

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2020.6.2.177>

# Synthesis of a squaric acid-derived molecular probe for near-infrared fluorescence and photoacoustic imaging

Jung Eun Park<sup>1</sup>, Yong Dae Park<sup>2</sup>, and Jongho Jeon<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Chemistry, School of Applied Chemical Engineering, Kyungpook National University, Daegu 41566, Korea

<sup>2</sup>Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongseup 56212, Korea

## ABSTRACT

Dual-modality imaging strategy using near-infrared fluorescence (FLI) and photoacoustic imaging (PAI) demands a suitable probe to enable dual-modular signal production. Herein, we demonstrate a synthetic protocol of small molecular dye for dual-modular FLI and PAI. A condensation reaction between squaric acid and carboxypentyl benzoindolium, and followed by basic hydrolysis to give the benzoindole derived squaraine (BSQ) dye in 49% yield. Next, the carboxylic acid group of BSQ was further functionalized with *N*-hydroxysuccinimide or azide group for an efficient conjugation with a targeting biomolecule. BSQ showed a maximum fluorescent emission at around 680 nm and the photoacoustic signal reached a maximum intensity at 680–700 nm. Based on these results, we conclude that BSQ analogs will be useful probes for dual-modular (FLI/PAI) imaging studies in animal models.

**Key Word:** Fluorescence imaging, Photoacoustic imaging, Squaraine dye, Bioconjugation

## Introduction

근적외선(near-infrared, NIR) 파장(650–900 nm) 영역에서 광학 영상은 암의 시각화 및 모니터링에 있어 널리 활용되고 있는 영상 기법으로서 바이오 의학 연구와 임상 연구에 널리 활용되어 왔다(1). 특히, NIR 영역에서의 형광 영상(fluorescence imaging, FLI)은 저렴한 비용과 짧은 시간에 영상 결과를 얻을 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 전임상 및 임상 연구에서 종양을 식별하기 위한 다양한 연구 결과가 발표되고 있다(2). 그러나 FLI는 형광 신호의 침투 깊이(penetration depth)가 제한되어 대상 물체의 피상적인 영역에서 영상만 가능하며, 영상의 분해능이 낮다는 한계를 가진다(3). 광음파 영상(photoacoustic imaging, PAI)은 또 다른 유용한 영상 기법으로 활용되고 있으며, PA 효과에 기반

한 상대적으로 우수한 해상도와 높은 광학 영상 대비를 결합하여 FLI의 한계를 극복하는 데 활용될 수 있다(4). 즉, 영상 신호의 감도가 높은 FLI와, 상당한 깊이에서 높은 분해능을 가지는 PAI(5)를 결합하면 생체 영상 연구에서 표적 분자와 조직의 생체 의학 영상에 유용하게 활용 될 수 있을 것으로 기대된다. 현재까지 다양한 기능성 나노 물질(6–8)을 이용한 FLI-PAI 이중-모듈러 영상 프로브가 개발되어 있으며, 표적 분자와 결합되어 *in vitro* 및 *in vivo* 연구에 사용되었다. 소분자 기반 조영제로 FDA에서 승인된 유기 형광염료인 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)을 예로 들 수 있다. ICG는 NIR 영역의 형광과 광음파(PA) 신호를 모두 방출하는 성질을 보이기 때문에, 암 세포 영상에 활용되고 있다(9). 그러나 기능화 및 표적 화학의 어려움, 높은 비용, 광학적 불안정성 등과 같은 문제점을 가지고 있다(10). 따라서 이상적

Received: December 15, 2020 / Revised: December 24, 2020 / Accepted: December 29, 2020

**Corresponding Author :** Jongho Jeon, E-mail: jeonj@knu.ac.kr

Copyright©2020 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

인 NIR FLI와 PAI 조영제는 우수한 NIR 형광 방출과 동시에 높은 흡수 계수를 가지고 있어야 하며, 또한 생물학적 조건 하에 적합한 광안정성 및 낮은 세포독성을 가져야 한다(11).

유망한 기능성 유기 NIR 염료인 squaraine(SQ)은 생체 영상(12), 염료감응형 태양전지(dye-sensitized solar cells, DSSC)(13), 광역학 치료(photodynamic therapy)(14) 등 다양한 용도에의 활용가능성을 입증했다. 또한 SQ는 쉽게 설계하고 합성할 수 있는 형광 소분자로 활용 될 수 있으며, 또한 광안정성, 높은 효율성, 비교적 저렴한 가격 등의 장점을 가지고 있으므로 본 연구에서는 PAI와 NIR 이중-모듈러 영상 프로브 합성을 위한 물질로 SQ를 선택하였다. 본 논문에서는 SQ 기반 영상 프로브인 benzoindeole derived SQ (BSQ)를 합성하는 프로토콜을 소개하고자 한다(Scheme 1).

