를 100배 배율로 확대한 이미지이고, 도 9는 도 9 이미지 내의 사각형 부분에 대한 확대 사진이다. 특히, 도 10을 참조하면, 시간 경과(5초 동안)에 따라 산성 소포체가 축색을 따라 세포체와 축색말단 사이에서 빨리 이동하는 것을 알 수 있다. 이것은 본 발명에 따른 이광자 염료가 실시간으로 진행되는 산성 소포체 위치 변화를 실시간으로 이미지화할 수 있음을 나타낸다.

<61> 실험예 6

<62> pH 조건에 따른 이광자염료의 특성분석

<63> 범용 완충액(0.1M 시트르산, 0.1M KH₂PO₄, 0.1M Na₂B₄O₇, 0.1M Tris, 0.1M KCl 10mM)에서 본 발명의 상기 실시예 1, 2에서 제조된 이광자 염료를 함유하는 용액의 pH를 서서히 감소시켰다. 이때 일광자 흡수 및 방출 스펙트럼을 측정하여 도 11a 내지 11c에 나타내었다.

<64> 도 11a 내지 11c를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자염료는 산성 변화에도 불구하고 거의 일정한 수준의 형광강도를 나타내는 것을 알 수 있다.

<65> 비교 실험예 1

<66> 이광자 동작 단면적 및 흡수강도 측정

<67> 이광자 단면적(δ)을 펨토초(fs) 형광 측정 기술을 이용하여 측정하였다.

<68> 측정 방법을 살펴보면, 본 발명에 따른 이광자 염료 및 비교대상으로서 종래의 알려진 표지자인 LysoTracker Red(DND-99)를 5.0x 10⁻⁶M의 농도에서 범용 완충액(pH=3.2)에 용해시킨 후, 이광자-유도 형광 강도를 740-940nm의 영역대에서 측정하는데, 이때 이광자 특성이 잘 알려진 플루오레세인(8.0 x 10⁻⁵M, pH=11)을 기준염료로 하였다.

<69> 즉, 본 비교실험예에서 이광자 단면적의 측정을 위하여 기준염료 및 본 발명에 따른 샘플 염료의 이광자-유도 형광 스펙트럼의 강도를 측정한 후, 이광자 단면적(Two-photon cross-section)은 하기 수학적 식 2에 의하여 계산하였고, 여기에 양자효율을 곱한 값이 이광자 동작 단면적(Two-photon action cross-section)으로 계산하였다.

수학식 2

$$\delta = \frac{S_s \Phi_r \phi_r c_r}{S_r \Phi_s \phi_s c_s} \delta_r$$

<70>

<71>

상기 식에서 하첨자인 s와 r은 샘플과 기준염료를 의미하며, δ 는 구하고자 하는 이광자 단면적이고, 디텍터에 의해 수집된 신호의 강도를 S로 표시하고, 형광 양자효율을 Φ 로 표시하였으며 ϕ 는 실험장비의 전체 형광 수집 효율을 의미한다. 또한, 용액 내 분자의 수밀도(number density)는 c로 표시하였다. δ_r 은 기준염료의 이광자 단면적을 의미한다.

<72>

도 12는 740nm 내지 940nm의 파장 범위에서 측정한 측정치를 기초하여 계산한 이광자 동작 단면적을 나타내는 그래프이다.

<73>

도 12를 참조하면, 본 발명에 따른 이광자 염료는 780nm의 파장대에서 가장 높은 이광자 동작 단면적을 가지며, 92GM 이상의 수준이었다. 반면, 종래의 기술에 따른 LysoTracker Red(LTR)은 약 10GM 수준에 불과하므로, 결국 본 발명에 따른 이광자 염료는 종래의 이광자 염료에 비하여 무려 9배 이상의 높은 이광자 동작 단면적을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 이광자 염료가 갖는 높은 이광자 동작 단면적은 상술한 바와 같이 깊은 투과깊이로 산성 소포체를 효과적으로 염색하여, 여기 형광시킬 수 있다.

