(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0087165
(43) 공개일자 2012년08월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61F 2/02 (2006.01) *G01N 33/574* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-7014490
(22) 출원일자(국제) 2010년11월05일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2012년06월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2010/055729
(87) 국제공개번호 WO 2011/057146
국제공개일자 2011년05월12일
(30) 우선권주장
61/259,011 2009년11월06일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
사이언티픽 나노메디슨, 아이엔씨.
미국, 뉴멕시코 87111, 엘버커키, 11109 컨트리 클럽 디알. 엔이
(72) 발명자
플린, 에드워드, 알.
미국, 뉴멕시코 87111, 엘버커키, 엔이, 11109 컨트리 클럽 디이
(74) 대리인
허용록

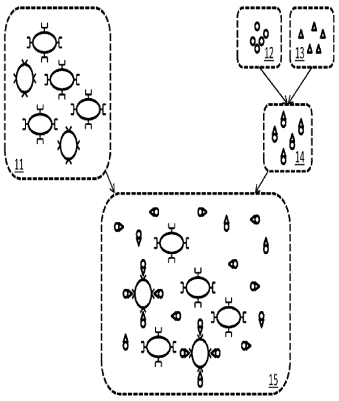
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 **표적화된 나노입자 및 그것의 자기 특성을 사용하는 암 및 다른 생물학적 물질과 같은 세포의 검출, 측정 및 이미징**

(57) 요 약

본 발명은 표적화된 자기 나노입자 및 특수 자기 시스템을 사용하여, 대상체의 생체내에서 심지어 매우 낮은 농도로 존재하는 세포 또는 물질을 검출하고, 측정하거나 위치결정하기 위한 방법 및 장치를 제공한다. 자기 시스템은 예로서 SQUID 센서 및 원자 자력계를 포함하는 자기 서브시스템 및 센서 서브시스템을 포함할 수 있다. 자기 시스템은 소정의 종류의 세포 또는 물질에 항체에 의해 결합된 입자를 검출하고, 측정하거나 위치결정할 수 있다. 예시적 자기 시스템은 이 나노입자의 서브나노그램 양을 검출할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(30) 우선권주장
61/308,897 2010년02월27일 미국(US)
61/310,700 2010년03월04일 미국(US)
61/314,392 2010년03월16일 미국(US)
61/331,816 2010년05월05일 미국(US)
61/361,998 2010년07월07일 미국(US)

특허청구의 범위

청구항 1

a) 한 가지 이상의 소정 종류의 환자 내 암 세포 또는 생물학적 물질에 결합한 나노입자를 자화하도록 구성된, 자화 서브시스템; 및

b) 나노입자의 잔여 자화를 검출하고, 한 가지 이상의 소정 종류의 환자 내 암 세포 또는 생물학적 물질을 검출하고, 측정하거나 위치결정하기 위한 잔여 자화를 분석하도록 구성된, 센서 서브시스템;

을 포함하는 것을 특징으로 하는 한 가지 이상의 소정 종류의 생체 내 암 세포 또는 생물학적 물질의 검출, 측정 또는 위치결정을 위한 장치.

청구항 2

제1항에 있어서, 자화 서브시스템은 다수의 헬름홀츠 코일(Helmholtz coils)을 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 3

제1항에 있어서, 센서 서브시스템은 구배 측정기의 어레이를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 4

제1항에 있어서, 센서 서브시스템은 다수의 평면 구배 측정기를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 5

제4항에 있어서, 적어도 하나의 평면 구배 측정기는 약 2cm의 기준선을 가지는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 6

제4항에 있어서, 적어도 하나의 평면 구배 측정기는 포토리소그래피 공정을 사용하여 제조되는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 7

제4항에 있어서, 평면 구배 측정기와 연결된 초전도 양자 간섭 소자(SQUID)를 더 포함하며, SQUID는 액체 질소의 온도 주변의 온도에서 초전도성인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 8

제4항에 있어서, 다수의 평면 구배 측정기 중 하나와 각각 연결된 다수의 SQUID를 더 포함하며, SQUID는 액체 질소 온도 주변의 온도에서 초전도성인 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 9

제1항에 있어서, 센서 서브시스템은 원자 자력계를 포함하는 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 10

제1항에 있어서, 센서 서브시스템은 전자기적 역문제(inverse problem)를 해결하도록 구성된 것을 특징으로 하는 장치.

청구항 11

a) 제1항의 장치를 제공하는 단계;

b) 다수의 표적화된 나노입자를 환자에게 위치시키는 단계로서, 표적화된 나노입자는 한 가지 이상의 소정 종류의 암세포 또는 생물학적 물질과 우선적으로 결합하는 표적제와 콘쥬게이트된 상자성 나노입자를 포함하는

단계;

c) 자화 서브시스템을 사용하여 나노입자를 자화하는 단계;

d) 센서 서브시스템을 사용하여 한 가지 이상의 소정 종류의 암 세포 또는 생물학적 물질을 검출하고, 측정하고 또는 위치결정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 한 가지 이상의 소정 종류의 생체 내 암세포 또는 생물학적 물질을 검출하고, 측정하거나 위치결정하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 표적화된 나노입자는 사전결정된 종류의 암 세포에 특이적으로 결합하는 항체로 표지되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 항체 표지된 자기 나노입자는 적어도 하나의 특이적 항체에 부착된 생체 적합 코팅으로 코팅된 자기 코어를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 자기 코어는 강자성 물질을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 강자성 물질은 산화철을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 자기 코어는 직경이 30㎚ 미만인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제13항에 있어서, 생체 적합 코팅은 덱스트란, 카르복실, 아민 또는 그것의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제13항에 있어서, 적어도 하나의 특이적 항체는 전립선 암 특이적 항체, 유방암 특이적 항체, 난소암 특이적 항체, 호지킨 림프종 특이적 항체, 췌장암 특이적 항체, 호지킨 림프종과 관련된 리드스텐버그(Reed Sternberg) 세포에 특이적으로 결합하는 항체 중 한 가지 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제13항에 있어서, 적어도 하나의 특이적 항체는 CD15 또는 CD30 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 적어도 하나의 특이적 항체는 CA-125인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 적어도 하나의 특이적 항체는 HER-2 항체인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

본 명세서에 설명되는 것을 특징으로 하는 방법 및 장치.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 표적화된 나노입자 및 자기 완화(magnetic relaxation) 측정을 사용하는 세포 또는 물질의 생체 내 검출 및 측정에 관한 것이며, 특히 인간에서 암을 검출하고 측정하는데 유용하다.

배 경 기 술

[0002] 질병의 조기 검출은 성공적인 치료 및 회복의 가능성을 최대로 높일 수 있다. 더 나아가, 질병의 조기 검출 및 국소화는 치료 효율을 최적화하는 질병 부위에 관련된 치료를 허용한다. 적절한 검출 장치에 의해, 치료는 모니터링될 수 있고, 더 나아가 적용된 약물 또는 다른 형태의 치료의 효율을 증가시킨다. 특정 질병을 표적화하는 능력은 또한 치료 성과를 개선시킬 수 있다. 미국에서 사망의 두 번째 유발 원인인 암의 조기 검출 및 국소화는 환자 성과를 개선시킬 수 있다. 암의 검출을 위한 임상 목적을 위해 사용되는 가장 흔한 방법은 모두 비특이적이며, 즉, 암 또는 양성 종양을 구별할 수 없고, 어떤 것도 100% 정확한 검출을 가져올 수 없다. 이용가능한 방법은 모두 불리함과 약점을 가지며, 거짓 진단의 비율은 높고 긍정적 진단의 비율은 너무 낮으며, 이와 함께 사망률은 증가하게 된다. 부가적인 선택이 이용가능할 때, 현재 이용가능한 가장 흔한 임상적 양상은 (1) X-레이 유방촬영술, (2) 자기 공명 영상(MRI), 및 (3) 초음파 스캐닝과 함께 (4) 양전자 방사 단층 촬영이다.

[0003] X-레이 감쇠의 측정은 매개(intervening) 배지 밀도의 정보를 제공하며 FDA 승인되어 있고, 다양한 형태의 질병, 특히 암을 검출하기 위해 사용되는 가장 흔한 장치이다. 그것은 또한 다수의 위음성(false-negative) 및 위양성(false-positive) 결과를 가져온다. 조기 단계의 암 종양은 검출될 수 있지만 양성 또는 암성 종양에 대한 특이성이 없다. 아티팩트(artifact)는 건강한 조직에 의해 야기될 수 있고 위양성 결과를 생기게 한다. 선량이 낮아도, 일반적으로 X-레이 및 방사선에 노출에 관한 걱정은 증가한다. 전반적으로 암의 X-레이 이미징에서 위양성의 수는 높게 남아 있으며 X-레이 방법은 조기 단계 종양을 검출할 수 없다.

[0004] 초음파는 종양을 이미징하는 두 번째 방법을 제공하기 위해 사용된다. 초음파는 탁월한 콘트라스트 해상도를 가지지만 X-레이 및 다른 이미징 기법과 비교하여 공간 해상도가 감소되어 있다. 초음파는 현재 암에 대한 1차 스크리닝 도구로서 FDA에 의해 승인되어 있지 않지만, 보통 정기검사에서 검출된 임의의 이상들을 추가로 조사하기 위해 사용된다. 이것은 종종 유방 및 난소암의 X-레이 이미지에서 의심 영역을 확인하기 위해 사용되는 도구이다.

[0005] MRI는 X-레이 스캔 동안 보이는 잠재적인 문제 영역을 추적하기 위해 사용되지만, 그러나 MRI 스캔 비용은 그것을 사용하지 못하게 한다. MRI는 조직 내 작은 이상을 검출할 수 있고, 또한 암이 전이되었는지 여부를 결정하는데 유용하다. 동적 콘트라스트 향상(Dynamic Contrast Enhanced: DCE) MRI는 잠재적으로 양성과 암성 종양을 구별하지만 다수의 위양성을 만든다. MRI 비용은 스크리닝 도구로서 그것의 적용을 제한한다. 암의 MRI 이미징은 종종 콘트라스트 촉진제로서 자기 나노입자를 사용하고, 이러한 나노입자의 주입을 위한 표준을 제공하는 허용된 프로토콜이다. 혈관 내 MRI 콘트라스트 촉진제는 2mg/kg의 나노입자 중량의 용량으로 전이성 병변을 검출하기 위해 사용되고 있다.

[0006] 질병 조기 검출의 중요성 때문에, 다양한 다른 기법들이 이미징을 위해 현재 연구되고 있다. 이러한 기법들은 PET 또는 SPECT, 임피던스 단층촬영 및 다양한 형태의 RF 이미징을 사용하는 유방신티그래피를 포함한다.

[0007] 병변이 여전히 함유되어 있는 동안 병변의 조기 검출이 중요한데, 이는 조기 검출된 많은 암의 치료율이 거의 100%이기 때문이다. 기존의 이미징 방법으로는 종종 병변이 상당히 성장할 때까지 병변을 식별하지 못한다. MRI, PET, 초음파, 신티그래피 및 다른 방법으로 포함하는 대안의 방법에 대한 연구가 진행중이다. 현재, 이 방법 중 어떤 것도 암성과 비암성 조직간 조직 특성의 차이를 사용하여 종양 유형에 관한 특이성을 가지지 않는다. 특히 방사선, 또는 매우 고가의 절차에 의존하지 않고 종양의 매우 조기의 검출을 제공하는 새로운 접근법이 확실히 필요하다. 본 발명은 생체 내 암 검출을 위한 새로운 능력을 제공한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 2009년 11월 6일자로 출원된 미국 제61/259,011호; 2010년 2월 27일자로 출원된 제61/308,897호;

2010년 3월 16일자로 출원된 제61/314,392호; 2010년 5월 5일자로 출원된 제61/331,816호; 2010년 7월 7일자로 출원된 제61/361,998호의 출원과 관련되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0009] 본 발명은 세포 또는 물질, 예컨대 조직 내 암 세포를 검출하기 위한 장치 및 방법을 제공한다. 이 시스템은 대상체의 조직에 알려진 자기장을 부과하여 관심의 세포 또는 물질에 결합된 표적화된 상자성 나노입자를 자화하는 자기장 발생 장치를 포함하고, 나노입자 감쇠의 자화로서 잔여 자기장을 검출할 수 있는 민감한 자기 센서를 포함하는, 자기 시스템을 포함한다. 자기 시스템의 예는 측정 스테이지에 위치한 환자의 암 조직에 대해 균일한 자화 펄스장을 적용하기에 적합한 자기 펄서(pulser)를 포함하는 초전도 양자 간섭 소자(superconducting quantum interference device) 센서; 및 적용된 펄스장에 의해 만들어진 잔여 자기장을 검출하고 이미징하기에 적합한 잔여 자기장 검출기를 포함한다. 마그네틱 펄서는 한 쌍의 헬름홀츠 코일(Helmholtz coil)을 포함할 수 있다. 잔여 자기장 검출기는 구배측정기의 어레이를 포함할 수 있다. 다른 예의 자기 시스템은 원자 자력계 및 원자 구배 측정기의 어레이, 즉 자기장 내 원자의 라머세차운동(Larmor precession)에 기반한 극도로 약한 자기장을 측정하기 위해 사용될 수 있는 매우 민감한 자기장 센서를 포함한다. 본 발명의 일부 구체예에서, 원자 자력계는 원자 증기셀(vapor cell)을 함유하는 작은 공동(cavity)을 함유하는 칩 세트를 포함한다. 이 증기셀은 Rb 원자를 함유하고, 원평광(circularly polarized) 레이저 빔에 의해 시각적으로 펌프된다. 원자는 라머세차운동을 겪고, 이 세차운동의 주파수는 인가된 자기장에 응하여 증기의 굴절 지표의 변화를 일으킨다. 제 2레이저는 한 세트의 회절 격자(grating)를 사용하여 굴절에서 이 변화에 대한 측정 자기장으로서 사용되어 적용된 자기장이 변함에 따른 간섭 패턴 변화를 측정할 수 있다. 이 증기셀은 하나일 수 있고 또는 구배 측정기 구성 내에 배열되어 거리함수로서 필드(field) 내 변화를 측정할 수 있다.

[0010] 본 발명에 따르는 방법은 자기 시스템을 제공하는 단계; 암 세포 또는 다른 세포 또는 관심의 물질에 특이적인 결합을 위해 표적화된(예를 들어 항체로 표지된) 상자성 나노입자를 대상체에 주입하는 단계; 알려진 (예를 들어 균일한) 자성 펄스장을 적용하여 대상체 조직 내 나노입자를 자화하는 단계; 및 자화된 나노입자의 잔여 자기장을 검출함으로써, 환자의 암 조직에 결합된 나노입자의 이미지를 제공하는 단계를 포함한다. 표적화된 상자성 나노입자는 적어도 하나의 특이적 항체에 부착된 생체적합 코팅으로 코팅된 자기 코어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 자기 코어는 산화철과 같은 강자성 물질을 포함할 수 있다. 항체와 같은 적당한 표적화제의 예는 이하에 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0011] 수반하는 도면은 본 명세서에 포함되고 부분을 형성하며, 본 발명을 예시하고, 상세한 설명과 함께 본 발명을 설명한다. 도면에서, 동일 요소는 동일 숫자에 의해 언급된다.

