(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0122467
(43) 공개일자 2015년11월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07D 405/14 (2006.01) *C07D 401/14* (2006.01)
C07D 403/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0048761
(22) 출원일자 2014년04월23일
심사청구일자 2014년04월23일

(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

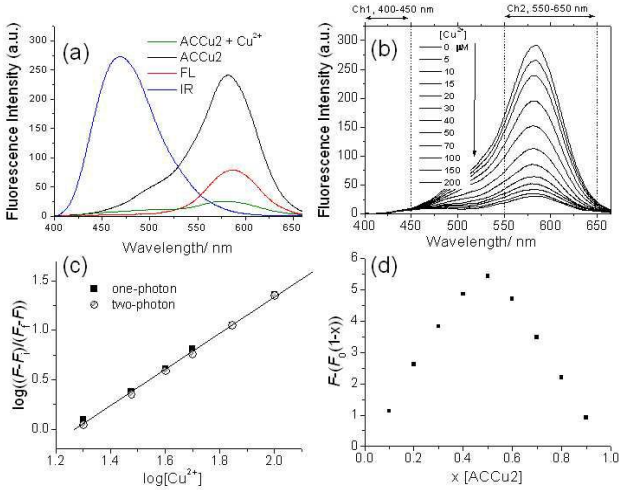
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 및 이를 이용한 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법**

(57) 요 약

본 발명은 구리 2가 이온에 선택성을 갖는 생체 내 영상화용 이광자 표지자 및 이를 이용하여 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 이광자 표지자는 생체 세포 및 조직 내에서 90 ㎛보다 높은 투과 깊이를 가지고 오표적화 및 광탈색의 문제점 없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 2가 이온을 검출할 수 있으며, 400-450 nm 영역의 청색발광 강도와 550-650 nm 영역의 적색발광 강도의 발광 강도비를 이용하여 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화할 수 있다.

대 표 도 - 도3



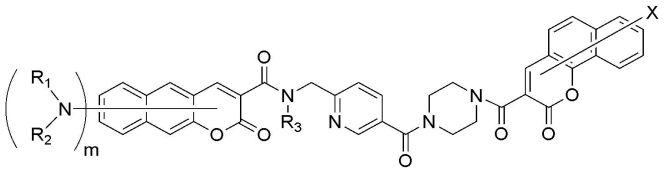
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물:

[화학식 1]



상기 [화학식 1]에서,

R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되며,

m은 1 내지 3의 정수이고,

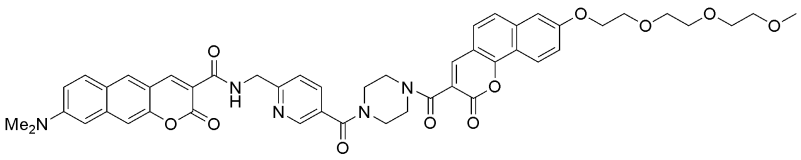
n은 1 내지 6의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물 인 것을 특징으로 하는 화합물:

[화학식 2]



상기 [화학식 2]에서 Me는 메틸기를 의미한다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 구리 2가 이온에 선택성을 가지는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 이광자 흡수 및 발광을 하는 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 이광자 흡수 및 발광에 의해 생체 내 영상화가 가능한 것을 특징으로 하는 화합물.

청구항 6

제1항에 있어서,

[화학식 1]로 표시되는 화합물은 생체 세포 및 조직 내에서 90 ㎛보다 높은 투과 깊이를 가지는 것을 특징으로 하는 화합물

청구항 7

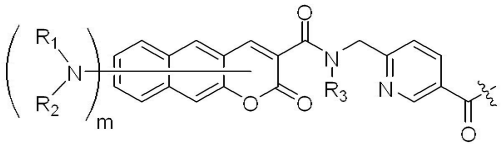
형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 화합물과 표준물질로서 청색발광을 내는 화합물이 피페라진기의 양단에 연결된 구조를 가지는 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 화합물.

청구항 8

제7항에 있어서,

형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 화합물:

[화학식 3]



상기 [화학식 3]에서,

R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되고,

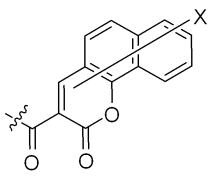
m은 1 내지 3의 정수이다.

청구항 9

제7항에 있어서,

표준물질로서 청색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물 인 것을 특징으로 하는 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 화합물:

[화학식 4]



상기 [화학식 4]에서

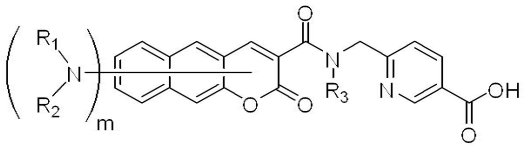
X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

n은 1 내지 6의 정수이다.

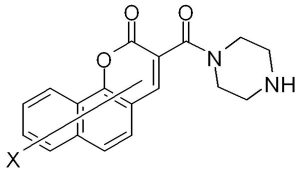
청구항 10

하기 [화학식 5]의 화합물과 하기 [화학식 6]의 화합물을 반응시킴으로써 제1항에 따른 화합물을 제조하는 방법:

[화학식 5]



[화학식 6]



상기 [화학식 5] 또는 [화학식 6]에서,

R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되며,

m은 1 내지 3의 정수이고,

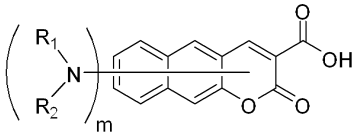
n은 1 내지 6의 정수이다.

청구항 11

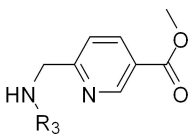
제10항에 있어서,

상기 [화학식 5]의 화합물은 하기 [화학식 7]의 화합물과 하기 [화학식 8]의 화합물을 반응시켜 하기 [화학식 9]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 9]의 에스테르기를 카르복시기로 치환시키는 단계;를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 제1항에 따른 화합물을 제조하는 방법:

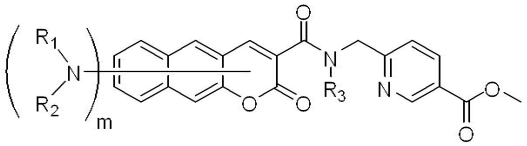
[화학식 7]



[화학식 8]



[화학식 9]

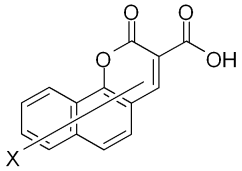


청구항 12

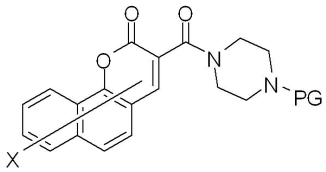
제10항에 있어서,

상기 [화학식 6]의 화합물은 하기 [화학식 10]의 화합물과 한쪽 아민기가 아민보호기로 보호된 피페라진을 반응시켜 하기 [화학식 11]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 11]의 아민보호기를 제거하는 단계;를 수행함으로써 제조되는 것을 특징으로 제1항에 따른 화합물을 제조하는 방법:

[화학식 10]



[화학식 11]



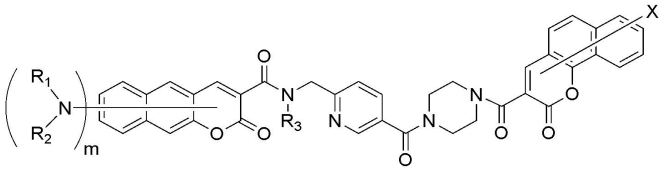
상기 [화학식 11]에서,

PG는 아민보호기이다.

청구항 13

하기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 구리 2가 이온의 반응에 의해 얻어진 단파장 및 장파장 영역에서 측정된 발광강도 비율을 이용하여 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법:

[화학식 1]



상기 [화학식 1]에서,

R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되며,

m은 1 내지 3의 정수이고,

n은 1 내지 6의 정수이다.

청구항 14

제13항에 있어서,

단파장 영역의 최대 파장과 장파장 영역의 최소 파장의 거리는 70 nm 이상인 것을 특징으로 하는 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

단파장 영역의 범위는 400 내지 480 nm인 것을 특징으로 하는 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 구리 2가 이온의 반응은 pH 5 내지 7.5 범위에서 수행되는 것을 특징으로 하는 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 생체 내에서 구리 2가 이온(Cu^{2+})을 검출할 수 있어 구리 이온 검출용 이광자 표지자로 이용될 수 있는 신규한 화합물 및 이를 이용하여 생체 내 구리 2가 이온(Cu^{2+})의 농도를 정량화하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 구리 이온은 생체 내의 다양한 기관에서 발견되는 필수 표지 금속으로 세포질내 효소, 미토콘드리아 효소, 및 막산화 효소들의 반응에 보조 인자로서 작용하며, 세포에너지의 생성, 산소분자 저감 및 신호전달 유도 등 생체 내 시스템에서 중요한 역할을 수행한다. 환원된 상태의 구리 1가 이온 (Cu^{+})은 세포에 내재화되어 있지만 산화된 상태의 구리 2가 이온 (Cu^{2+})은 산화적 환경 하의 세포에서 종종 발견된다. 구리 이온 농도 조절에 이상이 생길 경우에는 멘케스병 (Menkes disease), 윌슨병 (Wilson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 프리온 질병(prion diseases)과 같은 심각한 질병들을 야기할 수 있으며, 생체 내 구리이온의 농도가 높아지면 위장장애, 간 및 신장 손상 등이 발생될 수 있다. (Gaggelli, E.; Kozlowski, H.; Valensin, D.; Valensin, G. Chem. Rev. 2006, 106, 1995; Macreadie, I. G. Eur. Biophys. J. Biophy. 2008, 37, 295; Georgopoulos, P. G.; Roy, A.; Yonone-Lioy, M. J.; Opiekun, R. E.; Lioy, P. J. J. Toxicol. Env. Heal. B 2001, 4, 341).

[0003] 정상 및 비정상 조직에서 구리 이온 농도를 정량적으로 측정하는 종래의 방법으로는 TRXRF(total-reflection X-ray fluorescence) 법과 원자 흡수 분광법이 있다. 그러나 상기와 같은 방법은 구리의 산화상태 구별이 불가능하며, 검출 감도가 낮아 생체 내 구리 이온의 농도를 정량적으로 측정하기에 용이하지 않다(Kucharzewski, M.; Braziewicz, J.; Majewska, U.; Gozdz, S. Biol. Trace Elem. Res. 2003, 92, 1).

[0004] 상기와 같은 문제를 해결하고, 생체 내 금속 이온을 정량적으로 측정하는 방법으로 이광자 현미경을 이용하는 방법이 있다. 이광자 현미경법은 소스로서 근적외선 광자를 이용하고 여기를 위해서 공초점 현미경보다 낮은 에너지를 가지는 2개의 광자를 사용하여 장시간 동안 세포 깊은 곳을 영상화할 수 있는 기술이다(Helmchen, F.; Denk, W. Nat. Methods 2005, 2, 932; Zipfel, W. R.; Williams, R. M.; Webb, W. W. Nat. Biotechnol. 2003, 2, 1369; Kim, H. M.; Cho, B. R. Acc. Chem. Res. 2009, 42, 863.; Kim, H. M.; Cho, B. R. Chem. Asian J. 2011, 6, 58).

