



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0005658
(43) 공개일자 2017년01월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/58 (2006.01) C07D 403/14 (2006.01)
C07D 405/14 (2006.01) G01N 21/77 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/582 (2013.01)
C07D 403/14 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0096022

(22) 출원일자 2015년07월06일

심사청구일자 2015년07월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

에스에프씨 주식회사

충청북도 청주시 청원구 오창읍 과학산업5로 89

(72) 발명자

조봉래

서울특별시 성동구 성수일로4길 26 103동 504호(성수동2가, 서울숲힐스테이트아파트)

(74) 대리인

정은열

전체 청구항 수 : 총 5 항

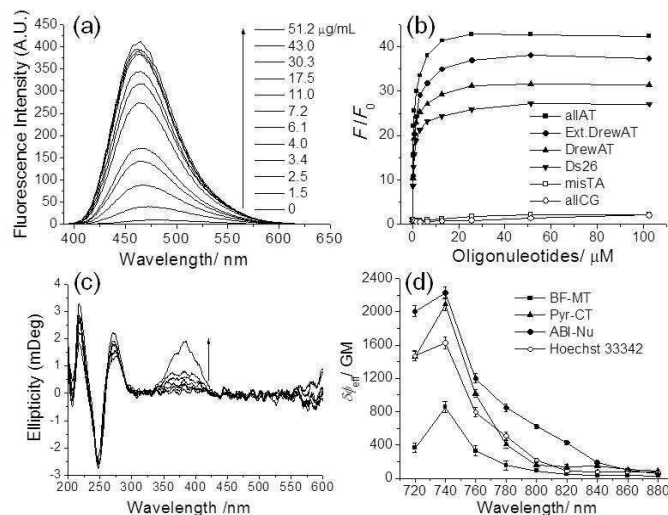
(54) 발명의 명칭 핵, 세포질 및 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물 및 이를 포함하는 조성물

(57) 요약

본 발명은 핵, 세포질 및 미토콘드리아에 대한 특이적 영상화가 가능한 이광자 프로브 화합물 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것으로, 핵, 세포질 및 미토콘드리아에 대해 높은 선택성을 갖고, 핵과 세포질, 핵과 미토콘드리아를 동시에 검출하는 것이 가능하며, 현저한 이광자 활성 단면을 갖기 때문에 낮은 농도에서도 밝은 이광자 영상을 얻을 수 있으며, 낮은 세포독성, 높은 광안정성 및 pH 독립성을 보유한 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 상기 프로브들을 이용하여 평균 핵 면적(N-면적)과 핵 대 세포질(N/C) 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 이중-색 TPM 영상화에 의해 정량적으로 평가할 수 있는바, 결장암을 비롯한 악성 종양질환의 병리 진단에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07D 405/14 (2013.01)

G01N 21/77 (2013.01)

G01N 33/52 (2013.01)

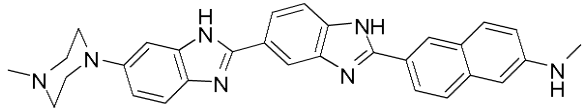
명세서

청구범위

청구항 1

하기 [화학식 1]로 표시되는 핵 영상화용 이광자 프로브 화합물:

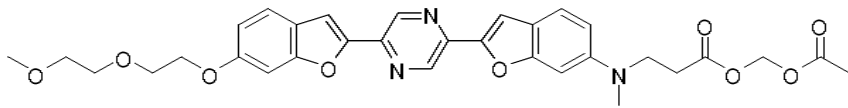
[화학식 1]



청구항 2

하기 [화학식 2]로 표시되는 세포질 영상화용 이광자 프로브 화합물:

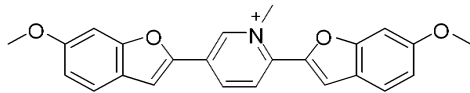
[화학식 2]



청구항 3

하기 [화학식 3]으로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물:

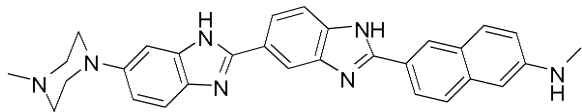
[화학식 3]



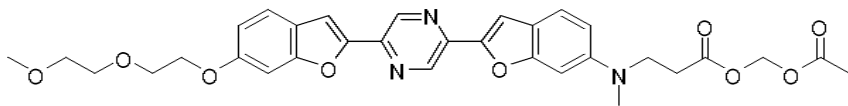
청구항 4

하기 [화학식 1]의 화합물 및 하기 [화학식 2]의 화합물을 포함하는 핵 및 세포질 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물:

[화학식 1]



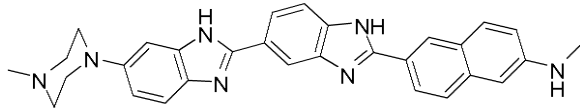
[화학식 2]



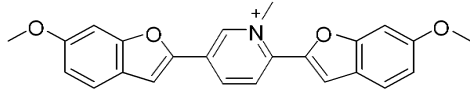
청구항 5

하기 [화학식 1]의 화합물 및 하기 [화학식 3]의 화합물을 포함하는 핵 및 미토콘드리아 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물:

[화학식 1]



[화학식 3]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 핵, 세포질 및 미토콘드리아에 대한 특이적 영상화가 가능한 이광자 프로브 화합물 및 이광자 프로브 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 결장암은 결장의 선종-선암 진행으로부터 발병하는 가장 흔한 소화기암이다. 결장암의 진단은 내시경술 도중에 용종 또는 종양이 발견되면, 이를 분리한 후 포르말린과 파라핀으로 처리하여 얇은 박편을 제작한 다음, 헤마톡실린과 에오신(H&E)으로 염색하여 영상화하여 진단한다(Treanor, D. & Quirke, P. Pathology of colorectal cancer. *Clin. Oncol.* **19**, 769-776 (2007)). 이때, 정상세포가 암세포화되는 과정에서 세포가 길쭉해지고 핵의 크기가 증가하므로, 세포의 외양과 핵 대 세포질의 비율(N/C)을 조사하여 암 진단을 완료하는데, 이러한 진단방법은 진단에 수일이 소요될 뿐만 아니라 생체의 박편의 세포 형상, 핵 크기와 N/C 비를 포함한 종양의 전체 병리조직학적 특징들을 정확히 대변하지 못하는 단면 사진을 토대로 하기 때문에 관찰자간 차이가 커 신뢰성이 높지 않다.

[0003] 최근에는 보다 정확한 병리진단을 위한 방안으로서, 근적외선 영역의 광자 2개를 여기원으로 사용하여 살아있는 조직의 깊은 영역을 높은 공간해상도로 영상화할 수 있는 이광자 현미경법(two-photon microscopy)이 주목받고 있다(Helmchen, F. & Denk, W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nat. Method.* **2**, 932-940 (2005); Zipfel, W. R., Williams, R. M., & Webb, W. W. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* **2**, 1369-1377 (2003)). TPM을 이용하면, 수백 개의 생체의 박편의 단면 사진을 얻을 수 있으며, 이들로부터 표적 세포소기관의 평균 크기를 측정할 수 있다.

[0004] 한편 최근의 연구에서, 암세포는 정상세포에 비해 미토콘드리아의 크기와 수의 증가를 보인다는 것이 보고된바(Shapovalov, Y., Hoffman, D., Zuch, D., de Mesy Bentley, K. L. & Eliseev, R. A. Mitochondrial Dysfunction in Cancer Cells Due to Aberrant Mitochondrial Replication. *J. Biol. Chem.* **286**, 22331-22338 (2011); Liu, C.-H. *et al.* Optical spectroscopic characteristics of lactate and mitochondrion as new biomarkers in cancer diagnosis: understanding Warburg effect. *Proc. of SPIE*, **8220**, 82200Y1-10 (2010)), 미토콘드리아 농도의 증가를 토대로 암의 진단이 가능할 것으로 기대된다.

[0005] 이에 본 발명의 발명자들은 널리 분리된 과장에서 TP-여기 형광을 방출하는 핵, 세포질 및 미토콘드리아 검출을 위한 이광자(TP) 프로브가 개발될 경우, 이중-색 TPM 영상화를 이용하여 평균 핵 면적(N-면적)과 N/C 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비의 동시 평가를 가능하게 하여 결장암에 대한 새로운 병리학적 진단이 가능할 것으로 기대하였다.

[0006] 최근 들어, 핵(Y.-C. Zheng, M.-L. Zheng, S. Chen, Z.-S. Zhao, X.-M. Duan, J. Mater. Chem. B. 2014, **2**, 2301-2310)과 미토콘드리아(F. Miao, W. Zhang, Y. Sun, R. Zhang, Y. Liu, F. Guo, G. Song, M. Tian, X. Yu, Biosens. Bioelectron. 2014, **55**, 423-429)의 영상화를 위한 TP 프로브가 다수 개발되었으나 상기 언급한 요건을 충족하는 프로브는 현재까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명에서는 세포기관들 중 핵, 세포질 및 미토콘드리아에 대한 특이적 영상화가 가능하며, 나아가 이중-색 TPM 영상화에 의해 평균 핵 면적(N-면적)과 핵 대 세포질(N/C) 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 정량적으로 평가하여 결장암을 비롯한 악성 종양질환의 병리진단에 유용하게 사용할 수 있는 이광자 프로브 및 이광자 프로브 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위해서,

[0009] 하기 [화학식 1]로 표시되는 핵 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

[0010] [화학식 1]

[0011]

[0012] 또한, 하기 [화학식 2]로 표시되는 세포질 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

[0013] [화학식 2]

[0014]

[0015] 또한, 하기 [화학식 3]으로 표시되는 미토콘드리아 영상화용 이광자 프로브 화합물을 제공한다:

[0016] [화학식 3]

[0017]

[0018] 또한, 하기 [화학식 1]의 화합물 및 하기 [화학식 2]의 화합물을 포함하는 핵 및 세포질 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물을 제공한다:

[0019] [화학식 1]

[0020]

[0021] [화학식 2]

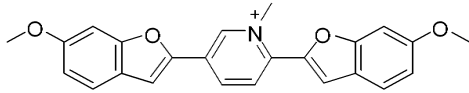
[0022]

[0023] 또한, 하기 [화학식 1]의 화합물 및 하기 [화학식 3]의 화합물을 포함하는 핵 및 미토콘드리아 동시 영상화용 이광자 프로브 조성물을 제공한다:

[0024] [화학식 1]

[0025]

[0026] [화학식 3]



[0027]

발명의 효과

[0028]

본 발명에 따르면, 핵, 세포질 및 미토콘드리아에 대해 높은 선택성을 갖고, 핵과 세포질, 핵과 미토콘드리아를 동시에 검출하는 것이 가능하며, 현저한 이광자 활성 단면을 갖기 때문에 낮은 농도에서도 밝은 이광자 영상을 얻을 수 있으며, 낮은 세포독성, 높은 광안정성 및 pH 독립성을 보유한 이광자 프로브들을 제공할 수 있다.

[0029]

또한, 본 발명에 따른 상기 프로브들을 이용하여 평균 핵 면적(N-면적)과 핵 대 세포질(N/C) 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 이중-색 TPM 영상화에 의해 정량적으로 평가할 수 있는바, 결장암을 비롯한 악성 종양질환의 병리진단에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0030]

도 1에서 (a)는 CT-DNA(0-51.2 mg/mL)가 존재하는 PBS 중 ABI-Nu(1 M)의 일광자 방출 스펙트럼, (b)는 올리고뉴클레오타이드의 형광 증강(F/F_0) 대 물농도를 그래프로 나타내 얻은 형광 적정 곡선, (c)는 PBS 중 ABI-Nu(0-64 μ M)가 존재하는 상태에서 allAT(10 μ M)의 CD 스펙트럼, (d)는 HeLa 세포에서 Pyr-CT, ABI-Nu, Hoechst 33342와 BF-MT의 유효 이광자 작용 단면적을 나타낸다.

도 2에서 (a) 내지 (c)는 ABI-Nu와 Pyr-CT (d) 내지 (f)는 ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 HeLa 세포의 TPM 이미지로, (a), (b)는 Ch1(핵)과 Ch2(세포질과 미토콘드리아)에서 각각 취합한 TPM 이미지이며, (c), (f)는 합성 이미지이다. (g)는 ABI-Nu(청색), Pyr-CT(빈 오렌지색)와 BF-MT(채워진 오렌지색)로 각각 표지한 HeLa 세포의 이광자 여기 형광(TPEF) 스펙트럼이며, (h)와 (i)는 DNase(h)와 RNase(i) 각각 0.5 g/mL으로 분해한 후 Ch1에서 취합한 ABI-Nu 표지 HeLa 세포의 TPM 이미지이다. HeLa 세포는 37 °C에서 30분 동안 1 M 프로브와 함께 배양하였다. 여기 파장은 750 nm이었다. 스케일 바=30 μ m.

