



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0083587
(43) 공개일자 2013년07월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07D 413/04 (2006.01) *G01N 33/84* (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0004258

(22) 출원일자 2012년01월13일

심사청구일자 2012년01월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

조봉래

서울특별시 성동구 성수동2가 843 서울숲 힐스테이트 103동 504호

전훈재

서울특별시 서초구 반포동 20-1 LG자이아파트 111-603

(74) 대리인

특허법인충현

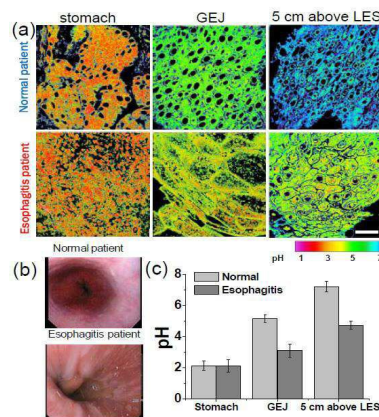
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 생체 내의 수소이온 농도의 측정 가능한 이광자 표지자

(57) 요약

본 발명은 유의미한 이광자 작용 단면 및 pH에 반응하여 청색-대-녹색 발광 색상의 뚜렷한 변화, 높은 광안정성과 낮은 세포독성을 보이므로 생체내의 pH를 효과적으로 측정할 수 있는 이광자 표지자를 제공한다. 본 발명에 따른 이광자 표지자는 이광자 현미경법을 통한 비율계량법에 의해 인간의 위와 식도 조직 뿐 아니라 생세포에서 90-180 μ m 깊이의 pH를 효과적으로 측정할 수 있다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

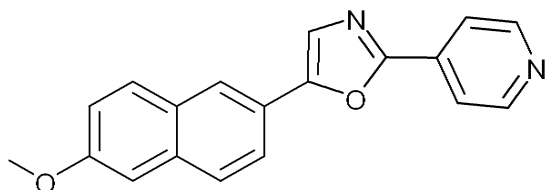
과제고유번호	A11118211010000100
부처명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	대장암의 조기 진단과 맞춤형 치료에 이용할 수 있는 다광자 진단 표지자의 개발
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

하기 화학식 1의 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자:

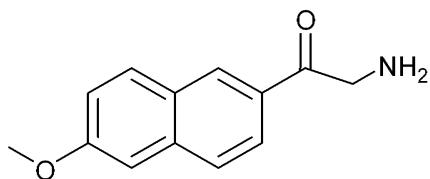
<화학식 1>



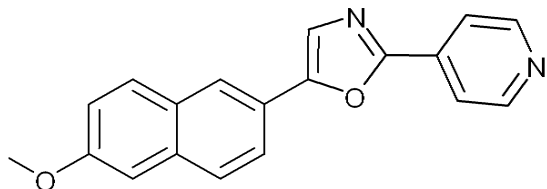
청구항 2

화학식 2의 화합물과 이소니코티닉 산 및 포스포러스 옥시클로라이드의 혼합물을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조방법:

<화학식 2>



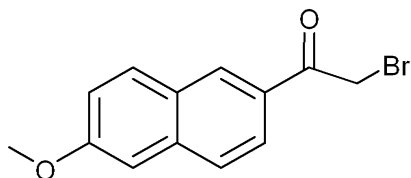
<화학식 1>



청구항 3

제2항에 있어서, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 3의 화합물과 헥사메틸렌테트라민의 혼합물을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조방법:

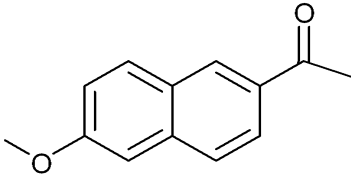
<화학식 3>



청구항 4

제2항에 있어서, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물과 CuBr_2 의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조방법:

<화학식 4>



명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 생체 조직 내의 pH를 효과적으로 측정하기 위한 이광자 표지자에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 위식도 역류성 질환(Gastroesophageal reflux disease, GERD)은 pH와 관련된 흔한 위장관 장애로, 하부 식도의 괄약근이 불완전하여 식도로 위산이 역류하여 발생하는 만성증상 또는 점막 손상이다. GERD 관련 증상을 가진 환자의 2/3은 내시경 검사에서 이상 소견이 관찰되지 않아 음성을 나타내며, 일반적으로 점막 결손없이 발적, 부종 등의 경미한 소견만 있는 경우를 비미란성 역류질환(Non-Erosive Reflux Esophagitis, Endoscopy Negative Reflux Esophagitis, NERD)이라고 한다.