<74>

비교실험예 2

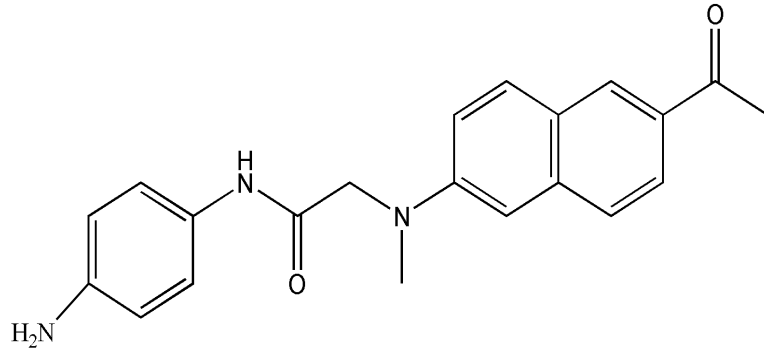
<75>

또 다른 이광자 염료와의 이광자 분석

<76>

하기 화학식 2는 본 발명자가 개발하였으나, 공개되지 않은 산성 소포체 이광자 염료이다.

화학식 2



<77>

<78>

본 발명에 따른 화학식 1의 이광자 염료와 상기 화학식 2의 이광자 염료를 표지자로 이용하여 실시예 4의 쥐해마조직을 염색시킨 후, 780nm의 파장대에서 여기시켜 얻어진 이광자 여기 형광 이미지를 도 13a 및 13b에 각각 나타내었다.

<79>

도 13a 및 13b를 참조하면, 두 영상은 사실상 동일한 결과를 나타내는 것을 알 수 있는데, 특히 본 발명에 따른 이광자 염료는 보다 강한 형광이미지를 나타내는 것을 알 수 있다.

<80>

또한 도 14a 및 14d는 도 13a 및 13b 내의 다양한 지점으로부터 얻어지는 이광자 여기 형광 스펙트럼을 나타낸다. 상기 도면을 참조하면, 두 이광자 염료로부터 발생하는 여기 형광 스펙트럼은 사실상 동일한 패턴을 나타내지만, 본 발명에 따른 이광자 염료가 각 지점에서 보다 균일한 스펙트럼 패턴을 보여준다(도 13b). 따라서, 본 발명에 따른 이광자 염료는 산성 소포체에 대한 이광자 여기 형광 이미지를 매우 효과적이고, 일관성있게 보여줄 수 있다.