도 3은 (a) BF-MT(1 μ M)와 (b) Mitotracker Red FM(1 μ M)으로 공동-표지한 HeLa 세포의 (a) TPM 및 (b) OPM 이미지 및 (c) 공동-영역화된 이미지이다. 각각 750 nm와 543 nm에서 여기서 450-600 nm와 650-700 nm에서 TPEF와 OP 형광 데이터를 취합하였다. 스케일 바, 30 μ m. 도시된 세포들은 반복 실험(n=5)을 통해 얻은 대표 이미지들이다.

도 4는 깊이 90-150 μ m의 (a) Ch1과 (b) Ch2에서 취합한 ABI-Nu와 Pyr-CT로 공동-표지한 정상 조직의 20 배율의 3-D TPM 이미지 및 (c) 합성이미지이다. 적색 파선은 검출을 위해 이용한 4개의 영역을 분할하고 백색 박스는 150 개의 단면 이미지를 100 배율로 취합한 영역을 나타낸다. (d)는 90-150 μ m 깊이에서 얻은 (c)의 100 배율의 TPM 단면 이미지이다. 청색과 황색 도메인은 각각 핵과 세포질을 나타낸다. 조직을 37 °C에서 40분 동안 10 μ M 프로브와 함께 배양하였다. TPM 이미지는 Ch1(400-475 nm, 청색)과 Ch2(600-700 nm, 황색)에서 750 nm 여기 및 형광 방출 윈도우를 이용하여 얻었다.

도 5는 환자 1(a-c)과 2(d-f)의 정상, 선종(이형성증 정도가 낮은)과 선암 조직의 결장경 이미지, ABI-Nu와 Pyr-CT(g-i) 또는 ABI-Nu와 BF-MT로(j-l) 공동-표지한 조직의 100 배율의 3-D 이미지 및 120 μ m 깊이의 조직에서 핵의 380 배율의 TPM 이미지(m-r)이다. 면적이 작아지는 순으로 분류한 형광 영역 중 상위 5%가 포함되어 있다. 동일 조직 박편의 결장경 사진 아래에 TPM 이미지를 나타내었다. 청색, 황색과 녹색 도메인은 각각 핵, 세포질과 미토콘드리아를 나타낸다. 모든 실험에서, 조직은 37 °C에서 40분 동안 10 μ M 프로브와 함께 배양하였다. Ch1(400-475 nm, 청색)과 Ch2(600-700 nm, 황색)에서 750 nm 여기 및 형광 방출 윈도우를 이용하여 TPM 이미지를 얻었다. 스케일 바, 30 μ m(l)과 8 μ m(r).

도 6은 ABI-Nu와 Pyr-CT-AM(a, b) 또는 ABI-Nu와 BF-MT(a, c)로 공표지한 정상, 선종(이형성증 정도가 낮은)과 선암 조직 박편의 1200개의 TPM 사진으로부터 계산한 (a) 평균 핵 면적(N-면적), (b) 핵 대 세포질(N/C) 비 및 (c) 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 나타낸 그래프이다.

도 7에서 (a) 및 (d)는 CT-DNA와 allAT가 부재 및 존재하는 PBS 완충용액 중 ABI-Nu, (b)와 (e)는 EtOH와 디옥산/ H_2O (32/1) 중 Pyr-CT-AM, (c)와 (f)는 PBS 완충용액과 EtOH 중 BF-MT의 정규화된 흡수(a-c) 및 방출 스펙트럼(d-f)을 나타낸다.

도 8은 (a, c) 일광자 형광 및 (b) 흡수 스펙트럼 및 인산 완충용액 중 ABI-Nu, Pyr-CT-AM과 BF-MT에 대해 염료 농도 대비 (d, f) 형광 및 (e) 흡수 세기를 나타낸 그래프이다. 여기 파장은 360 nm이었다(a, c).

도 9는 형광 증강 F/F_0 대 CT-DNA와 RNA의 농도를 그래프로 나타내어 얻은 형광 적정 곡선이다.

도 10은 pH 7.4의 10 mM PBS 중 ABI-Nu(0-64 μ M)의 존재 하 a11CG(a), Ext.DrewAT(b), DrewAT(c)와 Ds26(d)의 CD 스펙트럼이다. 모든 경우에 올리고뉴클레오티드 농도는 10 μ M이었다.

도 11은 a11AT가 부재 및 존재하는 PBS 중 (a) ABI-Nu와 Hoechst 33538, (b) 1,4-디옥산/H₂O(32/1) 중 Pyr-CT 및 (c) EtOH 중 BF-MT의 이광자 작용 스펙트럼을 나타낸다.

도 12는 ABI-Nu (a), Pyr-CT (b)와 BF-MT (c)으로 표지한 HeLa 세포의 TPM 이미지이다. 세포를 1 μ M의 ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT 각각과 함께 30분 동안 37 °C에서 배양하였다. (d-f)는 상부 칼럼에 있는 A-C에서 시간 함수로서 측정된 상대적 TPEF 세기를 나타낸다. fs 펄스로 750 nm에서 여기서 400-650 nm에서 TPEF를 취합하였다.

도 13은 EtOH/H₂O에서 ABI-Nu(a), Pyr-CT(b)와 BF-MT(c)의 일광자 형광 세기에 대한 pH의 효과를 나타낸다. 여기 파장은 365 nm이었다.

도 14는 ABI-Nu(a), Pyr-CT(b)와 BF-MT(c)가 존재하는 상태에서 CCK-8 키트를 이용하여 측정된 HeLa 세포의 생존율을 나타낸다. 세포를 2-6시간 동안 1-10 μ M 프로브와 함께 배양하였다.

도 15는 HeLa 세포에서 MTR의 일광자 형광 스펙트럼과 BF-MT의 이광자 여기 형광 스펙트럼을 나타낸다. 일광자 여기 파장과 이광자 여기 파장은 각각 543(MTR)과 750(BF-MT)이었다.

도 16은 ABI-Nu와 Pyr-CT(a, d) 그리고 ABI-Nu와 BF-MT(g, j)로 공동-표지한 HeLa 세포(a, g)와 인간 결장 조직(d, j)의 염색 후 0과 60분에 얻은 TPM 이미지, 0-60 분간 배양 후 측정된 HeLa 세포와 인간 결장 조직에서 핵(b, e, h, k), 세포질(c, f)과 미토콘드리아(i, l)의 전체 면적을 나타낸다. 도식된 세포들과 조직들은 반복 실험(n=5)을 통해 얻은 대표 이미지이다. 750 nm에서 여기서 400-475 nm(Ch1, ABI-Nu)와 600-700 nm(Ch2, Pyr-CT와 BF-MT)에서 TPEF를 취합하였다.

도 17은 깊이 90-150 μ m의 (a) Ch1과 (b) Ch2에서 취합한 ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 정상 결장 조직의 20 배율의 3-D TPM 이미지, (c) 합성이미지 및 (d) 90-150 μ m의 깊이에서 얻은 100 배율의 TPM 단면 이미지이다. 청색과 황색 점들은 각각 핵과 미토콘드리아를 나타낸다.

도 18은 깊이 120 μ m의 Ch1에서 취합한 ABI-Nu와 Pyr-CT로 공동-표지한 (a) 정상, (d) 선종(이형성증 정도가 낮은)과 (g) 선암의 TPM 단면 이미지 및 면적이 감소하는 순으로 분류한 이미지(b, e, h)이다. Image-Pro Analyzer 3D 7.0 소프트웨어(Media Cybernetics)를 이용하여 계수 분석을 수행하였다. (a), (d), (g)에서 백색 표시는 소프트웨어가 인식한 형광 영역을 나타낸다. (b), (e), (h)에서 점선의 백색 박스는 TPEF 세기가 최대치의 상위 90%에 속하는 형광 영역을 포함하고 있다. (c, f, i)는 (b), (e), (h)에서 면적이 작아지는 순으로 핵의 분포를 보여주는 막대도표이다. 수직선은 TPEF 세기가 최대치의 90%인 영역을 나타낸다.

도 19는 깊이 120 μ m의 Ch1에서 취합한 ABI-Nu와 Pyr-CT로 공동-표지한 (a) 정상, (d) 선종(이형성증 정도가 낮은)과 (g) 선암의 TPM 단면 이미지 및 면적이 감소하는 순으로 분류한 이미지(b, e, h)이다. Image-Pro Analyzer 3D 7.0 소프트웨어(Media Cybernetics)를 이용하여 계수 분석을 수행하였다. (a), (d), (g)에서 백색 표시는 소프트웨어가 인식한 형광 영역을 나타낸다. (b), (e), (h)에서 점선의 백색 박스는 TPEF 세기가 최대치의 상위 90%에 속하는 형광 영역을 포함하고 있다. (c, f, i)는 (b), (e), (h)에서 면적이 작아지는 순으로 핵의 분포를 보여주는 막대도표이다. 수직선은 TPEF 세기가 최대치의 90%인 영역을 나타낸다.

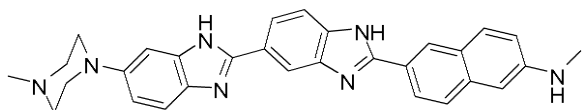
도 20은 깊이 120 μ m의 Ch1에서 취합한 ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 (a) 정상, (d) 선종(이형성증 정도가 낮은)과 (g) 선암의 TPM 단면 이미지 및 면적이 감소하는 순으로 분류한 이미지(b, e, h)이다. Image-Pro Analyzer 3D 7.0 소프트웨어(Media Cybernetics)를 이용하여 계수 분석을 수행하였다. (a), (d), (g)에서 백색 표시는 소프트웨어가 인식한 형광 영역을 나타낸다. (b), (e), (h)에서 점선의 백색 박스는 TPEF 세기가 최대치의 상위 90%에 속하는 형광 영역을 포함하고 있다. (c, f, i)는 (b), (e), (h)에서 면적이 작아지는 순으로 핵의 분포를 보여주는 막대도표이다. 수직선은 TPEF 세기가 최대치의 90%인 영역을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 도면 및 실시예를 참조하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하기로 한다.

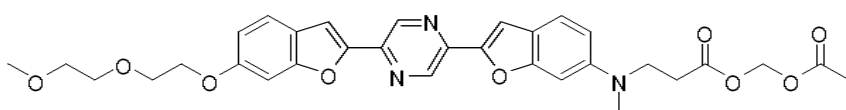
[0032] 본 발명자들은 핵에 대한 TP 프로브(하기 [화학식 1], 이하 "ABI-Nu"로 명명), 세포질에 대한 TP 프로브(하기 [화학식 2], 이하 "Pyr-CT-AM"으로 명명, 또한 하기 [화학식 2]의 CH₂OC(O)Me 작용기가 H로 치환된 하기 [화학식 4]의 화합물은 "Pyr-CT"로 명명) 및 미토콘드리아에 대한 TP 프로브(하기 [화학식 3], 이하 "BF-MT"로 명명)를 새롭게 개발하였으며, 본 발명에 따른 상기 프로브들은 하기 요건을 충족시킨다: i) 각 세포기관에 대한 높은 선택성; ii) 두 가지 세포기관을 동시에 검출하기 위해 세포 중에서 넓게 분리된 TPEF 스펙트럼; iii) 낮은 프로브 농도에서도 밝은 TPM 영상을 얻기 위한 현저한 TP 활성 단면; iv) 낮은 세포독성, 높은 광안정성, 및 pH 독립성.

