(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0008220
(43) 공개일자 2022년01월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 9/50 (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 9/5004 (2013.01)
A61K 49/0021 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0082522
(22) 출원일자 2021년06월24일
심사청구일자 2021년06월24일
(30) 우선권주장
1020200086106 2020년07월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박경순
강원도 춘천시 방송길 70, 102동 2004호 (온의동, 온의 롯데캐슬 스카이클래스)
김진원
서울특별시 서초구 신반포로3길 19, 60동 306호 (반포동, 주공1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 12 항

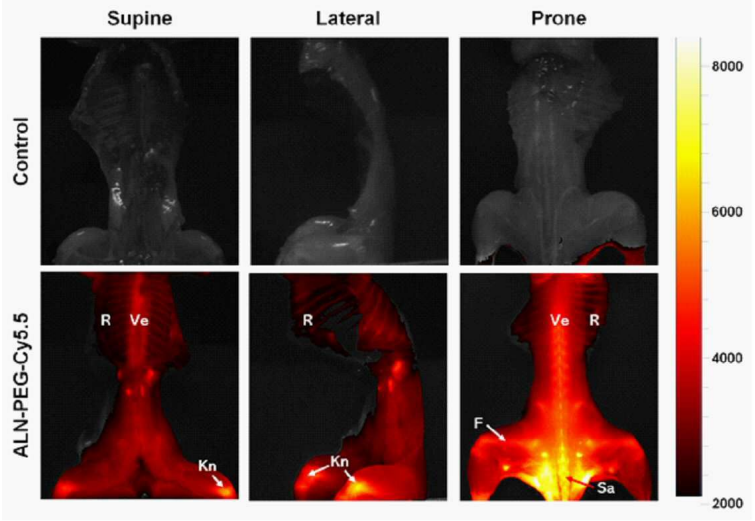
(54) 발명의 명칭 **신규 칼슘 결합 나노프로브 및 이를 포함하는 조영제 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 신규 칼슘 결합 나노프로브 및 이를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 화합물은 칼슘 이온에 대한 선택성 및 결합 특성을 가질 수 있다. 이에 따라, 칼슘 이온을 포함하는 세포 또는 조직에 대한 우수한 친화력으로 인해 이들을 표적하여, 체내에서 장기간 근적외선의 형광을 방출함으로써 뼈 조직, 석회화 경화반(calcific plaque), 또는 골형성 대식세포(osteogenic macrophage) 등을 영상화 할 수 있는 조영제 조성물로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 49/0093 (2013.01)
(72) 발명자
임용근
경기도 군포시 고산로185번길 13, A동 301호(당정동, 대경시실리)
강동오
서울특별시 서초구 서초중앙로24길 33, 104동 1204호(서초동, 서초교대이편한세상)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711126959
과제번호 2019M3A9E2066883
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 고위험 동맥경화반 표적 진단-치료 융합소재 개발
기 여 율 25/100
과제수행기관명 중앙대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711127256
과제번호 2019M3A9E2066882
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 관상동맥내 파열 고위험 동맥경화반 영상진단 및 광치료 생체내 평가
기 여 율 25/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711131952
과제번호 2018R1A2B3002001
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 혈관내 고위험 동맥경화반 진단-치료 융합기법 개발
기 여 율 50/100
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

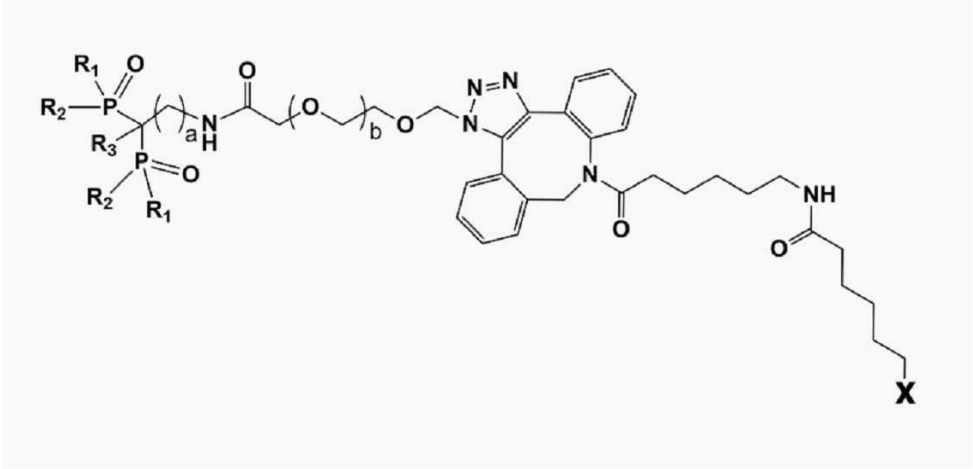
명 세 서

청구범위

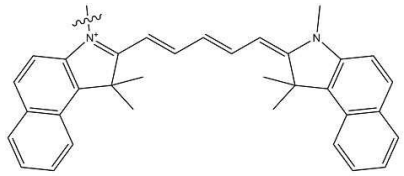
청구항 1

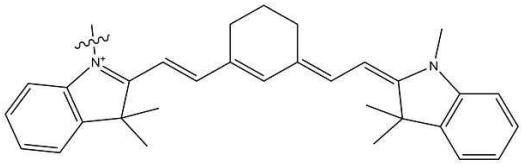
하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염:

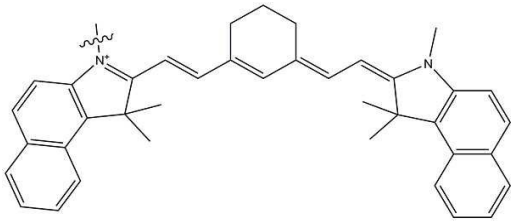
[화학식 I]



상기 화학식 I에서

X는 ,

, 및

로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나이고;

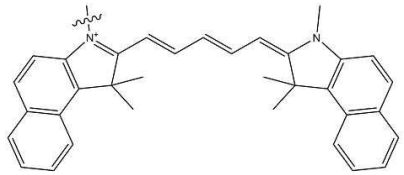
a는 1 내지 5의 정수이고;

b는 4 내지 450의 정수이고; 및

R_1, R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 -OH, $-O^-$ 또는 $-OR_c$이고, R_c는 C_1 내지 C_3의 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

X는  인 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 화학식 I에서 a는 3인 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 화학식 I로 표시되는 화합물은 자가 조립되어 나노입자를 형성하는 것인, 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 나노입자의 크기는 50 내지 500 nm인 것인. 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조영제 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 근적외선(near-infrared, NIR)의 형광을 방출하는 것인, 조영제 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 칼슘 이온과 결합하는 것인, 조영제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 뼈 조직, 석회화 경화반(calcific plaque), 또는 골형성 대식세포(osteogenic macrophage)를 표적화하는 것인, 조영제 조성물.