도 1은 본 발명에 따르는 측정을 위한 대상체 조직의 예시적 프레파라트(preparation)의 개략적인 도시이다.

도 2(a,b,c,d)는 본 발명에 따르는 예시적 측정의 개략적인 도시를 제공한다.

도 3은 도 2와 관련되어 설명되는 과정으로부터 측정의 개략적인 도시이다.

도 4는 본 발명의 사용에 적합한 장치의 개략적인 도시이다.

도 5는 초전도 양자간섭소자(SQUID) 자기 센서를 사용하는 예시적인 장치의 개략적인 도시이다.

도 6은 인간 암 검사에 사용될 수 있는 예시적인 SQUID 센서 장치의 개략적인 도시이다.

도 7은 약한 필드(weak field) 측정을 위한 원자 자력계의 개략적인 도시 및 사진이다.

도 8은 표적 특이적 세포에 대해 생체적합 코팅 및 부착된 항체를 가지는 자기 나노입자의 개략적인 도시이다.

도 9는 알려진 결합 능력을 가지는 마이크로스피어의 범위와 비교에 의한, 계산한 세포 당 Her2 부위 수의 도시이다.

도 10은 HER2/neu 항체 및 나노입자와 함께 인큐베이션 후 함수로서 측정한 2개의 유방암 세포주, MCF7/HER218 및 MDA-MB-231의 자기 모멘트의 도시이다.

도 11은 2개의 인자에 의해 세포를 아래로 피펫팅하는 것에 의해 세포 수의 함수로서 측정한 세포 샘플의 자기 모멘트의 도시이다.

도 12는 MCF7 세포, 좌 2E+06, 우=1E+06 세포의 삽입된 바이알을 갖는 팬텀(phantom)의 도시이다.

도 13은 SQUID 시스템 하 누드 마우스의 사진이다.

도 14는 마우스 종양으로부터 얻은 위치 신뢰도(confidence) 플롯을 포함한다.

도 15는 35개의 다른 측정 부위에 대해 관찰한 자기 등고선의 도시이다.

도 16은 2마리의 마우스 및 각 마우스의 둘 다의 종양에 대한 측정의 시간 과정의 도시이다.

도 17은 이 측정 결과의 도시이며 살아있는 마우스에서 생체 내 측정과 매우 양호한 일치를 나타낸다.

도 18은 마우스의 실제 종양에서 2개의 겹쳐진 위치에 대해 2-차원 95% 신뢰도 제한의 예시이다.

도 19는 추출 후 종양 조직의 사진이다.

도 20은 난소에서 종양 성장을 나타내는 난소 암의 도시이다.

도 21은 환자 대상체의 통상적인 거리에서 SQUID 센서 장치 하에 위치된 실제 크기 난소 팬텀의 사진이다.

도 22는 도 21에 나타낸 팬텀에 삽입한 살아있는 난소 세포에 대한 감도 연구 결과의 도시이다.

도 23은 유세포분석기를 사용한 이 세포들에 대한 항체 부위 확인의 도시이다.

도 24는 살아있는 마우스 내에 난소 인간 암 세포에 부착된 자기 나노입자(Ocean Nanotech제)로부터의 자기 모멘트의 도시이다.

도 25는 SQUID 센서 방법이 마우스로부터 자기 등고선 필드와 함께 생체 내에서 작동하는 것을 입증하기 위해 사용된 마우스의 사진이다.

도 26은 림프종 세포주에 대해 자기 나노입자를 주입하는 인큐베이션에 대한 시간의 함수로서 SQUID 센서 방법 내 자기 모멘트의 측정 그래프이다.

도 27은 나노입자에 대해 이용가능한 부위 수를 결정하는 림프종 시스템으로부터의 RS 세포의 유세포분석기 측정 결과 및 SQUID 센서에 의한 검출의 도시이다.

도 28은 호지킨병이 있는 환자로부터의 조직 박편이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 다양한 구체예 및 적용의 맥락에서 설명된다. 일부의 설명에서, "검출"이란 용어는 간결성을 위해 사용되며, 본 발명은 세포 또는 물질의 존재 검출, 세포의 수 또는 물질양의 측정, 세포 또는 물질 위치의 검출, 앞서 언급한 것의 변화 또는 변화율의 검출, 및 유사한 검출을 제공할 수 있고, 이것 모두는 용어 "검출하는"에 포함된다.

[0013] 본 발명에 따르는 자기 완화 측정의 간략화된 예가 우선 설명된다. 도 1은 본 발명에 따르는 측정을 위한 대상체 조직의 예시적 프레파라트의 개략적인 도시이다. 도면의 도시는 매우 간략화되어 있고 단지 설명의 용이성을 위한 것으로 의도되며, 수반된 실제 재료의 실제 형상, 모양, 비율 또는 복잡성을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 조직(11)의 일부, 예를 들어 조사되는 기관, 또는 알려진 또는 의심되는 종양 부위는 관심 형태의 일부 세포(도면에서 주변부를 둘레에 "V" 형 구조를 갖는 원으로서 표시됨) 및 일부 다른 유형의 세포(도면에서 주변부를 둘레에 직사각형 구조를 갖는 타원으로서 표시됨)를 포함한다. 다수의 자기 나노입자(12)가 제공되며, 이는 도면에서 작은 원으로서 표시된다. 다수의 표적 분자(13)가 또한 제공되며, 이는 도면에서 작은 삼각형으로서 표시된다. 나노입자 및 표적 분자는 합쳐져서(또는 콘쥬게이트되어서) 표적화된 나노입자(14)를 형성한다.

[0014] 표적화된 나노입자는 그 다음에 조직(15)에 유입될 수 있다. 관심 유형의 세포는 결합 부위 또는 표적 분자에 대한 다른 친화도를 가지며, 도면에서 이러한 세포 주변부 둘레에 "V" 형 구조로 도시된다. 표적 분자는 관심 유형의 세포에 부착하며 도면에서 "V" 형 구조 내에 위치된 삼각형 표적 분자로 도시된다. 일반적으로, 각 세포는 다수의 이러한 결합 또는 친화 부위를 갖는다. 다른 유형의 세포는 이러한 결합 부위 또는 친화도를 가지지 않으며, 도면에서 부착된 표적화된 나노입자가 없는 타원형으로 도시된다. 세포와 결합하지 않는 표적화된 나노입자는 제조된 샘플 내에 자유롭게 남으며, 도면에서 어떠한 특정 세포와도 연결되지 않는 부착된 삼각형을 갖는 작은 원으로 도시된다.

[0015] 도 2(a,b,c,d)는 본 발명에 따르는 예시적 측정의 개략적 도시를 제공한다. 도 2a에서, 조직은 도 1에서와 같으며, 각 나노입자 근처에 화살표의 부가가 있다. 화살표는 각 나노입자의 자화의 표시이며, 조직 내 나노입자의 자화는 무작위라는 것을 나타낸다(도면에서, 화살표는 단지 설명의 편이를 위해 4방향 중 하나로 나타내며, 실제로 자화는 모든 방향을 가질 수 있다).

[0016] 도 2b에서, 외부 자기장(도면의 아래 오른쪽에서 윤곽이 그려진 화살표로 표시됨)이 인가된다. 인가된 자기장에 대한 나노입자의 자화는, 동일 방향을 지시하는 모든 자화 화살표에 의해 도면에 표시된 바와 같이 현재 균일하다.

[0017] 도 2c는 자기장이 제거되고 단시간 후의 조직을 도시한다. 세포와 결합하지 않은 나노입자는 브라운 운동(Brownian motion)에 의해 자유롭게 이동하고, 그것의 자화는 무작위로 빠르게 돌아오며, 도면에서 다양한 방향으로 지시하는 비결합 나노입자의 자화 화살표에 의해 표시된다. 그러나 세포에 결합한 나노입자는 이러한 물리적 움직임이 억제되고, 따라서 그것의 자화는 인가된 자기장의 존재 하에 있을 때와 실질적으로 동일한 것으로 남는다.

[0018] 도 2d는 적용된 자기장이 제거되고 더 긴 시간 후 제조된 샘플을 도시한다. 결합된 나노입자의 자화는 또한 지금쯤 무작위로 되돌아 있다.

[0019] 도 3은 도 2에 관해서 설명되는 과정으로부터 측정의 개략적인 도시이다. 자기장은 설명의 편이를 위해 간략화된 표현의 시간 함수로서 나타내며, 실제로 신호의 단위, 규모 및 형상은 다르고 더 복잡할 수 있다. 도 2a의 상태에 대응한 과정의 초기에는 나노입자 자화는 무작위이며, 외부 자기장이 적용된다. 그 시간 후, 나노입자의 자화는 균일하며, 도 2b의 상태에 대응한다. 비결합 나노입자는 무작위 자화로 되돌아오는 단시간 동안 자기장은 무시될 수 있으며, 도 2c의 상태에 대응한다. 자화는 그 다음에 균일로부터 무작위 자화의 결합된 나노입자 전이로서 측정될 수 있으며, 도 2d의 상태에 대응한다. 도 2c의 상태로부터 도 2d의 상태의 측정 자화의 특징은 샘플 내 결합된 나노입자의 수와 관련되어 있으며, 따라서 샘플 내 관심 유형의 세포 수와 관련된다.

[0020] 도 4는 본 발명의 사용에 적합한 장치의 개략적 도시이다. 대상체 스테이지(41)는 대상체를 장치의 나머지에 대해 효과적인 관계로 배치하도록 구성된다. 자화 시스템(42), 예를 들어 헬름홀츠코일은 자화 시스템이 샘플에 자기장을 인가할 수 있도록 대상체 스테이지에 대해 장착된다. 자기 센서 시스템(43)은 그것이 자화된 나노입자와 관련된 작은 자기장을 감지할 수 있도록 대상체 스테이지에 대해 장착된다. 본 시스템은 제어되며, 센서 데이터는 제어 및 분석 시스템(44)에 의해, 예를 들어 적절한 프로그래밍을 가지는 컴퓨터에 의해 분석된다.

[0021] 도 5는 초전도 양자 간섭 소자(SQUID) 마그네틱 센서를 사용하는 예시적인 장치의 개략적 도시이다. 사진 상단의 액체 헬륨 저장소 드워(dewar)(51)는 SQUID 센서의 온도를 유지한다. SQUID 2차(2nd-order) 축 구배 측정기는 지지 프레임을 통해 돌출하는 흰색 돌출부(52)에 포함된다. 이 예시적 돌출부 내에 7개 구배 측정기가 포함되는데, 중앙에 1개 및 2.15cm 반경의 원에 6개의 구배 측정기가 포함된다. 각 구배 측정기는 낮은 온도의 SQUID와 유도적으로 결합된다. 두 개의 원형 코일(54)은 나노입자에 대해 자화 펄스장을 제공할 수 있는 헬름홀츠 쌍을 형성한다. 이 코일들에 의해 생성된 균일한 필드는 다양할 수 있지만, 통상적으로 40가우스 내지 50가우스이고, 펄스 길이는 통상적으로 300msec 내지 800 msec이다. 이 예에서, 나무 프레임이 SQUID 및 측정 플랫폼뿐만 아니라 자화 코일을 지지한다. 비자기 지지체 시스템은 금속 성분이 없는, 예를 들어 플라스틱으로 구성될 수 있는 3차원 스테이지(55)를 포함한다. 상부의 2개의 검정색 노브(knob)는 a+/-10cm 범위에서 x-y 스테이지 이동을 제어하며, 하부의 노브는 측정 스테이지를 20cm 범위에서 올리고 내리기 위해 사용된다. 샘플 홀더는 마우스 또는 다른 작은 동물과 같은 살아있는 대상체를 함유할 수 있는 스테이지에 삽입될 수 있다.

[0022] 도 6은 인간 암 검사에 사용될 수 있는 예시적인 SQUID 센서 장치의 개략적 도시이다. 나무로 된 구조물(63)은 도 5에서 나타내는 지지체 프레임과 유사할 수 있다. 측정 스테이지는 환자 배치를 위한 베드(65)로 대체될 수 있다. 두 개의 더 큰 헬름홀츠 코일(64)은 베드 위와 아래에 나무로 된 원형을 포함한다. 이 더 큰 코일은 균일한 펄스장을 만들고 환자에 주입되어 있는 자기 나노입자를 자화하기 위해 사용될 수 있다. 전류는 변경될 수 있고, 예를 들어 도 5에서 나타내는 장치에서 사용되는 것으로부터 증가되어 40가우스 내지 50 가우스의 범위에서 다시 필드를 만들 수 있다. 도 5에서 나타내는 장치와 유사하게, 자기 구배 측정기의 어레이를 가지는 SQUID 드워(61)가 사용되어 자화된 나노입자에 의해 만들어진 잔여 자기장 변화를 측정할 수 있다.

[0023] 도 7은 약한 필드 측정을 위한 원자 자력계의 개략도 및 사진이다. 이 장치는 마이크로칩 가공 방법을 사용하는 것에 의해 소형화되고, 다수의 유닛이 나란히 위치되어 센서 어레이를 형성할 수 있다. 자력계의 작동은 광섬유를 통해 인가된 레이저 빔의 인가을 통해 이뤄진다. 이 빔은 특정 원자 상태로 증기 셀 내 가열된 Rb 가스를 펌

프한다. 빔은 우선 타원 편광되고 증기 셀에 시준(collimate)된다. 거울은 이 빔을 셀과 렌즈를 통해 편광 분석기로 되반사한다. 자력계의 길이에 대해 수직인 적용된 자기장은 셀 내 기체의 굴절률을 변화시키고, 셀을 통해 빛의 편광을 변화시킨다. 편광의 변화로 적용된 자기장의 규모를 얻는다. 펌핑 레이저는 다수의 광섬유 케이블을 공급하고 따라서 다수의 자력계에 대해 사용된다. 릴랙소메트리(relaxometry) 측정을 위한 이 자력계의 배열은 7개의 증기 셀을 포함하는데 1개는 중심부에 위치되고 6개로 더 둘러싸인다. 나노입자에 최대로 관찰 가능한 자기 모멘트를 유도하기 위해서 자화 코일로부터 인가된 필드는 도 5에서 나타내는 배열과 수직이다. 도 7의 아래쪽 사진은 본 발명의 적용을 위한 원자 자력계의 예시적인 물리적 배열 및 크기이다. 장치의 감도는 1.0pT/vHz(1000fT/vHz)의 도 5에서 나타내는 예시적인 SQUID 시스템의 감도와 비교하여 0.16fT/vHz이다. 원자 자력계는 극저온 냉각수가 필요하지 않은데, 이는 이러한 냉각수, 특히 액체 헬륨이 항상 용이하게 얻어질 수 있는 경우가 아닌 임상적 용도에 원자 자력계를 바람직하도록 만들 수 있다.