[0005] 종래기술로서, 대한민국 공개특허 제2013-0039680호에서는 구리 1가 이온에 선택성을 가지는 이광자 형광 염료 및 그 제조방법에 대하여 개시하고 있으며, 대한민국 등록특허 제886,722호에서는 세포질 내 마그네슘을 실시간

모니터링 할 수 있는 이광자 염료 및 그 방법에 대하여 개시하고 있고, 대한민국 등록특허 제976,623호에서는 세포 내 칼슘을 실시간으로 모니터링 할 수 있는 이광자 염료에 관하여 개시하고 있다. 생체 내 금속 이온의 검출을 위하여 다양한 이광자 표지자들이 개발되고 있으나 아직까지 구리 2가 이온에 선택성을 가지는 이광자 표지자는 개발이 보고된바 없다. 따라서, 구리 2가 이온이 생체 내에서 갖는 중요성을 감안할 때, 이를 선택적으로 검출하고 정량화할 수 있는 이광자 표지자에 대한 기술개발이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

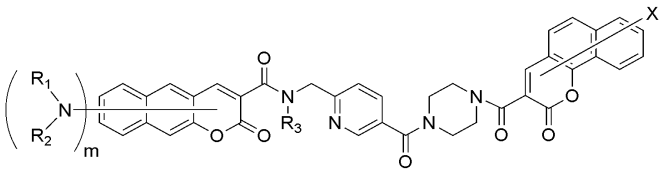
[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 구리 2가 이온에 대해서 높은 선택성과 감도를 가지며, 생체 세포 및 조직 내에서 90 ㎛보다 높은 투과 깊이를 가지고 오표적화 및 광탈색의 문제점 없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 2가 이온을 검출할 수 있어 생체 내 영상화용 이광자 표지자로 이용될 수 있는 화합물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명이 이루고자 하는 두 번째 기술적 과제는 상기 화합물을 이용하여 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기한 첫 번째 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0009] [화학식 1]

[0010] 

[0011] 상기 [화학식 1]에서,

[0012] R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

[0013] X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

[0014] 상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되며,

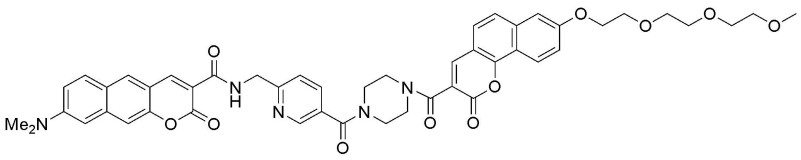
[0015] m은 1 내지 3의 정수이고,

[0016] n은 1 내지 6의 정수이다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬은 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 뷰틸, sec-뷰틸, tert-뷰틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐 및 데실로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0019] [화학식 2]

[0020] 

[0021] 상기 [화학식 2]에서 Me는 메틸기를 의미한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 구리 2가 이온에 선택성을 가질 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 이광자 흡수 및 발광을 할 수 있다.

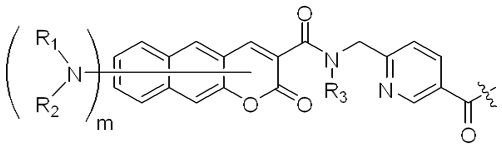
[0024] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 이광자 흡수 및 발광에 의해 생체 내 영상화가 가능하다.

[0025] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, [화학식 1]로 표시되는 화합물은 생체 세포 및 조직 내에서 90 ㎛보다 높은 투과 깊이를 가질 수 있다.

[0026] 한편, 본 발명은 형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 화합물과 표준물질로서 청색발광을 내는 화합물이 피페라진기의 양단에 연결된 구조를 가지는 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 화합물을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물일 수 있다.

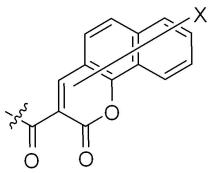
[0028] [화학식 3]

[0029] 

[0030] 상기 [화학식 3]에서, R_1, R_2, R_3 및 m은 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 표준물질로서 청색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물일 수 있다.

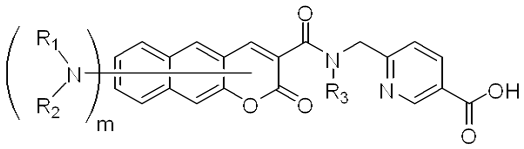
[0032] [화학식 4]

[0033] 

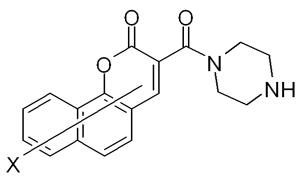
[0034] 상기 [화학식 4]에서, X 및 n은 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0035] 한편, 본 발명은 하기 [화학식 5]의 화합물과 하기 [화학식 6]의 화합물을 반응시킴으로써 상기 [화학식 1]의 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0036] [화학식 5]

[0037] 

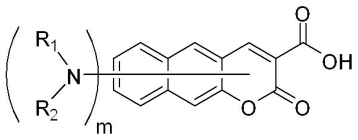
[0038] [화학식 6]

[0039] 

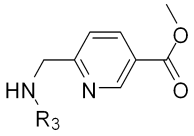
[0040] 상기 [화학식 5] 또는 [화학식 6]에서, R_1, R_2, R_3, X, m 및 n은 상기 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0041] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 5]의 화합물은 하기 [화학식 7]의 화합물과 하기 [화학식 8]의 화합물을 반응시켜 하기 [화학식 9]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 9]의 에스테르기를 카르복시기로 치환시키는 단계;를 수행함으로써 제조될 수 있다.

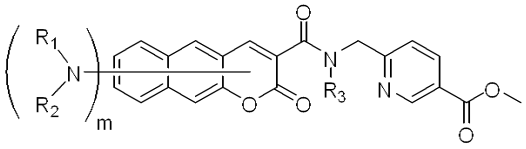
[0042] [화학식 7]

[0043] 

[0044] [화학식 8]

[0045] 

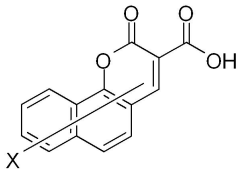
[0046] [화학식 9]

[0047] 

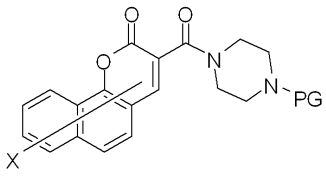
[0048] 상기 [화학식 7] 내지 [화학식 9]에서, R_1, R_2, R_3, X, m 및 n은 상기 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0049] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 의하면, 상기 [화학식 6]의 화합물은 하기 [화학식 10]의 화합물과 한쪽 아민기가 아민보호기로 보호된 피페라진을 반응시켜 하기 [화학식 11]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 11]의 아민보호기를 제거하는 단계;를 수행함으로써 제조될 수 있다.

[0050] [화학식 10]

[0051] 

[0052] [화학식 11]

[0053] 

[0054] 상기 [화학식 11]에서,

[0055] PG는 아민보호기이다.

[0056] 또한, 본 발명은 상기한 두 번째 목적을 달성하기 위하여, 상기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 구리 2가 이온의 반응에 의해 얻어진 단파장 및 장파장 영역에서 측정된 발광강도 비율을 이용하여 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화하는 방법을 제공한다.

[0057] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 단파장 영역의 최대 파장과 장파장 영역의 최소 파장의 거리는 70 nm이

상일 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 단파장 영역의 범위는 400 내지 480 nm일 수 있다.

[0059] 본 발명의 또 다른 일 구현예에 따르면, 상기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 구리 2가 이온의 반응은 pH 5 내지 7.5 범위에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0060] 본 발명은 높은 광안정성과 낮은 세포독성을 나타내며 세포 내 구리 2가 이온에 대하여 다른 금속 이온들 및 세포막 결합 탐침들로부터의 간섭 없이 높은 선택성 및 감도를 갖아 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자로 이용될 수 있는 화합물을 제공한다. 본 발명에 따른 화합물은 생체 세포 및 조직 내 90 내지 160 ㎛ 투과 깊이를 가지고 오표적화 및 광탈색의 문제없이 장시간 동안 세포 내 유리 구리 2가 이온을 모니터링 할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1a 내지 1f는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, EtOH/HEPES(9:1) 및 HEPES 완충용액 ([HEPES] = 20mM, pH 7.0) 중에서 [화학식 2]의 화합물(이하, 'ACCu2'라 한다), [화학식 12]의 화합물(이하, 'FL'라 한다) 및 [화학식 13]의 화합물(이하, 'IR'라 한다)에 대한 정규화된 흡수(도 1a-c) 및 형광(도 1d-f) 스펙트럼이다.

도 2는 373 nm의 여기 파장 및 EtOH/HEPES(9:1, v/v, pH 7.0)에서 ACCu2, FL 및 IR 대한 흡수(도 2a) 및 형광(도 2b) 스펙트럼이다.

도 3a는 TP에 의한 373 nm의 여기 파장 및 EtOH/HEPES(9:1, v/v, pH 7.0)에서 ACCu2, FL 및 IR에 대한 형광 스펙트럼이다. 도 3b는 다양한 농도의 유리 구리 2가 이온(0-200 μM)의 존재 하에 ACCu2(3 μM) 착화합물의 이광자 방출에 의한 형광 강도 스펙트럼이다. 도 3c는 다양한 농도의 유리 구리 2가 이온(0-200 μM)의 존재 하에 ACCu2(3 μM) 착화합물의 Hill-곡선이다. 도 3d는 EtOH/HEPES 용매(9:1, v/v, pH 7.0)하에 ACCu2-Cu^{2+}의 화학양론 결정을 위한 작업-곡선이다.

도 4a는 EtOH/HEPES 용매(9:1, v/v, pH 7.0) 및 구리 2가 이온 존재하에서 ACCu2, FL 및 IR에 대한 이광자 형광 스펙트럼이며, 도 4b는 ACCu2, FL 및 IR을 포함하는 헬라세포의 이광자 여기 형광인자(TPEF) 그래프이며 여기파장은 740 nm이다. ACCu2로 표지된 헬라세포의 TPEF 스펙트럼은 각각 470 및 582 nm를 중심으로 두 개의 가우시안 기능으로 분해하였다.

도 5a는 일광자법에 의해 측정된 구리 2가 이온 농도에 따른 ACCu2 형광강도변화를 나타낸 그래프이며, 도 5b는 구리 2가 이온 농도에 따른 일광자 및 이광자법으로 측정된 적정곡선이다.

도 6a은 경쟁 금속 이온들과 대비한 구리 2가 이온의 ACCu2에 대한 반응성을 상대 형광 강도(I_{red}/I_{blue})로 표시한 막대그래프로, (1) Na^{+}; (2) K^{+}; (3) Mg^{2+}; (4) Ca^{2+}; (5) Mn^{2+}; (6) Fe^{2+}; (7) Co^{2+}; (8) Ni^{+}; (9) Zn^{2+}; (10) Pd^{2+}; (11) Cd^{2+}; (12) Cu^{2+};이다. 도 6b는 pH 변화에 따른 ACCu2 및 ACCu2와 구리 2가 이온의 반응성을 확인한 그래프이다.

도 7은 본 발명의 일 구현예에 따른 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 농도별 ACCu2 존재 하에서 헬라세포의 생존능을 측정한 그래프이다.

도 8a는 본 발명의 일 구현예에 따른 400-650 nm에서 수집된 ACCu2(3 μM)로 표지된 헬라세포의 TPM 이미지이며, 도 8b는 상대적인 TPEF 강도를 나타낸 도이다.

도 9a-d는 본 발명의 일 구현예에 따른 ACCu2(3 μM)로 표지된 헬라세포의 TPM이미지로 750 nm 여기 파장을 이용하였다. 도 9a는 채널 1(100-450 nm, I_{blue}) 검출창을 이용해 얻은 TPM이미지이며, 도 9b-d는 채널 2(550-650 nm, I_{red}) 검출창을 이용해 얻은 TPM이미지이다. 도 9e는 ACCu2(3 μM)로 표지된 헬라세포에 구리 2가 이온, PDTC 및 EDTA 첨가 시간에 따른 TPEF 강도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 구현예에 따른 ACCu2(20 μM)로 처리한 랫트 해마 절편의 TPM 이미지이다. 여기 파장으로 750 nm를 사용하였으며, 검출창으로 채널 1(400-450 nm, I_{blue}) 및 채널 2(550-650 nm, I_{red})를 이용하였다(스케일바 300 ㎛).