## Materials

실험에 사용된 모든 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구매하였고, 추가적인 정제과정을 거치지 않고 사용하였다.  $^1\text{H}$  및  $^{13}\text{C}$ -NMR 스펙트럼은 JNM-ECA 500 spectrometer (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 고해상도 질량 스펙트럼(High-resolution mass spectra, HRMS)는 경상대학교

(Jinju, Korea)의 JMS-700 (JEOL, Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 컬럼 크로마토그래피를 위해 고정상(Silica-gel 60, 70-230 mesh)을 사용하였고, 반응 모니터링을 위한 TLC plate는 Merck (Hohenbrum, Germany)에서 구입하였다.

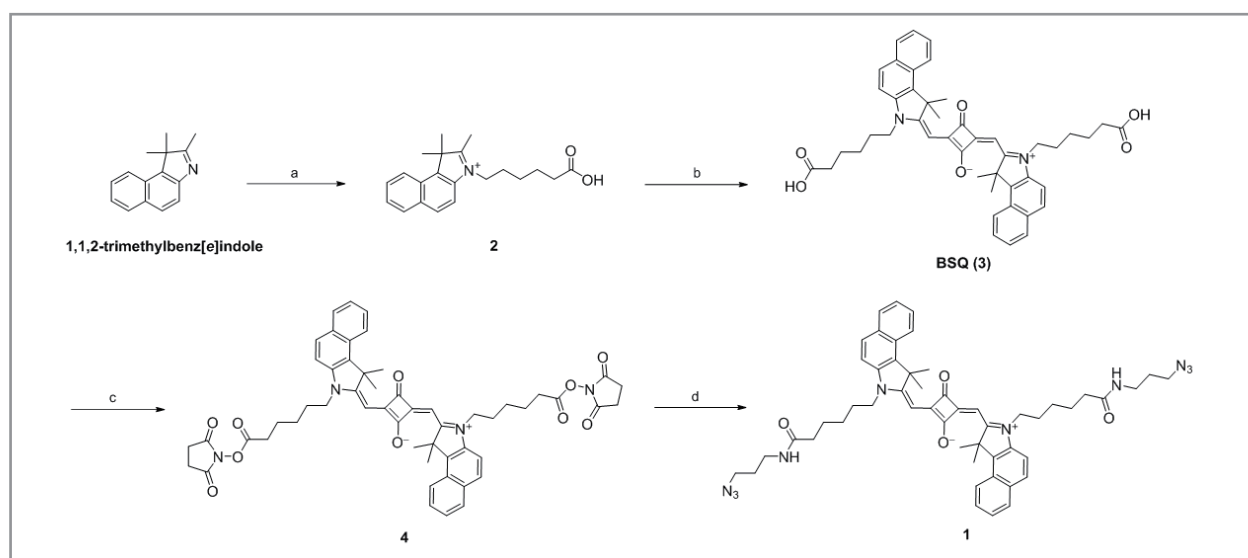
## Protocol

### 1. 3-(5-Carboxypentyl)-1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indolium bromide (2)의 합성

- 1.1) 1,1,2-Trimethylbenzo[e]indole (1.0 g, 4.7 mmol)과 6-bromohexanoic acid (1.4 g, 7.0 mmol)을 MeCN (100 mL)에 용해한 후, 질소가스 하에서 48시간 동안 환류한다.
- 1.2) 반응 종료 후 용매를 증발시키고, 0 °C에서 Et<sub>2</sub>O (30 mL)를 첨가하여 결과물을 침전시킨다.
- 1.3) Glass filter를 활용하여 거른 후 남은 침전물을 Et<sub>2</sub>O 로 세척한다. 그 결과 화합물 2 (1.5 g, 79%)를 얻는다.

### 2. BSQ (3)의 합성

- 2.1) 3-(5-Carboxypentyl)-1,1,2-trimethyl-1H-benzo[e]indolium bromide 2 (0.7 g, 1.74 mmol)



**Scheme 1.** Synthesis of the azide group bearing BSQ (1) from 1,1,2-trimethylbenzo[e]indole. Reagents and condition. (a) 6-bromohexanoic acid, MeCN, reflux, 48 h, 79%; (b) (i) squaric acid, *n*-BuOH/toluene, reflux, 12 h, (ii) 2 M NaOH, MeOH, 50 °C, 6 h, 49% (over 2 steps); (c) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide, N-hydroxysuccinimide, DMF, rt, 12 h, 87%; (d) 3-azido-1-propanamine, DMF, rt, 12 h, 89%.