[0033] [화학식 1]



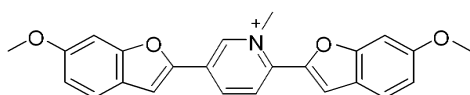
[0034]

[0035] [화학식 2]



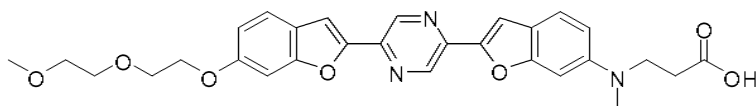
[0036]

[0037] [화학식 3]



[0038]

[0039] [화학식 4]



[0040]

[0041] 하기 실시예를 통해 본 발명에 따른 상기 프로브들은 전술한 요건들을 모두 충족시킴을 확인하였으며, 이에 상기 프로브들을 이용하여 평균 핵 면적(N-면적)과 핵 대 세포질(N/C) 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 이중-색 TPM 영상화에 의해 정량적으로 평가할 수 있는바, 결장암을 비롯한 악성 종양질환의 병리진단에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

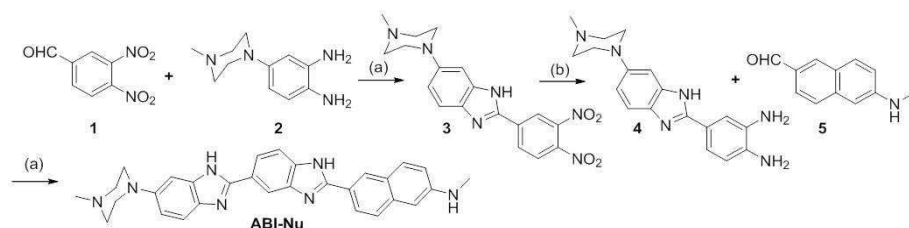
[0042] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.

[0043] 실시예

[0044] 하기 반응식 1 내지 3에 따라 본 발명에 따른 이광자 프로브 화합물인 ABI-Nu(반응식 1), Pyr-CT-AM(반응식 2) 및 BF-MT(반응식 3)를 합성하였다. 이때, 반응식 1의 화합물 1, 2, 5, 반응식 2의 화합물 6 및 반응식 3의 화합물 7은 종래 보고된 바에 따라서 제조하였다(a) X. Han, R.L. Civiello, H. Fang, D. Wu, Q. Gao, P.V. Chaturvedula, J. E. Macor and G. M. Dubowchik, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 21, 8502; b) M. Ikeda, H. Nakagawa, T. Suzuki and N. Miyata, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 1949; c) H. M. Kim, B. H. Jeong, J. Y. Hyon, M. J. An, M. S. Seo, J. H. Hong, K. J. Lee, C. H. Kim, T. Joo, S. C. Hong and B. R. Cho, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 4246; d) C. S. Lim, S. T. Hong, S. S. Ryu, D. E. Kang, B. R. Cho, submitted; e) J. A. Drewry, S. Fletcher, H. Hassana, P. T. Gunning, *Org. Biomol. Chem.*, **2009**, *7*, 5074.)

[0045] ABI-Nu의 합성

[0046] [반응식 1]



[0047]

[0048] 상기 [반응식 1]에서 (a)는 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, EtOH, H_2O ; (b)는 H_2 , Pd/C, AcOH를 포함하는 반응조건이다.

[0049] (1) 화합물 3

[0050] 0.2 ml 물 중 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (170 mg, 0.89 mmol, 1.5 당량) 용액을 EtOH(2 mL) 중 화합물 1(110 mg, 0.58 mmol)과 2(120 mg, 0.58 mmol, 1 당량)를 함유하는 용액에 첨가하였다. 이 혼합물을 밤새 환류하고 rt로 냉각하였다. 진공에서 용매를 제거하고 잔류물을 용리액으로서 5% MeOH/ CHCl_3 를 이용하는 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 갈색 고체로서 95 mg(43%)의 화합물 3을 수득하였다. ^1H NMR(300 MHz, Acetone- d_6); δ 8.78(1H, s), 8.63(1H, d, $J=8.4$ Hz), 8.30(1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.57(1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.08-7.11(2H, m), 3.26(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.69(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.39(3H, s).

[0051] (2) 화합물 4

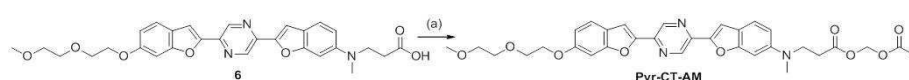
[0052] AcOH 중 화합물 3(90 mg, 0.23 mmol)과 5% Pd/C 촉매의 현탁액을 rt에서 2시간 동안 H_2 하에서 교반하였다. 촉매를 여과 제거하고 여액을 진공 농축하여 78 mg(95%)의 화합물 4를 갈색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6); δ 7.51(1H, d, $J=1.8$ Hz), 7.31-7.37(2H, m), 7.00(1H, d, $J=1.8$ Hz), 6.86(1H, dd, $J=8.4$, 1.8 Hz), 6.70(1H, d, $J=8.4$ Hz), 3.12(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.52(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.26(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, DMSO- d_6); δ 172.7, 159.6, 159.3, 149.5, 148.6, 136.0, 134.9, 125.9, 120.6, 115.6, 105.4, 101.1, 55.1, 49.9, 45.3.

[0053] (3) ABI-Nu

[0054] 0.1 mL H_2O 중 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (17 mg, 0.090 mmol, 1.5 당량) 용액을 EtOH(1 mL) 중 화합물 4(20 mg, 0.060 mmol)와 화합물 5(13 mg, 0.074 mmol, 1.2 당량)를 함유한 용액에 첨가하였다. 이 혼합물을 밤새 환류하고 rt로 냉각하였다. 진공에서 용매를 제거하고 잔류물을 용리액으로서 MeOH을 이용하는 플래시 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 20 mg(66%)의 ABI-Nu를 황색 고체로서 수득하였다. ^1H NMR(300 MHz, CD_3OD); δ 8.40(1H, s), 8.28(1H, s), 8.05(1H, dd, $J=8.4$, 1.8 Hz), 7.96(1H, dd, $J=8.4$, 1.8 Hz), 7.75-7.71(3H, m), 7.52(1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.16(1H, d, $J=1.8$ Hz), 7.07-7.00(2H, m), 6.79(1H, d, $J=1.8$ Hz), 3.27(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.91(3H, s), 2.81(4H, t, $J=4.2$ Hz), 2.48(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD); δ 154.8, 149.5, 148.3, 137.0, 129.3, 126.7, 126.6, 126.3, 124.3, 123.7, 121.6, 121.2, 118.8, 115.1, 102.2, 54.9, 50.5, 44.9, 29.1. HRMS(FAB $^+$): m/z [$\text{C}_{30}\text{H}_{29}\text{N}_7+\text{H}^+$]에 대한 계산치: 488.2518, 실측치: 488.2564.

[0055] Pyr-CT-AM의 합성

[0056] [반응식 2]



[0057]

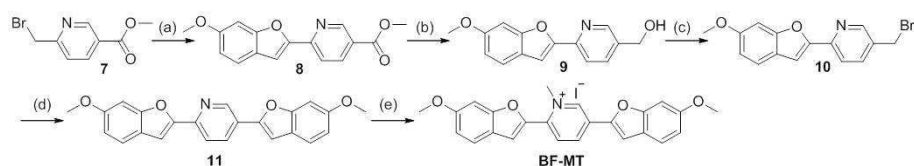
[0058] 상기 [반응식 2]에서 (a)는 브로모메틸 아세테이트(bromomethyl acetate), TEA, DMF, rt를 포함하는 반응조건

이다.

[0059] DMF(3 mL) 중 화합물 6(50 mg, 0.094 mmol), 브로모메틸 아세테이트(0.14 g, 0.94 mmol)와 트리에틸아민(0.14 g, 1.4 mmol)의 혼합물을 Ar하에서 밤새 교반하였다. 진공에서 용매를 제거하고 조생성물을 용리액으로서 에틸 아세테이트/헥산(2:1)을 이용하는 칼럼 크로마토그래피에 의해 정제하였다. 수율: 29 mg(51%); ^1H NMR(500 MHz, CDCl_3): δ 9.02(2H, s), 7.54-7.49(2H, m), 7.43(1H, s), 7.42(1H, s), 7.14(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.96(1H, dd, $J=8.8$, 2.2 Hz), 6.94(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.82(1H, dd, $J=8.8$, 2.2 Hz), 5.76(2H, s), 4.25-4.21(2H, m), 3.95-3.91(2H, m), 3.82-3.75(4H, m), 3.64-3.60(2H, m), 3.42(3H, s), 3.06(3H, s), 2.74-2.69(2H, m), 2.11(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3): δ 171.3, 170.9, 158.3, 157.8, 156.6, 152.1, 150.7, 148.2, 143.1, 142.2, 140.3, 140.1, 122.1, 122.0, 121.9, 118.9, 113.5, 110.7, 107.0, 106.3, 96.7, 94.7, 79.2, 71.9, 70.8, 69.7, 67.9, 59.1, 48.7, 38.8, 31.5, 20.7 ppm; HRMS(FAB $^+$): m/z [$\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_9+\text{H}^+$]에 대한 계산치: 604.2290, 실측치: 604.2289.

[0060] BF-MT의 합성

[0061] [반응식 3]



[0062]

[0063] 상기 [반응식 3]에서 (a)는 4-메톡시살리실알데히드, K_2CO_3 , DMF, 90 $^\circ\text{C}$; (b)는 LAH, THF, 0 $^\circ\text{C}$; (c)는 DDQ, PPh_3 , Bu_4NBr , CH_2Cl_2 , rt; (d)는 4-메톡시살리실알데히드, K_2CO_3 , DMF, 환류; (e)는 MeI, 환류를 포함하는 반응 조건이다.

[0064] (1) 화합물 8

[0065] 화합물 7(200 mg, 0.87 mmol), 4-메톡시살리실알데히드(130 mg, 0.87 mmol)와 K_2CO_3 (360 mg, 2.6 mmol)의 혼합물을 DMF에서 8시간 동안 90 $^\circ\text{C}$ 에서 교반하였다. 암색의 반응 혼합물을 물로 희석하고 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 유기층을 증발시키고 잔류물을 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (4/1)을 이용하는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 황색 고체로서 화합물 8을 수득하였다(180 mg, 75%). ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 9.23(1H, d, $J=2.2$ Hz), 8.35(1H, dd, $J=8.5$, 2.2 Hz), 7.88(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.53(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.50(1H, s), 7.10(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.93(1H, dd, $J=8.5$, 2.2 Hz), 3.98(3H, s), 3.89(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3): δ 165.8, 159.6, 157.1, 153.7, 152.7, 151.4, 138.1, 124.3, 122.5, 122.1, 118.7, 113.2, 107.5, 96.0, 55.9, 52.6.

[0066] (2) 화합물 9

[0067] LiAlH_4 (0.26 mL, 0.52 mmol, THF 중 2.0 M)를 0 $^\circ\text{C}$ 에서 THF(5 mL) 중 화합물 8(100 mg, 0.35 mmol)의 용액에 첨가하고 이 혼합물을 30분 동안 교반하였다. 소량의 물로 반응을 종결시키고 EtOAc로 추출하였다. 유기층을 증발시키고 잔류물을 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (1/1)을 이용하는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 황색 생성물로서 화합물 9를 수득하였다(71 mg, 80%). ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3): δ 8.60(1H, d, $J=2.2$ Hz), 7.78-7.82(2H, m), 7.50(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.34(1H, s), 7.09(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.90(1H, dd, $J=8.5$, 2.2 Hz), 4.76(2H, s), 3.87(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3): δ 159.0, 156.6, 154.3, 149.0, 148.8, 135.9, 135.1, 122.3, 122.0, 119.4, 112.7, 105.0, 96.1, 62.9, 55.9.

[0068] (3) 화합물 10

[0069] $\text{Bu}_4\text{N}^+\text{Br}^-$ (225 mg, 0.70 mmol)을 CH_2Cl_2 (10 mL) 중 PPh_3 (183 mg, 0.70 mmol)와 2,3-디클로로-5,6-디시아노벤조퀴논(159 mg, 0.70 mmol)을 함유한 혼합물에 첨가하고 10분 동안 rt에서 교반하였다. 다음, 이 혼합물에 화합물 9(100 mg, 0.35 mmol)를 첨가하고 rt에서 30분 동안 교반하였다. 물로 반응을 종결시키고 생성물을 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 유기층을 Na_2SO_4 으로 건조하고 여과, 농축하였다. 잔류물을 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (5/1)을 이용하는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 화합물 10(72 mg, 65%)을 수득하였다. ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3); δ 8.64(1H, s), 7.76-7.81(2H, m), 7.51(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.37(1H, s), 7.08(1H, d, $J=2.2$ Hz), 6.90(1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz), 4.51(2H, s), 3.87(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3); δ 159.1, 156.7, 154.1, 150.1, 149.3, 137.5, 132.4, 122.3, 122.2, 119.4, 112.9, 105.7, 96.1, 55.9, 30.1.