청구항 10

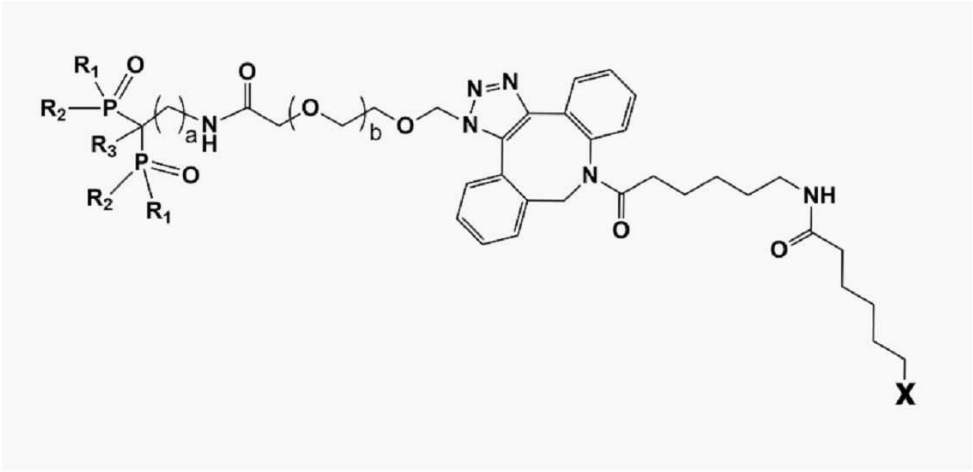
제9항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 동맥경화성 석회화(atherosclerotic calcification) 또는 중막성 석회화(medial calcification)으로부터 선택되는 혈관 석회화 관련 질환의 진단용인, 조영제 조성물.

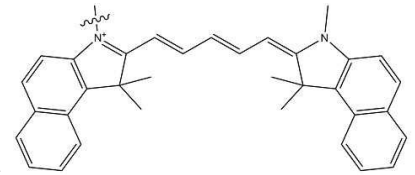
청구항 11

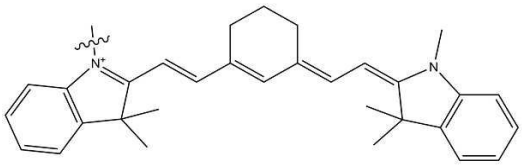
하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 나노입자:

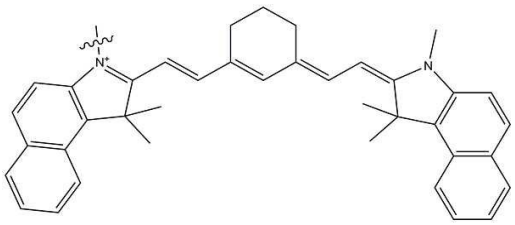
[화학식 I]



상기 화학식 I에서

X는 ,

, 및

로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나이고;

a는 1 내지 5의 정수이고;

b는 4 내지 450의 정수이고; 및

R_1, R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 -OH, $-O^-$ 또는 $-OR_c$이고, R_c는 C_1 내지 C_3의 알킬이다.

청구항 12

제11항에 따른 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조영제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 칼슘 결합 나노프로브 및 이를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 동적인 조직인 뼈는, 조골 세포(osteoblast)에 의한 무기질화와 파골 세포(osteoclast)에 의한 탈무기질화 사이의 균형을 통해 모델링과 리모델링을 거친다. 또한, 조골 세포-유사 세포가 혈관벽에서 관찰되고, 혈관 석회화

는 심혈관 질환에서 주요한 문제를 나타낸다. 중요하게도, 히드록시 아파타이트 (hydroxyapatites, HAps)는 조골세포에 의해 생성되는 뼈 조직 및 석회화 혈관 세포의 주요 무기 미네랄이다. 따라서, 세포 및 뼈 조직에서의 히드록시 아파타이트는 약물 전달 및 영상화에 대한 매력적인 표적이다.

[0003] 비스포스포네이트는 2가 양이온과 각 포스포네이트 기의 산소 원자의 배위를 통해 히드록시 아파타이트에 강력하게 결합한다. 이들의 강력하고 선택적인 친화력은 뼈 조직 영상화를 위한 특이적인 표적 리간드로서의 사용으로 이어졌다. 지금까지, 근적외선 형광 (near-infrared fluorescence, NIRF)을 방출하는 뼈 표적 이미징 조영제로 테트라 사이클린 유도체 또는 비스포스포네이트를 포함하는 뼈 표적 리간드를 IRDye78, IRDye800CW, Alexa Fluor 647, ZW800-1, P700 및 P800과 같은 NIR 염료와의 화학적 결합으로 개발되어 왔다. 이들의 화학적 구조와 특성에 기초하여, 이들은 근적외선 형광체에 설페이트 기의 존재로 인해 수용액에 잘 녹는다. 근적외선 형광체는 생체 조직으로부터 자가형광(autofluorescence)에 의한 간섭을 최소화할 수 있으며, 자외선-가시광선(Ultraviolet-Visible) 영역에서 뼈의 광자 산란을 최소화 할 수 있기 때문에, 근적외선 형광체-기반 뼈 이미징 조영제는 *in vivo* 뼈 영상을 위한 최적의 형광체이다.

[0004] 최근 몇몇 연구자들은 뼈 표적 영상화 및 약물 전달을 위해 알렌드로네이트(Alendronate)를 탄소 양자점(Carbon dot) 및 플루오레세인 5(6)-이소 티오시아네이트 (fluorescein 5(6)-isothiocyanate, FITC) 또는 로다민 B 이소티오시아네이트 (rhodamine B isothiocyanate, RITC) 로 표지된 나노 다이아몬드와 화학적으로 결합함으로써 나노입자 크기의 형광 프로브를 개발하였다.

[0005] 그러나, 이들의 보고에서, 뼈 표적화를 위한 나노입자 프로브들의 형광 파장은 가시광선 스펙트럼 범위 내에 있기 때문에, 이들 나노입자 프로브들은 가시광선 영역에서의 자가형광 및 광자산란의 간섭을 피할 수 없다.

[0006] 한편, 혈관 석회화(vascular calcification, VC)는 정상적인 노화과정에서 뿐만 아니라 당뇨병, 동맥경화증 및 만성 신장질환에서 병리학적으로 발생한다. 혈관 석회화는 2 종류의 독특한 패턴이 확인되었는데, 그 중 하나인 중막성 석회화(medial calcification)는 평활근 세포의 조골세포-유사 세포로의 표현형 형질전환과 관련하여 혈관의 중막에서 발생하는 반면에, 다른 하나인 죽종형성(atherogenesis)은 지질-함유 대식세포 및 내막 증식증(intimal hyperplasia)과 관련이 있다.

[0007] 내막 벽 석회화는 비교적 젊은 만성 신부전 환자에게서 발생할 수 있으며, 신장 질환이 없어도 진성 당뇨병을 앓고 있는 환자에게 보편적으로 나타난다. 동맥의 내막 벽내 칼슘의 존재 여부에 따라, 상기 종류의 혈관 석회화를 죽상경화증 관련 혈관 석회화와 구별한다. 죽상경화성 혈관 석회화는 동맥의 내막 층을 따라 죽종 플라크에서 발생된다. 석회화는 보통 크고 상당히-진행된 병변에서 가장 크게 나타나며, 연령에 따라 증가한다. 죽상경화증 환자의 동맥 석회화 정도는 일반적으로 질환의 중증도에 부합한다. 내막 벽 석회화와는 달리, 죽상경화성 혈관 병변은 칼슘 함유 여부와는 상관없이 동맥 내강을 침범하여 혈류를 방해한다. 산화 지질 및 기타 산화성 스트레스로 인한 염증 및 단핵구 및 대식세포에 의한 침윤 때문에 죽상경화성 플라크 내에서 칼슘의 국소 침착이 일어날 수도 있다.