[0003] 현재 이용 가능한 NERD 진단 방법은 24시간 식도 pH 모니터링, 내시경 검사와 양성자 펌프 억제제(PPI) 시험 등으로 알려져 있으나, 이들 방법 중 어느 것도 평가 표준으로 받아들이지 않고 있다 [Hirano, J. E. Richter, Am. J. Gastroenterol. 2007, 102, 668-685]. GERD의 병리생태학에 대한 중요한 가설이 제안한 바에 따르면, 확장된 세포 간 공간(DIS)이 넓어지고, 세포 간 밀착결합이 약해짐에 따라 역류된 산이 식도로 침투하여 침해수용기를 자극하게 된다[R. Fass, G. Tougas, Gut. 2002, 51, 885-892]. 그러나 상기 가설을 시험하고, NERD를 진단하기 위해서는 식도 조직 깊숙한 안쪽의 pH를 측정하는 것이 중요하나 신뢰할 만한 기술개발이 미흡한 실정이다.

[0004] 일광자 현미경 (one-photon microscopy, OPM)이 여기를 위해서 높은 에너지를 갖는 하나의 광자를 사용하는 반면에 이광자 현미경법(TPM)은 여기원으로 2개의 근 적외선 광자를 채용하여, 일광자 현미경법(OPM)에 비해 덜 손상적인 낮은 에너지광을 이용한다. TPM은 OPM에 비해서, 국부적 여기 (localized excitation), 증가된 투과 깊이 (>500 μ m), 낮은 세포 자가형광 및 자체흡수 (self-absorption)를 보일 뿐만 아니라, 감소된 광손상 및 광탈색 (photobleaching)과 같은 장점들을 갖는다 [W. R. Zipfel, R. M. Williams, W. W. Webb, Nat. Biotechnol. 2003, 21, 1368-1376]. 그러나 TMP에 의한 pH 측정을 위해 적용할 수 있는 비율계량(ratiometric) pH 탐침의 표적 구성과 평가는 아직 보고된 바가 없으며, 따라서 생체 내의 깊숙한 안쪽의 pH를 측정이 가능한 효과적인 이광자 표지자를 개발할 필요성이 대두되었다.

발명의 내용

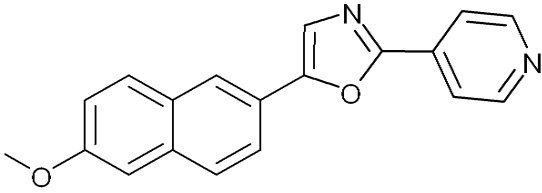
해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 유의미한 이광자 작용 단면과 높은 광안정성 및 무시할 정도의 낮은 독성을 나타내며, 이광자 현미경법에 의해 생세포와 인체 조직 내 pH를 효과적으로 측정할 수 있는 이광자 표지자 및 이의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상술한 과제를 해결하기 위하여, 하기 화학식 1의 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자를 제공한다:

[0007] <화학식 1>

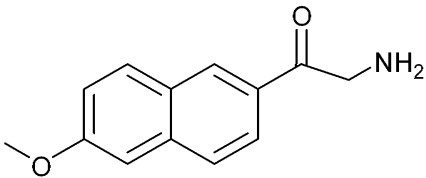


[0008]

[0009] 본 발명은 상기 두 번째 기술적 과제를 달성하기 위하여,

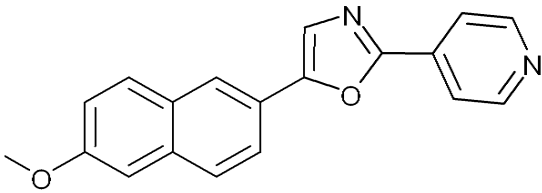
[0010] 하기 화학식 2의 화합물과 이소니코티닉 산 및 포스포러스 옥시클로라이드의 혼합물을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조방법을 제공한다:

[0011] <화학식 2>



[0012]

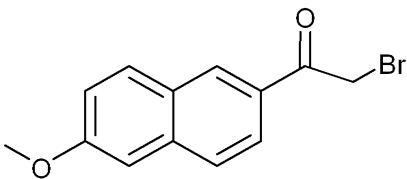
[0013] <화학식 1>



[0014]

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학식 2의 화합물은 화학식 3의 화합물과 헥사메틸렌테트라민의 혼합물을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

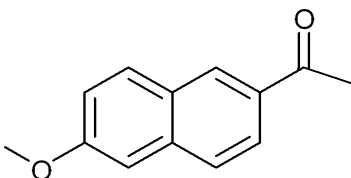
[0016] <화학식 3>



[0017]

[0018] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 화학식 3의 화합물은 화학식 4의 화합물과 CuBr_2 의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조될 수 있다:

[0019] <화학식 4>



[0020]