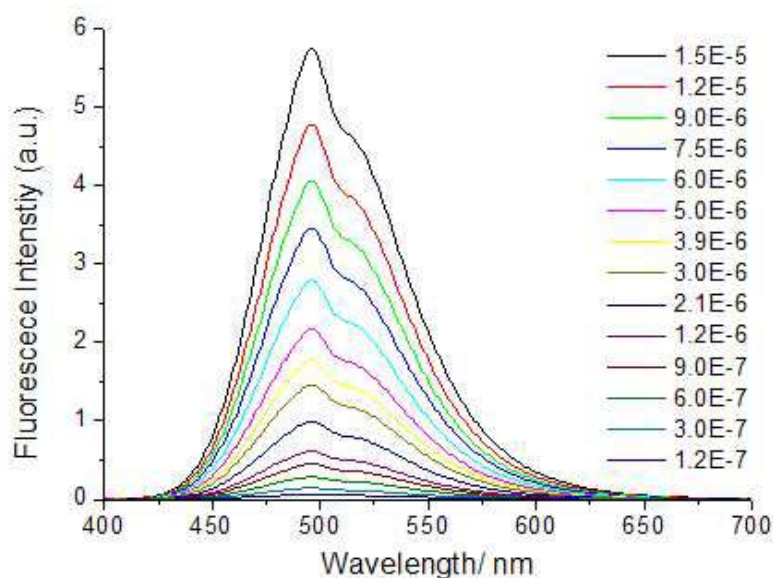
<81>

도면의 간단한 설명

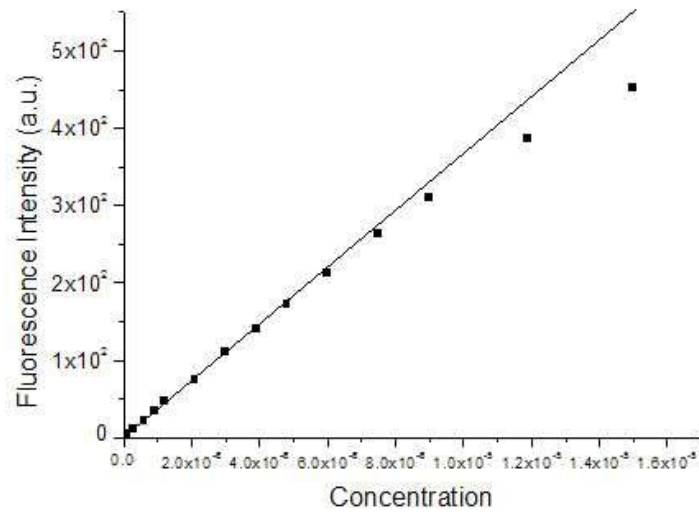
- <82> 도 1 및 2는 본 발명에 따른 이광자 염료가 가지는 물 용해도를 나타내는 그래프이다.
- <83> 도 3 및 4는 본 발명에 따른 이광자 염료가 1,4-디옥산, DMF, EtOH 및 H₂O이라는 용매 조건에서 가지는 흡수 조건을 나타내는 그래프이다.
- <84> 도 5a 내지 5d는 각각 360-470nm의 여기 파장대에서 얻어진 이광자 여기 형광 이미지, 본 발명에 따른 이광자 염료로 표지화된 대식세포 이미지, 종래기술에 따른 이광자 염료로 표지화된 대식세포 이미지 및 도 5b 및 5c를 중첩시킨 이미지이다.
- <85> 도 6은 실험에 4에서 얻은 이광자 여기 형광 영상의 이미지이다.
- <86> 도 7은 상이한 깊이(100, 150, 200, 250 μ m)에서 얻어진 쥐 해마 조직의 이광자 현미경 이미지이다.
- <87> 도 8은 상이한 깊이에서 얻어진 쥐 해마 조직의 이광자 현미경 이미지를 중첩시킨 이미지이다.
- <88> 도 9는 실험에 5에서 쥐 해마조직의 CA3을 100배 배율로 확대한 이미지이다.
- <89> 도 10은 쥐 해마조직에서 시간 경과(5초 동안)에 따라 산성 소포체가 축색을 따라 세포체와 축색말단 사이에서 빨리 이동하는 것을 나타내는 이미지이다.
- <90> 도 11a 내지 11c는 pH조건에 따른 일광자 흡수 및 방출 스펙트럼을 측정하여 나타낸 그래프이다.
- <91> 도 12는 740nm 내지 940nm의 파장 범위에서 측정한 측정치를 기초하여 계산한 이광자 동작 단면적을 나타내는 그래프이다.
- <92> 도 13a 및 13b는 각각 본 발명에 따른 이광자 염료와 비교 이광자 염료로 염색된 쥐 해마 조직의 이광자 이미지이다.
- <93> 도 14a 및 14d는 도 13a 및 13b 내의 다양한 지점으로부터 얻어지는 이광자 여기 형광 스펙트럼을 나타내는 그래프이다.