[0024] 유방암의 검출에 대한 예시적 적용

[0025] 유방암에 대해, 스크리닝 및 검출을 위해 현존하는 방법은 유방촬영술이다. 유방촬영술이 유방암을 더 조기에 검출하기 위한 본 발명자들의 능력을 상당히 개선시켰지만, 그것은 여전히 양성과 악성 병변을 구별하는 것에서 불능, 밀집해 있고 흉터가 남는 유방 조직 내 종양 검출의 어려움을 겪고 있고, 10% 내지 30%의 유방암을 검출하지 못한다. 완화 필드의 측정을 통해 입자들의 검출과 조합되어 종양 특이적 시약에 콘쥬게이트된 자기 나노입자의 사용은, 더 조기에 종양을 검출하기 위한 본 발명자들의 능력을 개선시키는 가능성을 가지는 촉망되는 새로운 기술을 나타낸다. 더 나아가, 약한 필드 센서를 사용하는 표적화된 자기 나노입자의 검출은 빠르고, MRI 검출보다 더 민감할 수 있는데, 표적 세포와 결합한 입자들만이 검출되기 때문이다.

[0026] 본 발명자들은 HER2 항원을 발현시키는 유방암 세포에 표적화된 콘쥬게이트된 자기 나노입자를 개발하였는데, 이는 약 30%의 인간 유방암에서 과발현된다. 본 발명자들은 나노입자를 그것들의 자기 특성에 대해 특성화하였고, Fe의 mg 당 최적의 크기 및 자기 모멘트의 특성을 선택하였다. HER2에 대해 특이성을 갖는 다수의 다른 세포주가 검출을 위한 센서 시스템의 그것의 부위 밀도 및 감도를 결정하도록 연구되었다. SCID 마우스 모델을 인간 세포주로부터 성장시킨 종양을 사용하고, 센서 시스템 하에 마우스를 이미징한 다음 조직 연구를 확인하여 탐구하였다. 이 결과는 유방암의 민감한 검출을 위한 자기 센서 접근의 타당성을 나타낸다.

[0027] 도 8은 생체적합 코팅 및 은 표적 특이적 세포에 대해 생체적합 코팅 및 부착된 항체를 가지는 자기 나노입자의 개략적인 도시이다. 본 발명의 예시적 구체예의 증명에서, 본 발명자들은 유방암의 30% 내지 40%에 특이적인 HER2 항체(Ab)를 사용하였다. 나노입자는 카르복실기를 함유하는 코팅을 가지며, 설퍼-NHS 방법은 나노입자를 항체에 콘쥬게이트하기 위해 사용된다. 유세포분석법을 유방암 세포주 MCF7, MCF7/Her2-18(Her2으로 안정하게 트랜스펙션된 MCF7 클론), BT474, 및 MDA-MB-231에 대해 수행하였다. Her2 결합 부위의 수를 유세포분석기, 형광 프로프 FITC에 콘쥬게이트된 항-Her2 항체에 의해 결정하였다. 도 9는 알려진 결합 능력을 가지는 마이크로스피어 범위와 비교에 의해 계산된 세포 당 Her2 부위 수의 도시이다. Her2-18를 과발현하도록 유전자 조작된 MCF7 세포는 11 x 10^6Her2 결합 부위/세포를 가지고, BT-474는 2.8 x 10^6를 가지고, MCF7 0.18 x 10^6, MDA-MB-231 0.11 x 10^6이다. 비유방 세포주는 4000 Her2 결합 부위/세포 미만을 가진다.

[0028] 도 10은 유방암 세포주에 자기 나노입자(Ocean Nanotech제)를 부착하는 인큐베이션을 위한 시간 함수로서 SQUID 센서 시스템의 자기 모멘트의 측정 그래프이다. 자기 나노입자를 카르복실의 생체적합 코팅으로 코팅한 다음 Her2/neu 항체에 콘쥬게이트하였다. 이 항체는 인간에서 대략 30%의 유방암에 특이적이다. 표지된 자기 나노입자를 살아있는 암 세포를 함유하는 바이알에 삽입하였고, 바이알의 자기 모멘트를 1분 내지 16분 범위의 다양한 시간에 측정하였다. 0시점은 세포에 첨가하기 전 나노입자 바이알의 자기 모멘트이다. 혼합되지 않은 입자에 대한 자기 모멘트의 결여는 비결합 입자가 이 SQUID 이미징 방법으로 자기 신호를 제공하지 않는다는 것을 증명한다. 세포와 혼합 시, 자기 모멘트는 빠르게 증가하고 포화되어 세포가 1분 내지 2분에 가능한 최대 수의 나노입자를 그것의 표면에 수집하였다는 것을 나타낸다. 상단 곡선은 유방암 세포주, 즉 Her2/neu 항체에 매우 특이적이 되는 것으로 알려진 MCF7/Her218에 대한 것이며, 큰 크기의 자기 신호가 이것을 증명한다. 유방암 세포주, 즉 MDA-MB-231은 또한 Her2/neu에 포지티브 하지만, 항체 표적화된 나노입자가 부착되는 훨씬 더 적은 부위를 가진다. 더 작은 크기가 또한 이런 경향을 나타낸다. CHO 세포주는 Her2/neu에 대해 비특이적이며 인큐베이션 후 실질적으로 더 작은 자기 모멘트를 제공한다. 자기 모멘트의 존재는 나노입자가 들어가는 세포들의 일부 식세포작용을 나타낸다. 세포 없음에 대한 곡선은 나노입자만을 함유하는 바이알에 대한 것이며, 입자만이 계속해서 아무 신호를 보내지 않아 입자의 응집이 생기지 않음을 보여준다. 이 결과들은 표적 암 세포에 대한 항체의 특이성을 증명하고 결합된 항체만이 자기 모멘트를 제공한다는 것을 입증한다. 이 결과는 결합된 또는 비결합된

모든 입자를 보는 MRI와 같은 다른 방법에 대해서는 적용되지 않는다.

[0029] 도 11은 2개의 인자에 의해 세포를 아래로 피펫팅하는 것에 의해 세포 수의 함수로서 측정한 세포 샘플의 자기 모멘트의 도시이다. 증명한 감도는 MCF7세포 및 Ocean 나노입자에 대해 100,000세포이고, 세포에 대해 센서로부터 3.5cm이다. $2.5x10^{6}$np/세포가 있다. 직선성은 세포의 자기 모멘트 수율을 증명하며, MRI 콘트라스트는 세포 수의 선형 함수가 아니다. 통상적인 유방조영상은 1천만 개의 세포가 필요하다.

[0030] 유방 팬텀은 모델로서 표준 유방조영상 교정 팬텀을 사용하여 구성되었다. 팬텀은 점토로 구성되었고, 비금속 재료가 이 분야에서 알기 쉽다. 살아있는 세포를 함유하는 바이알을 팬텀에 삽입하였다. 도 12는 MCF7 세포, 좌 2E+06, 우=1E+06 세포의 삽입된 바이알을 가지는 팬텀의 도시이다. 세포는 Ocean Nanotech제의 HER2 Ab. np에 콘쥬게이트된다. 필드는 5개의 7-채널 SQUID 위치 = 35 부위를 맵핑하였다. 3-D 등고선 맵은 필드 분포를 나타낸다. 위치 및 모멘트 규모는 역문제로부터 얻었다. 모멘트는 상기 나타낸 세포 데이터로부터 바이알 내 세포 수를 결정한다.

[0031] 유방암의 마우스 모델은 SQUID 센서 측정에 대해 적절한 것으로 개발되었다. SCID 누드 마우스를 인간 유방암 세포주로 사용하였다. 도 13은 SQUID 시스템 하 누드 마우스의 사진이다. SQUID 기법에 의해 생체 내 처리를 연구하기 위하여, 마우스는 2주 전 2개 위치에 인간 MCF7 세포를 주입하였다. 다음으로 이 세포는 마우스의 옆구리에서 인간 종양을 만들었고, 하나의 이러한 종양은 마우스의 오른쪽 귀 뒤에 보인다. 마우스를 그것의 입을 거쳐서 튜브를 통해 마취시켰다. 표지한 자기 나노입자를 이 단계에서 꼬리, 복막내 또는 종양내 주사에 의해 마우스에 주사하였다. 주사에 이어서, 마우스를 나타내는 바와 같은 센서 시스템 하에 두었고, 자화 펄스를 적용하였고, 주사한 입자의 결과된 자기 모멘트를 측정하였다. 살아있는 암 세포의 경우에서처럼, 입자가 종양 내 세포에 부착되지 않는다면 모멘트는 관찰되지 않았다. 일부 경우에 종양들은 둘 다 MCF7형 세포이었고, 다른 경우에, 2가지의 다른 세포주가 사용되어 마우스의 종양을 발생시켰다. 도 5에서 나타내는 스테이지에 둔 마우스를 센서 시스템 하에서 몇몇 위치로 이동하여 더 공간적인 정보를 얻을 수 있었다. 측정을 시간 함수로서 만들어서 입자가 혈류로부터 얼마나 빨리 흡수되는지, 얼마나 빨리 식세포작용이 일어나서 입자들이 간에 이르게 되는지를 결정하였다. 마우스를 통상적으로 7-채널 SQUID 시스템 하의 5개 스테이지 위치에 두어서 35개 공간 위치를 얻었다. 다음에 모든 위치에서 자기장은 특별한 암호로 사용되어 레벤버그-마쿼트 이론(Levenberg-Marquardt theorem)을 사용하여 전자기의 역문제를 해결하여서 마우스에서 자기 입자의 모든 공급원의 위치를 결정하였다. 다음으로 이 정보를 사진의 마우스의 알려진 기하학과 비교하여 살아있는 동물에서 유방암 종양의 위치를 결정하기 위한 정확성 및 감도를 결정하였다. 도 14는 마우스 종양으로부터 얻은 위치 신뢰도 플롯을 포함한다. 왼쪽의 구는 자기 모멘트가 약 2 x 우측 종양인 좌측 종양의 것이다(하기 참조). 위치는 2개의 쌍극자 최소제곱법으로써 계산하여 자기 모멘트와 위치를 얻는다. 모멘트는 종양 내 표지 세포의 수를 결정한다.

[0032] 살아있는 동물의 생체 내 측정에 대한 SQUID 시스템 결과를 2마리의 다른 종양 함유 동물에 대해 도 16, 17, 18에서 나타낸다. 각 마우스는 2개의 종양을 가지지만 다른 세포 유형을 가진다. 다른 양의 나노입자를 각각 2개의 종양에 의해 흡수하였다. MCF7 세포를 갖는 마우스는 앞서 HER2/neu 항체에 대해 특이적 부위의 더 큰 수에 기인하여 예상되는 바와 같이 MDA-MB-231 종양을 갖는 마우스보다 더 높은 자기 모멘트를 나타내었다. 도 15는 도 13에서 설명하는 35개의 다른 측정 부위에 대해 관찰한 자기 등고선의 도시이다. 이 자기장의 분석은 이 위치의 측정 값과 일치하는 종양의 공간적 위치를 얻었고, SQUID 결과는 대략 3㎜의 물리적 측정보다 더 큰 정확성을 제공한다. 도 16은 2마리 마우스 및 각 마우스의 종양 둘 다에 대한 측정의 시간 과정의 도시이다. 입자의 흡수는 첫 번째 시간에 얻은 최대값 근처의 신호에 의해 빠르게 일어났다. 나노입자는 실험 시간인 적어도 5시간 동안 종양 내에 남아있다. 이 측정 이후에, 마우스를 안락사시켰고, 종양과 다른 기관을 제거하였고, 센서 시스템 하에 두어서 종양 내에 얼마나 많은 나노입자 주입이 있었는지를 결정하였다. 도 17의 플롯은 이 측정의 결과이며 살아있는 마우스의 생체 내 측정과 매우 양호한 일치를 나타낸다. 하부의 좌측 도면에서, 마우스 모멘트를 간에서 관찰하였는데, 이는 약간의 식세포 작용이 일어났고, 입자가 제거를 위해 간에 전달되었다는 것을 나타낸다. 이후에 또한 종양 조직은 프러시안 블루(Prussian blue) 염색을 사용하여 자기 나노입자 내 철을 강조하여서 종양 내 세포에 입자가 상당히 부착되어 있음을 나타내었다.

[0033] 마우스의 생체 내 측정에 대한 종양 위치의 정확도를 결정하기 위해 신뢰도 영역을 계산하였다. 도 18은 마우스의 실제 종양에서 겹쳐 놓은 2개 종양의 위치에 대한 2차원 95% 신뢰도 제한의 도시이다. 대략 +/- 3㎜의 공간적 위치의 정확성을 x 및 y 방향에서 얻는다. 도 19는 추출 후 종양 조직의 사진이다. 현미경 이미지는 하나의 MCF-7 종양 박편이다. 세포의 프러시안 블루 염색은 세포에 부착된 np에 존재하는 철을 나타낸다. 화살표는 np로 덮인 세포를 지시한다.

[0034] 민감한 자기장 센서 시스템은 유방암 세포주에 대한 항체에 콘쥬게이트된 자기 나노입자를 검출함으로써 유방암의 생체 내 조기 검출을 증명하였다. 100만개 초과의 나노입자들이 각 암 세포에 부착한다. 방법은 유방 종양과 비슷한 거리에서 100,000개 미만의 세포에 대해 민감하다. 표준 X-레이 유방촬영술은 통상적으로 1000만 개 세포의 세포 밀도를 필요로 한다. 측정한 모멘트는 세포 수에 대해 선형이며, 즉 자기 모멘트의 측정은 존재하는 암 세포의 수를 산출한다. 매우 큰 콘트라스트의 세포에 부착되지 않은 나노입자는 관찰되지 않았다. 팬텀 연구는 다수의 공급원이 정확히 편재화된다는 것을 증명하며, 공급원 당 세포수를 결정하였다. 인간 유방암 세포주의 다수의 종양을 사용하여 마우스 모델을 개발하였고, 생체 내 측정으로 나노입자 주입 다음에 이 종양의 위치 및 암 세포수 계측을 결정하였다. 역문제의 해결은 성공적으로 종양과 세포 수를 찾아낸다. 조직은 np 마우스 종양의 존재를 확인한다.