[0070] (4) 화합물 11

[0071] 3 mL DMF 중 화합물 10(50 mg, 0.13 mmol), 4-메톡시살리실알데히드(21 mg, 0.13 mmol)과 K_2CO_3 (75 mg, 0.54 mmol)의 혼합물을 밤새 환류시켰다. 암색의 반응 혼합물을 물로 희석하고 CH_2Cl_2 로 추출하였다. 유기 용매를 증발시키고 잔류물을 용리액으로서 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (3/1)을 이용하는 실리카겔 칼럼 크로마토그래피에 의해 처리하여 황색 고체로서 화합물 11을 수득하였다(40 mg, 63%). ^1H NMR(300 MHz, CDCl_3); δ 9.08(1H, d, $J=2.2$ Hz), 8.13(1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz), 7.88(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.53(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.48(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.39(1H, s), 7.11-7.09(2H, m), 7.08(1H, s), 6.94-6.88(2H, m), 3.89(6H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, CDCl_3); δ 159.1, 158.8, 156.7, 156.4, 154.4, 152.3, 148.3, 146.2, 132.0, 125.5, 122.4, 122.3, 122.1, 121.5, 119.3, 112.8, 112.7, 105.4, 102.9, 96.1, 96.0, 56.0, 55.9.

[0072] (5) BF-MT

[0073] MeI(3 mL) 중 화합물 11(20 mg, 0.054 mmol)을 1시간 동안 환류시켰다. 이 혼합물을 얼음조에서 냉각하고 CH_2Cl_2 와 함께 여과하여 황색 분말로서 BF-MT를 수득하였다(18 mg, 86%). ^1H NMR(300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ 9.69(1H, s), 8.91(1H, d, $J=8.5$ Hz), 8.58(1H, d, $J=8.5$ Hz), 8.17(1H, s), 7.90(1H, s), 7.79(1H, d, $J=8.5$ Hz), 7.73(1 H, d, $J=8.5$ Hz), 7.40(1 H, d, $J=2.2$ Hz), 7.28(1 H, d, $J=2.2$ Hz), 7.07(1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz), 7.03(1H, dd, $J=8.5, 2.2$ Hz), 4.61(3H, s) 3.88(3H, s), 3.86(3H, s). ^{13}C NMR(100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$); δ 161.5, 160.0, 159.3, 157.3, 156.9, 148.4, 146.3, 144.4, 143.5, 142.5, 138.6, 127.8, 127.4, 124.3, 123.3, 122.8, 122.3, 121.9, 121.7, 119.7, 117.3, 56.4, 56.3, 49.3. HRMS(FAB $^+$): m/z [$\text{C}_{24}\text{H}_{20}\text{NO}_4$ $^+$]에 대한 계산치:386.1392, 실측치: 386.1391.

[0074] 시험예

[0075] 분광학적 측정

[0076] Hewlett-Packard 8453 다이오드 어레이 분광광도계를 이용하여 흡수 스펙트럼을 측정하였고 1 cm 표준 석영 셀을 구비한 Amico-Bowman 시리즈 2 발광분광계로 형광 스펙트럼을 얻었다. 형광 양자 수율은 공개된 방법에 따라 쿠마린 307과 로다민 B를 이용하여 측정하였다(Demas, J. N. & Crosby, G. A., The measurement of photoluminescence quantum yields. A review, *J. Phys. Chem.*, **75**, 991-1024 (1971)). CD 스펙트럼은 Jasco J-810-150S 분광계로 모니터링하였다. 각각의 스펙트럼은 600 nm에서 200 nm까지 1 nm씩 단계적으로 평균 4회 스캔하였다. 스캔 속도는 200 nm/분이었다. 모든 분광학 실험에서 사용한 완충용액은 pH 7.4의 10 mM 인산나트륨 완충용액이었다. 다양한 조건에서 얻은 스펙트럼 데이터들 도 7-10 및 하기 표 1에 도시하였다.

표 1

Solvent	ABI-Nu			Pyr-CT			BF-MT		
	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}/\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ [a]	Φ [b]	$\Phi\delta_{\text{max}}$ [c]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}/\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ [a]	Φ [b]	$\Phi\delta_{\text{max}}$ [c]	$\lambda_{\text{max}}^{\text{abs}}/\lambda_{\text{max}}^{\text{fl}}$ [a]	Φ [b]	$\Phi\delta_{\text{max}}$ [c]
HeLa Cell	-/473	-	-	-/561	-	-	-/560	-	-
1,4-Dioxane			-	442/530	0.91	-	425/538	0.046	-
1,4-Dioxane :H ₂ O (32:1)	-	-	-	442/560	0.43	194	-	-	-
EtOH	363/452	0.45	-	457/577	0.020	-	421/550	0.040	13
Buffer ^[d]	362/472	0.0043	-	-	-	-	-	-	-
CT-DNA ^[e]	374/463	0.67	8.7	-	-	-	-	-	-
allAT ^[f]	376/463	0.94	12	-	-	-	-	-	-

^[a] nm로 나타낸 일광자 흡수 및 방출 스펙트럼의 λ_{max} .

^[b] 형광 양자수율. 불확실성은 $\pm 15\%$ 이다.

^[c] 10^{-50} cm s / 광자(GM)으로 나타낸 이광자 작용 단면적, 불확실성은 $\pm 15\%$.

^[d] PBS 완충용액(pH 7.2); 물에 대한 값.

^[e] 송아지 흉선의 데옥시리보핵산 나트륨염.

^[f] 자가상보적인 올리고뉴클레오티드.

인산 완충용액에서의 용해도

소량의 염료를 DMSO에 녹여 모액(5.0×10^{-3} M)을 준비하였다. 이 용액을 1.0×10^{-3} M으로 희석하고 3.0 mL PBS(인산 완충용액, pH=7.4)를 함유한 큐벳에 마이크로 주사기를 이용하여 첨가하였다. 이 용액을 6.0×10^{-3} 내지 6.0×10^{-5} 으로 희석하고 3.0 mL PBS를 함유한 큐벳에 마이크로 주사기를 이용하여 첨가하였다. 모든 경우에서 PBS 중 DMSO의 농도를 0.2%에서 유지하였다((a) J. R. Long, R. S. Drago, *J. Chem. Ed.* **1982**, *59*, 1037; (b) K. Hirose, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193.). 염료 농도 대비 흡수 및 형광 세기를 나타낸 그래프는 저농도에서 선형이었고 고농도에서는 하향 곡선형태를 보였다(도 7). 선형 영역에서 최대 농도를 용해도로서 취하였다. 완충용액 중 ABI-Nu, Pyr-CT-AM과 BF-MT의 용해도는 각각 ~ 3.0 , 4.0 과 6.0 μM 이었다.

핵산의 제조

Integrated DNA Technologies(코럴빌, IA, USA)로부터 하기 표 2에 표시된 Ext.DrewAT, DrewAT, Ds26, misTA, allAT와 allCG를 얻었다(Dumat, B. *et al.* Vinyl-triphenylamine dyes, a new family of switchable fluorescent probes for targeted two-photon cellular imaging: from DNA to protein labeling, *Org. Biol. Chem.* **10**, 6054-6061 (2012); Zanchetta, G. *et al.* Right-handed double-helix ultrashort DNA yields chiral nematic phases with both right-and left-handed director twist, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 17497-17502 (2010)). 자가상보적인 올리고뉴클레오티드(DrewAT, Ext.DrewAT, Ds26, allAT와 allCG)를 milliQ 수 중에서 5분간 95 °C로 가열한 다음, rt까지 서서히 냉각하여 이중가닥의 DNA구조를 만들었다. 농도는 260 nm에서 몰 흡광계수에 대한 제작사의 값을 이용하여 UV-Vis 흡수에 의해 측정하였다. 송아지 흉선의 DNA 나트륨염(CT-DNA)과 토롤라 효모의 RNA는 Sigma-Aldrich(ST. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. CT-DNA와 RNA를 10 mM

인산나트륨 완충용액(pH 7.4, 100 mM NaCl)에 용해시키고 여과하였다. 농도는 1의 OD 260 nm가 각각 약 50 g/mL 이중가닥 DNA와 40 g/mL RNA에 해당한다는 것을 감안하여 UV에 의해 평가하였다.

표 2

Oligonucleotides	Sequence (5' → 3')	Structure
allAT	AATAAATTTATT	B-DNA
Ext.DrewAT	CAATCGCGCGAAATTCGCGCGATTG	B-DNA
DrewAT	CGCGAAATTCGCG	B-DNA
Ds26	CAATCGGATCGAATTCGATCCGATTG	B-DNA
misTA	GGGTTACTACGAACTGG	Single strand
allCG	CCGGCGCGCCGG	B-DNA

[0088]

[0089] TP 작용 단면적($\delta \Phi$) 및 유효 TP 작용 단면적($\Phi \delta_{eff}$)의 측정

[0090] PBS(pH=7.4), 1,4-디옥산/H₂O(32/1)과 EtOH에서 ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT 각각의 값은 기재되어 있는 형광법에 의해 측정하였다(Makarov, N. S., Drobizhev, M. & Rebane, A. Two-photon absorption standards in the 550-600 nm excitation wavelength range. *Opt. Express*. **16**, 4029-4047 (2008); Haugland, R. P. *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, ed. Molecular Probes, Eugene, OR, 10th ed. (2005)). 유효 $\Phi \delta$ 값($\Phi \delta_{eff}$)은 TPM 장치 내 텔타 T-디쉬에서 MeOH(5.0 mM, 1.0 mL) 중 프로브 표지 세포와 Rhodamine 6G로부터의 TPEF 세기를 비교하여 평가하였다. $\Phi \delta_{eff}$ 값은 $\Phi \delta_{eff} = \Phi \delta_{ref} (I_{probe} / I_{ref})$ 를 이용하여 계산하였는데, 이때 $\Phi \delta_{ref}$ 은 MeOH 중 Rhodamine 6G의 값이고, I_{probe} 와 I_{ref} 은 각각 각 세포소기관 중 프로브의 TPEF 세기와 MeOH 중 Rhodamine 6G의 TPEF 세기이다.

[0091] 세포 배양

[0092] HeLa American Type Culture Collection(ATCC, 마네사, VA, USA)로부터 인간 경부암 세포를 얻었다. 이 세포를 가열하여 불활성화한 10% 우태아혈청(FBS)(WelGene), 페니실린(100 단위/mL)과 스트렙토마이신(100 mg/mL)이 첨가된 DMEM(WelGene Inc, 서울, 한국)에서 배양하였다. 모든 세포주를 5% CO₂와 95% 공기의 가습분위기하 37 °C에서 유지하였다. 영상화 이를 전에 세포를 분리하여 바닥이 유리인 디쉬(MatTek, 애설랜드, MA, USA)에 다시 도말하였다. 표지하기 위해 성장 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM으로 대체하였다. 세포를 30분 동안 TFCA(2 μ M)와 함께 배양하고, FBS가 없는 DMEM으로 3회 세척하여 영상화하였다.

[0093] TPM 영상화

[0094] 프로브 표지 HeLa 세포와 조직의 이광자 형광 현미경 사진은 개구수(NA)가 1.30인 100× 오일 대물렌즈와 NA가 0.50인 20× 건조 대물렌즈가 구비된 분광 공초점 및 다광자 현미경(Leica TCS SP2; Leica Camera, 졸름스, 독일)을 이용하여 얻었다. 이광자 여기는 초점면에서 출력 $6.26 \times 10^8 \text{ mW/cm}^2 (\times 20)$ 과 $3.80 \times 10^9 \text{ mW/cm}^2 (\times 100)$ 에 각각 상응하는 파장 750 nm와 출력 전력 1305 mW로 설정한 모드 고정 티타늄-사파이어 레이저 광원(Chameleon, 90 MHz, 200 fs; Coherent Inc., 산타클라라, CA, USA)을 이용하여 제공하였다. 내부 PMT를 이용하여 400-475 nm (채널 2)와 600-700 nm(채널 2)에서 사진을 얻어 스캔 속도 400 Hz에서 8-비트 무부호 512×512 화소 포맷으로 신호를 취합하였다.

[0095] 광안정성

[0096] 시험 프로브로 표지한 HeLa 세포에서 TPEF 세기의 시간 의존 감소를 모니터링함으로써 영상화 조건에서의 광안

정성을 측정하였다. 편중 없이 선택한 4개의 개별 세포에서 측정하였다(도 12).

[0097] pH 의존성

[0098] 상이한 pH 값의 EtOH/H₂O(1/1)에서 ABI-Nu와 Pyr-CT의 형광 세기를 측정하였다. pH 5.0-8.0 범위에 걸쳐 프로브는 pH의 영향을 받지 않았다(도 13).