도면

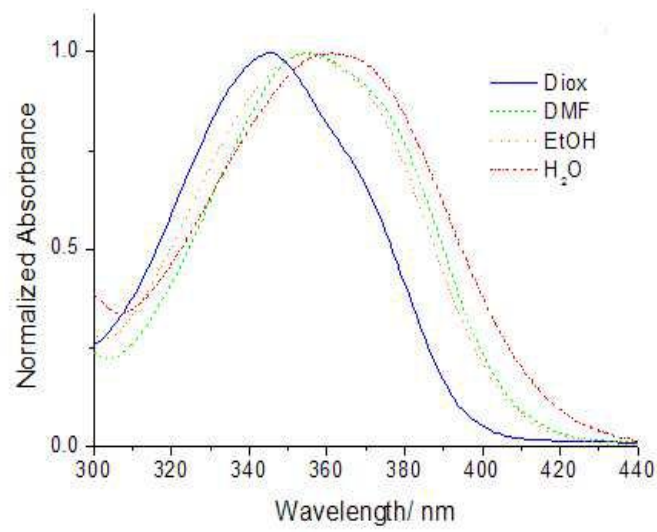
도면1



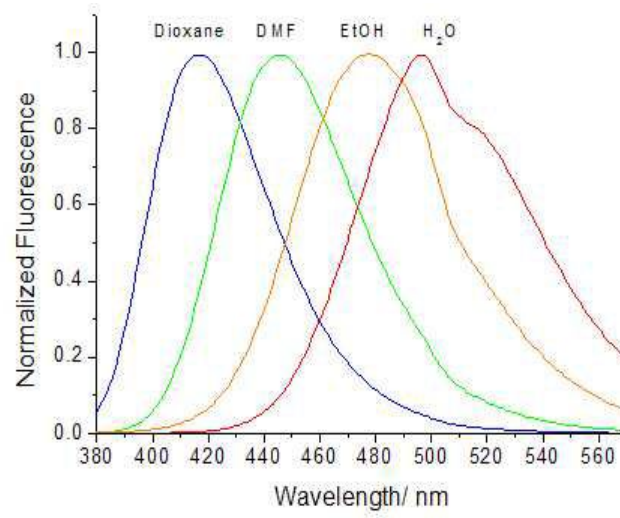
도면2



도면3



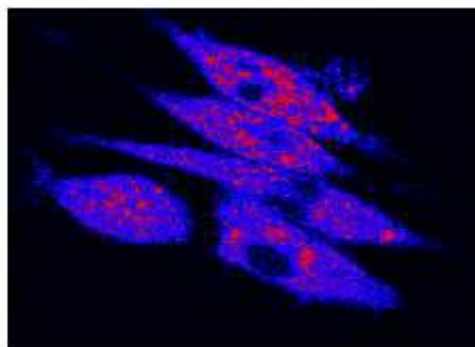
도면4



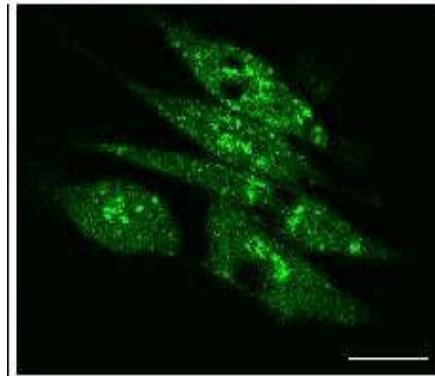
도면5a