발명의 효과

[0021] 본 발명은 유의미한 이광자 작용 단면 및 pH에 반응하여 청색-대-녹색 발광 색상의 뚜렷한 변화, 높은 광안정성과 낮은 세포독성을 보이므로 생체내의 pH를 효과적으로 측정할 수 있는 이광자 표지자를 제공한다. 본 발명에 따른 이광자 표지자는 이광자 현미경법을 통한 비울계량법에 의해 인간의 위와 식도 조직 뿐 아니라 생세포에서 90-180 μm 깊이의 pH를 효과적으로 측정할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 본 발명의 일구체예로서 (a)는 범용 완충액 내 pH에 따른 본 발명에 의하여 제조되는 화학식 1의 2.0 μ M에 대한 형광 스펙트럼의 변화이며, (b)는 일광자 방식(●)과 이광자 방식(○)에 의해 측정된 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 대 pH 그래프이다. 청색 = 400-500 nm, 녹색 = 600-750 nm. 실선은 단지 겉으로 보이기 위한 안내선을 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일구체예로서 (a)는 본 발명에 의하여 제조되는 화학식 1의 5 μ M 로 표지한 HeLa 세포의 의사 색상의 이광자 현미경(TPM) 이미지이며 (740 nm 여기와 400-650 nm에서 형광 발광 윈도우를 이용), (b)는 (a)의 빨간색 원 영역으로부터 얻은 TPEF 스펙트럼(스케일 바, 30 μ m. 나타낸 세포 사진들은 반복실험(n = 5))을 나타낸 도이다.

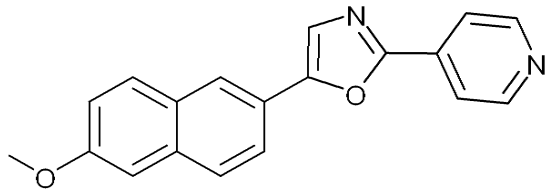
도 3은 본 발명의 일구체예로서 본 발명에 의하여 제조되는 화학식 1과 LTR(a) 또는 LTB(d-f)로 공-표지한 HeLa 세포의 의사 색상의 이광자 현미경(TPM) 이미지를 740 nm 여기와 발광 윈도우를 이용하여 나타낸 도이다. (a,d) 400-650 nm, (e) 400-475 nm, (f) 550-650 nm. (b,g) OPM 이미지는 각각 543 nm(b)와 365 nm(g) 여기와 580-700 nm(b)와 390-450 nm(g)에서 발광 윈도우를 이용하여 얻었다. (c,h)는 각각 (a)와 (b), (f)와 (g) 사이의 중첩 이미지이다. 모든 탐침 농도는 5 μ M 이며, 스케일 바는 20 μ M이다. 나타낸 세포 사진들은 반복실험(n = 5)을 통해 얻어진 대표 이미지이다.

도 4는 본 발명의 일구체예로서 (a)는 본 발명에 의하여 제조되는 화학식 1의 20 μ M 로 1시간 동안 표지한 위와 정상 및 식도염 조직의 비율계량 이광자 현미경(TPM) 이미지를 나타낸 도이다. 상기 식도 조직은 GEJ와 LES의 근위 경계 상방 5 cm에서 채취하였다. 740 nm 여기 및 형광 발광 윈도우를 사용하여 얻었다. 청색 = 400-475 nm, 녹색 = 550-650 nm. 나타낸 이미지들은 20 μ m 깊이에서 얻은 대표적인 사진들이다. (n=7). 스케일바 : 30 μ m. (b)는 정상 및 식도염 환자의 내시경 이미지를 나타낸 도이다. (c)는 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 비와 형광 적정 곡선으로부터 평가한 pH의 평균과 표준오차를 나타낸 도이다. 7개의 조직 시료에서 각각 90-180 μ m 깊이의 Z-방향을 따라 xy 면으로부터 채취한 10개 조각, 총 70개의 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 비를 이용하여 계산하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명은 하기 화학식 1의 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자를 제공한다:

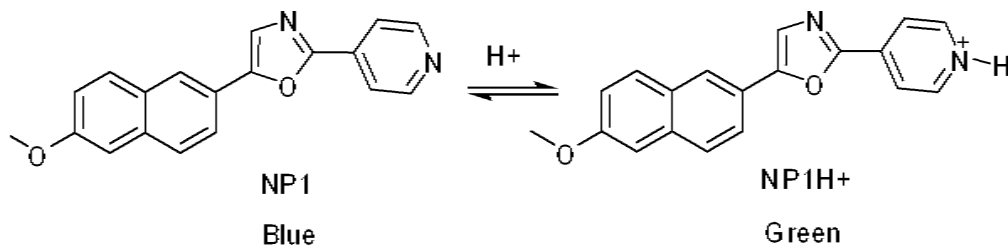
[0024] <화학식 1>



[0025]

[0026] 본 발명에 따른 하기 반응식 1의 이광자 표지자는 형광색소분자로서 2-메톡시-6-(5-옥사졸릴)나프탈렌의 양성자화 부위로서 피리딘으로부터 유도되어 피리딘 질소에서 양성자화가 일어나면 적색-이동된 형광이 나타나 비율계량법에 의한 pH 검출이 기대되는 신규 비율계량 pH 탐침으로 적용이 가능하다.

[0027] <반응식 1>



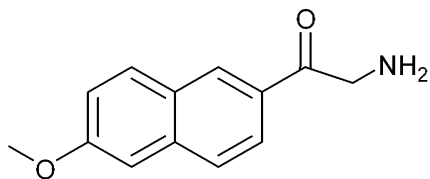
[0028]

[0029] 본 발명에 따른 화학식 1의 이광자 표지자는 나프탈렌 유도체와 양성자화 부위로서 피리딘을 이용하여 상기 나프탈렌 유도체와 유사한 화합물로부터 유도된 이광자 탐침이 생조직 영상화에 성공적으로 활용하였으며, 상기 피리딘의 pK_a 는 약산성의 환경을 검출하기에 적합한 ~5.0이므로, 이광자 현미경법을 이용한 생세포와 인체 조직

의 pH를 효과적으로 탐지할 수 있다.