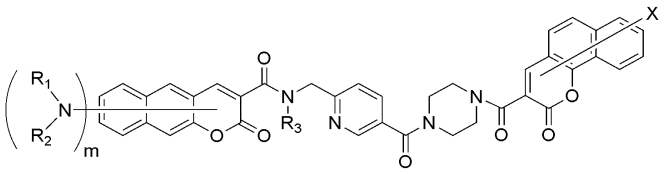
도 11a는 점막, 점막근층 및 점막하층을 나타낸 모식도이며, 도 11b는 본 발명의 일 구현예에 따라 결장의 EDTA 처리한 정상조직, 정상조직, 용종 및 암조직에서 얻은 TPM이미지로, 검출창으로 채널 1(400-450 nm, I_{blue}) 및 채널 2(550-650 nm, I_{red})를 이용하였다.

도 12는 결장의 EDTA 처리한 정상조직, 정상조직, 용종 및 암조직에서 얻은 TPM이미지이며, 정상조직 단면 이미지의 깊이에 따른 3차원 비율적 TPM 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 본 발명은 하기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제공한다.

[0063] [화학식 1]

[0064] 

[0065] 상기 [화학식 1]에서,

[0066] R_1, R_2 및 R_3은 서로 동일하거나 상이하고 각각 독립적으로 수소 또는 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬이며,

[0067] X는 $-OCH_2(CH_2OCH_2)_nCH_2OCH_3$이고,

[0068] 상기 치환된 알킬은 할로겐, 트리플루오로메틸, 아미노, 탄소수 1 내지 5의 알킬, 탄소수 1 내지 5의 알콕시, 히드록시, 탄소수 1 내지 5의 카르복시기, 시아노, 페닐 및 벤질로 이루어진 군 중에서 선택되는 치환기로 치환되며,

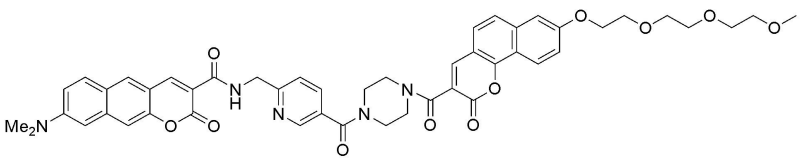
[0069] m은 1 내지 3의 정수이고,

[0070] n은 1 내지 6의 정수이다.

[0071] 본 발명에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 10의 치환 또는 비치환된 알킬은 예를 들어, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 뷰틸, sec-뷰틸, tert-뷰틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐 및 데실로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

[0072] 본 발명에 따르면, 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 구체적으로 하기 [화학식 2]로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0073] [화학식 2]

[0074] 

[0075] 상기 [화학식 2]에서 Me는 메틸기를 의미한다.

[0076] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물은 생체 내 구리 2가 이온에 대해서 매우 높은 선택성을 갖는다. 본 발명에 따른 [화학식 1]의 화합물은 생체 내 다양한 경쟁반응 금속들에 대한 반응성을 후술하는 바와 같이 다양한 실험을 통하여 검증해 본 결과, 생체 내의 Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Cu^+, Zn^{2+}, Pd^{2+} 및 Cd^{2+}와 같은 다른 경쟁 반응 금속들에 비해서 구리 2가 이온과 매우 높은 반응성을 가지고 선택적으로 반응함을 알 수 있었다.

[0077] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물은 이광자 흡수 및 발광할 수 있어 이광자 표지자로 이용이 가능하며, 상기 이광자 흡수 및 발광에 의해 생체 내 영상화가 가능하다.

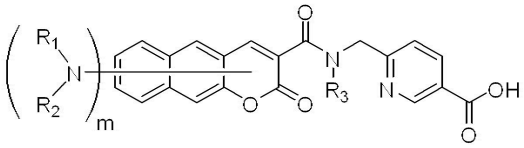
[0078] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물은 pH 5 내지 7.5 범위에서 구리 2가 이온을 효과적으로 검출할 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물의 생체 내 영상화제로서의 적합성을 검증해 보기 위해서 배양 HeLa 세포 내에서의 구리 2가 이온 검출 실험을 수행하였으며, 생체 조직 내 깊은 곳에 존재하는 구리 2가 이온을 검출할 수 있는지 여부를 검증해 보기 위해서 랫트 해마 및 시상하부 조직 박편과 인체 결장조직에 대한 TPM 영상을 촬영한 결과, 본 발명에 따른 염료가 생체 내 구리 2가 이온의 검출에 유용하게 사용될 수 있으며, 다양한 깊이의 조직에서도 훌륭한 검출 강도를 나타냄을 알 수 있었다.

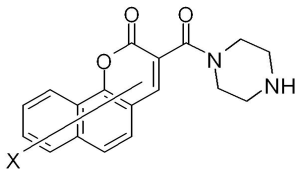
[0080] 본 발명에 따른 상기 [화학식 1]의 화합물은 생체 세포 및 조직 내에서 90 ㎛보다 높은 투과 깊이를 가질 수 있는데, 바람직하게는 90 내지 160 ㎛의 투과깊이를 가질 수 있다.

[0081] 본 발명은 하기 [화학식 5]의 화합물과 하기 [화학식 6]의 화합물을 반응시킴으로써 상기 [화학식 1]로 표시되는 화합물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0082] [화학식 5]

[0083] 

[0084] [화학식 6]

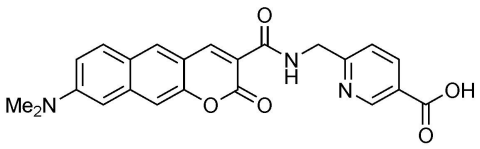
[0085] 

[0086] 상기 [화학식 5] 또는 [화학식 6]에서, R_1, R_2, R_3, X, m 및 n은 상기 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

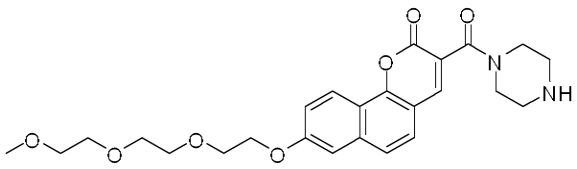
[0087] 상기 반응은 상기 [화학식 5]의 화합물과 상기 [화학식 6]의 화합물에 염기를 첨가하고 CH_2Cl_2와 같은 유기 용매 중에서 교반시킴으로써 수행될 수 있다. 상기 염기는 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카보디이미드 및 4-디메틸아미노피리딘 중에서 선택되는 1종 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 상기 반응은 아르곤과 같은 비활성기체 기류 하에서 수행될 수 있다.

[0088] 상기 [화학식 5]는 구체적으로 하기 [화학식 12]일 수 있고, 상기 [화학식 6]은 구체적으로 하기 [화학식 13]일 수 있다.

[0089] [화학식 12]

[0090] 

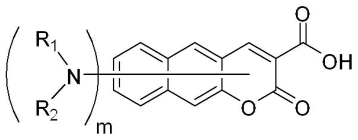
[0091] [화학식 13]

[0092] 

[0093] 바람직하게는 상기 [화학식 5]의 화합물은 하기 [화학식 7]의 화합물과 하기 [화학식 8]의 화합물을 반응시켜 하기 [화학식 9]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 9]의 에스테르기를 카르복시기로 치환시키는

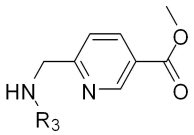
단계;를 수행함으로써 제조될 수 있다.

[0094] [화학식 7]



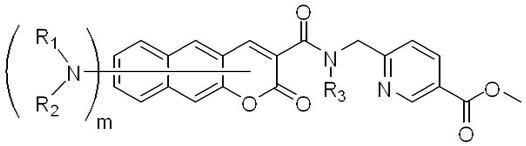
[0095]

[0096] [화학식 8]



[0097]

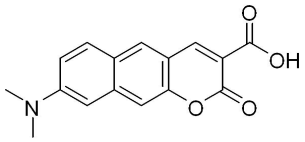
[0098] [화학식 9]



[0099]

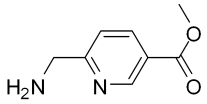
[0100] 상기 [화학식 7]는 구체적으로 하기 [화학식 14]일 수 있고, 상기 [화학식 8]은 구체적으로 하기 [화학식 15]일 수 있으며, 상기 [화학식 9]는 하기 [화학식 16]일 수 있다.

[0101] [화학식 14]



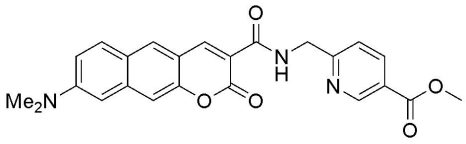
[0102]

[0103] [화학식 15]



[0104]

[0105] [화학식 16]

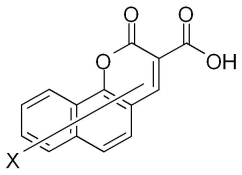


[0106]

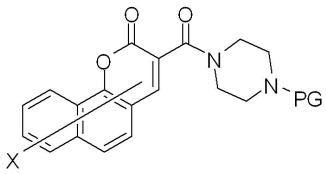
[0107] 상기 [화학식 9]의 화합물을 제조하는 단계는 염기를 추가하고 CH_2Cl_2와 같은 유기 용매 중에서 교반시킴으로써 수행될 수 있는데, 상기 염기는 1,3-디시클로헥실카보디이미드 및 4-디메틸아미노피리딘 중에서 선택되는 1종 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 상기 반응은 아르곤과 같은 비활성기체 기류 하에서 수행될 수 있다.

[0108] 상기 [화학식 6]의 화합물은 하기 [화학식 10]의 화합물과 한쪽 아민기가 아민보호기로 보호된 피페라진을 반응시켜 하기 [화학식 11]의 화합물을 제조하는 단계; 및 하기 [화학식 11]의 아민보호기를 제거하는 단계;를 수행함으로써 제조될 수 있다.

[0109] [화학식 10]

[0110] 

[0111] [화학식 11]

[0112] 

[0113] 상기 [화학식 11]에서,

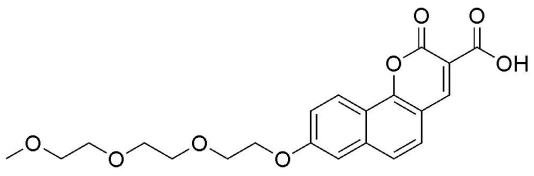
[0114] X는 상기 [화학식 1]에서 정의한 바와 같으며,

[0115] PG는 아민보호기이다.

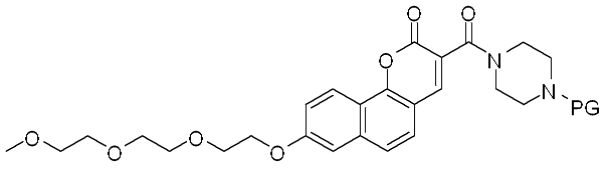
[0116] 상기 아민보호기로는 일반적으로 아민 보호에 사용되는 것이면 특별히 제한은 없으나, 바람직하게는 디-tert-부틸 피로카보네이트로 보호시킨 것일 수 있으며, 한쪽 아민기가 아민보호기로 보호된 피페라진은 tert-부틸 피페라진-1-카보네이트일 수 있다.

[0117] 구체적으로 상기 [화학식 10]의 화합물은 하기 [화학식 17]의 화합물 일 수 있으며, 상기 [화학식 11]의 화합물은 하기 [화학식 18]의 화합물일 수 있다.