[0008] 이러한 혈관 석회화 관련 질환의 진단을 위한 나노프로브는 전무하므로, 이에 대한 개발이 필요한 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 새로운 칼슘 결합 근적외선 나노프로브를 설계하고 칼슘 함유 무기 미네랄과의 결합력, *in vitro* 칼슘 수준 검출, *in vivo* 뼈 조직의 표적 특성, *in vivo* 혈관 내 석회화 경화반(calcific plaque)의 표적 특성을 평가하였으며, 이에 기초하여 본 발명을 완성기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 등록특허공보 제10-1469156호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 고안된 것으로, 본 발명은 칼슘 이온과의 강한 결합력을 기반으로 세포내 칼슘 이온 검출, *in vivo* 뼈 조직의 표적 및 *in vivo* 혈관 내 석회화 경화반의 표적이 가능

한 신규 칼슘 결합 근적외선 나노프로브 및 이를 포함하는 조영제 조성물의 제공을 목적으로 한다.

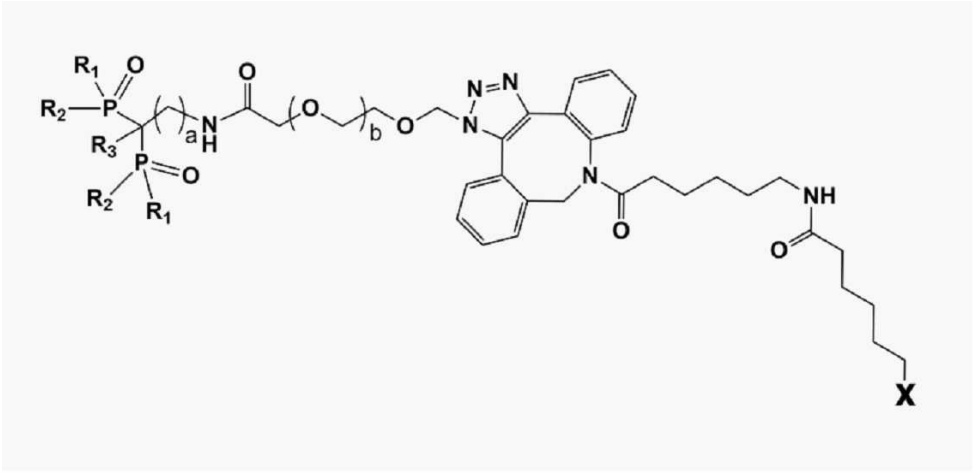
[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

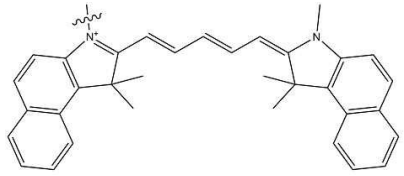
[0013] 이하, 본 발명의 구현예를 상세히 설명하기로 한다. 다만, 이는 예시로서 제시되는 것으로, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않으며 본 발명은 후술할 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

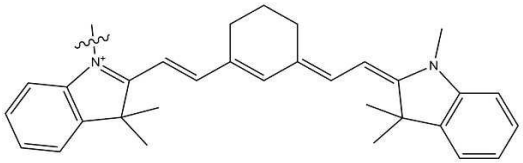
[0014] 본 발명의 일 구현예에서 하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 제공한다:

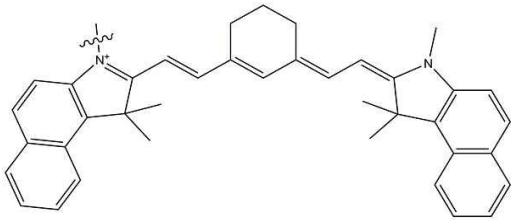
[0015] [화학식 I]

[0016] 

[0017] 상기 화학식 I에서

[0018] X는 ,

[0019] , 및

[0020] 로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나이고;

[0021] a는 1 내지 5의 정수이고;

[0022] b는 4 내지 450의 정수이고; 및

[0023] R_1, R_2 및 R_3는 각각 독립적으로 -OH, $-O^-$ 또는 $-OR_c$이고, R_c는 C_1 내지 C_3의 알킬이다.

[0024] 상기 화학식 I의 화합물은 알렌드로네이트(Alendronate), 폴리에틸렌글리콜 및 사이아닌(Cyanine) 계열 형광체가 표지된 디벤조사이클로옥틴이 클릭 케미스트리를 통해 접합된 양친매성 칼슘 표적형 근적외선 형광 화합물이다.

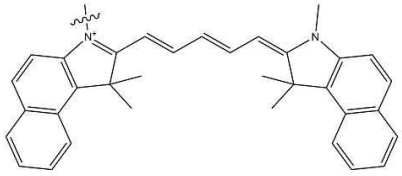
[0025] 알렌드로네이트는 비스포스포네이트 계열의 일 종류로 산소 원자의 배위를 통해 히드록시 아파타이트의 칼슘에 강하게 결합함으로써 상기 화학식 I의 화합물이 뼈에 대한 표적 능력을 갖게 한다. 즉, 상기 알렌드로네이트의 비스포스포네이트 기는 표적 리간드(targeting ligand)로 작용하여 뼈(골) 조직과 강한 결합 능력을 갖는다. 통상적인 반응을 통해 직접 또는 간접적으로 공유 또는 비공유 방식으로 결합되는 것을 포함할 수 있으며, 예를 들어 이온결합, 정전기적 결합, 수소 결합, 공유결합, 또는 반데르발스 결합을 통해 결합되는 것을 포함할 수 있다. 이를 통하여, 상기 화학식 I의 화합물은 신규의 칼슘 결합 근적외선 나노프로브로 적용될 수 있다.

[0026] 친수성인 폴리에틸렌글리콜은 상기 화학식 I의 화합물이 구조적 안정성을 가질 수 있도록 알렌드로네이트와 형광물질을 연결시키는 역할을 수행한다. 또한, 생체적합성인 폴리에틸렌글리콜은 나노프로브의 독성 감소 및 체내 순환 시간을 증가시키는 역할을 수행한다.

[0027] 디벤조사이클로옥틴은 클릭 케미스트리를 통해 알렌드로네이트-폴리에틸렌글리콜과 사이아닌 염료를 연결시키는 역할을 수행한다.

[0028] 근적외선 형광체는 근적외선 파장에서 형광을 나타내는 염료(dye)를 의미한다. 상기 근적외선은 적외선 영역의 전자파 중 파장이 짧은 영역을 의미하며, 이에 제한되지 않지만 일반적으로 약 670 nm ~ 900 nm의 파장 영역을 나타낸다. 분자의 회전 진동 스펙트럼은 대체로 상기 범위 안에서 나타나므로 분자 구조 연구에 중요한 파장 범위로 여겨지고 있다. 근적외선은 가시광선에 비해 피부 투과도가 좋아, 피하층의 혈관 또는 장기 등을 보기 위한 분자 영상이미지를 획득하거나, 수술과정 중 신경 또는 혈관과 같은 민감한 부분에 대한 가이딩(guiding)에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

[0029] 사이아닌 염료는 상기 화학식 I의 화합물이 근적외선(near-infrared, NIR)의 형광을 방출할 수 있게 한다.