[0035] 난소암의 검출에 대한 예시적 적용

[0036] 난소 암의 병인론은 잘 이해되지 않으며, 선제 스크리닝을 제안하는 위험 인자에 대한 증거는 거의 없다. 보통의 스크리닝 시험은 비정상적 확장과 같은 미심쩍은 증상이 있는지 여부의 골반 검사이고, 결과는 통상적으로 암의 후기 단계를 나타낸다. 믿을 수 있는 스크리닝 시험이 없기 때문에 여성의 통상적인 스크리닝은 현재 실행되지 않는다. 현재 난소 암에 의한 큰 어려움은, 난소암이 검출될 때쯤이면, 난소암은 난소로부터 다른 기관에 전이되어 있는 것이다. 이런 이유로, 난소 제거와 함께 자궁절제술이 종종 수행된다. 난소 암의 존재가 조기에 확인될 수 있고 난소 내에 존재한다면, 5년 생존률은 95%이다. 그러나 단지 29%만이 이 단계에서 검출된다. 질병이 국소적으로 퍼진다면, 이 생존률은 72%로 떨어지고, 멀리 떨어진 위치로 전이된다면, 생존률은 31%이다. 따라서, 조기 검출 방법의 개발은 반드시 필요하다.

[0037] 도 20은 난소 상에서 종양의 성장을 나타내는 난소 암의 도시이다. 이 종양은 항체 CA-125에 대해 다수의 수용체를 가지는 세포로 이루어져 있고, 이 항체로 표지된 자기 나노입자로 표적화될 수 있다. 도 21은 환자 대상체에 통상적인 거리에서 SQUID 센서 장치 하에 위치된 실제 크기 난소 팬텀의 사진이다. 팬텀은 그것에 삽입된 살아있는 난소 암 세포를 함유하는 바이알을 가진다. 항체 CA-125로 표지된 자기 나노입자는 이 바이알에 삽입되며 이 항체들이 이 난소 암 세포들에 대해 매우 특이적이기 때문에 다수는 세포 표면에 부착된다. 이 자기 나노입자들은 그 다음에 SQUID 센서 장치에 의해 검출되어 동물과 인간 생체 내 모델 둘 다에 대한 생체 내 측정에 대해 감도 검량을 제공한다.

[0038] 도 21에서 나타낸 팬텀에 삽입한 살아있는 나노 세포의 감도 연구 결과를 3개의 다른 난소 암 세포주, 즉 tov-112D, Ov-90 및 nihovcar-3에 대해 도 22에 도시한다. 센서로부터 환자의 난소까지의 거리 함수로서 플롯은 3개의 다른 세포주에 대해 이 장치에 의해 검출된 세포의 최소 수를 나타낸다. 암 세포주 ov-90은 가장 공격적인 암 중 하나인 것으로 알려져 있고, 이 결과는 세포 표면의 CA-125에 대해 많은 수용체가 있다는 것을 나타낸다. 세포 당 나노입자의 수는 이 측정으로부터 추정될 수 있고, tov-112D에 대해 세포 당 20,000개, ov-90에 대해 3400개 및 ovcar-3에 대해 6700개로 대응한다.

[0039] 도 23은 유세포분석기를 사용하여 이 세포들에 대해 항체 부위 확인의 도시이다. 도 23a 및 23b는 시험된 4개의 세포주 중 2개를 보여준다. 세포만으로부터의 신호를 나타내며, 이소형(비특이적 결합 분자를 사용, Igg), Her2/neu 항체 및 CA-125 항체는 이 플롯에서 오른쪽으로 증가하는 부위 수를 나타낸다. 이 도면들은 CA-125 항체가 이 세포 상에서 다수의 부위를 가진다는 것을 나타내며, 이 2가지 도면 중 SK-OV-3이 더 크다. 항체 Her2/neu는 또한30%의 유방암 세포에 대해 특이적이다.

[0040] 측정을 시간 함수로서 만들어서 입자가 혈류로부터 얼마나 빨리 취해지는지와 간 내의 입자들에 의해 얼마나 빨리 식세포작용이 일어나는지를 결정하였다. 살아있는 마우스 내 난소 인간 암 종양에 부착된 자기 나노입자(Ocean Nanotech제)로부터 자기 모멘트에 대해 시간 함수로서 SQUID 센서 장치 내 자기 모멘트의 측정을 도 24에 나타낸다. 마우스는 하나는 SK-OV-3이고 다른 하나는 NIH-OVCAR3인 2가지의 난소 종양을 가졌다. 자기 나노입자를 카르복실 생체적합 코팅으로 코팅한 다음 CA-125 항체에 콘쥬게이트하였다. 이 항체는 인간의 난소 암 세포에 특이적이다. 표지한 자기 나노입자를 마우스 종양에 주입하였고, 마우스의 자기 모멘트를 1분 내지 300분의 다양한 시간 범위에서 측정하였다. 입자의 흡수는 첫 번째 시간에 얻은 최대값 근처의 신호에 의해 빠르게 일어났다. 시간 과정은 많은 시간 동안 나노입자가 종양에 남아있다는 것을 나타낸다. 나노입자는 실험 시간인 적어도 5시간 동안 종양에 남아있었다. 다른 양의 나노입자를 각각 2개의 종양으로부터 흡수하였다. SK-OV-3 세포를 가지는 마우스 종양은 앞서 CA-125 항체에 대해 특이적 부위의 더 큰 수에 기인하여 예상되는 바와 같이 NIH-OVCAR-3 종양을 가지는 마우스보다 더 높은 자기 모멘트를 나타내었다. 나노입자는 주입 전 자기 모멘트를 제공하지 않으며, 종양 내 세포와 같은 어떤 것에 부착되었을 때 단지 자기 신호를 얻는다. 실험은 입자가 정상

세포에 결합하지 않기 때문에 종양 이외의 부위에 주입이 신호를 얻지 못한다는 것을 나타내었다. 일정 시간 후, 간은 이 입자들의 축적 표시를 나타내기 시작하였는데, 그것들이 시스템으로부터 식세포작용되기 때문이다. 이 측정 이후에, 마우스를 안락사시켰고, 종양과 다른 기관을 제거하였고, 센서 시스템 하에 두어서 종양 내에 얼마나 많은 나노입자 주입이 있었는지를 결정하였다. 이 측정은 살아있는 마우스의 생체 내 측정과 매우 잘 일치한다. 이후에 종양 조직은 프러시안 블루(Prussian blue) 염색을 사용하여 자기 나노입자 내 철을 강조하여서 종양 내 세포에 입자가 상당히 부착되어 있음을 나타내었다.

[0041] SQUID 센서 방법이 자기 등고선 필드와 함께 생체 내에서 작용한다는 것을 입증하기 위해 사용한 마우스의 사진을 도 25에 나타낸다. 인간 종양을 마우스의 옆구리에 나타내고, 이것은 표 25에서 위쪽의 범프(bumps)이며 꼬리 측면이다. 살아 있는 인간 난소암 세포를 심하게 퇴축된 면역 결핍 마우스에 인간 난소암세포를 주입하여 이 종양을 만들었고, 6mm 내지 10mm 종양이 분명해질 때까지 몇 주 동안 성장시켰다. 마우스를 모든 SQUID 센서 실험 동안 그것의 입을 거쳐서 튜브를 통해 마취시켰다. 표지한 자기 나노입자를 이 단계에서 꼬리, 복막내 또는 종양내 주사에 의해 마우스에 주사하였다. 주사에 이어서, 마우스를 도 1에서 나타내는 바와 같은 센서 시스템 하에 두었고, 자화 펄스를 적용하였고, 주사한 입자의 결과된 자기 모멘트를 측정하였다. 살아있는 암 세포의 경우에서처럼, 입자가 종양 내 세포에 부착되지 않는다면 모멘트는 관찰되지 않았다. 일부 경우에 종양은 둘 다 SK-OV-3형 세포이었고, 다른 경우에, 두 가지의 다른 세포주를 사용하여 마우스 내에 종양을 발생시켰다.

[0042] 도 5에 나타내는 스테이지에 둔 마우스를 센서 시스템 하에서 몇몇 위치로 이동하여 더 많은 공간적인 정보를 얻을 수 있었다. 마우스를 통상적으로 7-채널 SQUID 시스템 하의 5개 스테이지 위치에 두어서 35개 공간 위치를 얻었다. 그 다음에 모든 위치에서 자기장은 암호로 사용되어 레벤버그-마쿼트 이론을 사용하여 전자기의 역문제를 해결하여서 마우스에서 자기 입자의 모든 공급원의 위치를 결정하였다. 다음으로 이 정보를 사진의 마우스의 알려진 기하학과 비교하여 살아있는 동물에서 유방암 종양을 위치화하기 위한 정확성 및 감도를 결정하였다. 도 25는 35개의 다른 측정에 대해 관찰한 자기 등고선을 나타낸다. 이 자기장의 분석은 이 위치의 측정 값과 일치하는 종양의 공간적 위치를 얻었고, SQUID 결과는 대략 3mm의 물리적 측정보다 더 큰 정확성을 제공한다.

[0043] 호지킨 림프종 검출의 예시적 적용

[0044] 호지킨 림프종(HL)은 모든 림프종의 30%를 차지한다. HL은 림프절에서, 우선적으로 자궁경부 및 흉선에서 특징적으로 발생하지만, 진행된 질병에서는 멀리 떨어진 림프절, 비장 및 골수를 수반할 수 있다. 대부분의 경우가 15세 내지 34세의 젊은 성인에 있지만, 두 번째 발생 정도의 피크가 55세 초과에서 생긴다. 현재 진단을 위하여 생검 평가가 필요하다. 수술적 생검은 감염 및 출혈과 같은 합병증을 가지며, 생검 평가는 통상적으로 3일 내지 5일이 걸린다. 따라서 종양 덩어리가 혈액이 심장으로 되돌아가는 것을 막는 HL 경우에(즉, 상대정맥 증후군(superior vena cava syndrome), 10%의 경우), 상당한 이환율 및 사망률이 이 대기 기간 동안 생길 수 있다. 호지킨 림프종을 표적화하는 몇몇 항체, 즉 CD15, CD30, 및 CD25이 확인되었다. 그러나 마지막의 항체는 많은 세포들을 표적화하며 덜 특이적이다. 본 발명의 중요한 임상적 영향을 가질 수 있는 다른 적용이 치료 후 지속되는 HL의 검출에 있다. 재발을 경험하는 환자가 고용량의 방사선 치료를 받는다면, 재발이 조기에 검출되는 양호한 예측이 있다. 재발을 가지는 환자는 첫 번째 차도(remission)의 지속에 의해 우선 결정되는 예후를 가질 것이다. 특히 종격(mediastinum)에서 섬유성 결절의 지속은, 치료 후에 지속적 암이 존재하는지 여부 및 섬유성 결절의 수술이 출혈 문제와 환자 병적 상태를 제어하는 것에 어려움으로 가득한지 여부를 결정하는 것에서 불확실성을 야기한다.

[0045] 본 발명의 릴랙소메트리 방법은 흉선 및 비장과 같이 호지킨병에 의해 영향 받는 기관에 존재하는 림프종 세포수의 정량적 추정을 제공할 수 있다. RS 세포는 CD30 및 CD15에 대한 수백만개 수용체를 함유하는 B-림프구로부터 유래된 거대 세포(giant cell)이다. T-세포 림프구를 표적화하는 SQUID 센서에 의한 이전의 결과는 더 작은 세포에 대해, 대략 백만 개의 나노입자가 각 T-세포에 부착될 수 있다는 것을 나타내었다. 입체 장애는 정상 림프구에 부착된 나노입자의 수를 제한하지만 훨씬 더 많은 RS 세포는 25배 내지 50배 더 결합된 나노입자를 가질 수 있다. 나노입자 당 철의 양은 4.4×10^{-6} ng/np이다. 큰 크기의 RS 세포가 주어지면, 세포 당 몇 백만개의 나노입자가 있을 수 있고, 따라서 각 세포는 10ng 까지의 철을 가질 수 있다. 비장 또는 흉선에 축적된 100개의 RS세포는 1마이크로그램의 철을 함유할 수 있다. 1마이크로그램 미만이 SQUID 검출에 적합하며, 따라서 100개의 RS 세포의 검출능(detectability)이 가능하다. 생체 내 항체 표지된 나노입자의 잔여 자화의 측정된 진폭은 림프종 암에서 중요한 진단 도구를 제공할 수 있다. 신호 강도는 종양 세포 표면 상의 항원 밀도에 의존하며, 따라서 나노입자에 의해 생성된 필드 강도는 림프종 세포 상의 항원 부위 밀도 수와 비례한다. 입자 수 및 밀도는 검출된 자기장의 진폭을 제공하기 위해 결정될 수 있다. 이 정보는 생체 내 검출을 계획하는 것뿐만 아니라 사

용되는 나노입자의 선택을 보조하는 것에 사용될 수 있다. SQUID 센서는 RS 세포에 대해 큰 감도를 가지는 호지킨 병 및 생검이 없는 질병의 생체 내 검출 및 화학치료 동안 질병 치료를 모니터링하는 능력에 대한 이상적인 센서 시스템이다.

[0046] 도 26은 림프종 세포주에 자기 나노입자(Ocean Nanotech제)를 부착하는 배양에 대한 시간 함수로서 SQUID 센서 시스템의 자기 모멘트 측정의 그래프이다. 자기 나노입자를 카르복실 생체적합 코팅으로 코팅한 다음 CD34 항체에 콘쥬게이트하였다. 이 항체는 림프종 세포의 한 유형, 즉 인간의 급성 림프구성 백혈병에 특이적이다. 표지된 자기 나노입자를 살아있는 암 세포를 함유하는 바이알에 삽입하였고, 바이알의 자기 모멘트를 1분 내지 16분 범위의 다양한 시간에 측정하였다. 0시점은 세포에 첨가하기 전 나노입자 바이알의 자기 모멘트이다. 혼합되지 않은 입자에 대한 자기 모멘트의 결여는 비결합 입자가 이 SQUID 이미징 방법으로 자기 신호를 제공하지 않는다는 것을 증명한다. 세포와 혼합 시, 자기 모멘트는 빠르게 증가하고 포화되어 세포가 1분 내지 2분에 가능한 최대 수의 나노입자를 그것의 표면에 수집하였다는 것을 나타낸다. 상단 곡선은 CD34 항체에 매우 특이적이 되는 것으로 알려진 림프종 암 세포주 U937에 대한 것이며, 큰 규모의 자기 신호가 이것을 증명한다. 아래쪽의 곡선은 비특이적 마커, 즉 BSA외의 동일한 세포주에 대한 것이며, 인큐베이션 후 실질적으로 더 작은 자기 모멘트를 나타낸다. BSA에 대한 자기 모멘트의 존재는 나노입자가 세포에 들어가는 경우 이 세포들의 일부 식세포작용을 나타낸다. U937은 T 림프구 세포의 림프종이며, RS는 B 림프구 세포의 림프종이다. 림프종 세포의 주된 목적 중 하나는 제부위에 있지 않은 입자들을 차지하는 것이기 때문에, 이런 비특이성 양이 기대된다. 이 결과들은 표적 암 세포에 대한 항체의 특이성을 증명하고 결합된 항체만이 자기 모멘트를 제공한다는 것을 입증한다. 이 결과는 결합된 또는 비결합된 모든 입자를 보는 MRI와 같은 다른 방법에 대해서는 적용되지 않는다.