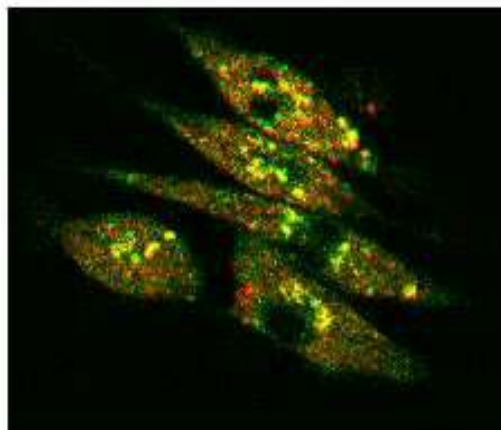
도면5b



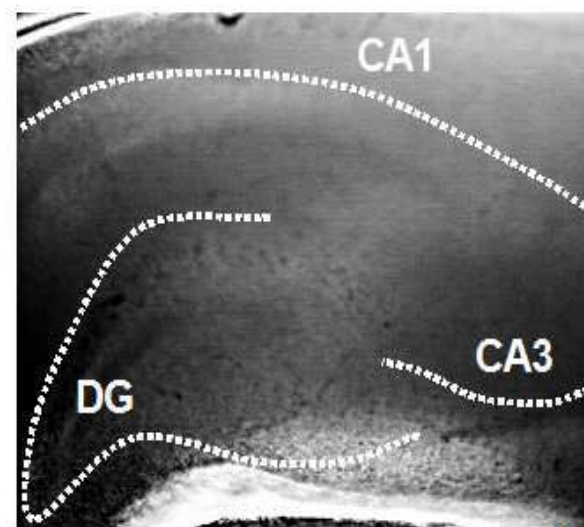
도면5c



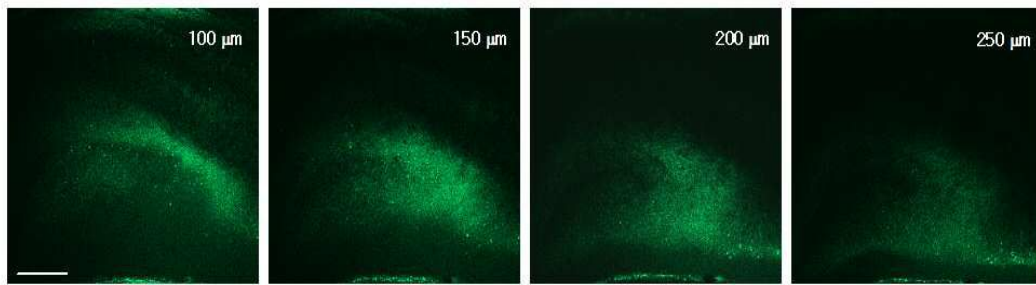
도면5d



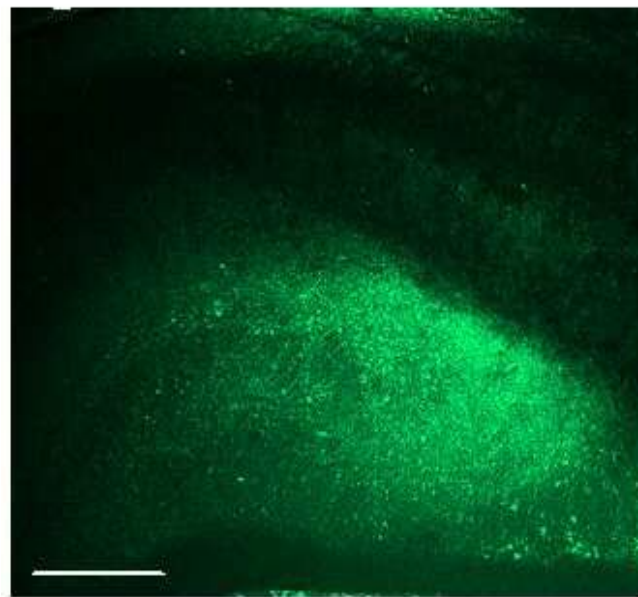
도면6



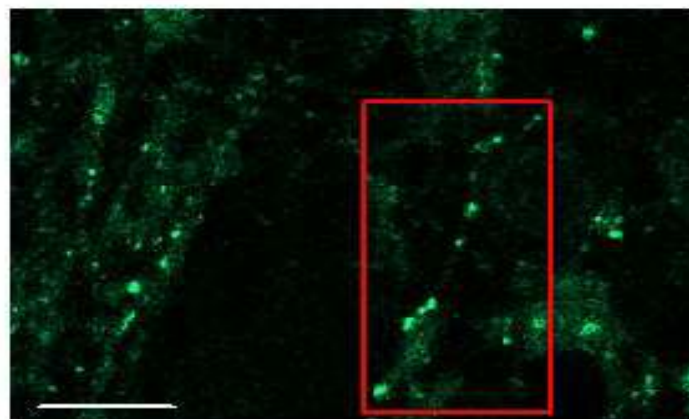