[0099] 세포 생존율

[0100] 배양조건에서 추적물질이 HeLa 세포의 생존율에 영향을 줄 수 없다는 것을 확인하기 위해 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, 도진도, 일본)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 측정하였으며, 그 결과를 그림 도 14에 나타내었다.

[0101] 검출 윈도우

[0102] HeLa 세포 내 ABI-Nu의 TPEF 스펙트럼은 Pyr-CT의 TPEF 스펙트럼과 크게 중첩되었다. 스펙트럼 중첩에 의한 오차를 최소화하기 위해서 다음 2개의 인자를 고려하여 검출 윈도우를 결정하였다: i) 상기 2개의 프로브로부터의 TPEF 스펙트럼은 최대한 멀리 분리되어야 하고; ii) 상기 2개의 프로브로부터의 TPEF 세기는 비슷해야 한다. 상기 요건을 만족한 검출 윈도우는 각각 400-475 nm(Ch1, ABI-Nu)와 600-700 nm(Ch2, Pyr-CT)이었다(도 2(g)). 공동-영역화 실험을 위한 BF-MT와 MTR의 검출 윈도우는 각각 450-600 nm(BF-MT)와 650-700 nm(MTR)이었다(도 15).

[0103] 세포와 조직의 무결성에 대한 배양시간의 효과

[0104] 세포와 조직 박편이 장기간 배양 중에 손상되지 않고 유지되는지 알아보기 위해서 본 저자들은 0-60분 동안 배양한 후 ABI-Nu와 Pyr-CT 그리고 ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 HeLa 세포와 정상 결장 조직의 TPM 사진을 얻었다. 150×150 μ m 패널에서 프로브 표지 세포와 조직 내 핵과 세포질의 전체 면적은 형광 영역의 면적을 자동 계산하는 Gen5TM(BioTek, 위노스키, VT, USA) 소프트웨어의 세포분석 프로그램을 이용하여 측정하였다. 면적은 시료에 따라 서로 달랐기 때문에 t=0에서 각각의 시료에서 측정한 값을 기준으로서 이용하고 그 값을 1.0으로 정하였다. 10개의 서로 다른 세포 시료의 TPM 사진과 90-150 μ m 깊이에서 얻은 조직 박편의 30개의 TPM 단면 사진으로부터 서로 다른 시간에 측정한 전체 면적의 평균을 구하였다. 이들은 60분 동안 실험 오차 범위에서 거의 동일하게 유지되었다(도 16).

[0105] 인간 결장 조직에서 N-면적, N/C 비와 N/M 비의 측정

[0106] 고려대학교의료원 안암병원에서 선택적 결장경 시술을 받은 2명의 외래환자로부터 사전동의서와 함께 생체의 결장 박편을 얻었다. 본 저자들은 병리학자에 의해 진단된 동일한 병소인 정상 결장 점막, 이형성증 정도가 낮은 선종과 중간 정도로 분화된 선암 조직으로부터 2개의 조직 박편을 이용하여 측정하였다(도 5(a)-(c) 및 (j)-(1)). 환자 1의 조직을 이용하여 N-면적과 N/C 비를 측정하는 한편, 환자 2의 조직을 이용하여 N-면적과 N/M 비를 측정하였다. 세포를 염색하는 시간보다 조직을 염색하는데 더 오랜 시간이 걸렸고 이렇게 지체됨으로써 조직이 변형될 수 있었기 때문에 본 저자들은 염색을 용이하게 하기 위해 과량의 ABI-Nu(10 μ M), Pyr-CT-AM(10 μ M)과 BF-MT(10 μ M)를 이용하였다. 이러한 조건에서 프로브는 유리 형태와 부분 응집 형태로서 존재할 것으로 예상되었다. 유리 형태의 프로브가 세포를 염색할 때 평형이 프로브 쪽으로 이동하여 염색 용액은 유리 프로브로 포화되고 염색은 용이하게 될 것이다. 본 발명자는 ABI-Nu와 Pyr-CT 그리고 ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 조직 박편 하나 당 z-방향을 따라 90-150 μ m 깊이의 150개 단면 각각에 대해 4개의 TPM 이미지로 이루어진 600개의 TPM 이미지를 얻었다. 이 TPM 이미지들은 100배의 배율로 Ch1(ABI-Nu)과 Ch2(Pyr-CT-AM, BF-MT)에서 취합하였다. 120 μ m 깊이에서 얻은 TPM 단면 이미지는 형광 면적의 분포를 보여 주었다. Image-Pro Analyzer 3D 7.0 소프트웨어(Media Cybernetics, 록빌, MD, USA)를 이용하여 계수 분석을 수행하여 형광 면적을 크기가 작아지는 순으로 분류하였다(도 18-20). 핵 면적은 중앙의 단면에서 최대화되어야 하기 때문에 1200개의 TPM 단면 이미지

(600개의 사진 2개의 생체의 박편)에서 형광 면적 중 상위 5%를 선택하고 평균값을 계산하여 N-면적을 얻었다. 이 단면 이미지들은 또한 인접 세포에 속한 핵, 세포질과 미토콘드리아의 일부를 보여주었다(도 18-20). 핵 부분은 동일한 핵에 포함되는 세포질과 미토콘드리아를 동반하여야 하므로 소정의 단면에서 N/C 비와 N/M 비는 핵의 전체 형광 면적을 세포질과 미토콘드리아의 전체 형광 면적으로 나누어 줌으로써 계산하였다. 평균 N/C 비와 M/N 비도 1200개의 TPM 단면 이미지로부터 계산하였다.

[0107] 결과 검토

[0108] 분광 특성 및 수용성

[0109] ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT는 인산 완충용액(10 mM 인산나트륨 완충용액, pH 7.4, 100 mM NaCl)에서 각각 362 nm ($\epsilon=14,200$), 362 nm ($\epsilon=24,180$)과 421 nm ($\epsilon=10,200$)에서 최대 흡수($\lambda_{\max}$)를 보였다(도 7). ABI-Nu의 최대 형광(λ_{fl})은 472 nm($F=0.0043$)에서 나타났지만 Pyr-CT와 BF-MT로부터의 발광은 매우 약해서 인산 완충용액 중 이들의 λ_{fl} 값을 측정할 수 없었다. 상기 프로브 모두가 눈에 띄만한 값을 보인 EtOH에서 ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT는 각각 452 nm($\Phi=0.45$), 577 nm($\Phi=0.020$)와 550 nm($\Phi=0.040$)에서 λ_{fl} 을 보였다(표 1). 모든 화합물에 대해서 $\lambda_{\max}$ 와 λ_{fl} 의 값은 극성이 거의 없는 용매에서 값 증가를 수반하여 점진적인 청색 이동을 보였다(표 1). 형광법에 의해 측정했을 때(Holm, A. I., Nielsen, L. M., Hoffmann, S. V. & Nielsen, S. B. Vacuum-ultraviolet circular dichroism spectroscopy of DNA: a valuable tool to elucidate topology and electronic coupling in DNA. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 9581-9596 (2010)), 인산 완충용액 중 ABI-Nu, Pyr-CT-AM과 BF-MT의 용해도는 각각 세포를 염색하기에 충분한 3.0, 4.0과 6.0 μ M이었다(도 8).

[0110] ABI-Nu와 DNA의 결합 모드

[0111] 자외선-가시광(UV-Vis), 형광 및 원편광 이색성(CD) 스펙트럼을 이용하여 ABI-Nu와 DNA의 결합 모드를 조사하였다. 인산 완충용액 중 ABI-Nu에 송아지 흉선 DNA(CT-DNA)를 첨가하였을 때, 흡수 스펙트럼은 적색 이동하였고($\Delta\lambda_{\max}=12$ nm) 형광 세기의 30배 증가와 함께 방출 스펙트럼은 청색 이동하였다($\Delta\lambda_{fl}=9$ nm)(도 1의 (a)). AT 서열을 함유한 이중가닥 올리고뉴클레오티드(표 2)가 존재하는 상태에서 유사한 결과와 함께 더 많은 연속 AT 서열을 가진 올리고뉴클레오티드에 대해서는 더 큰 형광 증강(F/F_0)이 관찰되었다(도 1의 (b)). 즉, allAT 쌍(즉, 12개의 AT 염기쌍)은 가장 큰 증강($F/F_0=43$)을 보였고, 이후에 연장 DrewAT(측쇄 내 추가 AT 서열을 가진 중앙의 코어 내 6개의 연속 AT 염기쌍, $F/F_0=38$), DrewAT(중앙의 코어 내 6개의 연속 AT 염기쌍, $F/F_0=32$)와 ds26(중앙의 코어 내 4개의 연속 AT 염기쌍, $F/F_0=27$) 순으로 큰 증강을 보였다. 이에 비해, RNA, misTA(단일가닥 올리고뉴클레오티드) 또는 allCG(AT 서열이 없는 이중가닥 올리고뉴클레오티드)의 첨가시 F/F_0 값에 있어 약간의 변화만이 기록되었다(도 1의 (b) 및 도 9).

[0112] 올리고뉴클레오티드의 CD 스펙트럼은 ABI-Nu이 존재하는 상태에서는 200-300 nm에서 이중 DNA 신호를 보였는데, 이는 자기-상보적인 올리고뉴클레오티드의 2중 구조가 적당히 합성되었음을 의미한다(도 1의 (c) 및 도 10)(17. Lee, S. K. *et al.* 2,6-Bis[4-(*p*-dihexylaminostyryl)styryl]anthracene Derivatives with Large Two-Photon Cross Sections. *Org. Lett.* **7**, 323-326 (2005)). allCG 이외의 모든 올리고뉴클레오티드의 CD 스펙트럼은 ABI-Nu이 존재하는 상태에서는 380 nm에서 큰 양의 CD 신호를 보였다. 나아가 더 많은 연속 AT 서열을 가진 DNA의 경우에 이 신호는 더욱 강하였다(그림 1c와 도 10).

[0113] 이광자 작용 단면적과 유효 이광자 작용 단면적

[0114] ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT의 TP 작용 단면적($\Phi\delta$)은 기준으로서 MeOH 중 로다민 6G를 이용하는 형광법에 의해 측정하였다(Makarov, N. S., Drobizhev, M. & Rebane, A. Two-photon absorption standards in the 550-600 nm excitation wavelength range. *Opt. Express.* **16**, 4029-4047 (2008); Haugland, R. P. *A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, ed. Molecular Probes, Eugene, OR, 10th ed. (2005)). 각각 allAT(ABI-Nu), 1,4-디옥산/ H_2O (32/1)(Pyr-CT)와 EtOH(BF-MT)를 함유한 인산 완충용액 중에서 측정하였다. 세포

내 환경을 위한 모델로서 이들 용매를 선정하였는데, 이는 ABI-Nu이 DNA에서 국재할 것이고 HeLa 세포 내 ABI-Nu의 최대 TPEF(473 nm), Pyr-CT의 최대 TPEF(561 nm)와 BF-MT의 최대 TPEF(560 nm)가 이들 용매에서 이들의 최대 발광(각각 472, 560과 550 nm)과 유사하였기 때문이다(표 1). ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT의 최대 TP 작용 단면적($\Phi \delta_{\max}$)은 각각 740 nm에서 12 GM, 750 nm에서 194 GM과 750 nm에서 13 GM이었다(도 10 및 표 1).

[0115] TP 휘도의 정량적 척도를 제공하기 위해서 프로브로 표지한 세포에 있는 각 세포소기관에서 TPEF 세기를 MeOH에서 로다민 6G의 TPEF 세기와 비교함으로써 유효 값($\Phi \delta_{\text{eff}}$)을 결정하였다. ABI-Nu, Pyr-CT-AM과 BF-MT의 $\Phi \delta_{\text{eff}}$ 값은 740 nm에서 각각 2230, 1555와 790 GM으로, 각 세포소기관 내 이들의 국소 농도가 각각 186, 8과 60 mM이었음을 의미한다(도 1의 (d)).

[0116] ABI-Nu와 Hoechst 33258의 TP 휘도를 비교하기 위해서 시판 프로브의 $\Phi \delta_{\max}$ 와 $\Phi \delta_{\text{eff}}$ 값을 측정하였다. 그 값은 740 nm에서 각각 10과 1625 GM이었는데, ABI-Nu에 대한 $\Phi \delta_{\max}$ 와 $\Phi \delta_{\text{eff}}$ 값이 Hoechst 33258에 대한 값들보다 더 크고 핵 내 Hoechst 33258의 국소 농도는 대략 160 mM이었음을 의미한다.