와 squaric acid (0.1 g, 0.87 mmol)를 *n*-butanol (15 mL)과 toluene (30 mL)에 용해한 후 Dean-Stark 장비가 장착된 둥근바닥 플라스크에서 환류한다. 반응 중 생성된 물은 Dean-Stark 장비를 이용하여 제거한다.

- 2.2) 12시간 후 진한 녹색의 반응 혼합물을 감압 하에서 농축하고, 얻어진 잔여물은 실리카 크로마토그래피(이동상: CHCl<sub>3</sub> 100%에서 5% MeOH in CHCl<sub>3</sub>)에 의해 정제한다. 그 결과 *n*-butyl 기로 보호된 중간체를 얻는다.
- 2.3) *n*-Butyl 기를 제거하기 위해 중간체를 methanol (50 mL)에 용해하고, 2 M NaOH (5 mL) 수용액을 가한 후 50 °C에서 6시간 가열한다. 그 후 2 M HCl 수용액으로 중화하고, 용매를 증발시킨다.
- 2.4) 실리카 크로마토그래피(이동상: EtOAc 100%에서 10% MeOH in EtOAc)를 활용하여 정제한다. 그 결과 squaraine dye 3 (BSQ) (620 mg, 49%)을 얻는다.

### 3. BSQ NHS ester (4)의 합성

- 3.1) 화합물 3 (50 mg, 0.069 mmol)을 질소가스 하에서 DMF (5 mL)에 용해한다.
- 3.2) *N*-Hydroxysuccinimide (32 mg, 0.28 mmol)와 *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N*-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC, 75 mg, 0.4 mmol)를 가하고, 상온에서 12시간 동안 반응한다.
- 3.3) 반응 혼합물을 감압 하에서 용매를 제거하고, 얻어진 잔여물은 실리카 크로마토그래피(이동상: CHCl<sub>3</sub> 100%에서 5% MeOH in CHCl<sub>3</sub>)로 정제한다. 그 결과 화합물 4 (55 mg, 87%)을 얻는다.

### 4. BSQ-azide (1)의 합성

- 4.1) 화합물 4 (100 mg, 0.1 mmol)를 질소가스 하에서 DMF (5 mL)에 용해한다.
- 4.2) 3-Azido-1-propanamine (30 μL, 0.3 mmol)를 가하고, 상온에서 12시간 동안 반응한다.
- 4.3) 반응 혼합물을 감압 하에서 용매를 제거하고, 얻어진 잔여물은 실리카 크로마토그래피(이동상: CHCl<sub>3</sub> 100%에서 10% MeOH in CHCl<sub>3</sub>)로 정제한다. 그 결과 화합물 1 (86 mg, 89%)을 얻는다.

## Representative Results

### 1. BSQ (3)의 합성

합성된 BSQ (3)의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 질량 분석을 통해 확인할 수 있었다 (합성 수율: 49%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 1.38–1.43 (*m*, 4H), 1.51–1.56 (*m*, 4H), 1.73–1.76 (*m*, 4H), 1.92 (*s*, 12H), 2.18 (*t*, 4H, *J* = 7.6 Hz), 2.46 (*t*, 4H, *J* = 6.9 Hz), 5.84 (*s*, 2H), 7.42 (*t*, 2H, *J* = 7.6 Hz), 7.59 (*t*, 2H, *J* = 7.4 Hz), 7.66 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.98 (*d*, 4H, *J* = 9.2 Hz), 8.2 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 24.7, 26.3, 26.7, 27.1, 34.0, 43.5, 51.0, 86.4, 111.8, 122.7, 124.7, 127.9, 128.4, 130.3, 131.4, 133.6, 140.3, 170.8, 174.9, 177.8. HRMS (FAB): [M<sup>+</sup>] Calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (M<sup>+</sup>): 724.3512, found: 724.3514.

### 2. BSQ NHS ester (4)의 합성

합성된 BSQ NHS ester (4)의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 을 통해 확인할 수 있었다 (합성 수율: 87%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 1.61–1.64 (*m*, 8H), 1.84–1.92 (*m*, 8H), 2.06 (*s*, 12H), 2.64 (*t*, 4H, *J* = 6.9 Hz), 2.85 (*s*, 8H), 5.98 (*s*, 2H), 7.29 (*d*, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.41 (*t*, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.56 (*t*, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.86 (*d*, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.89 (*d*, 2H, *J* = 7.6 Hz), 8.18 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 24.4, 25.7, 25.9, 26.7, 26.9, 30.7, 43.6, 51.3, 86.4, 110.2, 122.7, 124.4, 127.4, 128.8, 128.9, 129.8, 131.3, 134.3, 139.6, 168.5, 169.3, 171.4, 178.4.