[0030] 본 발명은 또한 하기 화학식 2의 화합물과 이소니코티닉 산 및 포스포러스 옥시클로라이드의 혼합물을 반응시킴으로써 화학식 1의 화합물을 제조하는 단계를 포함하는 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조방법을 제공한다:

[0031] <화학식 2>

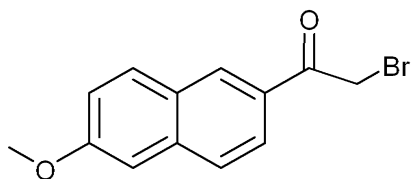


[0032]

[0033] 상기 반응은 화학식 2의 화합물 및 이소니코티닉 산의 혼합물을 포스포러스 옥시클로라이드와 같은 유기 용매 중에서 교반시킴으로써 수행될 수 있다.

[0034] 바람직하게는, 상기 화학식 2의 화합물은 하기 화학식 3의 화합물과 헥사메틸렌테트라민의 혼합물을 유기 용매 중에서 반응시킴으로써 제조될 수 있다:

[0035] <화학식 3>

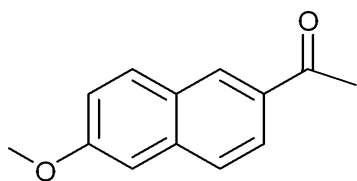


[0036]

[0037] 예를 들어, 상기 유기 용매로는 클로로포름을 사용할 수 있으며, 상기 화학식 2의 화합물은 용매를 진공 처리하여 제거하고 염산과 같은 산성 용액으로 처리한 다음, 침전 및 건조 과정을 거쳐서 제조할 수 있다.

[0038] 바람직하게는, 상기 화학식 3의 화합물은 하기 화학식 4의 화합물과 CuBr₂의 혼합물을 유기 용매 중에서 환류시킴으로써 제조될 수 있다:

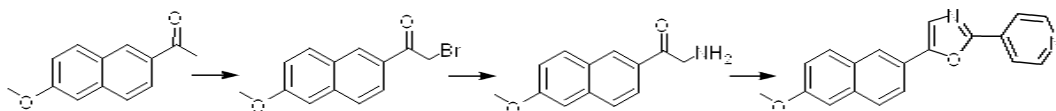
[0039] <화학식 4>



[0040]

[0041] 예를 들어, 상기 유기 용매로는 에틸아세테이트 및 클로로포름을 사용할 수 있으며, 필터 및 세척 건조과정을 거쳐서 제조할 수 있다.

[0042] 참고로, 하기 반응식에는 화학식 4의 화합물로부터, 화학식 1의 화합물을 제조하는 예시적인 개략 반응도를 나타내었다.



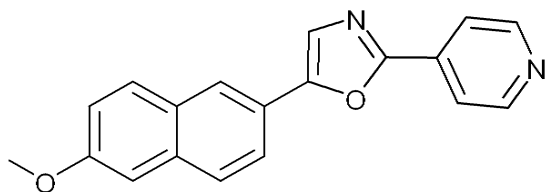
[0043]

[0044] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0045] 제조예. 본 발명에 따른 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자의 제조

[0046] 하기 제조예에 따라서 본 발명에 따른 생체 내의 pH 측정 가능한 이광자 표지자인 하기 화학식 1의 화합물을 제조하였다.

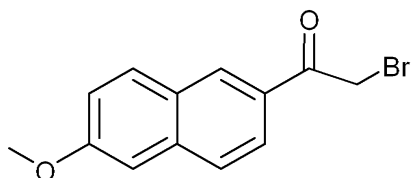
[0047] <화학식 1>



[0048]

[0049] 제조예 1. 2-브로모-1-(6-메톡시나프탈렌-2-일)에타논 (화학식 3)의 제조

[0050] <화학식 3>

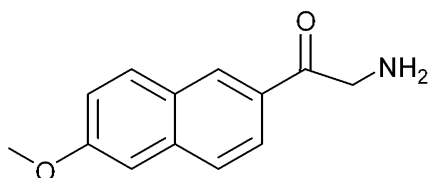


[0051]

[0052] CuBr₂ 슬러리를 에틸아세테이트 25ml에 넣고 가열하여 환류시켰다. 상기 용액에 클로로포름 25ml에 녹인 1-(6-메톡시나프탈렌-2-일)에타논 (1.0 g, 5.0 mmol)을 15분에 걸쳐 넣어주고 질소 분위기 하에서 80℃에서 3.5시간 동안 환류시켰다. 반응 종료 후 셀라이트 패드에서 필터 한 후, 얻어진 필터케이크를 에틸아세테이트로 세척한 후 남아있는 용매를 감압 농축하여 크루드 화합물을 수득하였다. ¹H NMR (acetone-d₆, 400 MHz): δ 8.64 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 8.02-7.99 (m, 2H), 7.89 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 7.27-7.23 (m, 1H), 4.84 (s, 3H), 3.96 (s, 3H)