[0030] 구체적인 일 실시 양태에서 X는  이다.

[0031] 일 실시 양태에서, 상기 a는 3인 것일 수 있다.

[0032] 다른 실시 양태에서, 상기 b는 4 내지 450인 것일 수 있다.

[0033] 바람직한 실시 양태에서, 상기 b는 4 내지 350인 것일 수 있다.

[0034] 보다 바람직한 실시 양태에서, 상기 b는 4 내지 250인 것일 수 있다.

[0035] 보다 더 바람직한 실시 양태에서, 상기 b는 4 내지 150인 것일 수 있다.

[0036] 상기 b가 4 미만인 경우 분자 내 존재하는 친수성기가 소수성기에 비해 지나치게 적어 자가조립이 원활하게 발생할 수 없고, 상기 b가 450 초과인 경우 나노프로브의 크기가 지나치게 커지고 분자 내 존재하는 친수성기가 소수성기에 비해 지나치게 많아 자가조립이 원활하게 발생할 수 없는 등의 문제점이 발생할 수 있다.

[0037] 다른 실시 양태에서, R_1, R_2 및 R_3는 -OH, $-O^-$ 또는 $-OR_c$이고, R_c는 C_1 내지 C_3의 알킬이다.

[0038] 바람직한 일 실시 양태에서, R_1 및 R_2는 각각 독립적으로 -OH 또는 $-O^-$이고, R_3는 -OH이다.

[0039] 상기 화학식 I의 화합물은 소수성을 갖는 Cy 염료 표지된 디벤조사이클로옥틴과 친수성을 갖는 알렌드로네이트와 폴리에틸렌글리콜에 의해 양친매성을 가짐에 따라 자가 조립(self-assembly)되어 나노입자를 형성하게 된다.

[0040] 상기 나노입자의 크기는 50 내지 500 nm인 것이 바람직하다.

[0041] 다른 실시 양태에서, 상기 나노입자의 크기는 50 내지 400 nm인 것일 수 있다.

[0042] 바람직한 실시 양태에서, 상기 나노입자의 크기는 100 내지 350 nm인 것일 수 있다.

[0043] 보다 바람직한 실시 양태에서, 상기 나노입자의 크기는 200 내지 300 nm인 것일 수 있다.

[0044] 상기 나노입자의 크기가 50 nm 미만인 경우 자가 조립의 강도가 약하여 나노입자의 물리적 형태를 유지함에 있어 어려움이 존재할 수 있고, 상기 나노입자의 크기가 500 nm를 초과하는 경우, 표적에 나노입자가 도달하는데

어려움이 존재하여 나노입자를 활용하여 뼈를 조영함에 있어 어려움이 발생할 수 있다.

[0045] 본 발명에서, 약학적으로 허용가능한 염은 의약업계에서 통상적으로 사용되는 염을 의미하며, 예를 들어 칼슘, 포타슘, 소듐 및 마그네슘 등으로 제조된 무기이온염, 염산, 질산, 인산, 브롬산, 요오드산, 과염소산 및 황산 등으로 제조된 무기산염; 아세트산, 트라이플루오로아세트산, 시트르산, 말레인산, 숙신산, 옥살산, 벤조산, 타르타르산, 푸마르산, 만데르산, 프로피온산, 젖산, 글리콜산, 글루콘산, 갈락투론산, 글루탐산, 글루타르산, 글루쿠론산, 아스파르트산, 아스코르브산, 카본산, 바닐릭산, 하이드로 아이오딕산 등으로 제조된 유기산염; 메탄설폰산, 에탄설폰산, 벤젠설폰산, p-톨루엔설폰산 및 나프탈렌설폰산 등으로 제조된 설폰산염; 글리신, 아르기닌, 라이신 등으로 제조된 아미노산염; 및 트리메틸아민, 트라이에틸아민, 암모니아, 피리딘, 피콜린 등으로 제조된 아민염 등이 있으나, 열거된 이들 염에 의해 본 발명에서 의미하는 염의 종류가 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 다른 구현예에서 상기 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조영제 조성물을 제공한다. 상기 조영제 조성물은 체내 혈관을 순환하여 칼슘, 구체적으로 칼슘 이온과 결합할 수 있는 알렌드로네이트에 의해 칼슘을 포함하는 조직 또는 세포와 결합하여 근적외선의 형광을 방출하는 것일 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 뼈 조직, 석회화 경화반(calcific plaque), 또는 골형성 대식세포(osteogenic macrophage)를 표적화할 수 있다.

[0048] 상기 조영제 조성물은 동맥경화성 석회화(atherosclerotic calcification) 또는 중막성 석회화(medial calcification)로부터 선택되는 혈관 석회화 관련 질환의 진단용도로 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 용어 “석회화 경화반(calcific plaque)”은 혈관 내에 콜레스테롤과 같은 지방질로 이루어진 퇴적물인 경화반(plaque)에 칼슘이 유입 및 침착되어 형성된 침착물 또는 석회질을 의미할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 용어 ”골형성 대식세포(osteogenic macrophage)“는 RANKL(Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand)로 유도된 대식세포를 의미할 수 있으며, 구체적으로 대식세포를 RANKL로 처리하여 형성할 수 있다. 보다 구체적으로, RANKL로 처리하여 파골세포의 특성을 갖게 된 대식세포는 주변으로부터 칼슘 미네랄 섭취를 촉진하게 된다. 구체적인 예로, 뼈에서 대식세포가 파골세포 특성을 갖게 될 경우 칼슘 미네랄이 풍부한 뼈의 소실을 촉진할 수 있다. 다만, 뼈 이외의 부위에서는 "이소성(ectopic)" 파골세포 특성을 획득하게 될 경우, 세포내 칼슘 입자가 증가함에 따라 결과적으로 주변의 석회화를 촉진하므로, 골형성능을 가진다고 표현할 수 있으며, 이에 따라, ” 골형성 대식세포”로 표현할 수 있다.

[0051] 본 발명에서 용어, "혈관 석회화(vascular calcification)"는 혈관 내에 세포외성 기질(matrix)인 수산화인회석(hydroxyapatite)(인산 칼슘) 결정 침착물(crystal deposits)의 형성, 성장 또는 침착을 의미할 수 있다.

[0052] 상기 혈관 석회화 관련 질환은 혈관 내에서 혈관 세포의 사멸 또는 석회화로 인해 발생하는 질환을 의미할 수 있고, 동맥경화성 석회화(atherosclerotic calcification) 또는 중막성 석회화(medial calcification)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 동맥경화성(죽상경화성) 석회화 동맥의 내막층을 따라 죽종성 플라크(artheromatous plaques)내에 발생하는 혈관 석회화를 의미할 수 있다. 또한, 상기 중막성 석회화, 중막벽 석회화(medial wall calcification) 또는 뫼켄베르그 경화증(Moenckeberg's sclerosis)은 동맥 중막벽 내에 칼슘의 존재에 의해 특징지어진 석회화를 의미할 수 있다. 석회질의 침착으로 인해 석회화가 진행되며 혈관, 관절, 유방 등 다양한 부위에서 다양한 질환으로 매개될 수 있고, 암으로 진행되는 경우도 있다.