[0117] 광안정성, pH 의존성 및 세포독성

[0118] 프로브 표지 세포 내 편중 없이 선정한 3개의 서로 다른 위치에서 TPEF 세기를 모니터링하여 광안정성을 결정하였다. ABI-Nu와 Pyr-CT-AM은 1시간에 걸친 무시할 정도의 TPEF 세기 변화가 나타내는 바와 같이 높은 광안정성을 보인 반면에, BF-MT는 TPEF 세기의 상당한 감소에 의해 나타난 바와 같이 보통 정도의 광안정성을 보였다(도 12의 (d)-(f)). 그러나 영상화 중에 특정 지점에서 단 1개의 펄스가 조사되기 때문에, 이들 모든 프로브는 TPM 사진을 얻기에 충분한 광안정성을 갖고 있다.

[0119] pH 의존성은 pH 5.0-8.0의 PBS에서 ABI-Nu, Pyr-CT와 BF-MT의 형광 세기를 측정함으로써 평가하였다. 이 pH 범위에서 형광 세기는 단지 조금 변한바, 생체 관련 pH 범위에서 pH와 무관함을 의미한다(도 13).

[0120] 제조사의 프로토콜에 따라 CCK-8 키트(Cell Counting Kit-8, 도진도, Japan)를 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 이들 모든 프로브는 배양 조건에서 최소 세포독성을 보인다(도 14).

[0121] 이중 색 TPM 영상화에 의한 생세포 내 DNA와 세포질, DNA와 미토콘드리아의 동시 검출

[0122] 스캔 램다 모드의 750 nm TP 여기를 이용하면 ABI-Nu, Pyr-CT-AM과 BF-MT로 표지한 HeLa 세포는 각각 475, 560과 565 nm를 중심으로 하는 넓은 스펙트럼을 방출하였다(도 2의 (g)). ABI-Nu의 방출 스펙트럼은 BF-MT과 Pyr-CT의 방출 스펙트럼과 상당히 중첩되었기 때문에, 400-475(Ch1, ABI-Nu)와 600-700 nm(Ch2, Pyr-CT와 BF-MT)를 검출 윈도우로서 선정하였다(도 2의 (g)). 이 조건에서 Pyr-CT의 TPEF는 Ch1에서 전체 TPEF의 10%를 기여한 반면에 ABI-Nu의 TPEF는 Ch2에서 전체 TPEF의 12%를 기여하였다. 유사하게 BF-MT의 TPEF는 Ch1에서 전체 TPEF의 4%를 기여한 반면에, ABI-Nu의 TPEF는 Ch2에서 전체 TPEF의 8%를 기여하였다. 이들 결과는 ABI-Nu와 Pyr-CT의 TPEF 그리고 프로브 표지 세포 내 ABI-Nu와 Pyr-CT의 TPEF가 검출 윈도우로서 Ch1과 Ch2를 이용하면 상호 간섭이 최소화되어 이중 색 TPM 영상화에 의해 검출될 수 있음을 암시한다. 실제로 Pyr-CT와 Pyr-CT-AM으로 공동-표지한 HeLa 세포의 TPM 사진은 핵과 세포질을 분명하게 보여준 반면에(도 2 (a)-(c)), ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 것은 핵과 미토콘드리아를 보여주었다(도 2 (d)-(f)). 나아가 Ch1에서 TPEF 세기는 데옥시리보뉴클레아제(DNase)로 분해시 급격하게 감소하였고 리보뉴클레아제(RNase)로 처리시에는 거의 동일하게 남아있었다(도 2 (h), (i)). 이러한 결과를 통해 RNA에 비해 DNA에 대한 ABI-Nu의 높은 선택성을 확인할 수 있었다.

[0123] BF-MT는 미토콘드리아에 국재한다는 것을 분명하게 확인하기 위해서 각각 450-600 nm(BF-MT)와 650-700 nm(MTR)에서 검출 윈도우를 이용하여 BF-MT와 미토콘드리아용인 시판 중인 일광자(OP) 형광 프로브인 MitoTracker Red FM(MTR)(Rumi, M. *et al.* Tetrastyrilarene Derivatives: Comparison of One- and Two-Photon Spectroscopic Properties with Distyrylarene Analogues. *J. Phys. Chem. C.* **112**, 8061-8071 (2008))로 공동-표지한 HeLa 세포를 이용한 공동-영역화 실험을 수행하였다(도 15). TPM 이미지는 미토콘드리아의 일광자 현미경(OPM) 이미지와 잘 일치하였다. BF-MT와 MitoTracker Red FM의 서로 다른 채널(Emmerson, K. & Roehrig, K. Epidermal growth factor (EGF) stimulation of ATP citrate lyase activity in isolated rat hepatocytes is age dependent, *Comp. Biochem. Physiol., B: Biochem. Mol. Biol.*, **103**, 663-667 (1992))의 세기 분포 간 상관관계를 기술하는 Pearsons 공동-영역화 계수(A)는 0.85로서, BF-MT가 미토콘드리아에 대부분

존재하였음을 의미한다(도 3의 (a)-(c)).

[0124] 세포와 조직의 무결성에 대한 배양시간 효과

[0125] 세포와 조직은 장시간 배양 후에 변형될 수 있기 때문에 변형이 시작되기 전에 세포와 조직에서 N-면적, N/C 비와 N/M 비를 측정할 수 있는 최적의 배양시간을 결정할 필요가 있었다. 이를 위해, 20-80분간 배양 후에 ABI-Nu와 Pyr-CT 또는 ABI-Nu와 BF-MT로 공표지한 HeLa 세포와 정상 결장 조직의 TPM 이미지를 얻었다. 소정의 시료 내 핵, 세포질과 미토콘드리아의 전체 면적은 60분 동안 거의 동일하게 유지되었는데(도 16), 이는 60분간 배양하는 동안 세포와 조직이 손상되지 않았음을 의미한다.

[0126] 인간 결장 조직에서 N-면적, N/C 비와 N/M 비의 측정

[0127] ABI-Nu와 Pyr-CT-AM으로 공동-표지한 정상 조직의 TPM 이미지는 z-방향을 따라 90-150 μm 깊이의 150개 단면의 Ch1(ABI-Nu)과 Ch2(Pyr-CT-AM)에서 TPEF를 취합하여 얻었다. 단면 이미지를 쌓은 다음(도 4의 (a), (b)) 합쳐 합성이미지를 얻음으로써(도 4의 (c)) 핵과 세포질의 3차원(3-D) 이미지를 얻었다. ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 정상 조직의 3-D 사진도 유사한 방법에 의해 얻었다(도 17).

[0128] 또한, 동일한 병소인 정상 결장 점막, 이형성증 정도가 낮은 선종과 중간 정도로 분화된 선암 조직으로부터 2개의 조직 박편을 이용하여 N-면적, N/C 비와 N/M 비를 측정하였다(도 5의 (a)-(c), (j)-(l)). ABI-Nu와 Pyr-CT-AM로 공동-표지한 조직의 3-D 사진(환자 1)은 핵과 세포질의 분포를 보여주고 있는 반면에(도 5의 (d)-(f)), ABI-Nu와 BF-MT로 공동-표지한 것(환자 2)은 핵과 미토콘드리아를 보여주고 있다(도 5의 (m)-(o)). N-면적, N/C 비와 N/M 비를 결정하기 위해서 z-방향을 따라 90-150 μm 깊이의 150개 단면 각각에 대해 4개의 TPM 이미지를 얻어 조직 박편 하나 당 600개의 TPM 이미지를 얻었다(도 4의 (c), (d)).

[0129] 120 μm 깊이에서 얻은 TPM 단면 이미지는 크기가 작아지는 순으로 분류한 형광 면적의 분포를 보여주고 있다(도 18-20). 핵 면적은 중앙의 단면에서 최대이어야 하기 때문에 1200개의 TPM 단면 이미지(600개의 이미지 $\times$ 2개의 생체의 박편)에서 형광 면적 중 상위 5%를 선정하고 평균값을 계산하여 N-면적을 얻었다. 정상 조직에서 선종과 선암 조직으로 순차적으로 변함에 따라 환자 1의 경우에 N-면적은 31 ± 2 에서 41 ± 3 과 $58 \pm 4 \text{ mm}^2$ 으로 순차적으로 증가한 반면에 환자 2의 경우에 N-면적은 29 ± 3 에서 44 ± 4 와 $63 \pm 5 \text{ mm}^2$ 으로 순차적으로 증가하였다(도 6).

[0130] 이 단면 이미지들은 또한 인접 세포에 속한 핵, 세포질과 미토콘드리아의 일부를 보여주었다(도 18-20). 각각의 핵 부분은 핵을 둘러싸고 있는 세포질과 미토콘드리아를 동반하여야 하므로 소정의 단면에서 N/C 비와 N/M 비는 핵의 전체 형광 면적을 세포질과 미토콘드리아의 전체 형광 면적으로 나누어 줌으로써 계산하였다. 평균 N/C 비와 M/N 비는 1200개의 TPM 단면 사진으로부터 계산하였다. N/C 비는 조직이 점차 비정상적으로 변함에 따라 0.46 ± 0.09 에서 0.69 ± 0.10 과 0.87 ± 0.08 으로 순차적으로 증가한 반면에, M/N 비는 0.48 ± 0.08 에서 0.63 ± 0.09 와 0.80 ± 0.08 으로 순차적으로 증가하였다(도 6).

[0131] 결론

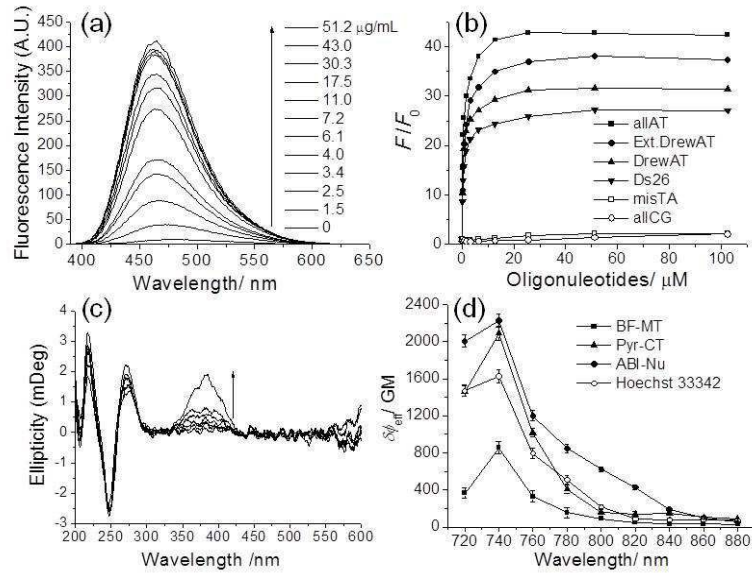
[0132] 종합하면, 본 발명에서는 핵(ABI-Nu), 세포질(Pyr-CT-AM) 및 미토콘드리아(BF-MT)에 대한 새로운 TP 프로브들을 제공하며, 이러한 프로브들은 DNA, 세포질 및 미토콘드리아 대하여 높은 선택성을 보이며, 현저한 TP 활성 단면을 나타내며, 세포 및 조직 내부로 용이하게 로딩이 가능할 뿐만 아니라, 세포 내에서 강한 TPEF를 발산하여, 세포독성 및 pH로부터 최소한의 간섭을 받으며 TPM을 사용하여 장시간 동안 살아있는 세포들 및 조직들 내의 핵, 세포질 및 미토콘드리아를 가시화할 수 있다. 또한, ABI-Nu와 Pyr-CT-AM 및 ABI-Nu와 BF-MT가 이중-색 TPM 영상에 의해서 생 세포 내부 깊은 곳의 핵과 세포질 또는 핵과 미토콘드리아를 동시에 가시화하는데 적용될 수 있다. 상기 결과들은 두 가지 쌍의 TP 프로브들, 즉 ABI-Nu와 Pyr-CT-AM 및 ABI-Nu와 BF-MT가 세포기관들 내에서 세포기관들의 모니터링 및 공동-영역화 실험들에 유용하게 사용될 수 있다는 점을 암시한다.