도면7



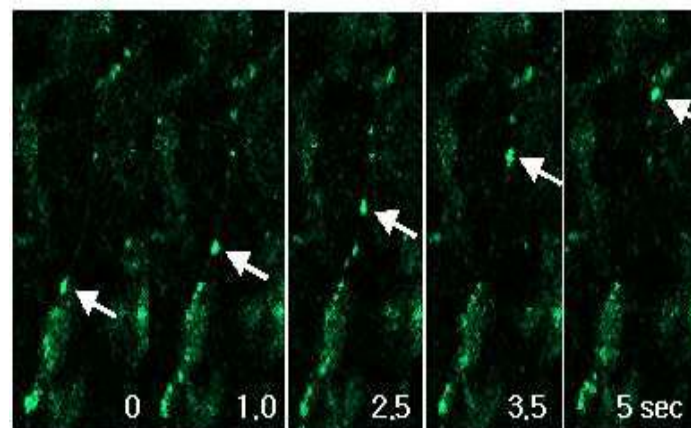
도면8



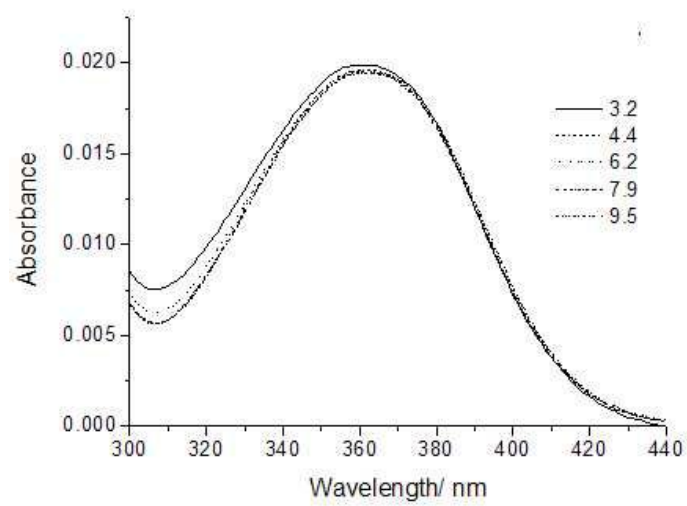
도면9



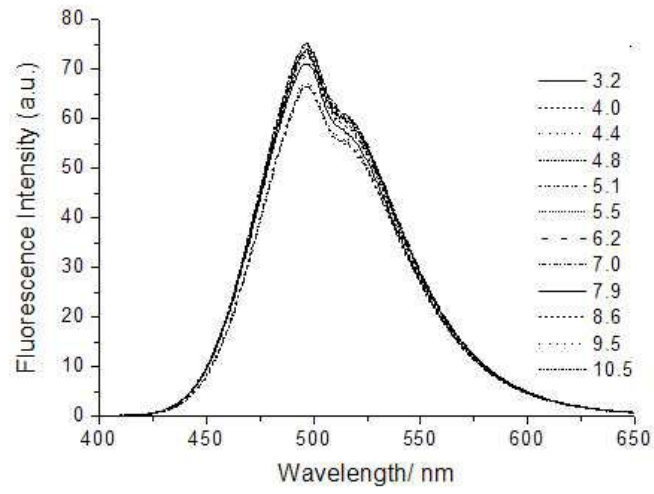
도면10



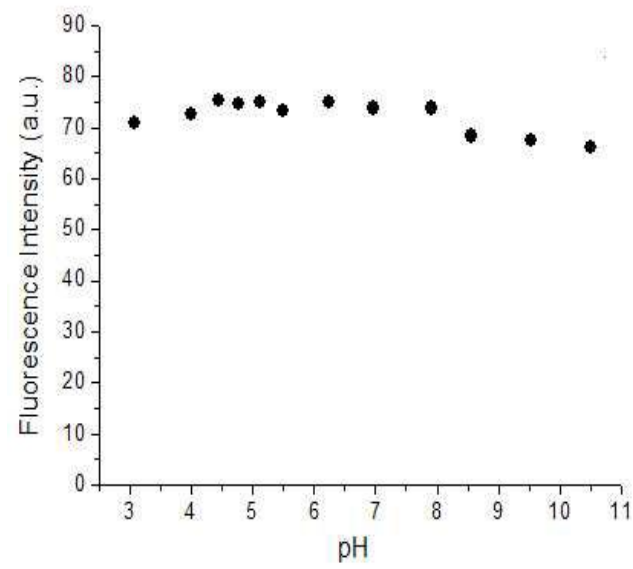
도면11a