[0118] [화학식 17]

[0119] 

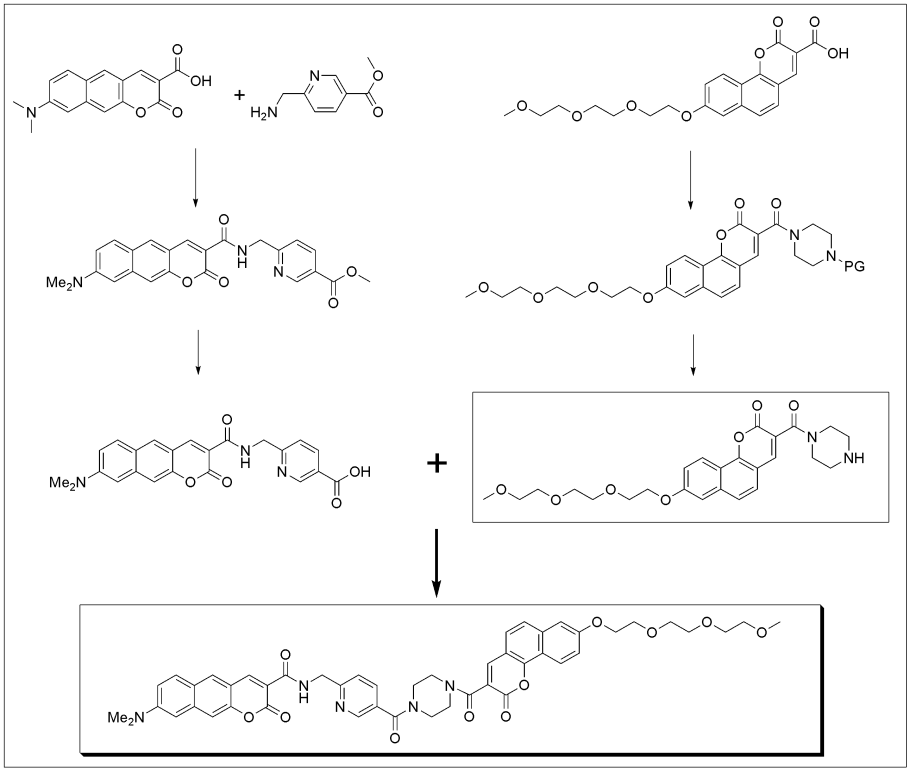
[0120] [화학식 18]

[0121] 

[0122] 상기 [화학식 11]의 화합물을 제조하는 단계는 염기를 추가하고 CH_2Cl_2와 같은 유기 용매 중에서 교반시킴으로써 수행될 수 있는데, 상기 염기는 1,3-디시클로헥실카보디이미드 및 4-디메틸아미노피리딘 중에서 선택되는 1종 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 상기 반응은 아르곤과 같은 비활성기체 기류 하에서 수행될 수 있다.

[0123] 참고로 하기 [반응식 1]에는 [화학식 2]로 표시되는 화합물을 제조하는 예시적인 개략반응도를 나타내었다.

[0124] [반응식 1]

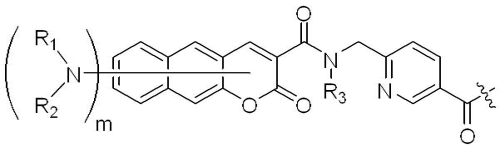


[0125]

[0126] 한편, 본 발명은 형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 [화학식 2]로 표시되는 화합물과 표준물질(internal reference)로서 청색발광을 내는 [화학식 3]으로 표시되는 화합물이 피페라진기의 양단에 연결된 구조를 가지는 구리 2가 이온 검출용 이광자 표지자 화합물을 제공한다.

[0127] 상기 형광단 및 구리 2가 이온 킬레이터로서 적색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 3]으로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0128] [화학식 3]

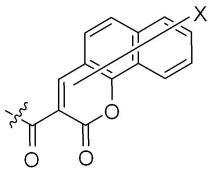


[0129]

[0130] 상기 [화학식 3]에서, R_1, R_2, R_3 및 m은 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0131] 또한, 상기 표준물질로서 청색발광을 내는 화합물은 하기 [화학식 4]로 표시되는 화합물일 수 있다.

[0132] [화학식 4]



[0133]

[0134] 상기 [화학식 4]에서, X 및 n은 [화학식 1]에서 정의한 바와 같다.

[0135] 본 발명에 따르면, 본 발명에 따른 [화학식 1]로 표시되는 화합물은 구리 2가 이온이 있는 환경에서 포스터 공명 에너지 전달(Forster resonance energy transfer, FRET)에 의해 [화학식 4]로 표시되는 화합물 구조에 의한

청색발광 강도가 감소될 수 있지만 [화학식 4]로 표시되는 화합물 구조는 구리 2가 이온에 영향을 직접적 영향을 미치는 것이 아니며, 구리 2가 이온의 변화 감지는 [화학식 3]으로 표시되는 화합물 구조에 의한 적색발광 강도 변화를 통해 확인할 수 있다.

[0136] 따라서, 본 발명은 상기 [화학식 1]로 표시되는 이광자 표지자를 이용하여 적색발광/청색발광 강도비를 측정함으로써 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화할 수 있다.

[0137] 본 발명은 상기 [화학식 1]의 화합물과 생체 내에 존재하는 구리 2가 이온의 반응에 의해 단파장 및 장파장 영역에서 측정된 발광강도의 비율을 이용함으로써 생체 내 구리 2가 이온의 농도를 정량화할 수 있다. 이때 단파장 영역의 최대 파장과 장파장 영역의 최소 파장의 거리는 70 nm 이상일 수 있고, 바람직하게는 70 내지 150 nm 일 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 단파장 검출 영역은 380 내지 480 nm, 장파장 검출 영역은 550 내지 700 nm 일 수 있으며, 바람직하게는, 단파장 검출 영역은 400 내지 450 nm, 장파장 검출 영역은 550 내지 650 nm 범위일 수 있다.

[0138] 본 발명에 따르면, 본 발명의 상기 [화학식 1]의 화합물 및 이광자현미경(two photon microscopy, TPM)을 이용하여 수득한 이중 색상의 TPM 생체 내 영상화 이미지를 통해 정상조직, 용종 및 암 조직에서 구리 2가 이온의 농도를 정량화할 수 있다.

[0139] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세하게 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것은 아니며, 본 발명의 이해를 돕기 위한 것으로 서술된 것이다.

[0140] **실시예**

[0141] **실시예: [화학식 2]의 화합물 제조**

[0142] 1) [화학식 16]의 화합물 제조

[0143] 8-Dimethylamino-2-oxo-2H-benzo[g]chromene-3-carboxylic acid(0.20 g, 0.84 mmol, 화학식 4), 6-(aminomethyl)nicotinate(0.21 g, 1.3 mol, 화학식 5), 1,3-dicyclohexyl carbodiimide(0.26 g, 1.3 mmol) 및 4-dimethylaminopyridine (0.010 g, 0.084 mmol)을 디클로로메탄에 용해시켜 아르곤 기류 하에서 12시간 동안 교반시켰다. 반응 종료 후, 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압 농축하였다. 감압된 농축액을 실리카겔을 이용한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 Hexane:EtOAc=1:2인 용매 시스템으로 정제하여 [화학식 16]의 화합물을 제조하였다. Yield: 0.20 g (64 %)

[0144] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 9.20 (1H, d, J = 2.0 Hz), 8.96 (1H, s), 8.27 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz), 8.01 (1H, s), 7.89 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 7.46 (1H, s), 7.43 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.16 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz), 6.81(1H, d, *J* = 2.5 Hz), 4.88 (2H, d, *J* = 5.8 Hz), 3.95 (3H, s), 3.16 (6H, s);

[0145] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 165.91, 162.94, 162.45, 162.05, 151.50, 150.87, 149.34, 138.67, 138.03, 136.30, 131.28, 130.63, 124.84, 123.92, 121.30, 116.44, 115.03, 114.82, 109.73, 103.97, 52.59, 45.56, 40.51 ppm.

[0146] 2) [화학식 12]의 화합물 제조

[0147] 테트라하이드로퓨란(THF) 5 mL과 메탄올 5 mL을 혼합한 혼합 용매에 [화학식 16]의 화합물(100 mg, 0.23 mmol)을 용해시킨 뒤, 물 5 mL에 용해시킨 KOH(65 mg, 1.2 mmol)를 첨가하여 상온에서 3시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 플라스크의 유기용매를 제거하고 염산 수용액을 이용하여 pH를 4 내지 5로 조절하였다. 이후, 디클로로메탄으로 추출하고 농축하였다. 디클로로메탄/메탄올 이용매 시스템을 이용하여 재결정하여 [화학식 12]의 화합물을 얻었다. Orange crystal. Yield: 50 mg (52%);

[0148] ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 9.01 (1H, s), 8.96 (1H, s), 8.35 (1H, s), 8.22 (1H, d, *J* = 8.2 Hz), 7.87

(1H, d, J = 9.2 Hz), 7.57 (1H, s), 7.48 (1H, d, J = 8.2 Hz), 7.28 (1H, d, J = 9.2 Hz), 6.96 (1H, s), 4.72 (2H, d, J = 5.8 Hz), 3.10 (6H, s) ppm.

[0149] 3) [화학식 18]의 화합물 제조

[0150] 8-(2-(2-(2-methoxyethoxy)ethoxy)ethoxy)-2-oxo-2H-benzo[h]chromene-3-carboxylic acid(0.30 g, 0.75 mmol), tert-butyl piperazine-1-carboxylate(0.17 g, 0.89 mmol), 1,3-dicyclohexyl carbodiimide(0.23 g, 1.1 mmol) 및 4-dimethylaminopyridine(9.0 mg, 0.075 mmol)를 디클로로메탄에 용해시켜 아르곤 기류하에서 12시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후, 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압 농축하였다. 감압된 농축액을 실리카겔을 이용한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 Hexane:EtOAc=1:2인 용매 시스템으로 정제하여 [화학식 18]의 화합물을 제조하였다. Colorless oily product. Yield: 0.28 g (65%);

[0151] ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$): δ 8.44 (1H, d, J = 9.3 Hz), 8.08 (1H, s), 7.58 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.44 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.33 (1H, dd, J = 9.3, 2.5 Hz), 7.19 (1H, d, J = 2.5 Hz), 4.30 (2H, m), 3.95 (2H, m), 3.78 (4H, m), 3.70 (2H, m), 3.65 (2H, m), 3.54 (6H, m), 3.40 (2H, m), 3.38 (3H, s), 1.47 (9H, s);

[0152] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 164.27, 159.93, 158.34, 154.64, 152.41, 145.30, 137.53, 124.61, 124.36, 124.10, 122.45, 120.19, 117.76, 112.47, 107.60, 80.37, 72.04, 71.03, 70.79, 70.70, 69.66, 67.86, 59.10, 47.26, 42.32, 28.45 ppm.

[0153] 4) [화학식 13]의 화합물 제조

[0154] [화학식 18]의 화합물(100 mg, 0.19 mmol)을 디클로로메탄(5 mL)에 용해시킨 뒤, CF_3CO_2H (1 mL)를 첨가하여 아르곤 기류 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 감압 농축하고 실리카겔을 이용한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 $CHCl_3$/MeOH=20:1인 용매 시스템으로 정제하여 [화학식 13]의 화합물을 제조하였다. Colorless oily product. Yield: 67 mg (75%);

[0155] ^{1}H NMR (500 MHz, acetone-d_6): δ 8.30 (2H, d, J = 9.3 Hz), 8.11 (1H, s), 7.66 (2H, m), 7.43 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.35 (1H, dd, J = 9.3, 2.2 Hz), 4.32 (2H, m), 3.92 (2H, m), 3.78 (4H, m), 3.52-3.72 (8H, m), 3.40-3.48 (4H, m), 3.28 (3H, s), 2.78-2.87 (4H, m);

[0156] ^{13}C NMR (125 MHz, acetone-d_6): δ 164.55, 159.58, 158.23, 151.72, 145.73, 137.38, 124.92, 123.79, 123.38, 121.05, 119.67, 117.04, 112.43, 107.62, 71.48, 70.39, 70.08, 69.87, 69.28, 67.80, 58.06, 43.50, 43.20 ppm.