[0047] RS 세포의 샘플을 세포 보관 및 표본 양에 대한 국가 공인 기관인 University of New Mexico의 Tissue Bank 시설로부터 얻었다. RS 세포를 검출하기 위한 SQUID 센서 시스템의 효율을 수동 혈구계산기(hematocytometer) 계측에 의해 결정한 샘플 내 RS 세포 수와 비교하였다. 이 분리한 RS 세포를 분리 과정 동안 CD15 및 CD3에 결합된 나노입자 특이성으로 표지하였다. 감도의 검량을 10개 세포 중 1 내지 100,000개 세포 중의 1의 범위 초과의 단계적 희석에 의해 수행하였다. 악성 세포의 나노입자 밀도 범위는 107 나노입자/세포를 초과한다. CD15의 부위 밀도를 수용체/세포를 정량하는 유세포분석 기법을 사용하여 결정한다. CD15 및 CD30 부위/세포의 수를 면역형광 염색 기법을 사용하여 확인하였다.

[0048] 도 27 나노입자에 대해 이용가능한 부위 수를 결정하는 림프계로부터 RS 세포의 유세포측정 결과 및 SQUID 센서에 의한 검출의 도시이다. 도 27a는 림프절 표본으로부터 분리한 RS 세포의 형태적 외관을 나타내는 사진이다. 도 27b는 유세포 분석을 위해 샘플 내 RS 세포의 빈도를 증강시키는 풍부화 과정을 수행하기 전(B1) 및 후(B2) 골수 샘플의 유세포 분석을 나타낸다. 보통 RS 세포는 정상 림프구 세포의 104 또는 105개 중 1개의 빈도로 생기며, 검출되기 위해서 유세포분석기에 의해 CD15 및 CD30염색을 사용하기 전 향상되어야 한다. SQUID 센서 시스템은 생체 내 모든 RS 세포를 검출하며, 샘플링을 필요로 하지 않아서 유세포분석기 결정에 필요한 것과 같은 증강은 필요하지 않다.

[0049] 림프절은 흉선샘과 별도로, R5세포를 축적하는 주요 부위 중 하나이다. 도 28은 호지킨병이 있는 환자로부터의 조직 박편이다. RS 세포는 면역퍼옥시다제 염색으로 염색되었다. 항체 CD15는 우측에 나타내고 항체 CD30은 좌측에 나타낸다. 둘러싸는 세포는 림프절에서 비악성 세포이다. SQUID 센서는 림프절에서 몇 백개의 이런 표지된 RS 세포를 검출할 수 있다.

[0050] 전립선 암의 검출에서 예시적 적용

[0051] 전립선 암은 표준 스크리닝 기법에 의한 조기 검출이 없기 때문에 높은 사망률을 가진다. 미국에서 2009년 경우의 수는 192,280명이었고, 27,360명이 사망하였다. 전립선암은 남성 사망의 9%를 차지하며, 6명 중 1명은 일생 동안 전립선 암의 발병 가능성이 있다. 이 질병은 보통 전립선의 비대, 비뇨기 문제가 초래될 때까지 또는 다른 기관에 퍼질 때까지, 검출되지 않는다. 이 질병의 무증상 검출은 보통 수지 검사(digital examination), PSA상승 시험 결과, 또는 생검에 의해 행해진다. PSA 시험은 현재 감염 위험을 수반하는 많은 불필요한 생검을 야기하는 믿을 수 없는 것으로 생각된다. 수지 검사는 또한 매우 주관적이다. 전립선암에 대한 시험은 매우 논쟁이 있다. 미국에서만 PSA 시험의 비용이 30억 달러를 초과하였고, New England Journal of Medicine에서 보고된 최근의 연구는 현존하는 스크리닝 방법이 55세 초과의 남성에서 사망률을 감소시키지 못한다는 것을 발견하였다. 본 발명은 이 암이 전이되기 전에 그것을 검출할 수 있다.

[0052] 조직 내 전립선 암을 검출하는 예시적인 방법은 초전도 양자 간섭 소자 센서 장치의 측정 스테이지에 환자를 위치시키는 단계; 환자 내 조직에 특이적 결합을 위해 다수의 항체 표지 자기 나노입자를 환자에게 주입하는

단계; 균일한 자화 펄스 필드를 적용하여 환자에게 주입된 나노입자를 자화하는 단계; 및 자화된 나노입자의 잔여 자기장을 검출함으로써 환자의 조직에 결합된 나노입자의 이미지를 제공하는 단계를 포함한다. 조직은 전립선 조직을 포함할 수 있고, 항체표지된 자기 나노입자는 전립선 암 세포에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체표지된 자기 나노입자는 부착된 특이적 항체에 생체 적합 코팅으로 코팅된 자기 코어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 자기 코어는 강자성 물질, 예컨대 산화철을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생체 적합 코팅은 덱스트란, 카르복실 또는 아민을 포함할 수 있다. 전립선 암의 검출을 위한 특이적 항체는 PSMA 항체일 수 있다.

[0053] 전립선-특이적 막 항원(PSMA)는 대부분의 전립선 암에 의해 고도로 발현되는 경막(transmembrane) 글리코단백질이다. 그것은 또한 mAb 7E11로도 불린다. 그것은 고체 암종의 종양 혈관 내피 표면 상에서 발현되지만, 정상 전립선 세포 상에서는 발현되지 않는다. 전립선 암에서 관찰되는 PSMA의 양은 종양의 중증도 또는 등급을 따른다. 유세포분석기는 LNCaP 및 PC-3을 포함하는 전립선 암의 몇몇 세포주에서 이 항체에 대한 다수의 수용체 부위가 있다는 것을 나타낸 반면, PSMA 음성 세포주, 즉 DU-145는 발현이 없다는 것을 나타내었다. 이 양성 세포주에 자기 나노입자 부착의 결과는 세포 당 백만개 이상의 나노입자를 증명한다. 이 결과는 세포 당 나노입자에 대해서 난소암 및 유방암으로부터의 결과와 비슷하며, SQUID 센서를 사용하는 생체자기 검출 방법은 난소암과 전립선암에 대해 동일한 감도를 가질 것이다(상기 참고로써 포함된 관련 출원 중 하나 이상에서 설명됨). 따라서 난소암의 연구 결과는 전립선암 검출과 국소화에 직접적으로 적용될 수 있다. 난소암에 대한 CA-125 항체와 비교하여, PSMA는 생체내 전립선 특이적 표적화 전략에 훨씬 더 특이적이다.

[0054] SQUID 센서 방법은 혈관 형성(신생혈관) 및 개개 종양 단계 정도(gradation)에 대해 새로운 대용물을 유발하는 종양 내 미세혈관 구조물의 정량적 추정을 제공할 수 있다. 나노입자를 사용하는 실험적 전립선 암 모델 내 종양 미세혈관의 특징의 연구에서 종양 성장 및 공격성/등급이 종양 신혈관형성과 직접 관계를 가진다는 것이 나타났다. 다른 연구들은 조직의 그램 당 약 2.3mg의 나노입자가 되는 종양 내 자기 입자의 농도를 추정한다. 이 농도는 간내 동맥으로 투여된 방사성 마이크로스피어를 통해 처치를 받는 인간 암 환자의 종양에서 정기적으로 달성되며, 나노입자는 종양의 혈관 성장 고리 내에서 응집하는 경향이 있다. 나노그램 미만이 SQUID 검출에 적합하다. 생체 내 항체 표지된 나노입자의 자여 자화의 측정된 진폭은 전립선 암에서 중요한 진단적 도구를 제공할 수 있다. 신호 강도는 종양 세포 표면 상의 항원 밀도에 의존하며, 따라서 나노입자에 의해 생성된 필드 강도는 전립선 종양 세포 상의 항원 부위 밀도 수와 비례한다. 따라서, 입자 수 및 밀도는 검출된 자기장의 진폭을 제공한다. 이 정보는 다음에 생체 내 계획에서 뿐만 아니라 사용되는 나노입자의 선택을 보조하는 것에 사용될 수 있다.

[0055] 교모세포종의 검출에 대한 예시적 적용

[0056] 뇌암은 특히 치명적이며 다양한 형태로 생긴다. 신경교세포를 수반하는 암은 가장 일반적인 형태이며 또한 인간에서 가장 공격적인 뇌 종양이다. 다양한 신경교세포는 핍지교종(핍지교세포를 수반), 성상세포종(성상세포를 수반) 및 교모세포종 형태의 암을 야기하는 것과 관련될 수 있다. 교모세포종은 뇌암 중 가장 빈번하게 발생한다. 이런 종류의 암은 보통 매우 단시간의 기간 내에 죽음을 초래한다. 교모세포종 세포는 이런 종류의 암을 이미징하기 위해 사용될 수 있는 EGFR, 81C6, 및 PTN 항체와 같은 마커에 의해 표적화될 수 있다. 마우스 모델 및 뇌암 세포주, 예컨대 U-251은 인간 적용 전에 시험을 위해 이용될 수 있다.

[0057] 뇌암을 표적화하는 것에서 중요한 고려사항은 부착된 마커를 가지는 나노입자의 혈관뇌장벽을 가로지르는 전달이다. 이 장벽은 악성 종양과 관련된 혈관계에서 다소 개방되지만, 여전히 장애물로 남아있다. 친유성 표면으로 코팅된 다음 항체 또는 펩티드에 콘쥬게이트된 나노입자의 사용은 장벽을 가로지르는 능력을 증가시킨다. 추가적으로, 마커를 가지는 나노입자는 리포좀 표면을 가지는 폴리머 코팅 내로 또는 미셀(micelle) 내로 캡슐화될 수 있으며, 다른 접근에서 가열 RF 또는 초음파 펄스의 약한 적용을 사용하여 일단 뇌 내부에서의 폴리머로부터 컨쥬게이트된 나노입자를 방출한다.

[0058] 뇌암을 검출하기 위한 예시적인 방법은 환자를 초전도 양자 간섭 소자 센서 장치의 측정 스테이지에 환자를 위치시키는 단계; 다수의 항체 표지된 자기 나노입자를 환자의 뇌 종양에 특이적 결합을 위해 환자에게 주입하는 단계; 균일한 자화 펄스장을 적용하여 환자에게 주입된 나노입자를 자화하는 단계; 및 자화된 나노입자의 잔여 자기장을 검출함으로써 환자의 조직에 결합된 나노입자의 이미지를 제공하는 단계를 포함한다. 표적은 뇌 종양이며, 항체 표지된 자기 나노입자는 뇌암 세포의 항원에 특이적으로 결합할 수 있다. 항체 표지된 자기 나노입자는 특이적 항체가 부착된 생체 적합 코팅으로 코팅된 자기 코어를 포함할 수 있다. 예를 들어, 자기 코어는 산화철과 같은 강자성 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생체 적합 코팅은 덱스트란, 카르복실 또는 아민을 포함할 수 있다. 교모세포종의 검출을 위하여, 특이적 항체는 EGFR 또는 유사한 항체일 수 있다.

[0059] 신생혈관 EGFR은 몇가지 형태를 가지며 교모세포종 세포와 정상이 아닌 세포를 포함하는 몇가지 종류의 암세포에 의해 과발현되는 표피생상인자 수용체(EGFR)의 버전이다. EGFR은 현재 교모세포종으로 진단된 환자에 대해 면역치료 임상 시험 중이다. 그것은 자기 릴랙소메트리 검출에 적당한 자기 나노입자와 콘쥬게이트될 수 있고 신체에 주입될 수 있다. 이 자기 나노입자는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 코팅을 포함할 수 있는데, 이는 혈액뇌장벽을 침투하기 위한 표적화된 나노입자의 효율을 증가시킬 것이다. 본 발명의 다른 구체예에서, 부착된 마커를 가지는 자기 나노입자는 혈액뇌장벽을 통해 침투할 수 있는 폴리머 코팅 내에 함유될 수 있고, 다음으로 RF 가열 펄스의 적용 또는 초음파의 사용 시 방출된다. 자기 나노입자에 이 신생혈관 펩티드를 부착하고 세포들에 이것을 부착하는 결과는 신체 내 종양 세포 및 깊이 당 나노입자에 관하여 난소 및 유방으로부터 다른 항체 결과의 사용과 비교할 수 있다. SQUID 센서와 같은 시스템을 사용하는 생체자기 검출 방법은 난소암과 뇌암에 대해 동일한 민감도를 가질 것이다(상기 참고로 포함된 하나 이상의 관련 출원 중에 설명됨). 유방암 및 난소암의 연구 결과는 따라서 뇌암 검출 및 국소화에 직접 사용될 수 있다.

[0060] 췌장암의 검출을 위한 예시적 적용

[0061] 다수의 종양 마커가 췌장암에 존재한다. CA19-9는 이 암에서 상승된 마커의 한 예이지만 매우 민감하지 않고(77%) 비특이적이다(87%). 마커의 조합은 M.D. Anderson Cancer Center에 의해 제안되었고, 이것은 췌장암의 스크리닝을 위해 시험된다. 이 마커는 마이크로RNA이고, miR-21, MiR-210, miR-155 및 miR-196a를 포함한다. 그러나 이 조합은 또한 단지 낮은 감도(64%)를 달성하지만 CA19-9보다 더 큰 특이성(89%)을 이룬다. 게다가, 많은 항체들이 인간 췌장암의 특정 세포주, 예컨대 FG 셀라인에 대해 확인되었고, 이것들은 S3-15, S3-23, S3-41, S3-60, S3-110, 및 S3-53을 포함한다. 다른 확인 마커는 췌장암 및 종양 기조직(stromal) 세포에서 크게 발현된 유로키나아제 플라스미노겐 활성제 수용체(urokinase plasminogen activator receptor : uPAR)이다. 후자의 마커는 누드 마우스에 이종이식으로서 성장시킨 췌장암에 자기 나노입자를 전달하기 위해 사용되었다. 이 마커는 표지된 콘트라스트 촉진제로서 사용될 때 마우스 내 종양의 MRI 검출을 유발하였다. 메커니즘은 주로 종양 내피세포에 나노입자의 전달이다.