[0053] 제조예 2. 2-아미노-1-(6-메톡시나프탈렌-2-일)에타논 (화학식 2)의 제조

[0054] <화학식 2>

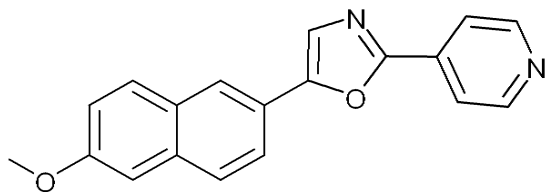


[0055]

[0056] 합성한 2-브로모-1-(6-메톡시나프탈렌-2-일)에타논과 헥사메틸렌테트라민 (1.1g, 8.0mmol)의 혼합물을 클로로포름 25ml에 녹여 하루 동안 교반시켰다. 반응 종료 후 반응물을 침전시켜 필터한 후 클로로포름으로 세척하고 진공에서 건조하였다. 생성된 크루드 화합물 (0.6 g, 1.8 mmol)을 0℃ 에탄올 15ml에 용해시킨 후 진한 염산을 한 방울씩 가하였다. 반응혼합물을 45℃에서 4시간 동안 교반시킨 후, 상온에서 냉각하고, pH가 10이 되도록 처리하였다. 생성된 침전물을 필터한 후 에탄올로 세척하였고, pH가 10이 되도록 처리한 후 진공 건조하여 화합물을 수득하였다. 수율: 0.33g (49 %); mp 138-139 ° C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.20 (s, 1H) 7.71-7.67 (m, 2H) 7.59 (d, *J* = 8.8 H, 1H) 7.04 (s, 2H) 4.66 (s, 2H) 3.82 (s, 3H).

[0057] 제조예 3. 본 발명에 따른 이광자 표지자 (화학식 1)의 제조

[0058] <화학식 1>



[0059]

[0060] 합성한 2-아미노-1-(6-메톡시나프탈렌-2-일)에타논 (0.33 g, 1.3 mmol)과 이소니코티닉 산 (0.16 g, 1.3 mmol)을 포스포러스 옥시클로라이드 10ml에 녹여 질소분위기 하에서 6시간동안 환류시켰다. 반응 종료 후 혼합물을 식힌 후 남아있는 과량의 포스포러스 옥시클로라이드를 감압 증류하여 제거하였다. 잔여물에 에탄올/물 (2:1)의 혼합용액을 첨가하고, 28% 암모니아를 추가하여 pH 10이 되도록 염기화시켰다. 생성된 침전물을 필터한 후, 물로 세척하고 건조시켰다. 생성된 크루드 화합물을 헥산/아세톤 (1:1) 용매를 사용하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 황갈색의 고체를 수득하였다. 수율 0.14g (20%); mp 184-185 ° C; ¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 8.77 (d, *J* = 5.2 Hz, 2H), 8.11 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 5.2, 2H), 7.79 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.72 (dd, *J* = 8.8, 2.0 Hz, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.20 (dd, *J* = 8.8, 2.4 Hz, 1H), 7.13 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H) 3.93 (s, 3H) ¹³C NMR (CDCl₃, 400 MHz): δ 158.59, 158.54, 152.94, 150.59, 134.73, 134.26, 129.81, 128.68, 127.68, 123.77, 123.46, 122.58, 119.84, 119.79, 105.92, 55.30. HRMS: 계산된 [M⁺] 302.1050, 실제값 302.1055.

[0061] 실험예 1. 흡수 및 형광 스펙트럼 측정

[0062] 흡수 스펙트럼은 Hewlett-Packard 8453 diode array spectrophotometer를 사용하였으며, 형광 스펙트럼은 1cm 표준 퀴즈 셀을 구비한 Amico-Bowman series 2 luminescence spectrometer를 사용하여 측정하였다. 형광법에 의해 범용 완충액 (pH 7.0)에서 측정된 화학식 1로 표시되는 화합물(NP1)의 용해도는 세포를 염색하기에 충분한 5 μM이다. 상기 생리학적 조건에서 NP1의 흡수 최대값은 $\lambda_{abs} = 342 \text{ nm}$ ($\epsilon = 17,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)에서, 최대 형광값은 λ_{abs} 로부터 거의 160nm 적색-이동된 $\lambda_{fl} = 500 \text{ nm}$ ($\Phi = 0.084$)에서 나타났다. NP1에서 관찰된 스트로크 이동이 특이적으로 큰 것은 전하-이동 여기 상태의 안정성이 크기 때문임을 알 수 있다

[0063] NP1의 흡수 및 발광 스펙트럼은 다음과 같은 순서로 용매 극성(E_T^{N12})이 증가함에 따라 점진적인 적색이동을 나타내었다: 1,4-디옥산 < DMF < EtOH < H₂O. 발광 (~70 nm) 스펙트럼에서 적색이동이 크다는 것은 극성 탐침으로서 NP1의 효용성을 의미한다. 또한 DMF 중 NP1에 대한 λ_{fl} 의 값은 HeLa세포에서 측정된 값과 유사한데, 이는 DMF가 세포내 환경의 극성을 충분히 나타낸다는 것을 알 수 있다.