[0054] 상기 조영제 조성물은 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화 될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 바람직하게는 본 발명의 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 멸균 수용액 또는 현탁액을 포함하며, 멸균 수용액 또는 현탁액의 다양한 제조기술이 당업계에 공지되어 있다. 상기 멸균 수용액 또는 현탁액은 또한 약학적으로 허용되는 완충제, 안정제, 항산화제 및 염화나트륨과 같은 전해질을 포함할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 직접 주사되거나 대용량의 비경구 제형과 혼합될 수 있다.

[0055] 경구 투여용 제형은 매우 다양할 수 있으며, 이는 당업계에 공지되어 있다. 상기 경구 투여용 제형은 진단적 유효량의 본 발명에 따른 조영제 조성물을 포함하는 수용액 또는 현탁액을 포함한다. 상기 경구 투여용 제형은 선택적으로 완충제, 계면활성제, 보조제(adjuvant), 요변성제(thixotropic agent) 등을 포함할 수 있다. 또한 경구 투여용 제형은 향미료 및 기타 관능성을 증가시키기 위한 성분을 포함할 수 있다.

[0056] 상기 조영제 조성물은 이에 제한되지는 않지만, 액체, 현탁액, 페이스트, 분말, 농축액, 적절한 농도로 혼합하

기 위한 과립화 분말 또는 고체 형태를 포함한 여러 가지 형태를 가질 수 있다. 예컨대, 본 발명에 따른 조영제 조성물은 주사제, 경피 투여용 제제, 삽관용 제제, 경구용 제제, 직장투여용 제제의 형태로 제조될 수 있으며, 바람직하게는 주사제, 더욱 바람직하게는 정맥 주사제일 수 있다.

[0057] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 이미징 영상의 목적하는 조영 효과를 달성하는데 유효한 양으로 투여된다. 그러한 투여량은 영상 절차의 대상인 기관 또는 조직, 사용되는 영상 장치 등에 따라 광범위하게 변할 수 있다. 예를 들어, 조영제 조성물로서 사용하기 위한 투여 농도는 0.1 mM 내지 1 M이 될 수 있다.

[0058] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 영상 진단 분석의 통상적인 방식으로 사용된다. 예를 들어, 상기 조영제 조성물은 포유동물에 전신적으로 또는 영상화되는 기관 또는 조직에 국부적으로, 적절한 시각화를 제공하는데 충분한 양으로 투여한 다음, 포유동물을 형광 촬영할 수 있다.

[0059] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 당해 분야의 기술자에게 공지된 근적외선 형광 영상 (NIR imaging) 방법으로 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 예를 들어 근적외선 광학영상 측정 장치(NIR optical imaging system)를 이용하여 영상을 촬영하고, 형광 분광계(Fluorescence Spectrophotometer; FluoroMate FS-2)를 이용하여 근적외선 형광 스펙트럼을 측정할 수 있다.

[0060] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 추가적으로 안정화제를 포함할 수 있다. 상기 안정화제는 임의의 유체, 반-유체 또는 고체를 포함하는, 물질의 점도를 변경시키는 임의의 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 적합하게 사용되는 안정화제로는, 제한되지는 않지만, 셀룰로오스, 젤라틴, 천연 하이드로콜로이드, 벤토나이트, 로커스트 빈 검 또는 영상 공정을 용이하게 하도록 물질의 점도를 적절히 변경시키는 임의의 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 조영제 조성물 내 사용에 적합한 천연 하이드로콜로이드는, 제한되지는 않으나, 카라기난, 알긴산염, 한천, 아가로오스, 푸셀란(fucellan) 및 크산탄 검과 같은 천연 해초 추출물; 구아 검, 로커스트빈 검, 타라검, 타마린드 검 및 프실리움(psillium) 검과 같은 천연 시드(seed) 검; 아카시아, 트라가칸트, 카라야 및 가티(ghatti) 검과 같은 천연 식물 삼출물; 저-메톡실 펙틴 및 고-메톡실 펙틴과 같은 천연 과일 추출물; 천연 및 정제 클레이를 포함한다. 본 발명에 따른 조영제 조성물은 이에 한정되지 않지만, 조성물 중 약 0.001 중량% 내지 약 70 중량%의 안정화제를 포함할 수 있고, 바람직하게 약 0.05 중량% 내지 약 25 중량%의 안정화제, 더욱 바람직하게약 0.1 중량% 내지 약 10 중량%의 안정화제를 포함할 수 있다.

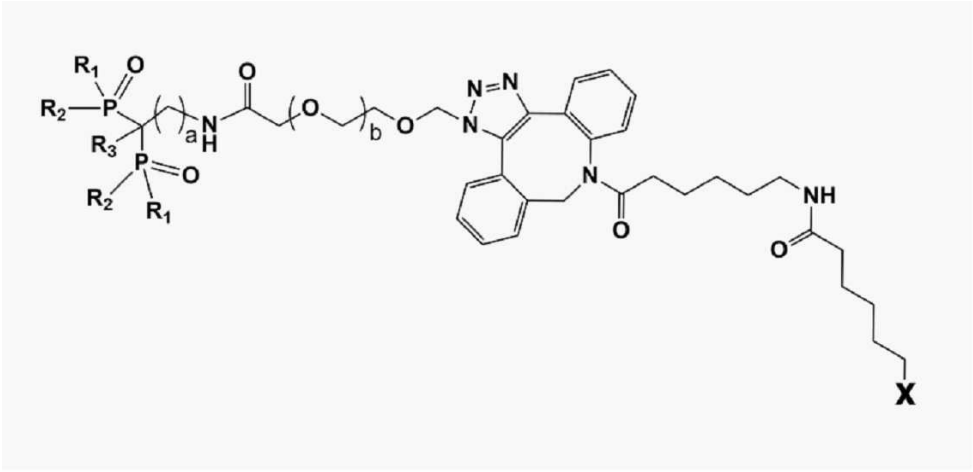
[0061] 본 발명에 따른 조영제 조성물은 신체로부터 해부학상 부분 내로의 유체의 전달을 촉진시키고, 신체에 의한 해부학상 부분 내 유체의 재흡수를 적어도 실질적으로 억제하는 삼투제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 삼투제는 이에 제한되는 것은 아니지만 당계(sugar based) 화합물을 포함한다.

[0062] 상기 당계 화합물은 이에 제한되는 것은 아니지만, 수크로오스, 글루코오스, 프럭토오스(fructose), 만니톨, 만노오스, 갈락토오스, 알도헥소오스(aldohexose), 알트로오스(altrose), 탈로오스(talose), 소르비톨,크실리톨, 락토오스, 비이온성 시드 폴리사카라이드, 하나의 갈락토오스 단위에 의해 각각의 만노오스에서 브랜칭으로 그루핑하는 직쇄 만난(mannan), 베타-D-man, 알파-D-gal, D-glcA, D-gal A, L-gul, 베타-D-man, 알파-Dgal(4:1), D-글루쿠론산, D-갈락투론산, 및 L-글루쿠론산을 포함하는 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 폴리사카라이드를 포함한다. 본 발명에 따른 조영제 조성물은 약 0.005 중량% 내지 약 20 중량%의 삼투제를 포함할 수 있고, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 5 중량%의 삼투제를 포함할 수 있다.