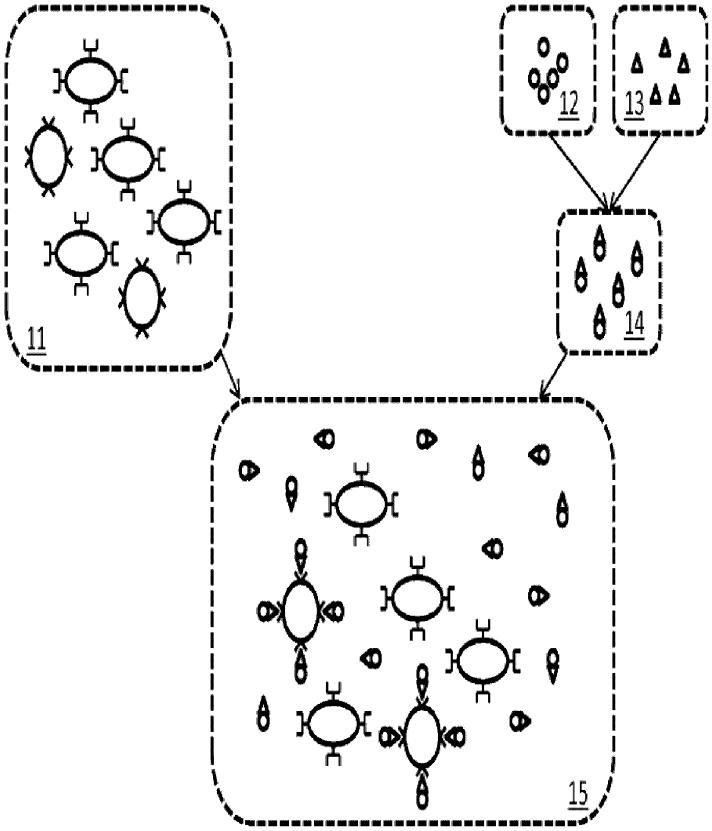
[0062] 췌장암의 진단을 위한 믿을 수 있는 이미징 접근은 없다. 따라서 MRI에 대하여 표적화된 이미징제로서 또는 더 민감한 기술의 자기 릴랙소메트리를 허용하는 바이오마커의 개발은 상당한 발전이다. MRI는 종양 내 작은 이상들을 검출할 수 있고 또한 암이 전이되었는지 여부를 결정하는데 유용하다. 동적 콘트라스트 증강(DCE) MRI는 양성과 암성 종양을 잠재적으로 구별하지만 다수의 위양성(false positive)을 만든다. MRI의 비용은 스크리닝 도구로서 그것의 적용을 제한한다. 종양의 MRI 이미징은 종종 상기 언급한 콘트라스트 촉진제로서 자기 나노입자를 사용하며, 이러한 나노입자의 주입을 위한 표준을 제공하는 용인되는 프로토콜이다. 2mg/kg의 나노입자 중량의 용량으로 혈관내 MRI 콘트라스트 촉진제가 사용되어 전이 병변을 검출하였다. 그러나 췌장암에서 MRI의 사용은 심하게 제한된다.

[0063] 본 발명은 혈관형성(신생혈관) 및 개개의 종양 단계정도에 대해 새로운 대용물을 유발하는 종양 내 미세혈관 구조물의 정량적 추정을 제공할 수 있다. 나노입자를 사용하는 실험적 전립선 암 모델 내 종양 미세혈관의 특징의 연구에서 종양 성장 및 공격성/등급이 종양 신혈관형성과 직접 관계를 가진다는 것이 나타났다. 다른 연구들은 조직의 그램 당 약 2.3mg의 나노입자가 되는 종양 내 자기 입자의 농도를 추정한다. 이 농도는 간내 동맥으로 투여된 방사성 마이크로스피어를 통해 처치를 받는 인간 암 환자의 종양에서 정기적으로 달성되며, 나노입자는 종양의 혈관 성장 고리 내에서 응집하는 경향이 있다. 나노그램이 본 발명에 의한 검출에 적합하다. 생체 내 항체 표지된 나노입자의 잔여 자화의 측정된 진폭은 췌장 암에서 중요한 진단적 도구를 제공할 수 있다. 신호 강도는 종양 세포 표면 상의 항원 밀도에 의존하며, 따라서 나노입자에 의해 생성된 필드 강도는 췌장 종양 세포 상의 항원 부위 밀도 수와 비례한다. 입자 수 및 밀도는 검출된 자기장의 진폭을 제공하도록 결정될 수 있다. 이 정보는 다음에 생체 내 계획에서 뿐만 아니라 사용되는 나노입자의 선택을 보조하는 것에 사용될 수 있다. 췌장암 세포주의 예는 uPAR 항체에 특이적인 것으로 알려진 FG 또는 MIA PaCa-2을 포함한다.

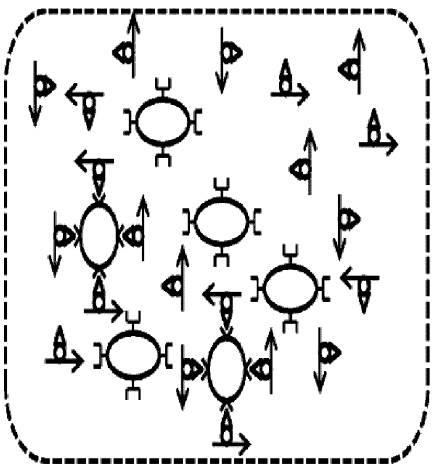
[0064] 본 발명은 다양한 예, 구체예 및 설계 고려사항에 대해서 본 명세서에 설명되었다. 상기 설명은 단지 본 발명의 원리 적용의 예시이며, 특허청구범위에 의해 결정되는 범주는 본 명세서에 비추어 보여 생각된다. 본 발명의 다른 변화 및 변형은 당업자에게 명백할 것이다.