[0157] 5) [화학식 2]의 화합물 제조

[0158] [화학식 12]의 화합물(50 mg, 0.12 mmol), [화학식 13]의 화합물(67 mg, 0.14 mmol), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide(28 mg, 0.18 mmol, EDCI) 및 4-dimethylaminopyridine(2 mg, 0.012 mmol)을 디클로로메탄에 용해시킨 뒤, 아르곤 기류 하에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 종료 후, 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압 농축하였다. 감압된 농축액을 실리카겔을 이용한 컬럼크로마토그래피법을 이용하여 acetate/acetone=3:1인 용매 시스템으로 정제한 뒤, 정제물을 디클로로메탄/메탄올 이용매 시스템을 이용하여 재결정하여 최종 목적하는 [화학식 2]의 화합물을 제조하였다. orange crystal. Yield: 38 mg (36%);

[0159] IR (deposit from CH_2Cl_2 solution on a NaCl plate): 3340 (NH), 1707 (C=O);

[0160] ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9.61 (1H, s), 8.94 (1H, s), 8.68 (1H, s), 8.43 (1H, br), 8.12 (1H, s), 7.99 (1H, s), 7.78 (2H, m), 7.58 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.46 (2H, m), 7.33 (1H, d, J = 8.5 Hz), 7.16 (1H, dd, J = 9.3, 2.2 Hz), 6.80 (1H, d, J = 2.2 Hz), 4.86 (2H, d, J = 3.7 Hz), 4.29 (2H, m), 3.95 (2H, m),

3.76-3.80 (4H, m), 3.64-3.72 (8H, m), 3.53-3.57 (4H, m), 3.38 (3H, s), 3.16 (6H, s);

[0161] ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 168.24, 162.97, 162.48, 160.11, 158.51, 152.69, 151.56, 150.89, 149.42, 147.94, 138.72, 137.74, 136.24, 131.34, 130.67, 129.71. 124.68, 124.60, 124.32, 123.99, 122.00, 121.71, 120.34, 117.86, 116.50, 115.11, 114.88, 113.38, 112.54, 109.80, 107.72, 104.04, 72.13, 71.14, 70.81, 69.75, 67.95, 59.27, 45.45, 43.69, 40.54;

[0162] HRMS(FAB^+): m/z calculated for [$C_{48}H_{47}N_5O_{11}{}^+H^+$]: 870.3306, found : 870.3350.

[0163] **시험예**

[0164] 시험예 1:. 흡수 및 형광 스펙트럼 측정

[0165] 흡수 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer를 사용하였으며, 형광 스펙트럼은 1cm 표준 쿼츠 셀을 구비한 Amico-Bowman series 2 luminescence spectrometer를 사용하여 측정하였다. 형광 양자 수율은 Coumarin 307과 Rhodamine B를 참조 화합물로 사용하는 참고 문헌의 방법에 따라서 측정하였다(J. N. Demas, G. A. Crosby, *J. Phys. Chem.* 1971, *75*, 991).

[0166] 도 1a 내지 1f에는 1,4-디옥산, DMF, 에탄올, EtOH/HEPES(9:1) 및 HEPES 완충용액 ([HEPES] = 20 mM, pH 7.0) 중에서 [화학식 2]의 화합물(이하, 'ACCu2'라 한다), [화학식 12]의 화합물(이하, 'FL'라 한다) 및 [화학식 13]의 화합물(이하, 'IR'라 한다)에 대한 정규화된 흡수 (도 1a-c) 및 형광 (도 1d-f) 스펙트럼을 도시하였으며, 이때 여기 파장으로는 420 nm의 빛을 사용하였다. ACCu2의 HEPES 완충용액([HEPES] = 20 mM, pH 7.0)에 대한 용해도는 참고문헌의 형광 방법을 사용하여 측정하였으며 (Kim, H. M.; Choo, H. J.; Jung, S. Y.; Ko, Y. G.; Park, W. H.; Jeon, S. J.; Kim, C. H.; Joo, T. H.; Cho, B. R. ChemBioChem 2007, 8, 553) 측정치는 8.0 μM로서, 세포들을 염색하기에 충분한 수준이었다.

[0167] 본 발명에 따른 ACCu2의 발광 스펙트럼은 다음과 같은 순서로 용매 극성(E_T^N)이 증가함에 따라 점진적인 적색이동을 나타내었다(1,4-디옥산 < DMF < EtOH < H2O). 발광스펙트럼에서 적색이동이 크다(계산 값 69 nm)는 것은 본 발명에 따른 ACCu2가 극성 탐침으로서 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 나타낸다.

표 1

[0168]

Solvent (E_T^N)[a]	λ_{max}^{abs}, nm[b]			λ_{max}^{fl}, nm[b]			Φ[c]		
	IR	FL	ACCu2	IR	FL	ACCu2	IR	FL	ACCu2
1,4-dioxane(0.164)	367	438	380/437	445	536	533	0.080	0.77	0.75
DMF (0.386)	366	454	371/456	448	576	577	0.070	0.29	0.54
EtOH (0.654)	372	457	379/460	451	582	578	0.18	0.25	0.34
EtOH/HEPES(9:1)	373	461	379/465	460	587	585	0.62	0.15	0.22
HEPES(1.000)[d]	375	452	380/453	468	590	602	1.00	0.0045	0.0028

[0169] [a] 괄호 안의 수치는 용매 극성에 대한 정규화된 경험적 파라미터. [b] 각각 OP(일광자) 흡수 및 방출 스펙트럼의 λ_{max}(단위: nm). [c] 형광 양자 효율, ±15%. [d] HEPES 완충용액([HEPES] = 20 mM, pH 7.0), 물에서의 용매극성(E_T^N) 값.

[0170] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, EtOH/HEPES(9:1) 용매가 세포 내 환경에서 효과적인 모델이며, ACCu2를 이용하여 TPM에 의해 구리 2가 이온을 확인할 수 있다는 것을 확인하였다.

[0171] 도 2a 및 도 2b에 나타낸 바와 같이, ACCu2의 흡수 스펙트럼은 IR 및 FL의 합과 거의 동일하였으며, ACCu2의 발광 스펙트럼은 IR 및 FL에 기인할 수 있는 두 개의 밴드 영역을 나타냈는데, 청색발광 영역(400-450 nm)의 면적은 IR에 비하여 9.2배 감소하였으며, 적색발광 영역(550-650 nm)의 면적은 FL에 비하여 3.4배 증가하였다.

[0172] 이와 유사한 결과는 이광자(Two photon, TP) 모드에서도 나타났다. 도 3a에 나타낸 바와 같이, 청색발광은 13배 감소하였으며, 적색 발광은 3.1배 증가하였다. 스펙트럼의 변화 원인을 평가하기 위해 하기 식(1)을 이용하여 에너지전달효율(energy transfer efficiency, ETE)을 계산하였으며, 93.4% 였다.

[0173] 식 (1)

$$ETE = (1 - \frac{A_{IR} F_{IR}}{A_{IR}' F_{IR}'}) \times 100$$

[0174]

[0175] 상기 식(1)에서,

[0176] A_{IR} 및 A_{IR}'은 각각 IR 부분과 IR의 흡광도이며, F_{IR} 및 F_{IR}'은 각각 IR 부분과 IR의 발광강도이다. 이때, 여기 파장은 373 nm였다.

[0177] 일광자(one-photon, OP) (또는 TP 모드)에서 안테나 효과는 각각 3.0 및 3.1였다. 상기 안테나 효과는 461 nm(TP 모드에서는 880 nm)에서 FL의 직접 여기에 의해 수집에 의해, 373 nm(TP 모드에서는 750 nm)에서 IR 부분의 여기 시 FL 부분으로부터 방출면적을 나누어 계산할 수 있다. 따라서, 청색발광 강도(I_{blue})의 감소는 93.4%의 에너지전달효율로 IR에서 FL로 Forster resonance energy transfer(FRET)된 것에 기인할 수 있으며, 적색발광 강도(I_{red})의 증가는 안테나 효과에 기인할 수 있다.

[0178] 도 4a를 참조하면, EtOH/HEPES (9/1 v/v, pH 7.0) 버퍼용액 중 ACCu2의 $\Phi\delta_{max}$ 값은 880 nm에서 32 GM이며, FL과 IR의 최대값은 각각 880 nm에서 32 GM 및 75 0nm에서 46 GM이었다. 750 nm에서 ACCu2의 $\Phi\delta_{max}$ 값이 IR에 비해 낮은 것은 IR에서 FL의 구조로 FRET(fluorescence resonance energy transfer) 강도를 감소시켰기 때문이며 이로 인해 표지세포 및 조직의 밝은 TPM이미지를 얻을 수 있게 하였다.

[0179] 도 4b를 참조하면, 주사 람다 모드에서 750 nm TP 여기를 이용하여, ACCu2로 표지한 HeLa 세포는 각각 470 nm (실선곡선)과 582 nm(점선곡선)에서 발광 최댓값을 갖는 2개의 가우시안 함수로 분리될 수 있는 광역 스펙트럼을 확인할 수 있다. 상기 두 곡선은 FL 및 IR로 표지한 HeLa 세포 TPEF 스펙트럼과 대비된다. 그리고, 상기 표 1 및 하기 도 1에 나타낸 EtOH/HEPES (9/1 v/v, pH = 7.0) 용매를 이용한 FL 및 IR의 OP-excited fluorescence (OPEF)의 스펙트럼을 통해 상기 시스템이 이 세포 내 환경에 대해 훌륭한 용매임을 확인하였다. 또한, FL 및 IR의 TPEF 강도는 도 3b 및 도 4b에 나타낸 바와 같이, 각각 채널1(400-450 nm, ch1) 및 채널 2(550-650 nm, Ch2)의 검출 창을 이용하여 간섭을 최소화하여 검출할 수 있다.

[0180] 시험예 2: 형광 적정

[0181] 이광자 프로세스에 의한 K_d값을 결정하기 위하여, 750 nm의 파장으로 세팅되고 모드-락된 티타늄-사파이어 레이저 광원 (Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)에 의해서 여기되는 DM IRE2 Microscope (Leica)를 사용하여 TPEF 스펙트럼을 얻었다.

[0182] 도 3b를 참고하면, EtOH/HEPES (9/1 v/v, pH = 7.0) 중의 ACCu2에 구리 2가 이온이 농도별로 첨가되었을 때, 채널 1(I_{blue})에서 TPEF 강도는 채널2(I_{red})에서 감지할 수 없을 정도로 서서히 감소하였으며, TP 모드에서도 유사한 결과가 관찰되었다.

[0183] 해리상수(K_d)는 하기 식(2)을 통해 계산될 수 있다.

[0184] 식 (2)

$$I - I_{inital} = \frac{[Cu^{2+}](I_{final} - I_{inital})}{K_d + [Cu^{2+}]}$$

[0185]

[0186] 상기 식에서,

[0187] I는 형광 세기를 의미하며,

[0188] I_{final}은 Cu^{2+}-ACCu2 착화합물의 형광세기를 의미하고,

[0189] I_{inital}은 ACCu2의 형광세기를 의미한다.