[0063] 조합되어 사용될 경우, 안정화제 및 삼투제는 상승 작용하여 진단 영상과 같은 의료 진단 절차에서 사용을 위한 향상된 포뮬레이션을 형성하는 것으로 밝혀졌다. 삼투제는 적합한 양의 유체의 관심 해부학상 부분 내로의 전달을 촉진시키고, 안정화제 및 삼투제는 충분한 양의 유체가 관심 해부학상 부분 내에 유지되도록 하는 것으로 여겨진다. 따라서, 해부학상 부분은 진단 영상을 위해 충분히 팽창 또는 확장되어, 상기 해부학상 부분이 영상화되면, 얻어진 진단 영상 상에서 충분히 윤곽이 그려진다.

[0064] 본 발명은 또한 하기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염을 포함하는 나노입자를 제공한다:

[0065] [화학식 I]



[0066]

[0067] 상기 화학식 I에서

[0068] X, a, b, R_1, R_2 및 R_3에 대한 정의는 앞서 정의하였던 것과 동일하게 정의된다.

[0069] 상기 나노입자는 상기 화학식 I로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 자가 조립에 의해 형성된 것일 수 있다.

[0070] 상기 나노입자의 크기는 50 내지 500 nm인 것일 수 있다.

[0071] 본 발명은 또한 상기 나노입자를 유효성분으로 포함하는 조영제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0072] 본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 화합물은 칼슘 이온에 대한 선택성 및 결합 특성을 가질 수 있다. 이에 따라, 칼슘 이온을 포함하는 세포 또는 조직에 대한 우수한 친화력으로 인해 이들을 표적하여, 체내에서 장기간 근적외선의 형광을 방출함으로써 뼈 조직, 석회화 경화반(calcific plaque), 또는 골형성 대식세포(osteogenic macrophage) 등을 영상화 할 수 있는 조영제 조성물로 사용될 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 조영제 조성물은 혈관 석회화 관련 질환의 진단용도로 사용될 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명에 따른 화학식 I로 표시되는 화합물은 양친매성으로 인하여 자가조립에 의해 나노입자 형태로 체내에 투여될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 (a) N_3-PEG-NHS 및 (b) ALN-PEG-N_3의 FT-IR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 2는 (a) N_3-PEG-NHS 및 (b) ALN-PEG-N_3의 ^{1}H-NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다.

도 3은 (a) ALN-PEG-N_3 (점선) 및 ALN-PEG-Cy5.5 (실선)의 MALDI-TOF 질량 스펙트럼 및 (b) ALN-PEG-Cy5.5의 입자 크기 분포와 나노프로브 SEM 이미지를 나타낸 것이다(스케일바: 200 nm).

도 4는 나노프로브의 칼슘 결합 친화력 평가를 보여주는 것으로, (a) ALN-PEG-Cy5.5를 무기미네랄인 BCP, HAp, 또는 MnO_2와 반응한 후 결합정도를 비교하는 사진 및 형광이미지이며, (b) ALN-PEG-Cy5.5가 무기미네랄들과 결합정도를 비교하는 형광신호 정량분석 결과이다.

도 5는 (a) 대식세포 및 (b) RANKL-유도 골형성 대식세포에 대한 나노프로브의 세포독성을 검사한 결과이다.

도 6은 나노프로브를 사용하여 대식세포 및 RANKL-유도 골형성 대식세포 내 *in vitro* 칼슘 이온을 검출한 것이다.

도 7은 나노프로브가 대식세포 및 골형성 대식세포내의 칼슘 결합 정도를 정량적으로 비교한 형광세기의 결과이

다.

도 8은 (a) 나노프로브를 정맥주사 후 Balb/c 누드마우스에서 시간에 따른 체내 분포 및 배출을 평가하기 위한 *in vivo* 형광 이미지 및 (b) 나노프로브 투여 후 48시간째에 마우스로부터 적출된 간, 폐, 비장, 신장 및 심장에서의 나노프로브의 *ex vivo* 조직 분포 형광이미지를 나타낸 것이다.

도 9은 ALN-PEG-Cy5.5의 정맥주사 후 48시간 째 획득한 in vivo 뼈 조직 형광이미지를 나타낸 것이다[갈비뼈(R), 척추(Ve), 대퇴골(F), 천골(Sa), 무릎(Kn)].

도 10은 (a) *in vivo* 동맥경화반 분자영상 이미징 프로토콜 및 (b) 다채널 형광현미경 생체 내 분자영상 이미징 시스템(Customized multichannel IVFM imaging system)의 모식도이다.

도 11은 (a) 주 실험군(① 와파린 섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입), (b) 첫번째 대조군(② 와파린 미섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입), (c) 두 번째 대조군(③ 와파린 섭취 마우스; PEG-Cy5.5 주입) 및 (d) 세번째 대조군(④ 와파린 섭취 마우스; 생리식염수 주입)에 대한, 다채널 형광현미경 생체 내 분자영상 이미징 결과(Multichannel IVFM imaging assessment)를 나타낸 이미지이다(스케일 바: 1mm).

도 12는 (a) 도 11의 동맥경화반 분자영상 이미지 중 merged 이미지(FITC 형광 필터 및 NIRF-Cy5.5 근적외선 필터의 병합; 스케일 바: 1mm) 및 (b) merged 이미지에 대한 Cy5.5 근적외선 신호강도의 정량분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 13은 (a) 주 실험군(① 와파린 섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입), (b) 첫번째 대조군(② 와파린 미섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입), (c) 두 번째 대조군(③ 와파린 섭취 마우스; PEG-Cy5.5 주입) 및 (d) 세번째 대조군(④ 와파린 섭취 마우스; 생리식염수 주입)에 대한, von-Kossa 염색(흑색 점) 결과를 나타낸 이미지이다(스케일 바: 100㎛).

도 14는 (a) 주 실험군(① 와파린 섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입)에 대한 von-Kossa 염색 결과를 나타낸 다른 이미지, (b) 칼슘 침착(von-Kossa)과 cy5.5 근적외선 신호의 상관관계에 대한 정략분석 결과 그래프, (c) von-Kossa 염색 결과를 나타낸 다른 이미지(a)의 고밀도 석회화(Dense calcification)에 대한 고배율 이미지 및 (d) von-Kossa 염색 결과를 나타낸 다른 이미지(a)의 반점 석회화(Spotty calcification)에 대한 고배율 이미지이다.(스케일 바: 100㎛)

도 15는 (a) 도 13(a)(case 1) 및 (b) 도 14(a)(case 2)에 대한, 대식세포(표지자: F4/80) 및 골형성 대식세포(표지자: RANK)의 추가적인 염색 결과를 나타낸 이미지이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076] **실시예**