### 3. BSQ-azide (1)의 합성

합성된 BSQ-azide (1)의 구조는 <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR 및 질량 분석을 통해 확인할 수 있었다 (합성 수율: 89%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 1.58–1.61 (*m*, 8H), 1.90–1.95 (*m*, 12H), 2.07 (*s*, 12H), 2.34 (*t*, 4H, *J* = 7.6 Hz), 3.43–3.46 (*m*, 8H), 5.97 (*s*, 2H), 7.29 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz), 7.43 (*t*, 2H, *J* = 7.5 Hz), 7.59 (*t*, 2H, *J* = 6.9 Hz), 7.88 (*d*, 2H, *J* = 9.2 Hz), 7.90 (*d*, 2H, *J* = 7.6 Hz), 8.18 (*d*, 2H, *J* = 8.4 Hz); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, δ, ppm): 24.8, 25.6, 26.7, 29.3, 36.3, 37.2,

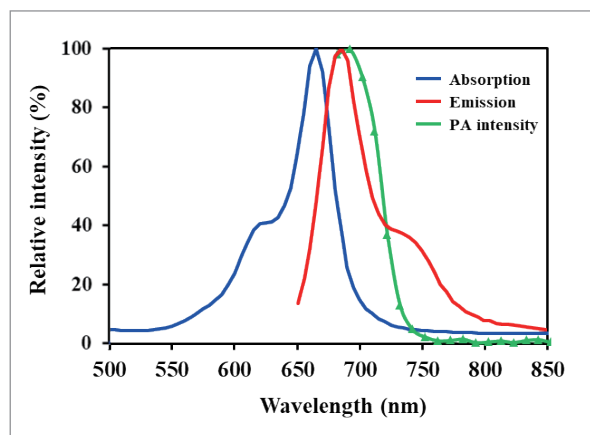
38.8, 42.9, 49.7, 51.3, 85.9, 110.1, 122.5, 124.6, 127.6, 128.7, 129.9, 130.0, 131.4, 134.3, 139.4, 171.7, 173.3, 176.7. HRMS (FAB):  $[M^+]$  Calcd. for  $C_{52}H_{60}N_{10}O_4$  ( $M^+$ ): 888.4799, found: 888.4796.

#### 4. BSQ (3)의 광학적 특성

pH 7.4의 PBS 완충용액에 용해된 프로브의 광학적 특성을 측정하였다. BSQ (3)은 665 nm와 680 nm에서 최대 흡수 및 방출을 보였다(Figure 1). PA 신호는 BSQ (3)를 agarose phantom에 주입하여, 680에서 800 nm의 여기 파장 범위에서 10 nm 간격으로 측정하였으며 680–700 nm 범위에서 가장 높은 신호 세기를 나타낸다.

## Discussion

PAI는 생체 내 표적 세포의 비침습적 영상화를 위한 여러 장점을 가진 기법이다(5). 구체적으로, 신호를 특정 조직을 대상으로 할 수 있어 배경 조직의 간섭을 최소화 할 수 있다. 더욱이 초음파 영상과 유사한 공간 해상도로, 실시간으로 저렴하고 정량적인 영상을 제공할 수 있으며 이온화 방사선이 필요하지 않다. PAI의 장점을 충분히 활용하기 위해 소분자와 나노 입자를 포함한 다양한 조영제가 개발되었다. 그



**Figure 1.** Photophysical properties and multispectral PAI of BSQ (3). Absorption (blue) and emission (red) spectra (excitation at 620 nm) of BSQ in PBS (1  $\mu$ M). Multispectral PA intensity (green) of BSQ in PBS at pH 7.4 loaded into the agarose phantom.

러나 생체 내 표적 세포에서 PAI의 임상 적용은 여전히 제한적이며, 이런 이유 중 하나는 생체 영상에 적합한 물성을 가지는 프로브가 부족하기 때문이다. 본 연구에서는 SQ 기반 소분자 프로브인 BSQ (3)을 성공적으로 합성하였으며, 생체 내 영상 연구를 위하여 BSQ의 광학적 특성을 조사하였다. 이중-모듈러 분자 영상이 중증질환 진단의 핵심 기술로 활용될 수 있음을 고려할 때(15), 본 연구를 통해 합성된 프로브는 향후 분자 영상연구에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대된다(16).