[0133] 또한, 본 발명에 따른 상기 프로브들을 이용하여 인간 결장 조직 내 평균 핵 면적(N-면적)과 핵 대 세포질(N/C) 비와 핵 대 미토콘드리아(N/M) 비를 생검 후 약 2주 내 이중 색 이광자 현미경 영상화에 의해 정량적으로 평가할 수 있었다. 그 결과 N-면적, N/C비와 N/M 비는 정상 결장 점막<결장 선종<결장 선암 순으로 증가하였다. 나

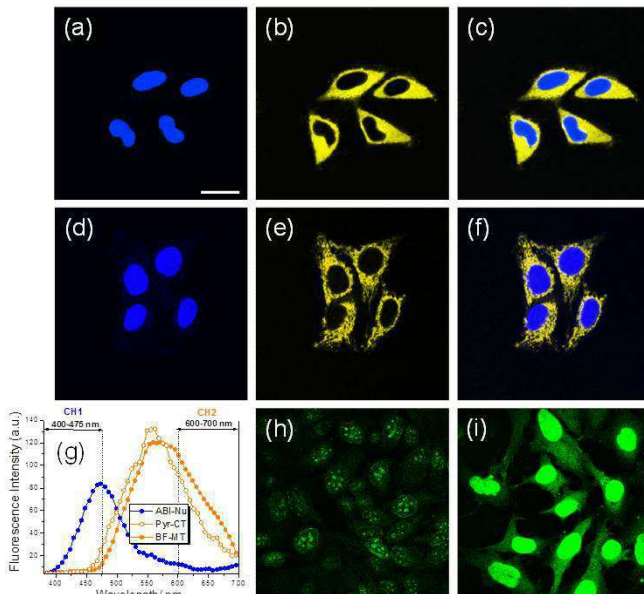
아가 이들 조직의 N-면적은 실험 오차 범위를 크게 벗어난 유의적인 차를 나타냈는데, 이는 N-면적의 진단 잠재력을 보여주는 것이다. 따라서, 본 발명에 따른 프로브를 결장암을 비롯한 암 진단에 활용한다면, H&E 염료로 염색한 파라핀 처리 생검 시료의 외관 검사를 이용하는 종래의 병리학적 진단보다 훨씬 빠르고 신뢰성이 더 높은 결과를 얻을 수 있음을 알 수 있다.