[0077] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

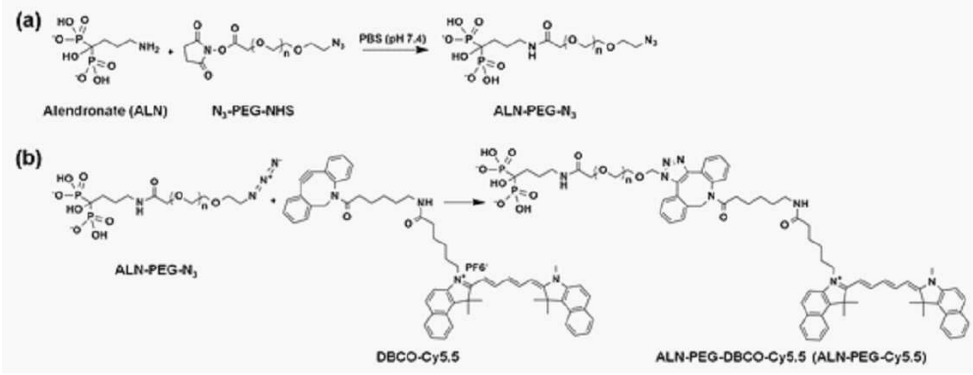
[0078] **재료**

[0079] 아자이드-PEG5000-NHS-에스터 (N_3-PEG-NHS) 및 디벤조사이클로옥틴-Cy5.5 (DBCO-Cy5.5)는 각각, JENKEM Technology (Plano, TX, USA) 및 Lumiprobe Co. (Hallandale Beach, FL, USA)에서 구매하였다. 알렌드로네이트 나트륨 (ALN) 및 디메틸 설폭사이드 (DMSO)는 삼진 제약 (서울) 및 덕산 종합 과학 (서울)에서 얻었다. 2상 인산 칼슘 (BCP)은 OssGen Corporation (경북)에서 구매하였다. 하이드록시 아파타이트 (HAp) 및 중수 소화 클로로포름 ($CDCl_3$)은 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였다. 이산화망간 나노 분말(MnO_2, 98 %, 50nm)은 US Research Nanomaterials, Inc. (Houston, TX, USA)로부터 얻었다. 인산염 완충 식염수 (PBS)는 Lonza (Walkersville, MD, USA)로부터 구매하였다. RPMI 1640, 태아 소 혈청 (FBS), 스트렙토마이신, 페니실린 및 둘베코 인산염 완충 식염수 (DPBS)는 Welgene Inc. (Seoul, Korea)에서 얻었다. 세포 계수 키트-8 (CCK-8)은 Dojindo Molecular Technologies, Inc. (일본 구마모토 소재)에서 구입하였다. 핵 인자 카파-B 리간드 (RANKL)의 수용체 활성화제; 형광 장착 배지 Fluo-3; 및 4',6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)은 각각 R&D systems (Minneapolis, MN, USA), 다나 코리아 (Seoul, Korea) 및 GBI Labs (Bothell, WA, USA)에서 구입하였다.

[0081] **실시예 1. 칼슘 결합 나노프로브의 합성 및 특성 분석**

[0082] 칼슘 결합 나노프로브는 하기 반응식 1의 2단계를 통해 합성하였다.

[0083] [반응식 1]



[0084]

[0085] **(a) 알렌드로네이트-PEG5000-아지드 (ALN-PEG-N_3)의 합성**

[0086] N_3-PEG-NHS (0.1 g, 0.02 mmol) 및 ALN (54.2 mg, 0.2 mmol)을 10 mL의 PBS (pH 7.4)에 용해시키고 24 시간 동안 반응시켰다. 생성된 용액을 투석막을 사용하여 3일 동안 정제하고 동결 건조시켰다.

[0087] N_3-PEG-NHS 및 얻어진 ALN-PEG-N_3을 푸리에 변환 적외선 분광법 분석하여 그 결과를 도 1에 각각 나타내었다. FT-IR 분석을 위해, 샘플을 포타슘 브로마이드 (KBr) 펠릿 형태로 제조하였다. FT-IR 스펙트럼은 4,000 내지 400 cm^{-1}에서 4 cm^{-1}의 해상도로 획득하였다.

[0088] FT-IR 스펙트럼은 1745 cm^{-1}에서 아미드 밴드 (N_3-PEG-NHS의 C= O 스트레칭)가 사라지고, 3461 cm^{-1}에서 히드록시 피크 (ALN의 -OH 스트레칭)가 생성물에서 증가함을 보여주었다.

[0089] ^{1}H-NMR 스펙트럼을 $CDCl_3$을 사용하여 ^{1}H-핵 자기 공명 (^{1}H-NMR) 분광기로 획득하였다. (a) N_3-PEG-NHS 및 (b) ALN-PEG-N_3의 NMR 스펙트럼을 각각 도 2에 나타내었다.

[0090] ^{1}H-NMR 스펙트럼에서, N_3-PEG-NHS의 NHS에 존재하는 메틸렌 양성자 피크 (2.72 ppm)가 사라지고, ALN에 존재하는 메틸렌 양성자 피크가 1.58 ppm에서 검출되었다. 이러한 데이터는 N_3-PEG-NHS와 ALN이 결합되어 ALN-PEG-N_3가 성공적으로 합성되었음을 의미한다.

[0092] **(b) ALN-PEG-DBCO-Cy5.5 (ALN-PEG-Cy5.5)의 합성 및 특성**

[0093] 8 mL의 PBS (pH 7.4)에 용해된, ALN-PEG-N_3 (80 mg, 0.0152 mmol) 및 2 mL의 DMSO에 용해 된 DBCO-Cy5.5 (31.9 mg, 0.031 mmol)를 반응시켰다. 24 시간 반응 후, 반응물을 투석 막 (MWCO; 3,500 Da)을 사용하여 30 % EtOH를 함유하는 증류수에서 1 일 동안 투석하고 증류수에 대해 추가로 2일 동안 투석하였다. 이어서, 투석된 용액을 원심 분리 (4,000 rpm, 20 분)하여 침전된 물질 (반응하지 않은 DBCO-Cy5.5)을 제거한 후 분리된 상층액 (supernatant)을 동결 건조하여 ALN-PEG-Cy5.5를 얻었다.

[0094] ALN-PEG-Cy5.5의 합성은 MALDI-TOF 질량 분석기를 사용하여 분자량을 측정함으로써 확인하고 그 결과를 도 3(a)에 나타내었다. 구체적으로, ALN-PEG-DBCO-Cy5.5 (이후, ALN-PEG-Cy5.5로 칭함)의 합성은 MALDI-TOF 질량 분석법에 의해 ALN-PEG-N_3 (m/z = 5,252) 및 ALN-PEG-Cy5.5 (m/z = 6,147)의 측정된 분자량으로 확인하였다(도 3(a)).

[0095] 입자 크기, 다분산 지수 및 Z-평균 크기는, ALN-PEG-Cy5.5를 증류수에서 0.25 mg/mL로 분산시킨 다음 입자 크기 분석기를 사용하여 분석하였다. 나노프로브의 입자 형태를 관찰하기 위해, 1 mg의 ALN-PEG-Cy5.5를 증류수에 분산시키고 분산된 용액을 유리 커버 슬립에 떨어뜨렸다. 이어서, 샘플을 건조시키고 백금으로 코팅하였다. ALN-

PEG-Cy5.5의 입자 형태는 15.0 kV에서 작동하는 전계 방출 주사 전자 현미경 사용하여 분석하고, 그 결과를 도 3(b)에 나타내었다.