## Conclusion

본 프로토콜에서는 PA와 NIR 이중-모듈러 영상을 위한 영상제로서 SQ 기반 프로브를 합성을 기술하였다. 개발된 프로브인 BSQ-azide가 알카인(alkyne)기를 포함하는 다른 표적 분자와 결합될 수 있다는 점을 고려할 때, 매우 효율적인 생체 의학 응용을 위한 이중-모듈러 영상 프로브로서 뛰어난 잠재력을 가지고 있다. 이러한 접근 방식은 다른 종류의 기능성 영상 프로브의 개발에 중요한 정보를 제공할 수 있으며, 향후 다양한 질병의 진단 연구에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## Acknowledgments

본 연구는 한국연구재단 과학기술분야기초연구사업 기본연구 (Grant number: 2019R1F1A1061596)의 지원으로 진행하였습니다.

## References

- Hong G, Antaris AL, Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging. *Nat Biomed Eng* 2017;1:0010.
- Nguyen QT, Tsien RY. Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation—a new cutting edge. *Nat Rev Cancer* 2013;13:653–662.
- de la Zerda A, Bodapati S, Teed R, May SY, Tabakman SM, Liu Z, Khuri-Yakub BT, Chen X, Dai H, Gambhir SS. Family of enhanced photoacoustic imaging agents for high sensitivity and multiplexing studies in living mice. *ACS Nano* 2012;6:4694–4701.
- Yao J, Wang LV. Recent Progress in Photoacoustic Molecular Imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2018;45:104–112.
- Weber J, Beard PC, Bohndiek SE. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. *Nat Methods* 2016;13:639–650.
- Sheng Z, Song L, Zheng J, Hu D, He M, Zheng M, Gao G, Gong P, Zhang P, Ma Y, Cai L. Protein-assisted fabrication of nano-reduced graphene oxide for combined in vivo photoacoustic imaging and photothermal therapy. *Biomaterials* 2013;34:5236–5243.
- Ku G, Zhou M, Song S, Huang Q, Hazle J, Li C. Copper sulfide nanoparticles as a new class of photoacoustic contrast agent for deep tissue imaging at 1064 nm. *ACS Nano* 2012;6:7489–7496.
- Guo B, Feng Z, Hu D., Xu S, Middha E, Pan Y, Liu C, Zheng H, Qian J, Sheng Z, Liu B. Precise Deciphering of Brain Vasculatures and Microscopic Tumors with Dual NIR-II Fluorescence and Photoacoustic Imaging. *Adv Mater* 2019;31:902504.
- Yu G, Jung H, Mok H. Indocyanine green incorporated exosomes for improved in vivo imaging of sentinel lymph node. *Appl Biol Chem* 2016;59:71–76.
- Landsman ML, Kwant G, Mook GA, Zijlstra WG. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. *J Appl Physiol* 1976;40:575–583.
- Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C. A review of NIR dyes in cancer targeting and imaging. *Biomaterials* 2011;32:7127–7138.
- Karpenko IA, Collot M, Richert L, Valencia C, Villa P, Mely Y, Hibert M, Bonnet D, Klymchenko AS. Fluorogenic squaraine dimers with polarity-sensitive folding as bright far-red probes for background-free bioimaging. *J Am Chem Soc* 2015;137:405–412.
- Paek S, Choi H, Kim C, Cho N, So S, Song K, Nazeeruddin MK, Ko J. Efficient and stable panchromatic squaraine dyes for dye-sensitized solar cells. *Chem Commun (Cambridge, U. K.)* 2011;47:2874–2876.
- Yao D, Wang Y, Zou R, Bian K, Liu P, Shen S, Yang W, Zhang B, Wang D. Molecular Engineered Squaraine Nanoprobe for NIR-II/Photoacoustic Imaging and Photothermal Therapy of Metastatic Breast Cancer. *ACS Appl Mater Interfaces* 2020;12:4276–4284.
- Wang Y, Chen J, Yang B, Qiao H, Gao L, Su T, Ma S, Zhang X, Li X, Liu G, Cao J, Chen X, Chen Y, Cao F. In vivo MR and Fluorescence Dual-modality Imaging of Atherosclerosis Characteristics in Mice Using Profilin-1 Targeted Magnetic Nanoparticles. *Theranostics* 2016;6:272–286.
- Park YD, Park J-E, Kim HS, Choi S-H, Park JE, Jeon J, Park S-H. Development of a Squaraine-Based Molecular Probe for Dual-Modal in Vivo Fluorescence and Photoacoustic Imaging. *Bioconjugate Chem* 2020;31:2607–2617.