[0190] OP 및 TP 프로세스에서 사용된 ACCu2의 해리상수(K_d^{OP} 및 K_d^{TP})는 도 3b의 형광적정곡선을 통해 계산될 수 있다. 도 3c에 나타낸 바와 같이 OP 및 TP법에 의해 측정된 구리 2가 이온에 대한 Hill 그래프는 1.0의 기울기를 가지는 우수한 선형성을 나타냈으며, 도 3d에 나타낸 바와 같이 Job 그래프는 0.20 몰비율에서 최대값을 나타내었다. 이것은 탐침과 양이온 사이에서 1:1 복합체가 형성됨을 의미한다. 계산된 구리 2가 이온의 해리상수 K_d^{OP} 및 K_d^{TP}는 각각 21±3 μM 및 22±4 μM이었다.

[0191] 하기 도 5를 참고하면, OP(일광자) 및 TP(이광자) 법에 의해 측정된, 본 발명에 따른 ACCu2는 구리 2가 이온이 200 μM의 농도로 존재하는 경우, 구리 2가 이온이 존재하지 않은 경우에 비하여 10배 이상 형광강도가 감소하였다. 또한, 도 5b에 삽입된 도를 참고하면, 구리 2가 이온의 농도가 0 내지 0.25 μM에서는 I_{red}/I_{blue}의 그래프가 우수한 선형성을 나타내었다. 이는 상기 농도 범위에서 구리 2가 이온의 정량적인 측정이 가능함을 의미하며, 이광자 모드를 사용하여 측정된 비율은 일광자 모드를 사용한 적정곡선에도 잘 부합되었다. 상기와 같은 결과는 이중 색상의 TPM이미지를 통해 구리 2가 이온을 정량화하는데 본 발명에 따른 ACCu2가 효과적으로 사용될 수 있음을 의미하며, 이때, TMP를 이용한 ACCu2의 구리 이온 검출 한계능은 0.84 μM이다.

[0192] 이광자 단면(δ)은 문헌(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 기재된 펨토 초단위(femto second, fs) 형광 측정방법을 이용하여 측정하였다. 20 mM HEPES 버퍼(pH 7.0)에 ACCu2를 3.0 × 10^{-6}M의 농도로 녹인 후, 로다민 6 6 g를 이용하여 이광자 특성이 잘 나타나는 740 내지 940 nm 에서 이광자에 유도된 형광강도(or 형광스펙트럼이 유도된 이광자 강도)를 측정하였다. 동일한 여기 파장에서 대조군과 샘플에서 방출되는 이광자에 의한 형광강도를 결정하였다.

[0193] 이광자 단면적은 하기 식 (3)을 통해 계산될 수 있다.

[0194] 식 (3)

[0195] $\delta = \delta_r(S_s\Phi_r\Phi_r c_r)/(S_r\Phi_s\Phi_s c_s)$

[0196] 상기 식 (3)에서, s 및 r은 각각 ACCu2 및 대조군의 분자에 대한 것이며, S는 CCD 검출기에 의해 수집된 신호의 강도이며, Φ는 형광 양자 수율이고, Φ 는 실험장치의 전반적인 형광 수집 효율이며, c는 용액 내 분자밀도를 나타내고, δ_r 은 대조군 분자의 이광자 단면적을 의미한다.

[0197] 시험예 3: 경쟁 이온 반응

[0198] 도 6에는 경쟁 금속 이온들과 대비한 구리 2가 이온의 ACCu2에 대한 반응성을 I_{red}/I_{blue}의 비로서 표시하였다. 채워진 막대는 3 μM의 ACCu2 및 EtOH/HEPES(9/1 v/v, pH 7.0) 용액에 Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+} (1 mM)의 알카리 및 알카리 토금속과 Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+}, Pd^{2+}, Cd^{2+} 및 Cu^{2+} (500 μM)의 전이 금속이온과 반응하는 경우에 측정된 결과이며, 빈 막대는 여기에 200 μM의 Cu^{2+}를 추가로 첨가한 후 측정된 결과이다.

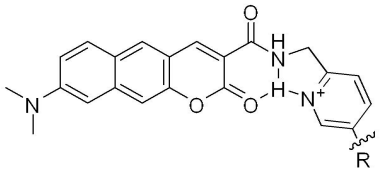
[0199] ACCu2는 상기 알카리 및 알카리토 금속이나 전이 금속들의 존재 하에서도 형광 반응의 방해를 받지 않음을 확인할 수 있다. 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 ACCu2가 세포 내 구리 2가 이온을 선택적으로 검출할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0200] 시험예 4: pH 효과

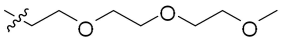
[0201] HEPES 완충 용액(EtOH/HEPES; 9/1 v/v, pH 7.0) 중의 0 (채워진 사각) 및 200 μM (빈 구) 농도의 구리 2가 이

온 존재 하에서, 3 μM 농도의 ACCu2에 대한 I_{red}/I_{blue}의 비를 각각 다른 pH에서 측정한 결과를 도 6b에 나타내었다. 이때, 여기 파장으로는 365 nm의 광을 이용하였다. 도 6b를 참고하면, I_{red}/I_{blue}의 비는 pH 6-7에서 최소값을 나타내었다. 6보다 낮은 범위의 pH에서는 I_{red}/I_{blue}의 비가 증가하였는데, 이는 하기 [화학식 19]에 나타낸 바와 같이 피리딘 잔기의 질소원자가 양성화되는데 기인할 수 있다. 반면, 7.0보다 높은 범위의 pH에서는 $Cu(OH)_2$의 형성으로 인하여 구리 2가 이온의 농도가 감소되기 때문에 I_{red}/I_{blue}의 비가 증가될 수있다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 이광자 표지자의 특징이며, 종래의 일광자 표지자의 차이점이라 할 수 있다.

[0202] [화학식 19]

[0203] 

[0204] 상기 [화학식 19]에서,

[0205] R은  이다.

[0206]

[0207] 시험예 5: 헬라세포(HeLa cells)에서 구리 2가 이온 농도의 정량화

[0208] 1) 이광자 현미경법 이미지

[0209] 생체 세포 내에서 ACCu2의 유용성을 알아보기 위해서, ACCu2로 표지된 HeLa 세포 및 조직의 TPM 이미지를 각각 ×100(NA = 1.30 OIL) 및 ×40(NA = 0.75 DRY) 대물렌즈로 스펙트럼 공초점 및 다중광자 현미경(spectral confocal and multiphoton microscopes, Leica TCS SP2)으로 얻었다.

[0210] TPM 이미지는 출력 전력 1305 mW 및 파장 780 nm으로 세팅되고, 모드-락된 티타늄-사파이어 레이져 광원(Coherent Chameleon, 90 MHz, 200 fs)에 의해 여기되는 DM IRE_2 Microscope(Leica)를 사용하여 얻었다. 400-650 nm 범위에서의 이미지를 얻기 위하여, 내부 PMTs는 400 Hz 스캔 속도로 512×512 픽셀의 부호없는 8비트 신호를 수집하는데 사용하였다.

[0211] 2) 세포배양

[0212] 헬라 인간 자궁 경부암 세포는 미국 ATCC(ATCC, Manassas, VA, USA)로부터 얻었으며, 세포는 열-비활성화된 10% FBS(WelGene), 페니실린(100 units/mL) 및 스트렙토마이신(100 mg/mL)으로 보충된 DMEM(WelGeneInc, Seoul, Korea)에서 배양되었다. 모든 세포는 37 ℃의 가습환경(5부피% CO_2 및 95부피% 공기)을 유지되었다. 이미징하기 2일 전에 세포를 유리 바닥 접시(MatTek)에 옮겨 평판배양하고, 표지 시, 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM으로 교체하였다. 세포를 37℃에서 20분 동안 3μM의 ACCu2를 첨가하여 배양하고, FBS 가 없는 DMEM으로 3회 세척하였다.

[0213] 3) 세포 생존능 확인

[0214] 상기 배양조건에서 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan)를 사용하여 ACCu2의 농도에 따른 헬라세포의 생존능을 측정하였으며, 이를 도 7에 나타내었다. 도 7을 참조하면, 본 발명에 따른 ACCu2가 헬라세포의 생존에 영향을 미치지 않으며, 세포독성으로부터 최소한의 간섭으로 생체 내 세포의 구리 2가 이온의 농도를 측정할 수 있다는 것을 의미한다.

[0215] 4) 광안정성

[0216] ACCu2(3 mM)로 표지된 헬라세포의 TPEF(TP excitated fluorescence) 강도 변화를 모니터링하여 ACCu2의 광안정

성을 측정하였으며, 이를 도 8에 나타내었다. TPEF 강도는 60분 동안 fs-펄스의 연속적인 조사 후에 거의 동일하게 남아있었는데, 이는 본 발명에 따른 ACCu2는 높은 광안정성을 가져, 최소한의 간섭으로 생체 내 세포의 구리 2가 이온의 농도를 측정할 수 있다는 것을 의미한다.

[0217] 5) 세포 내 구리 2가 이온 농도의 정량화

[0218] 생체 내에서 ACCu2의 유용성을 알아보기 위하여, 3 μM 농도의 ACCu2를 사용하여 형광 표지된 HeLa 세포의 채널 1(400-450 nm) 및 채널 2(550-650 nm) 영역의 TPEF 강도를 모니터하였으며, 이를 9a 내지 9d에 나타내었다. 도 9a는 채널 1(100-450 nm, I_{blue}) 검출창을 이용해 얻은 TPM이미지이며, 도 9b-d는 채널 2(550-650 nm, I_{red}) 검출창을 이용해 얻은 TPM이미지이다.

[0219] 도 9a 및 9b는 구리 2가 이온 첨가 전의 형광 표지된 HeLa 세포의 TPM 이미지이고, 도 9c는 200 μM 구리 2가 이온 및 100 μM PDTC을 첨가한 후의 TPM 이미지이며, 도 9d는 200 μM 구리 2가 이온, 100 μM PDTC 및 100 μM EDTA 첨가한 후의 TPM 이미지이다(각 스케일바 30 ㎛).

[0220] 도 9을 참조하면, ACCu2 표지된 HeLa 세포에 대한 TPM 영상은 매우 밝았는데, 이는 우수한 세포투과성과 TP 작용교차부의 감도가 우수하기 때문이다. 비율적 이미지는 두 개의 채널에서 수집된 TPEF강도로부터 구축하였고(도 9a-c), HeLa 세포에 표지된 ACCu2의 I_{red}/I_{blue} 비는 9.9±0.8 로 측정되었다(도 9d). 구리 2가 이온(200 μM)과 피롤리딘 디티오카바메이트(PDTC, 100 μM)의 첨가 시 세포 내 구리 2가 이온의 축적으로 I_{red}/I_{blue} 비는 6.5까지 감소하였으며, 막 투과성 금속 이온 킬레이트로서 에틸렌디아민 테트라아세틱산(EDTA, 100 μM)을 이용하여 처리 시 구리 2가 이온이 효과적으로 제거되어 I_{red}/I_{blue} 비는 9.8로 증가하였다.

[0221] 본 발명에 따른 ACCu2는 I_{blue}가 일정한 값을 가짐으로 I_{red}/I_{blue} 비율 계량을 통해 세포 내 구리 2가 이온 농도를 종래의 I_{red}와 I_{blue}가 모두 변하는 표지자를 이용하는 경우보다 더 정확하게 정량화할 수 있다. 도 5b에 도시된 I_{red}/I_{blue} 비율적정 곡선을 사용한 계산에 의하면, 유리 구리 2가 이온의 농도는 각각 도 9a에서 0.0±0.7 μM, 도 9b에서 15±2 μM 및 도 9c에서 0.0±1.9 μM로 계산되었다. 이때, 세포 내 유리 구리 1가 이온의 농도는 셀당 1 미만이며, 상기와 같은 결과들을 통해 구리 2가 이온의 낮은 세포 투과성을 확인할 수 있다.