도면

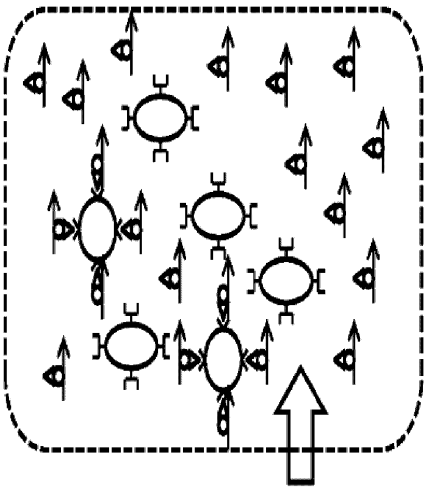
도면1



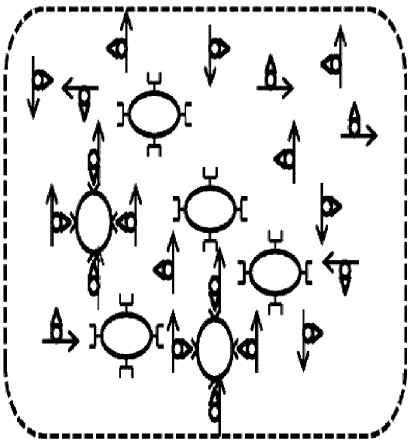
도면2a



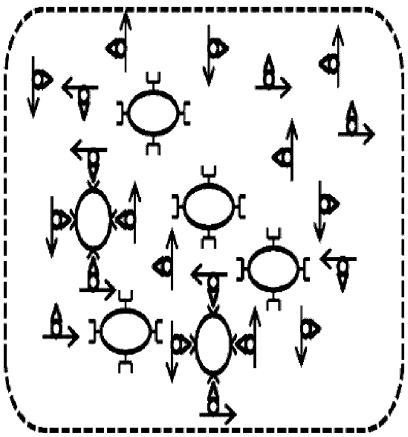
도면2b



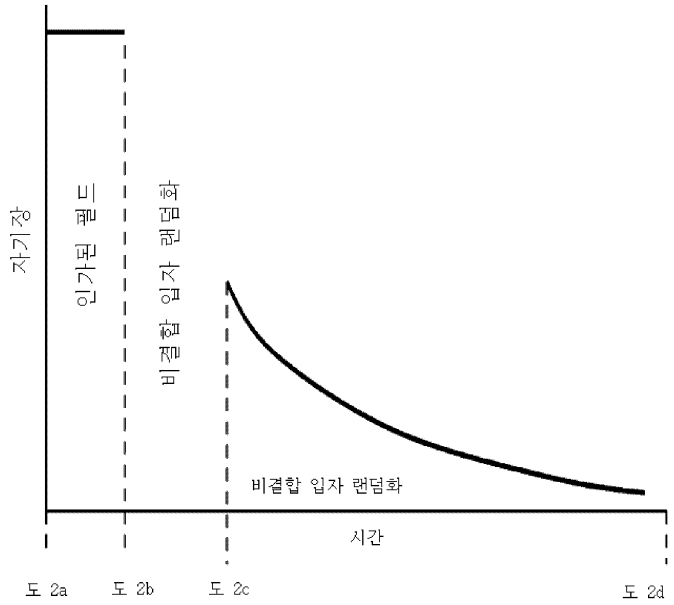
도면2c



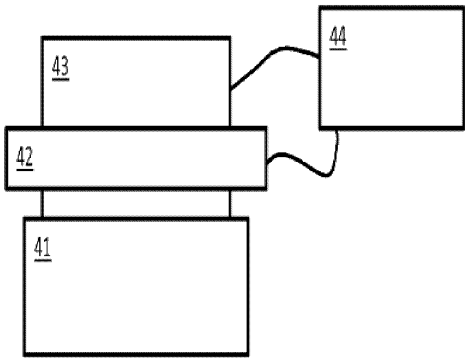
도면2d



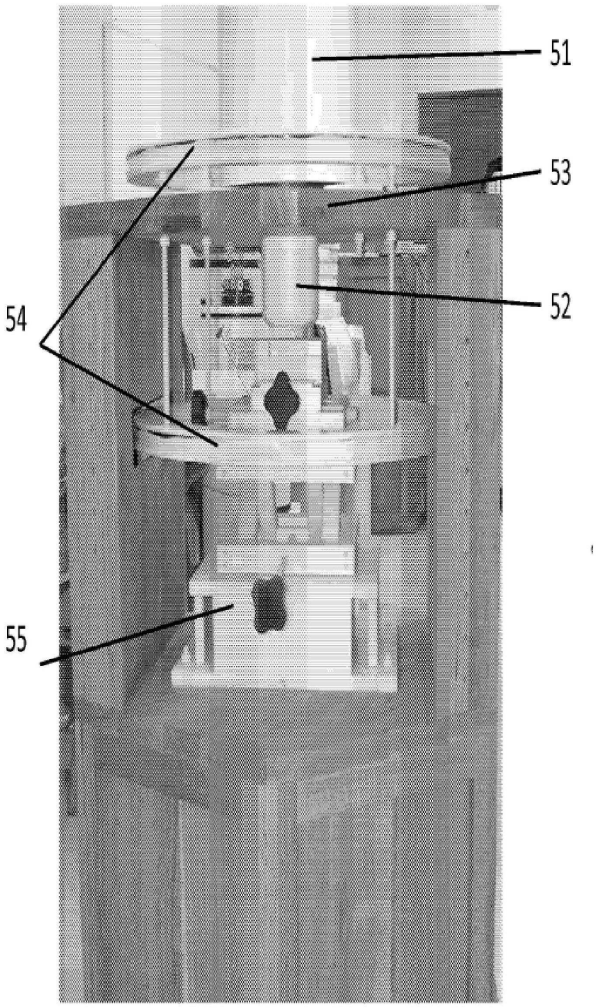
도면3



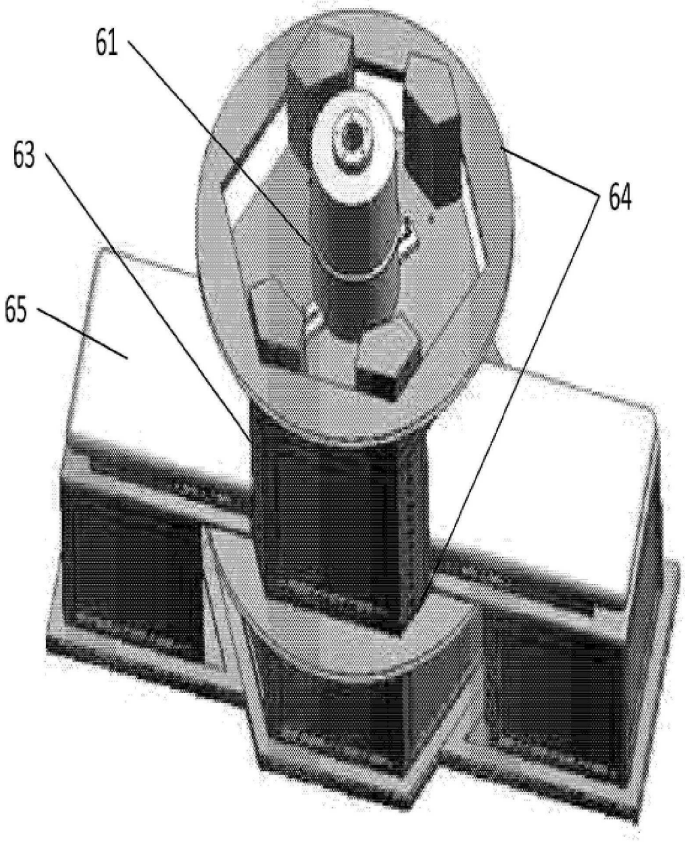
도면4



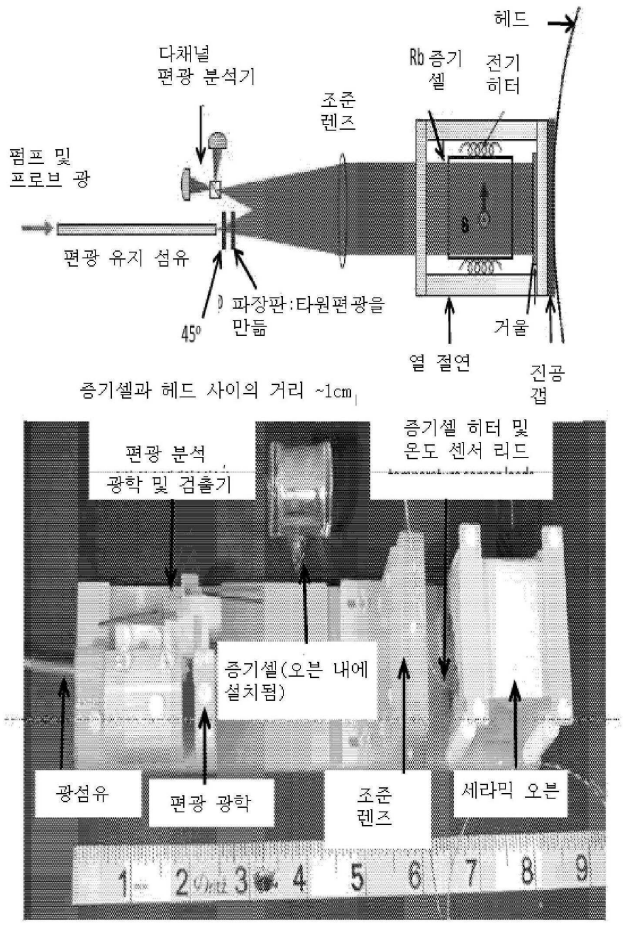
도면5



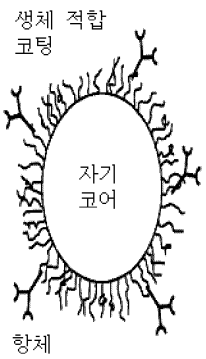
도면6



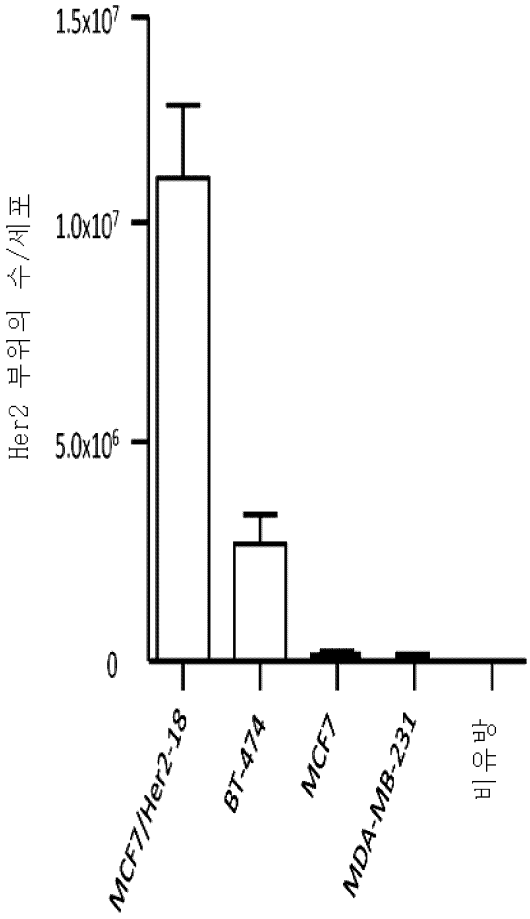
도면7


헤드
다채널
편광 분석기
Rb 증기
셀
전기
히터
조준
렌즈
펌프 및
프로브 광
편광 유지 섬유
파장판:타원편광을
만듦
45°
거울
열 절연
진공
갭
증기셀과 헤드 사이의 거리 ~1cm
편광 분석
광학 및 검출기
증기셀 히터 및
온도 센서 리드
증기셀(오븐 내에
설치됨)
광섬유
편광 광학
조준
렌즈
세라믹 오븐

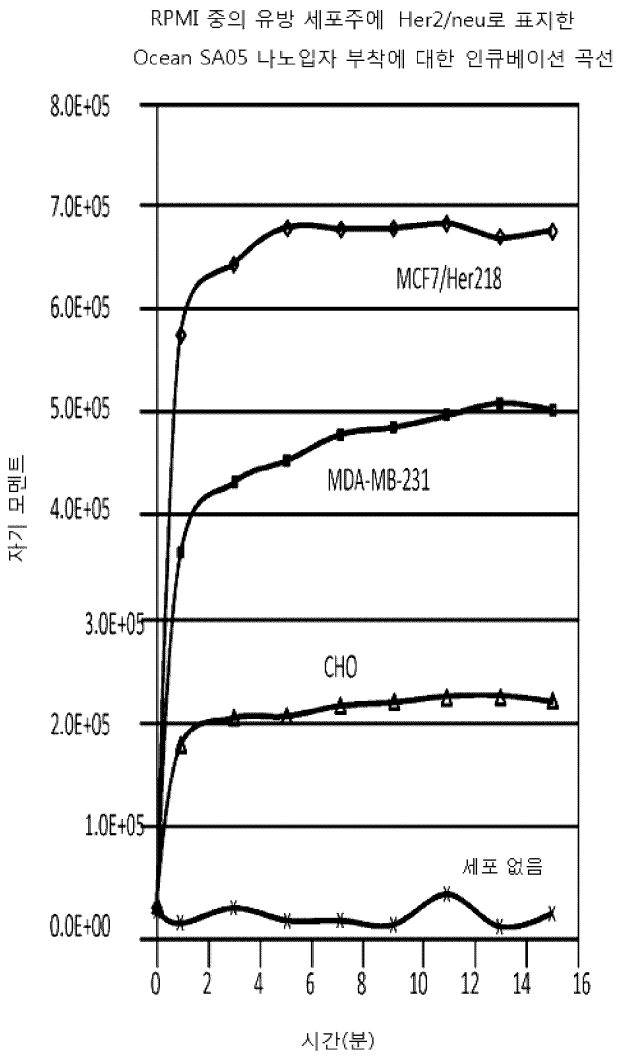
도면8


생체 적합
코팅
자기
코어
항체

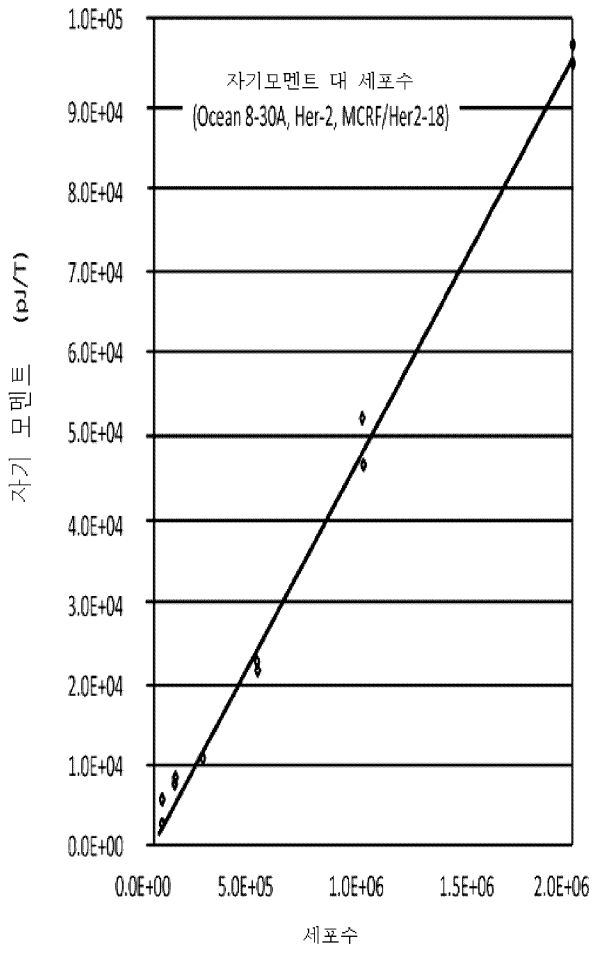
도면9


1.5x10^7
1.0x10^7
5.0x10^6
0
Her2 부위의 수/세포
MCF7/Her2-18
BT-474
MCF7
MDA-MB-231
비 유방

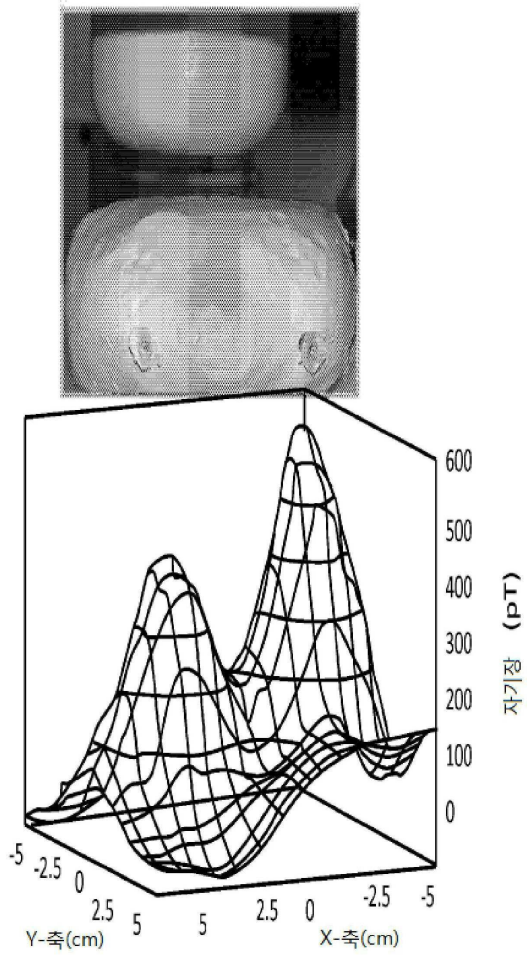
도면10


RPMI 중의 유방 세포주에 Her2/neu로 표지한
Ocean SA05 나노입자 부착에 대한 인큐베이션 곡선
8.0E+05
7.0E+05
6.0E+05
5.0E+05
4.0E+05
3.0E+05
2.0E+05
1.0E+05
0.0E+00
자기 모멘트
MCF7/Her218
MDA-MB-231
CHO
세포 없음
0
2
4
6
8
10
12
14
16
시간(분)

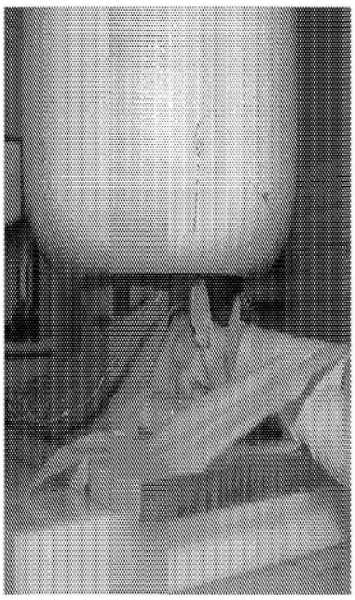
도면11


자기모멘트 대 세포수
(Ocean 8-30A, Her-2, MCRF/Her2-18)
자기 모멘트 (pJ/T)
1.0E+05
9.0E+04
8.0E+04
7.0E+04
6.0E+04
5.0E+04
4.0E+04
3.0E+04
2.0E+04
1.0E+04
0.0E+00
0.0E+00
5.0E+05
1.0E+06
1.5E+06
2.0E+06
세포수

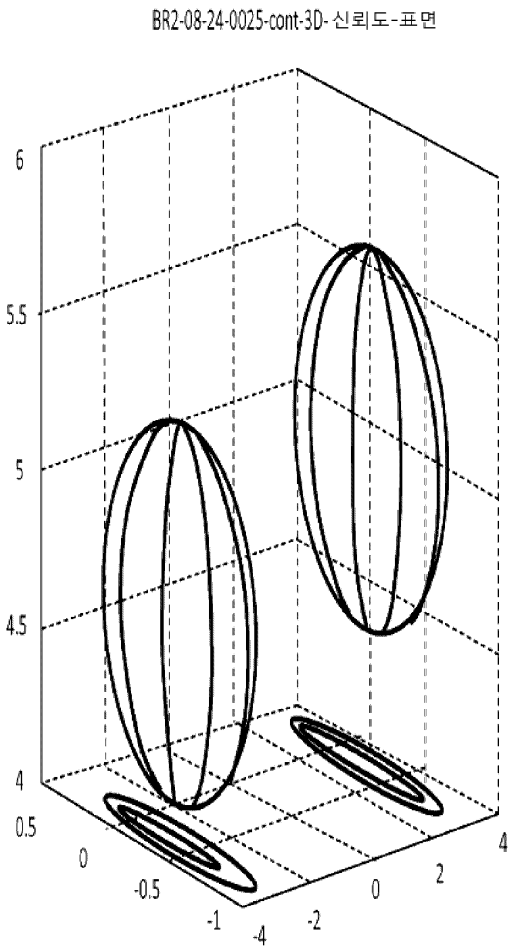
도면12



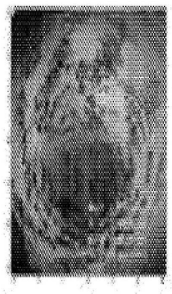
도면13

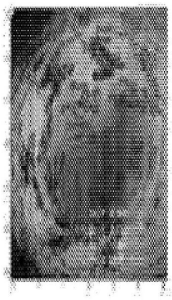


도면14

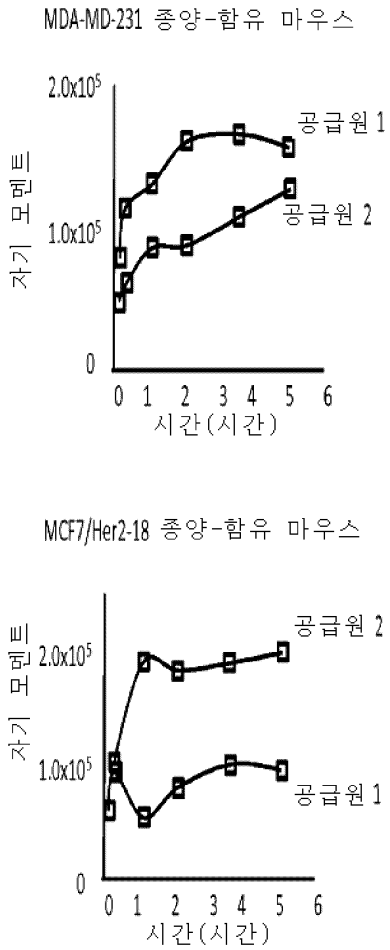


도면15

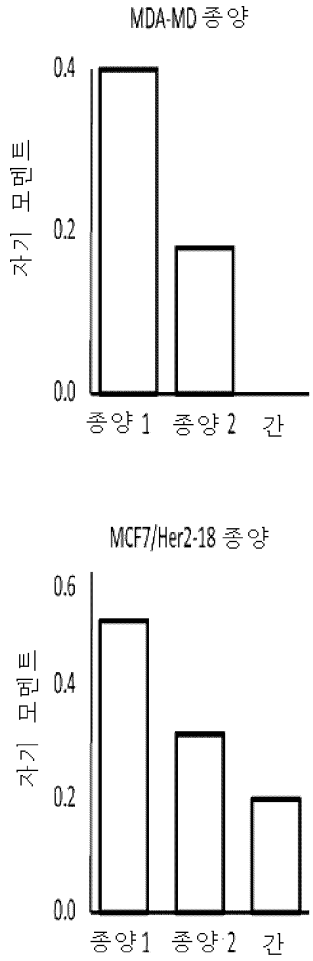




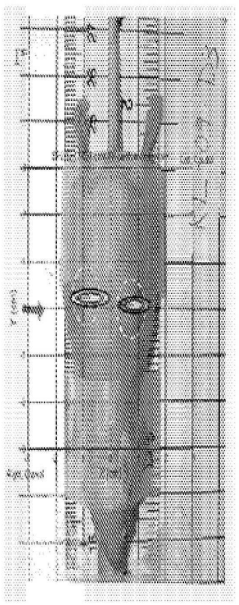
도면16


MDA-MD-231 종양-함유 마우스
2.0x10^5
1.0x10^5
0
자기 모멘트
공급원 1
공급원 2
0 1 2 3 4 5 6
시간(시간)
MCF7/Her2-18 종양-함유 마우스
2.0x10^5
1.0x10^5
0
자기 모멘트
공급원 2
공급원 1
0 1 2 3 4 5 6
시간(시간)