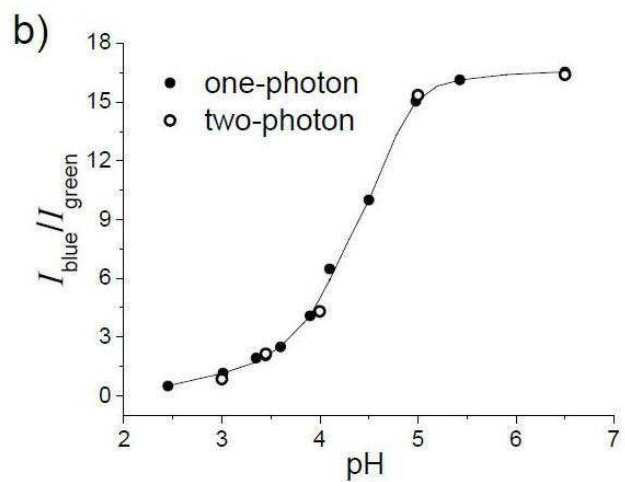
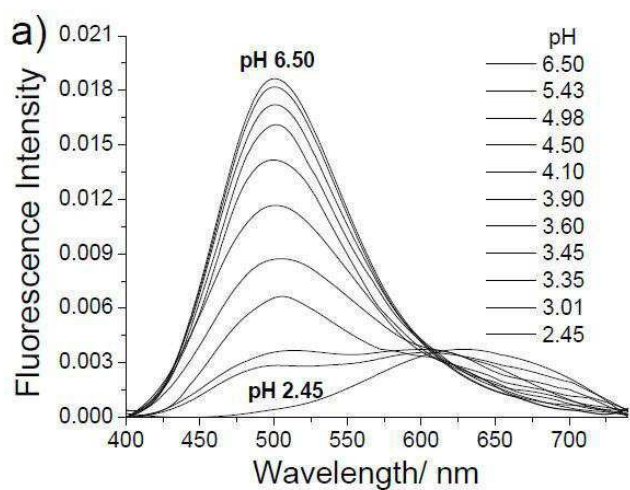
[0064] NP1의 흡수 스펙트럼은 pH가 감소함에 따라 410 nm에서 부수적인 증가를 포함하여 350 nm에서는 점진적인 감소를 보이며, 이는 피리딜 질소의 양성자화가 일어나 세포내 전하이동(ICT)과 λ_{abs} 를 증대시켰기 때문이다. 발광 스펙트럼은 장파장대가 약간 감소한 것을 제외하거나 유사한 거동을 보였다. 400-500 nm($I_{청색}$)와 600-750 nm($I_{녹색}$)에서 상대적 발광 세기 비($I_{청색}/I_{녹색}$)는 pH가 2.45에서 6.50으로 변함에 따라 12배 증가 되었다(도 1a). 또한, 흡수와 발광 적정 곡선에 의해 NP1에 대해 측정된 pK_a 는 4.4로 동일하였는데, 이는 상기 측정의 신뢰성을 증명하는 것이다(도 1b). $I_{청색}/I_{녹색}$ 대 pH의 그래프는 pH = 3.5-5.0에서 선형으로, 이는 NP1이 이 범위의 pH를 측정하기에 적합하다는 것을 의미한다. 이들 결과는 NP1이 약산 영역의 pH를 신빙성이 높은 정확도로 평가할 수 있는 비율계량 탐침으로서 작용할 수 있음을 알 수 있다.

[0065] 이어서, 이광자(TP) 작용 단면($\Phi \delta_{max}$)을 로다민 6G를 기준물질로서 이용하는 형광법에 의해 측정하였다. 발광 최대값이 유사하므로 세포내 환경을 위한 모델로서 DMF 중 NP1의 $\Phi \delta_{max}$ 값은 740 nm에서 155 GM이었다. 상기 값으로 NP1로 표지한 세포와 인체 조직의 밝은 이광자 현미경(TPM) 이미지를 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 본 발명의 이광자 표지자 NP1은 비율계량법에 의해 2-광자 방식으로 pH를 측정할 수 있음이 확인할 수 있었다.