[0222] 시험예 6: 랫트 뇌조직 중의 구리 2가 이온 농도 정량화

[0223] 박편들은 2일된 랫트(Sprague-Dawley, SD)의 해마(hippocampi) 및 시상하부(hypothalmi)로부터 제조하였다. 두정 박편(coronal slices)을, 인공 뇌척수 유체(ACSF; 138.6 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 21 mM $NaHCO_3$, 0.6 mM NaH_2PO_4, 9.9 mM D-glucose, 1 mM $CaCl_2$, 및 3 mM $MgCl_2$) 중의 진동날 박편절단기를 사용하여 400㎛ 두께로 절단하였다. 박편들을 ACSF 중의 20 μM의 ACCu2로, 37℃에서 95% O_2 및 5% CO_2로 30분 동안 기포를 불어넣어 주면서 배양하였다. 이어서, 박편들을 ACSF로 3회 세척하고, 유리바닥 접시(MatTek)로 옮긴 후, 스펙트럼 공초점 다중광자 현미경에서 관찰하였다.

[0224] 뇌 조직은 비균질한 구조를 갖기 때문에, 전체적인 구리 2가 이온의 분포를 가시화하기 위하여 90-190 ㎛의 깊이에서 TPM 영상을 얻었다. 이를 하기 도 10에 나타내었다.

[0225] ACCu2로 표지된 랫트 뇌 조직에 대한 I_{red}/I_{blue} 비율은 9.9±0.5였으며, 이에 대응되는 자유 구리 2가 이온의 농도는 0.0±1.1 μM이었다. 뇌 조직에서 구리이온은 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)으로부터 전송될 것으로 예상되므로, 자유 구리 이온의 농도는 제로에 가까운 2.5 ㎍/L (0.04 μM)로 계산된 값과 유사하였다.

[0226] 구리 2가 이온(500 μM) 및 PDTC(200 μM)로 처리된 ACCu2로 표지된 랫트 뇌 조직에 대한 I_{red}/I_{blue} 비율은 6.8±0.6으로 나타났으며, 이에 대응되는 자유 구리 이온의 농도는 14±1.5 μM로 나타났다.

[0227] 시험예 7: 인체 생체 결장조각 평가

[0228] 생체 대장조각은 고려대학교 의료원 안암병원에서 선택적 대장 내시경검사를 시행한 외래환자로부터

채취하였다. 실험은 병원윤리위원회에 의해 승인 하에 자원봉사자 모집을 통해 이루어졌으며, 모든 정보제공은 실험에 참여하는 사람들의 동의하에 이루어졌다. 장내 출혈 또는 출혈이 의심되는 자, 프로트롬빈 시간이 국제 정상화 비율의 1.4 초과하는 자, 혈소판의 수가 100,000 미만인 자 및 실험 전 5일 이내에 아스피린을 복용한 적이 있는 자는 제외하였다.

[0229] 대장내시경 검사를 통해 악성 병변, 선종 및 점상 점막을 생검겸자법을 통해 수득하였다. 정상 대장 점막 및 선종 또는 선암종 조직은 동일한 환자로부터 수집하였다. 표준생검겸자(Olympus Medical Sys-tems Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 결장에서 생검 표본 조직 쌍을 얻었으며, 정상, 용종 및 암 조직을 각각 28, 10 및 6개 취득하였다. 취득한 조직을 PBS 완충용액에 담아 각각 멸균된 시료 병에 넣었다. 이중 정상조직 샘플의 절반은 EDTA(1 mm) 로 40분간 처리하였다. 그 후, 샘플조직을 37.8 ℃에서 1~2시간 동안 ACCu2 20 μM이 함유된 인공뇌척수액으로 염색하여 영상화를 위한 이미지를 얻었다.

[0230] 하기 도 11a에 나타낸 바와 같이, 점막 및 점막하층 90-190 ㎛의 깊이에서 임상적으로 중요한 영상을 얻었으며, EDTA 처리한 정상조직, 정상조직, 용종 및 암조직에서 얻은 I_{red}/I_{blue} 비율은 각각 1400, 1400, 1000 및 600이었다.

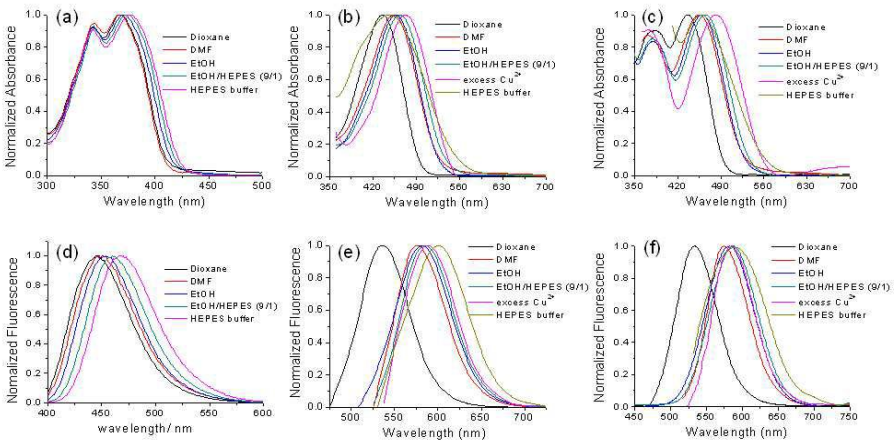
[0231] 도 11b 및 도 12는 본 발명에 따른 ACCu2로 표지된 생체조직에 대한 비율적 TPM 이미지이다. 도 11b는 EDTA 처리한 정상조직, 정상조직, 용종 및 암조직의 전체적인 구리 2가 이온의 분포에 대한 단면이미지이며,

[0232] 또한, 도 11c에 나타낸 바와 같이, EDTA 처리한 정상조직도 12는 상기 단면 이미지의 깊이에 따른 3차원 비율적 TPM 이미지를 나타낸 것이다. EDTA 처리한 정상조직, 정상조직, 용종 및 암조직에서 얻은 I_{red}/I_{blue} 비율평균은 각각 10.0±0.3, 8.3±0.4, 7.2±0.5 및 5.2±0.6이며, 이에 대응되는 구리 2가 이온의 농도는 각각 0.0±0.1, 8.2±0.3, 13±2 및 22±3 μM이었다.

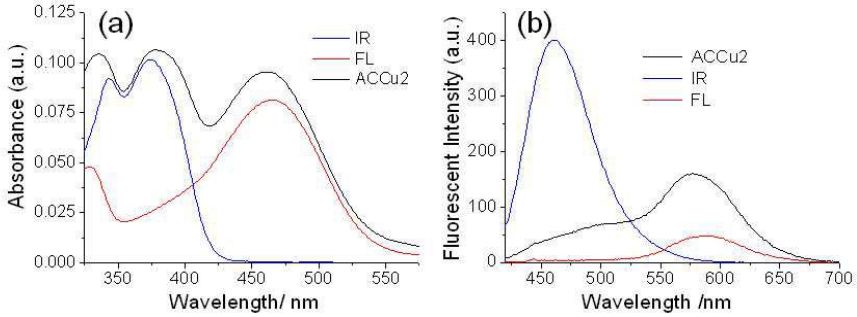
[0233] 상기와 같은 결과는 본 발명에 따른 ACCu2가 대장암의 초기진단 및 정량 검출에 유용하게 활용될 수 있음을 의미한다.

도면

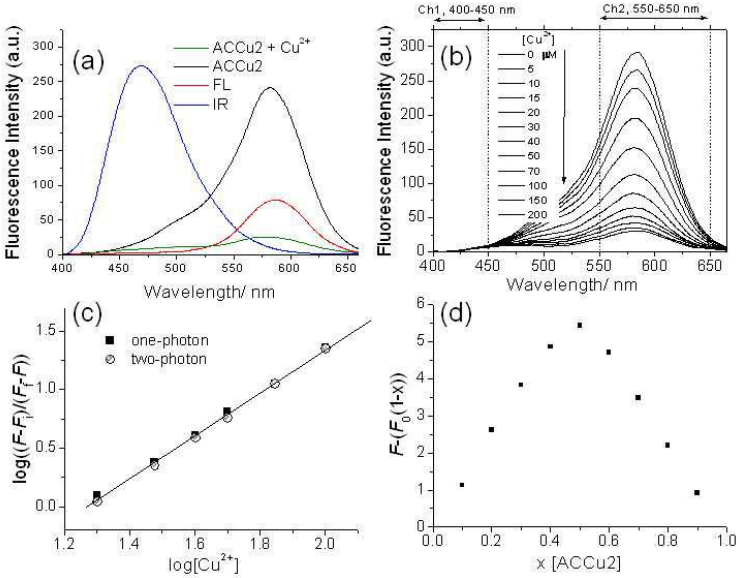
도면1



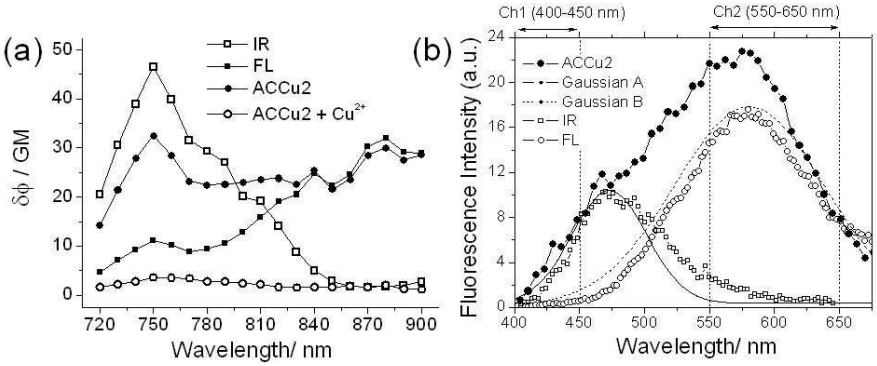
도면2


(a)
IR
FL
ACCu2
Absorbance (a.u.)
Wavelength/ nm
(b)
ACCu2
IR
FL
Fluorescent Intensity (a.u.)
Wavelength /nm

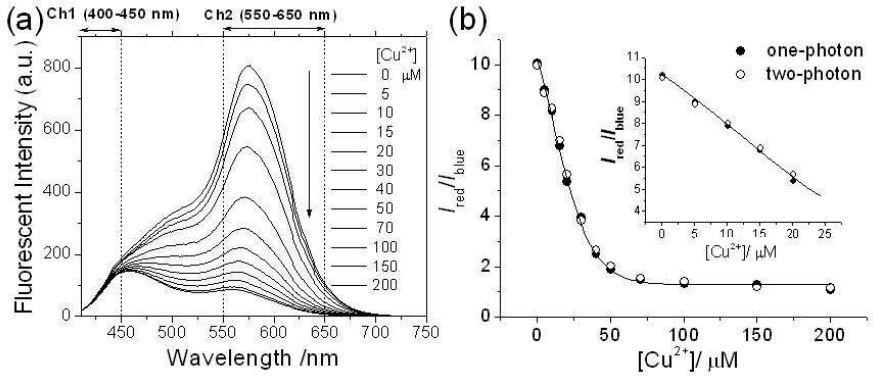
도면3


(a)
ACCu2 + Cu2+
ACCu2
FL
IR
Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm
(b)
Ch1, 400-450 nm
Ch2, 550-650 nm
[Cu2+]
Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm
(c)
one-photon
two-photon
log((F-Fi)/(Ff-F))
log[Cu2+]
(d)
F-(F0(1-x))
x [ACCu2]