도면17


MDA-MD 종양
자기 모멘트
0.4
0.2
0.0
종양 1
종양 2
간
MCF7/Her2-18 종양
자기 모멘트
0.6
0.4
0.2
0.0
종양 1
종양 2
간

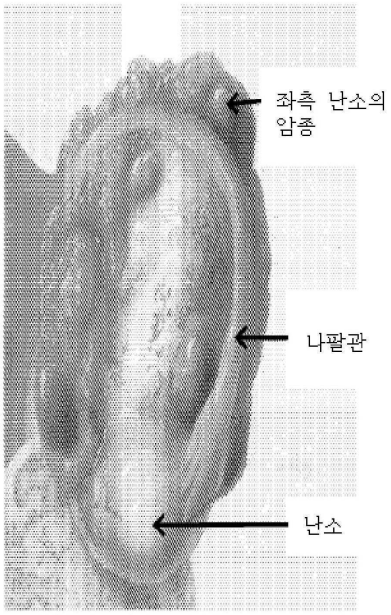
도면18



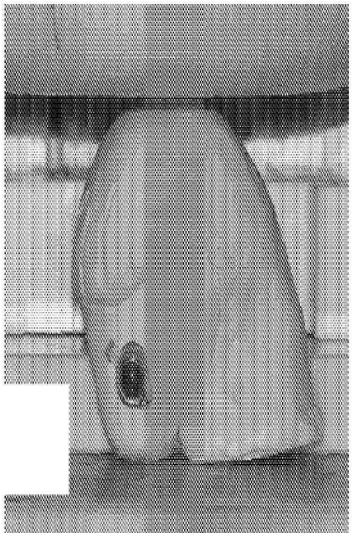
도면19



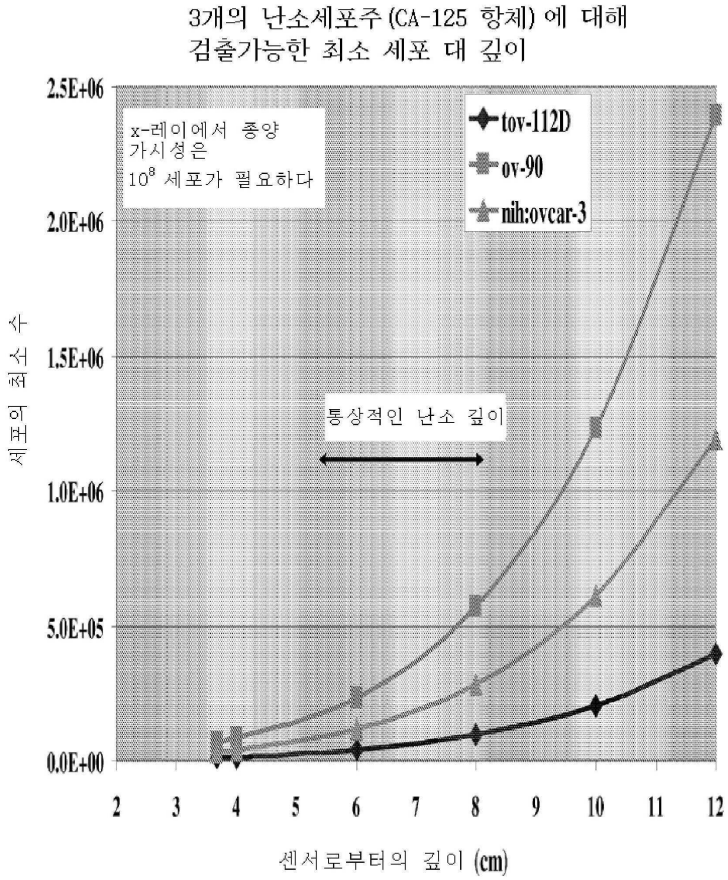
도면20



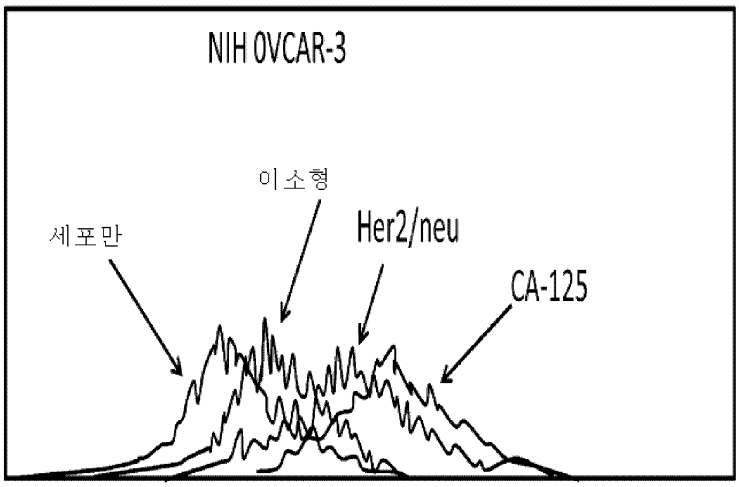
도면21



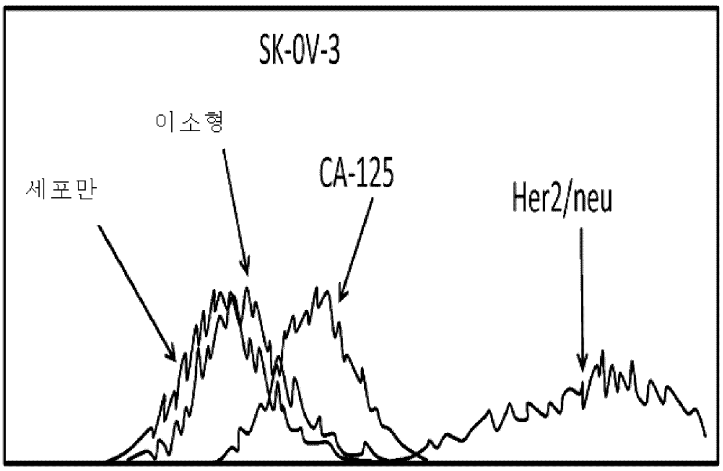
도면22


3개의 난소세포주 (CA-125 항체) 에 대해
검출가능한 최소 세포 대 깊이
x-레이에서 종양
가시성은
10^8 세포가 필요하다
tov-112D
ov-90
nih:ovcar-3
통상적인 난소 깊이
세포의 최소 수
2.5E+06
2.0E+06
1.5E+06
1.0E+06
5.0E+05
0.0E+00
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
센서로부터의 깊이 (cm)

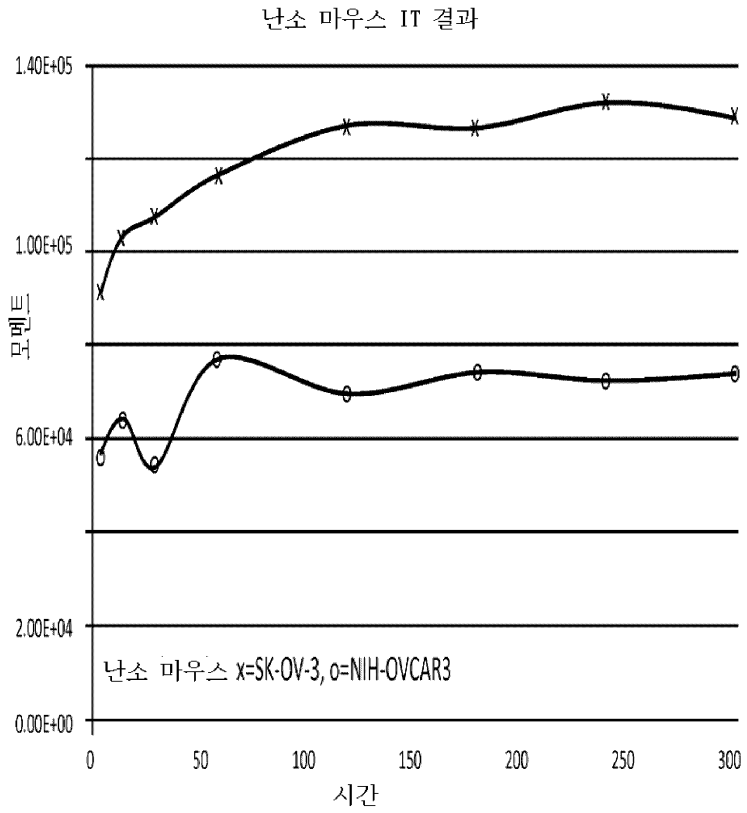
도면23a


NIH OVCAR-3
이소형
세포만
Her2/neu
CA-125

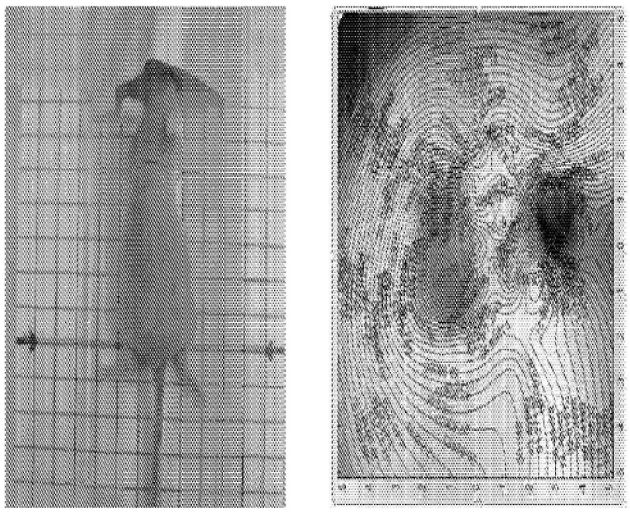
도면23b


SK-OV-3
이소형
세포만
CA-125
Her2/neu

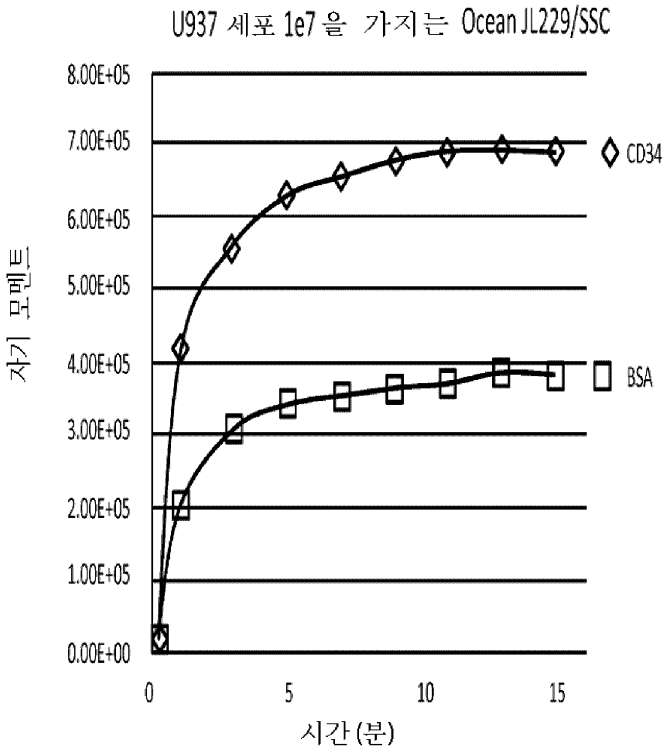
도면24


난소 마우스 IT 결과
1.40E+05
1.00E+05
6.00E+04
2.00E+04
0.00E+00
모멘트
난소 마우스 x=SK-OV-3, o=NIH-OVCAR3
0
50
100
150
200
250
300
시간

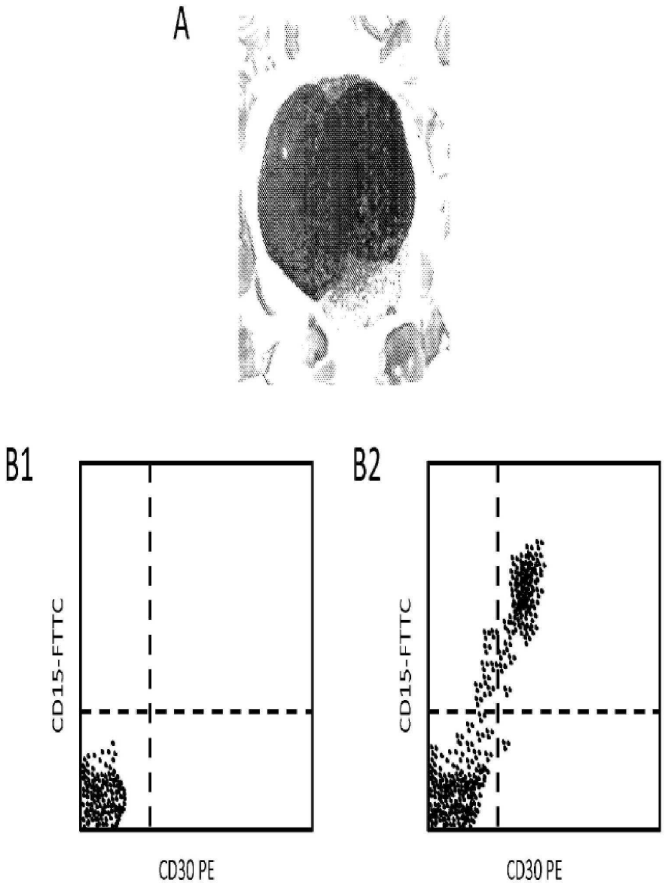
도면25



도면26


U937 세포 1e7 을 가지는 Ocean JL229/SSC
8.00E+05
7.00E+05
6.00E+05
5.00E+05
4.00E+05
3.00E+05
2.00E+05
1.00E+05
0.00E+00
자기 모멘트
0
5
10
15
시간 (분)
CD34
BSA

도면27


A
B1
B2
CD15-FITC
CD30 PE
CD15-FITC
CD30 PE

도면28