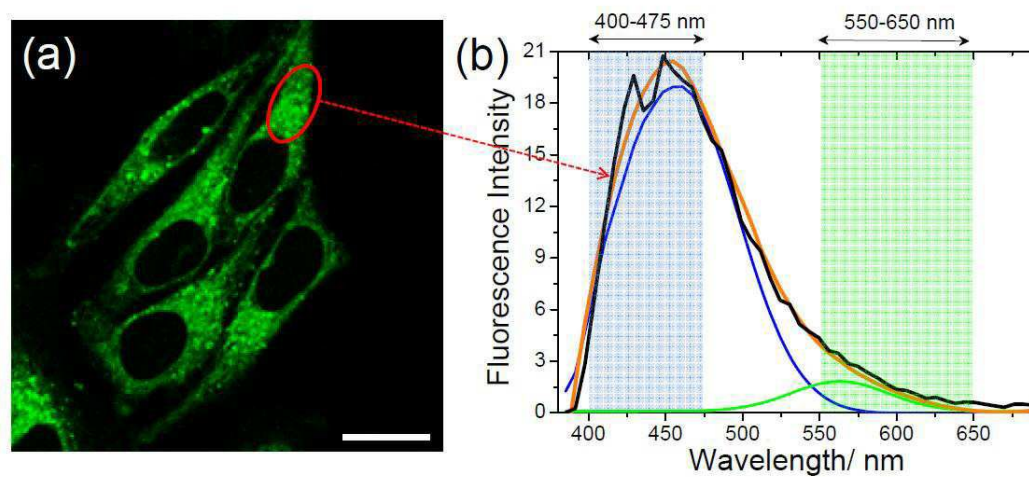
- [0066] 실험예 2. 본 발명의 이광자 표지자의 pH 탐지 능력 평가
- [0067] 세포 환경의 pH를 측정하기 위기 위해 TP 탐침으로서 NP1을 활용하였다. 주사 램다 방식으로 740 nm TP 여기를 이용하여 NP1으로 표지한 HeLa 세포는 각각 450 nm(청색 곡선)과 575 nm(녹색 곡선)에서 발광 최대값을 갖는 2개의 가우시안 함수로 분리될 수 있는 광역 스펙트럼을 보였다(도 2b). 상기 발광 최대값은 완충액에서 측정된 NP1과 NP1H⁺의 발광 최대값으로부터 각각 50과 55 nm 만큼 청색-이동하는데, 이는 세포에서 탐침 환경이 수성 완충액에 비해 더 소수성이라는 것을 의미한다. 더욱이, 분리된 가우시안 함수(청색 곡선)에서 단파장대는 550 nm에서 기준선까지 감소하였다. 그러나 400-475 nm에서 청색 곡선의 면적에 비해 575-650 nm에서 녹색 곡선의 면적이 훨씬 작아 $I_{\text{녹색}}$ 과 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 의 측정과 관련하여 오차를 일으킬 수 있었다. $I_{\text{녹색}}$ 이 550-650 nm까지 검출 윈도우를 증가시킴으로써 2배가 될 수 있고 550-575 nm에서 청색 곡선의 면적이 이전 면적의 10% 미만이기 때문에, 400-475 nm(청색)와 550-650 nm(녹색)의 검출 윈도우를 각각 이용하여 세포와 조직으로부터 TPEF를 수집하여 상기 오차를 최소화하였다.
- [0068] 수해소체 내 pH 범위는 4 내지 5이므로 NP1이 수해소체 내 양성자화된 형태(NP1H⁺)로서 축적될 가능성이 있다. 이러한 가능성을 검증하기 위해, NP1과 잘 알려진 수해소체용 1-광자 형광 탐침인 LysoTracker Red(LTR)로 공-염색한 HeLa 세포를 이용하여 공-편재화 실험을 수행하였다. NP1의 TPM 사진은 LTR의 OPM 사진과 부분적으로 중첩되었다(도 3a-c). 채널 사이의 세기 분포의 상관관계를 나타내는 피어슨 공편재화 계수 A 를 Autoquant X2 소프트웨어를 이용하여 계산하였다. LTB가 공편재화된 NP1의 A 값은 0.23인 반면에, NP1이 공편재화된 LTB의 값은 0.89로서, 그림 3a의 녹색 영역은 수해소체 내 NP1H⁺ 외에 세포질 내 NP1에 기인한 것임을 나타낸다.
- [0069] 유사한 결과가 NP1과 Lysotracker Blue(LTB)를 이용한 공-편재화 실험에서 관찰되었고(도 3d-h); Lysotracker Blue(LTB)가 공편재화된 NP1의 A 값은 0.19인 반면에, NP1이 공편재화된 LTB의 값은 0.91이었다(도 3d 및 3g). 또한, 550-650 nm에서 수집한 TPM 사진은 0.86의 A 값을 갖는 LTB의 OPM 사진과 상당히 중첩됨으로, 이를 통해 NP1H⁺가 수해소체 내에 주로 존재한다는 것을 알 수 있다(도 3f-h). NP1은 세포내 환경의 pH에 반응적이어서 청색과 녹색 윈도우로 구성된 비율 사진(ratio image)에서 산성(오렌지색 점들)과 중성 영역(청색 영역)을 보여준다(도 3i). NP1은 추가 이점으로서 NP1-표지한 HeLa 세포에서 TPEF 세기의 변화가 60분 동안 무시할 정도로 작다는 것에 의해 밝혀진 바와 같이 높은 광안정성과, CCK-8 키트를 이용하여 측정한 결과 무시할 정도의 세포독성을 갖는다. 이들 결과는 NP1이 광안정성과 세포독성에 의한 간섭이 최소화되면서 생세포 내 pH를 평가할 수 있다는 것을 입증한다.
- [0070] 실험예 3. 생체 내 pH 측정
- [0071] 인체 조직 깊숙한 안쪽의 pH를 측정하기 위한 탐침으로서 NP1을 적용하였다. 식도-위-십이지장 내시경에 의해 밝혀진 식도 점막이 손상된 식도염 환자가 기증한 위와 식도 조직을 이용하였다. 식도 조직은 위-식도 접합부(GEJ)와 하부 식도 괄약근(LES)의 근위 경계 상방 5 cm에서 채취하였다. 정상 환자가 기증한 대조군 조직도 연구하였다. 상기 조직은 염색 중에 변형될 수 있어 염색하는데 더 오랜 시간이 걸리기 때문에 NP1을 과량(20 M)으로 사용하여 염색을 용이하게 하였다.
- [0072] 20 μ M NP1로 표지한 조직 박편의 TPM 비율계량 사진을 깊이 90-180 μ m에서 2개의 수집 윈도우로부터 얻어 전체 pH 분포를 가시화하였다. pH 값은 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 비와 적정 곡선으로부터 평가하였다. 각 부위에서, 7개의 조직 시료의 깊이 90-180 μ m에서 z -방향을 따라 10개의 xy 면으로부터 얻은 총 70개의 $I_{\text{청색}}/I_{\text{녹색}}$ 비를 이용하여 계산하였다. 이 결과로부터 위의 pH는 약 2.1로 정상 환자의 pH(2.1 ± 0.31)와 식도염 환자의 pH(2.1 ± 0.39)와 거의 동일함을 알 수 있다(도 4c). 한편, 정상 환자의 식도 pH보다 식도염 환자의 식도 pH가 유의적으로 낮은데, GEJ와 LES의 근위 경계 상방 5 cm에서 식도염 환자의 pH 값은 각각 3.1 ± 0.41 과 4.7 ± 0.47 인데 비해, 정상 환자의 pH 값은 각각 5.1 ± 0.25 와 7.2 ± 0.33 이다(도 4c).
- [0073] 이 결과는 식도염 환자의 식도는 위로부터 역류한 강산에 의해 산성화되고 이 효과는 GEJ에서 더욱 확연해짐을 보여준다. 더욱이 서로 다른 깊이에서 얻은 비율계량 TPM 사진을 통해 주목할 정도의 pH 차이 없이 구성이 약간 변함을 알 수 있다. 이들 발견으로부터 NP1이 TPM을 이용하여 인체 조직에서 깊이 90-180 μ m 범위의 pH를 평가할 수 있음을 알 수 있다.