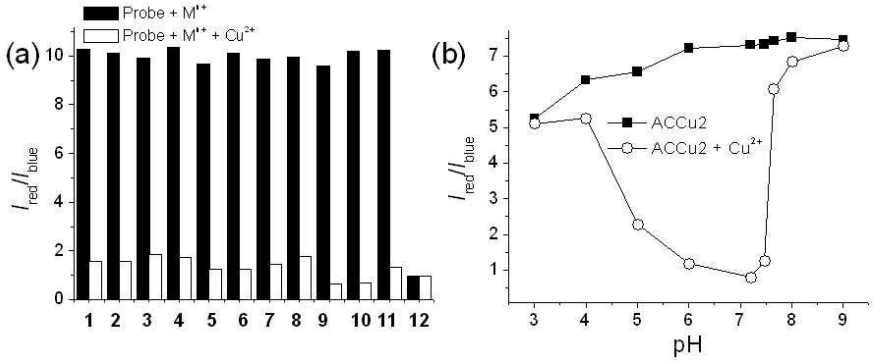
도면4


(a)
IR
FL
ACCu2
ACCu2 + Cu2+
δφ / GM
Wavelength/ nm
(b)
Ch1 (400-450 nm)
Ch2 (550-650 nm)
ACCu2
Gaussian A
Gaussian B
IR
FL
Fluorescence Intensity (a.u.)
Wavelength/ nm

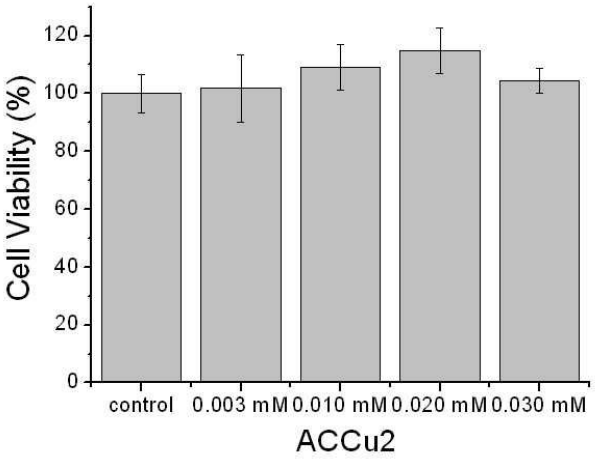
도면5


(a)
Ch1 (400-450 nm)
Ch2 (550-650 nm)
Fluorescent Intensity (a.u.)
Wavelength /nm
[Cu2+]
0 μM
5
10
15
20
30
40
50
70
100
150
200
(b)
one-photon
two-photon
I red / I blue
[Cu2+]/ μM

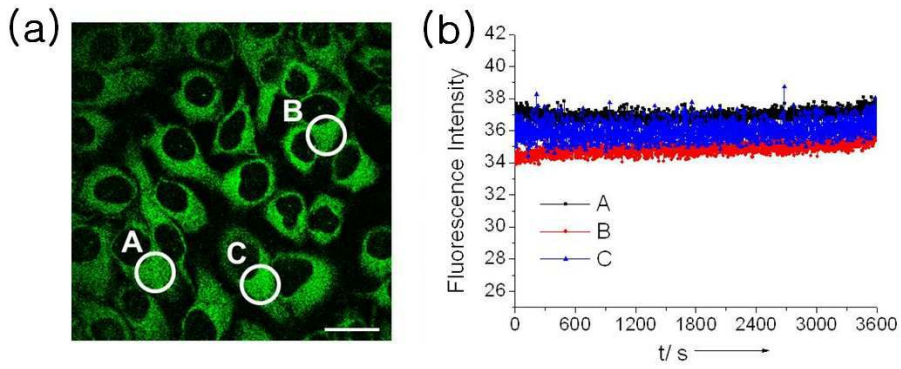
도면6


(a)
Probe + M++
Probe + M++ + Cu2+
I red / I blue
(b)
ACCu2
ACCu2 + Cu2+
pH

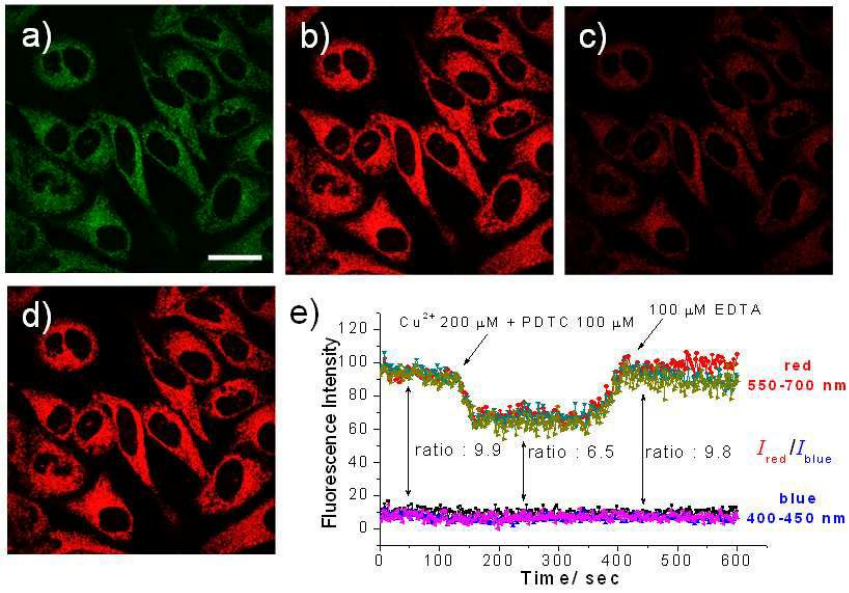
도면7


Cell Viability (%)
control
0.003 mM
0.010 mM
0.020 mM
0.030 mM
ACCu2

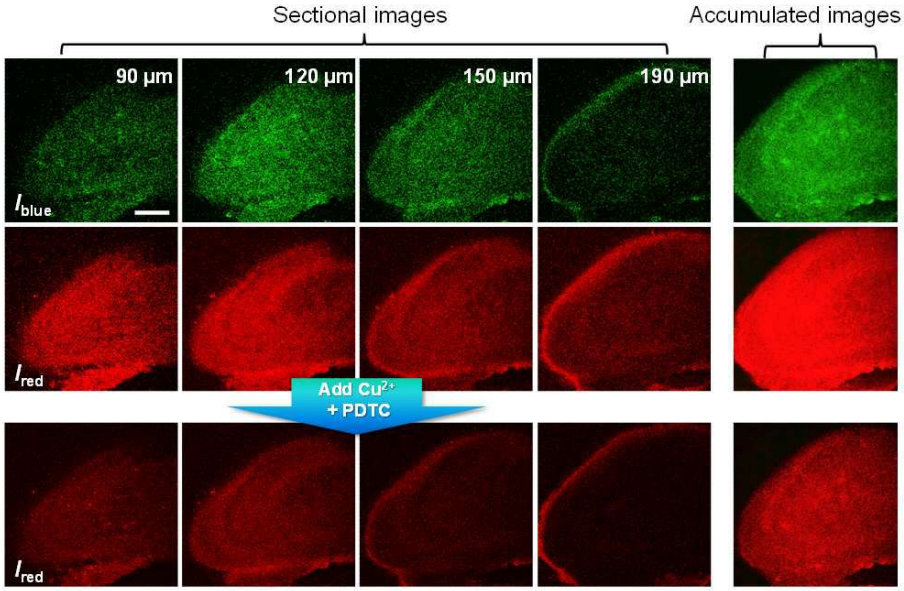
도면8


(a)
A
B
C
(b)
Fluorescence Intensity
t/ s
A
B
C

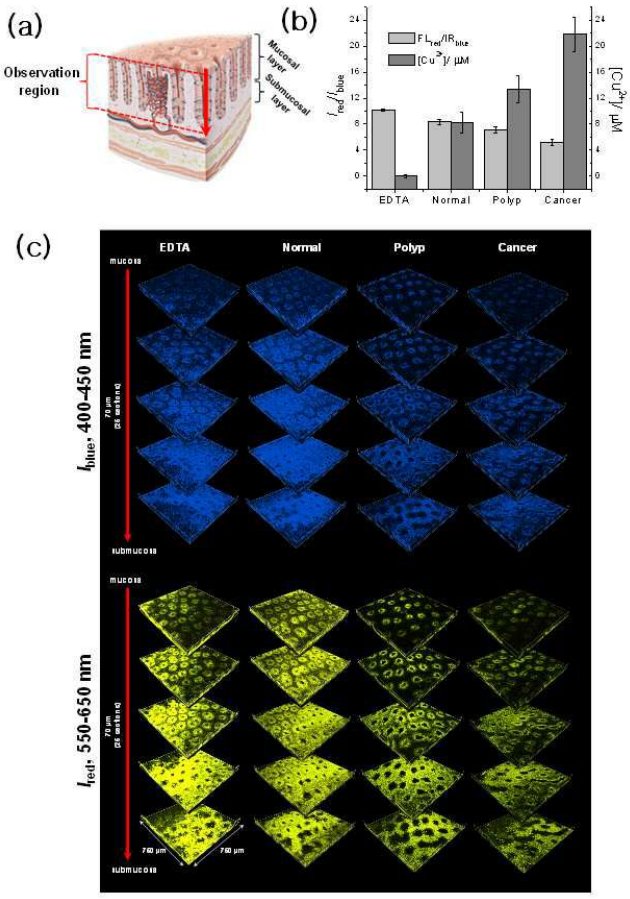
도면9


a)
b)
c)
d)
e)
Cu2+ 200 μM + PDTC 100 μM
100 μM EDTA
red
550-700 nm
ratio : 9.9
ratio : 6.5
ratio : 9.8
Ired/Iblue
blue
400-450 nm
Fluorescence Intensity
Time/ sec

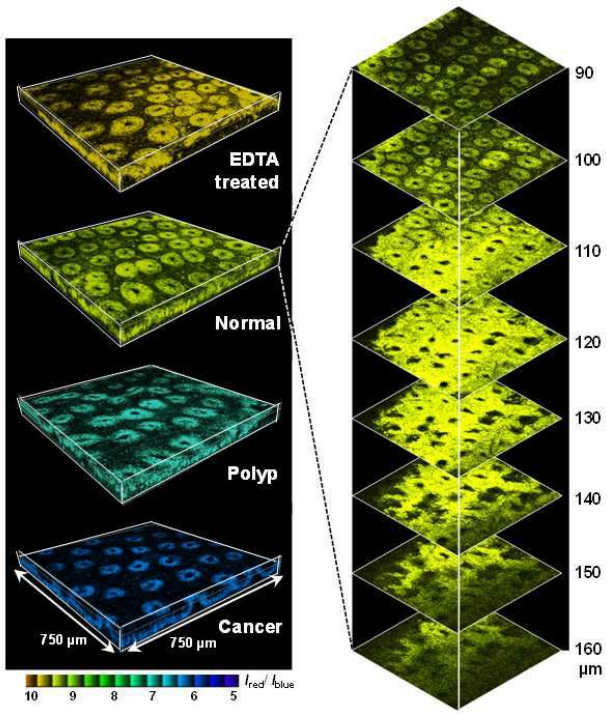
도면10


Sectional images
Accumulated images
90 μm
120 μm
150 μm
190 μm
I_{blue}
I_{red}
Add Cu^{2+}
+ PDTC
I_{red}

도면11


(a)
Observation region
Mucosal layer
Submucosal layer
(b)
FL_{red}/IR_{blue}
$[Cu^{2+}]$ / μM
EDTA
Normal
Polyp
Cancer
(c)
EDTA
Normal
Polyp
Cancer
I_{blue}, 400-450 nm
I_{red}, 550-650 nm
mucosa
submucosa
750 μm

도면12


EDTA
treated
Normal
Polyp
Cancer
750 μm
750 μm
10
9
8
7
6
5
I_{red}/I_{blue}
90
100
110
120
130
140
150
160
μm