도면

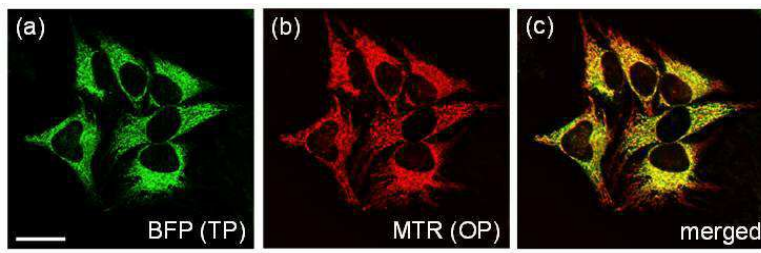
도면1



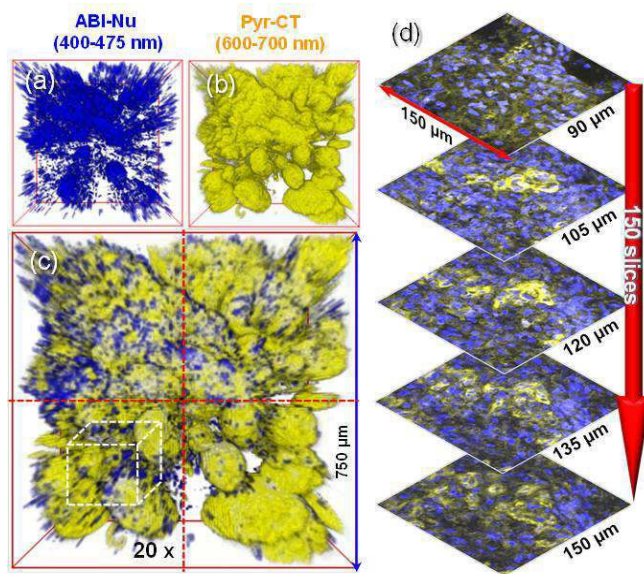
도면2



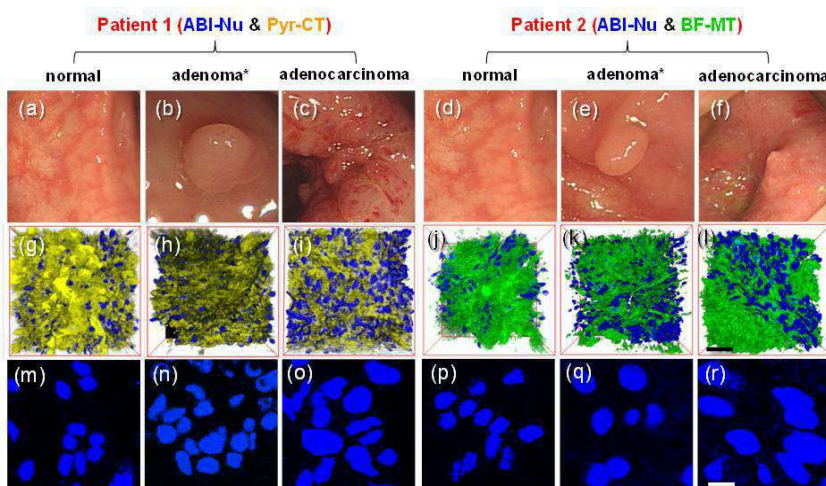
도면3



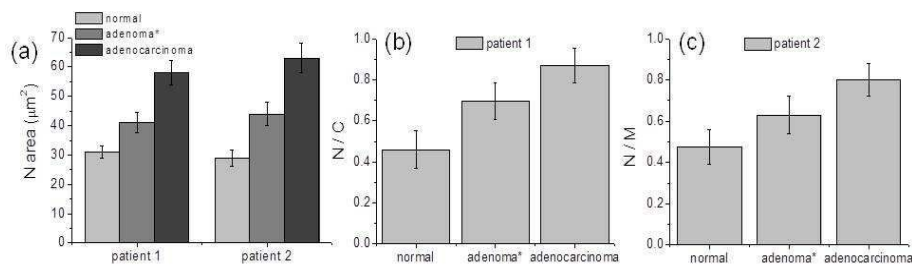
도면4



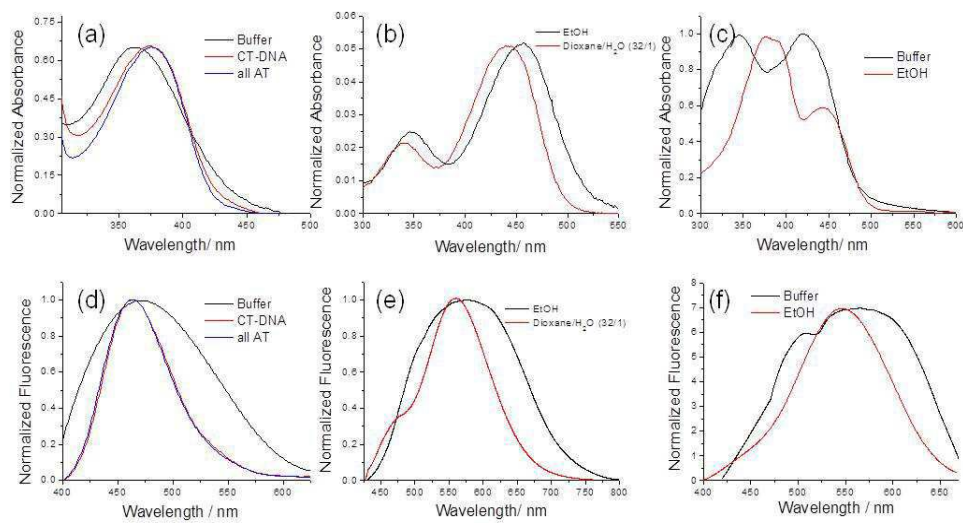
도면5



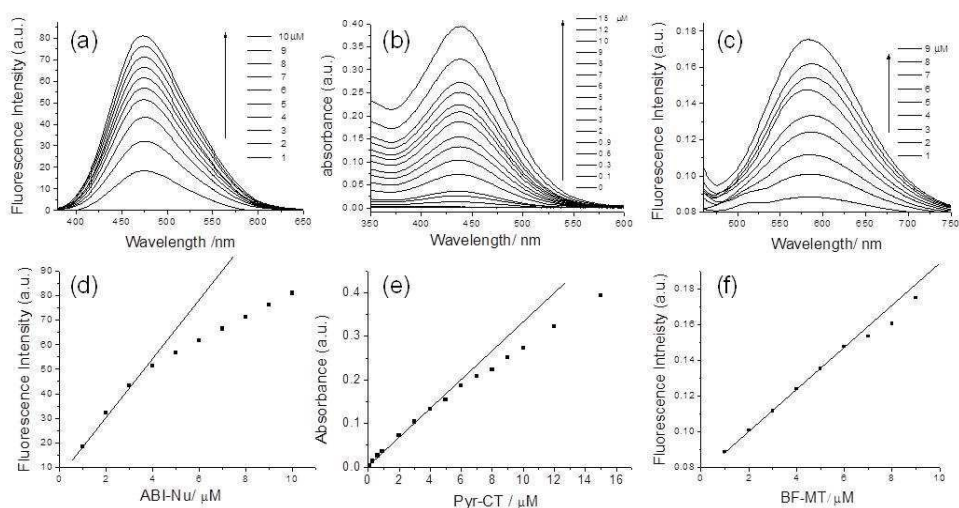
도면6



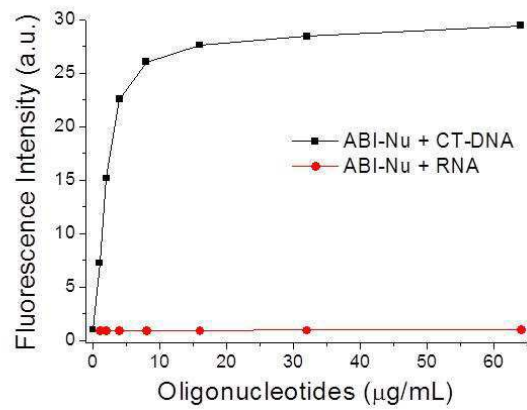
도면7



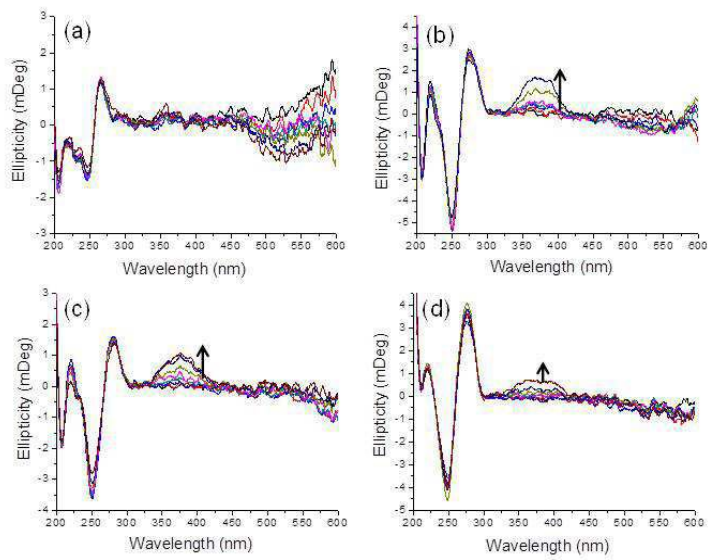
도면8



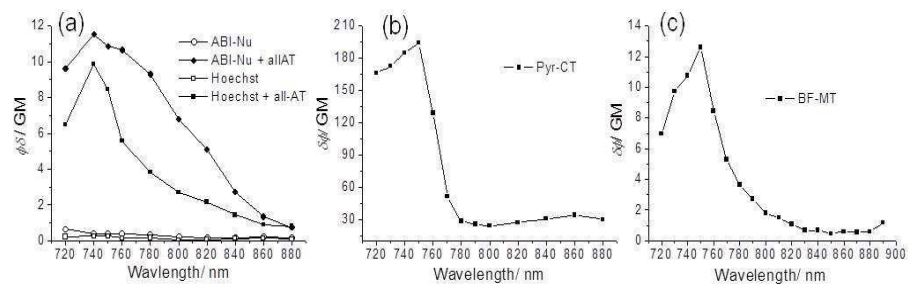
도면9



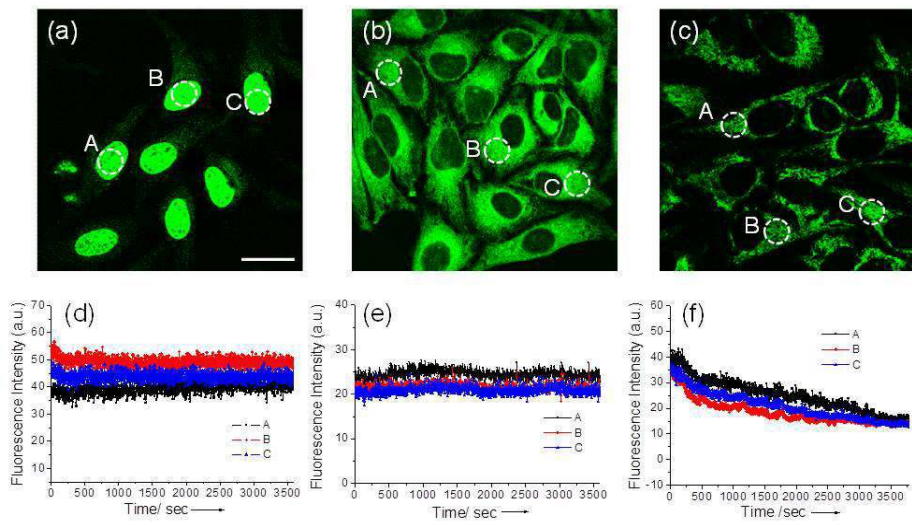
도면10



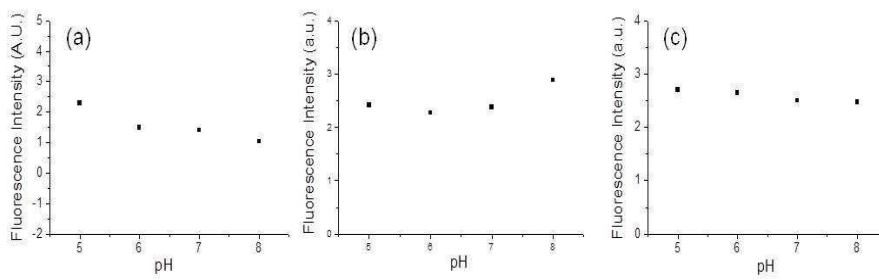
도면11



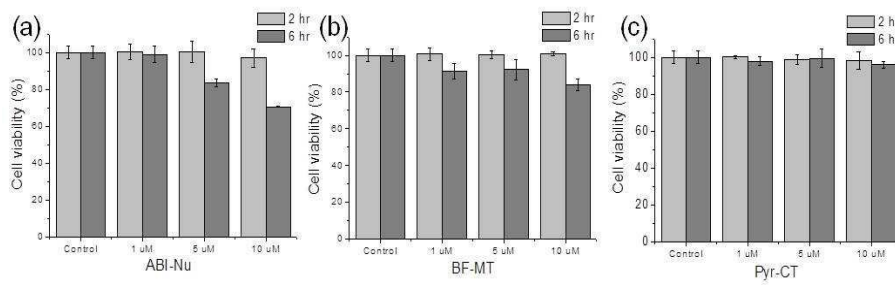
도면12



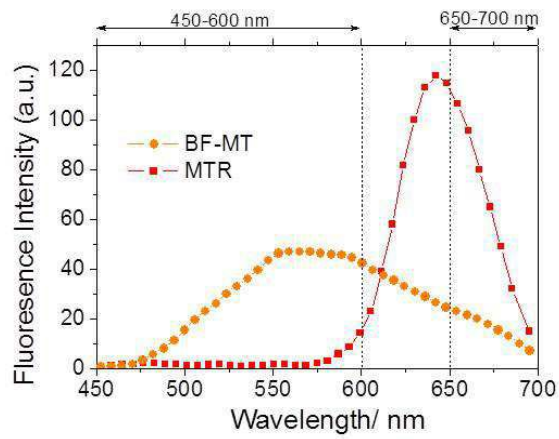
도면13



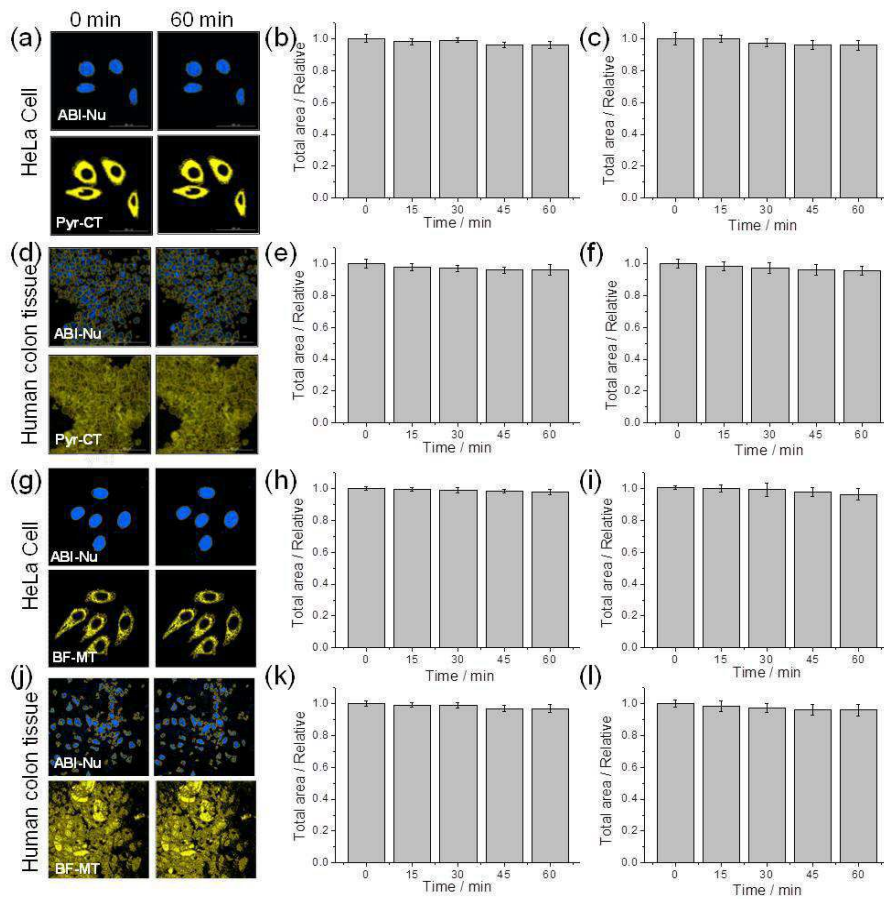
도면14



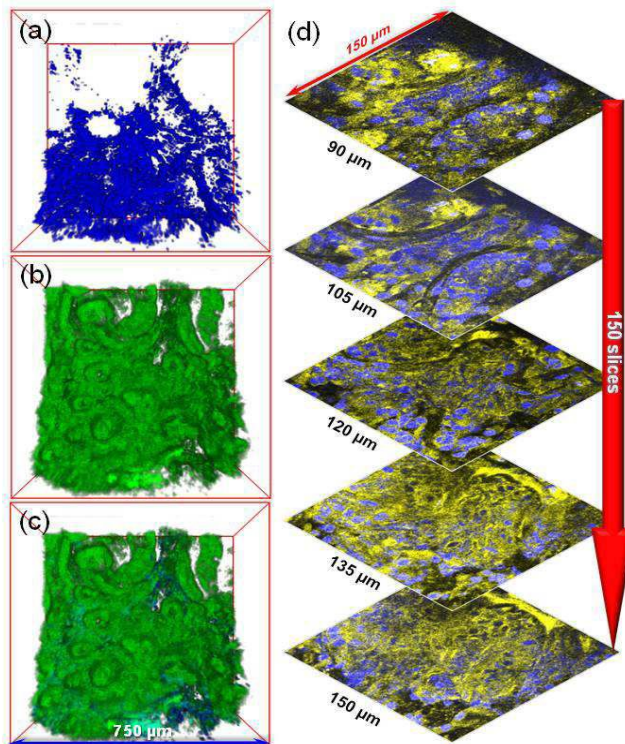
도면15



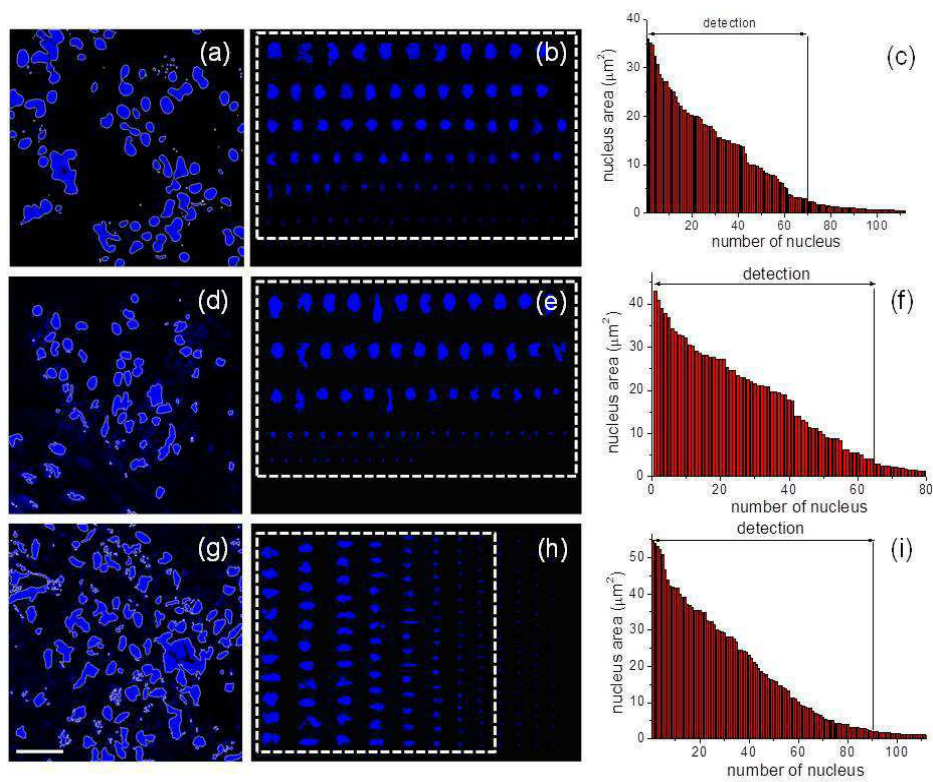
도면16



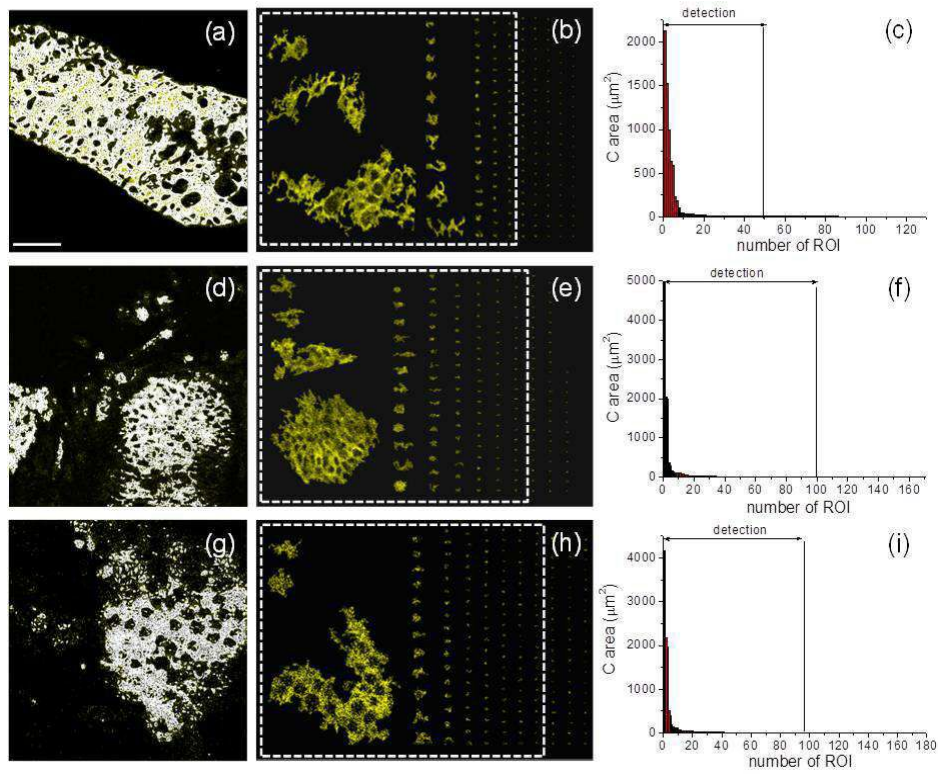
도면17



도면18



도면19



도면20