도면

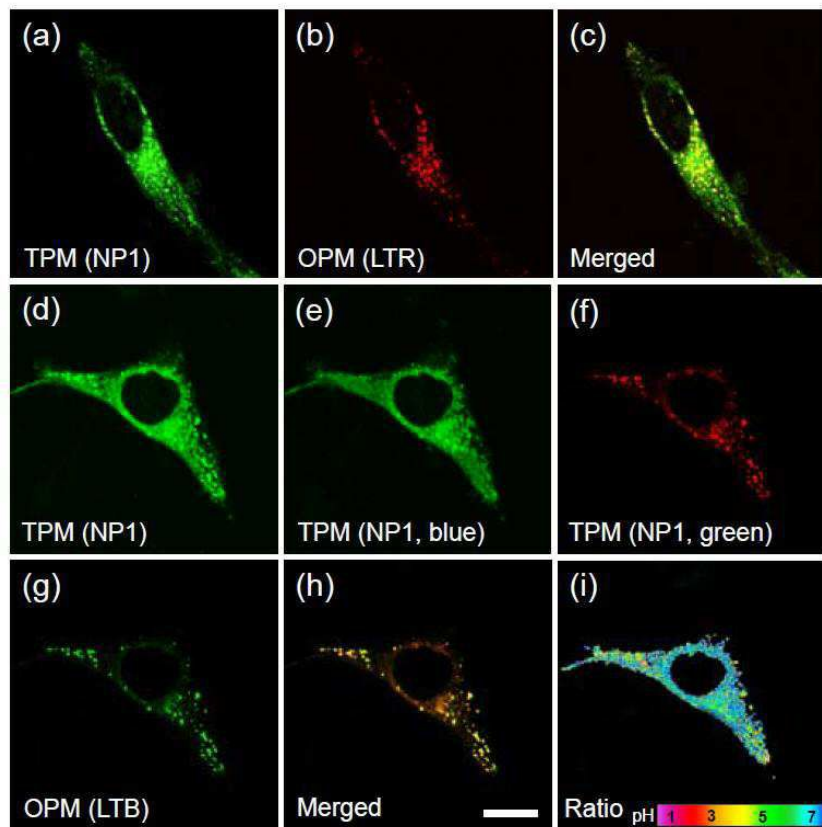
도면1



도면2



도면3



도면4