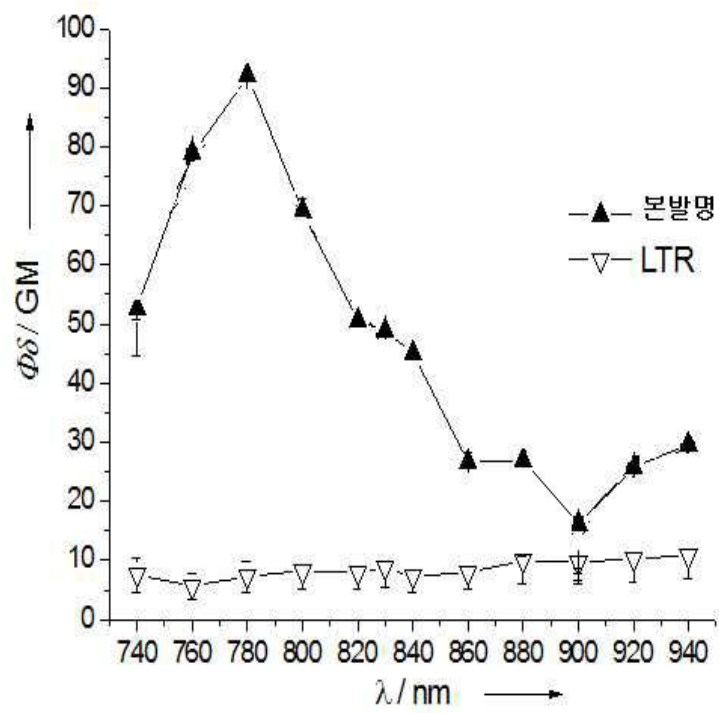
도면11b



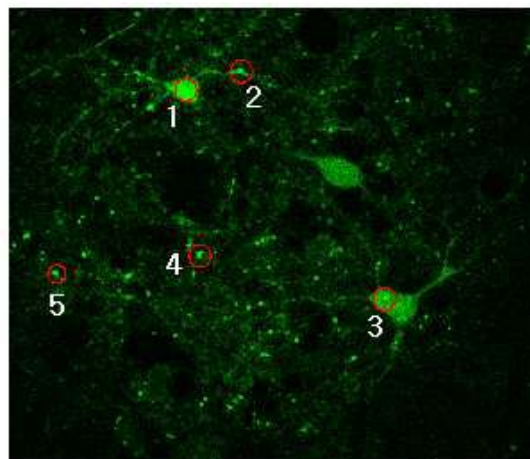
도면11c



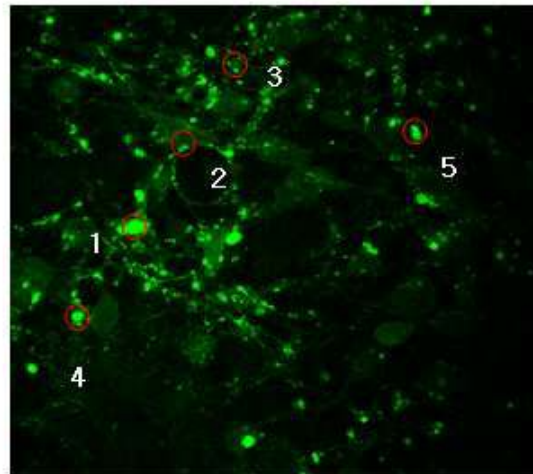
도면12



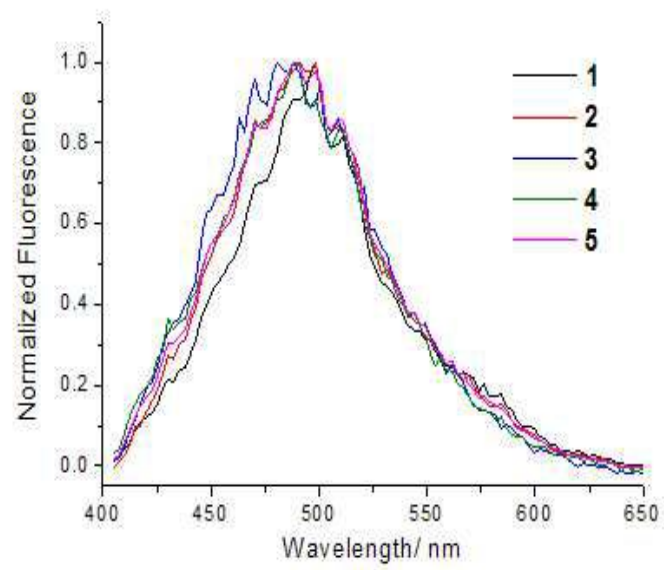
도면13a



도면13b



도면14a



도면14b