[0096] 증류수에 분산된 ALN-PEG-Cy5.5는 Z-평균 크기가 275.2nm이고 유체 역학적 크기가 275.8 ± 61.8nm이며, 다분산지수 (PDI)는 0.178이다. SEM 이미지는 ALN-PEG-Cy5.5가 구형인 것을 보여주었다 (도 3(b)의 삽입 이미지). 이러한 결과는 설페이트 기가 없는 중간의 소수성 DBCO-Cy5.5 분자가 수용액에서 제한된 용해도를 갖기 때문에, 양친매성 ALN-PEG-Cy5.5 분자가 수용액 환경에서 자기 조립에 의해 나노 구조를 형성함을 입증하였다.

[0098] **실시예 2. *in vitro*에서 나노프로브의 칼슘 결합 친화도 시험**

[0099] 600 μL의 PBS (pH 7.4) 내에 분산된 ALN-PEG-Cy5.5 나노 프로브 (1.5 mg)를 첨가하고 34.5 μmoles의 BCP (14.7 mg), HAp (17.3 mg) 및 MnO_2 (3 mg)와 2시간 동안 반응시켰다. 이어서, 혼합물을 5,500 rpm에서 30 분 동안 원심 분리하여 PBS로 3 회 세척한 후 미반응 나노 프로브를 제거 하였다. 나노 프로브의 결합 친화력을 비교하기 위해, 수집된 BCP, HAp 및 MnO_2를 200 μL의 PBS (pH 7.4)에 분산시킨 후, 분산된 샘플의 사진을 획득하였다. 또한, 분산된 샘플의 형광 강도는 소동물 이미징 장치를 사용하여 정량 및 비교분석 하였다. 상기 친화도 시험 결과를 도 4에 나타내었다.

[0100] 형광이미지 및 정량분석 결과를 바탕으로, MnO_2 보다는 BCP 및 HAp에서 더 강한 NIRF 신호가 관찰되었으며(도 4A (a) 및 (b)), 나노프로브의 P-C-P(hydroxyl methylene bisphosphonate) 구조와 인산칼슘의 강한 상호 작용을 나타내었다. 이러한 데이터는 나노 프로브가 칼슘 포스페이트를 함유하는 미네랄에 더 강력하고 선택적으로 결합할 수 있음을 시사한다.

[0102] **실시예 3. 대식세포 및 RANKL-유도 골형성 대식세포에 대한 나노프로브의 세포 독성 평가**

[0103] 대식세포 및 RANKL-유도 대식세포 (골형성 대식세포로 지칭됨)에 대한 나노 프로브의 *in vitro* 세포 독성을 CCK-8 분석 키트를 사용하여 평가하였다. RAW 264.7 세포를 37 ℃에서 10 % FBS 및 1 % 페니실린-스트렙토 마이신이 함유된 RPMI 1640에서 배양하였다. 계대배양된 RAW 264.7 세포 (2×10^4 세포/웰)를 96-웰 배양 플레이트에 옮긴 후 1 일 동안 부착시켰다. 또한, 대식세포를 RANKL (50 ng / mL)로 1 일 동안 처리하여 골형성 대식세포를 확립하였다. 대식세포 및 골형성 대식세포를 다양한 농도의 나노프로브(2, 5, 10, 20 및 50 μM)로 처리하였다. 24시간 배양 후, 세포를 세척한 뒤 CCK-8 용액을 세포에 첨가한 후 1시간 동안 추가 배양한 후, 플래시 멀티 모드 리더를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0104] (a) 대식세포 및 (b) 골형성 대식세포에 대한 상기 독성 평가 결과를 각각 도 5에 나타내었다. 측정 결과 대식세포 및 골형성 대식세포 나노프로브의 모든 농도에서, 세포 생존율이 100%에 달하거나 상회함을 확인하였다.

[0106] **실시예 4. 나노프로브의 *in vitro* 칼슘 결합 분석**

[0107] 나노프로브의 *in vitro* 칼슘 결합을 평가하기 위해, RAW 264.7 세포 (2×10^5 세포/웰)를 4-웰 챔버 슬라이드에서 배양하였다. 또한, 1 일 동안 RANKL(50 ng/mL)로 처리하여 골형성 대식세포를 확립하였다. 대식세포 및 골형성 대식세포를 나노 프로브 (10 μM)로 처리하고 1 시간 동안 배양하였다. 이어서, 세포를 DPBS로 3 회 세척하고 3.7 % 포르말린으로 30분 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 칼슘 지시제인 4 μM Fluo-3 (ex: 506 nm, em: 526 nm)으로 염색하고, 추가로 DAPI를 처리하여 세포 핵을 10 분 동안 염색하였다. 그 후, 공초점 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 세포를 이미지화하였다. 상기 나노프로브가 결합된 세포의 이미지를 도 6에 나타내었다. 대식세포 및 골형성 대식세포에서 *in vitro* 칼슘 결합 정도를 정량적으로 비교 분석하기 위해, 이미지 J 소프트웨어를 사용하였다. 단일 세포의 정량적 평균 형광 강도는 무작위로 선택된 세포들의 총 형광 강도를 무작위로 선택된 세포의 개수로 나누어 계산하였다 (n = 5). 상기 나노프로브의 대식세포 및 골형성 대식세포 내 칼슘 결합 정도를 정량적으로 비교한 결과를 도 7에 나타내었다.

[0108] 도 6에서 대식세포와 비교하여 골형성 대식세포에서 녹색 형광신호 및 NIRF 신호가 증가하였으며, 빨간색으로 표시된 나노 프로브의 NIRF 신호가 대식세포에서 Fluo-3의 녹색 형광 신호와 잘 일치함을 보여주었다. 도 7에서 골형성 대식세포의 NIRF 신호는 대식세포의 NIRF 신호와 비교하여 4.6배까지 증가하였는데, 이는 본 발명의 나

노 프로브가 *in vitro* 칼슘과 결합하여 *in vitro* 칼슘 수준을 감지하고 시각화하는 데 도움이 될 수 있음을 의미한다.

[0110] **실시예 5. 나노프로브의 *in vivo* 생체 분포 및 뼈 조직 영상**

[0111] 나노프로브의 시간에 따른 체내 분포 및 배출을 평가하기 위해, Balb/c 누드마우스의 꼬리 정맥을 통해 나노 프로브 (2 nmoles/100 μL/마우스)를 주사하였다. 근적외선 형광 이미지는 주사 후 0.5, 1, 2, 3, 6, 12, 24 및 48 시간에 소동물용 이미징 장비를 이용하여 획득하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0112] 나노프로브 주사 후 초기 시간까지, 강한 NIRF 신호가 관찰되었고, 이후 강도가 점차 감소하였다. 그러나, NIRF 신호는 최대 2 일 동안 가시적으로 유지되어, 나노 프로브의 연장된 체내 순환을 입증하였다. 주사 48시간 후, 폐, 비장, 신장 또는 심장에서 나노 프로브의 형광 신호가 검출되지 않았지만, 양친매성 특성으로 인하여 간 조직에서는 NIRF 신호가 여전히 검출되었다.

[0113] 도 9는 ALN-PEG-Cy5.5 주사 후 48시간에 얻은 뼈 조직 형광이미지 결과이다. 주사 48 시간 후, 나노 프로브는 갈비뼈, 척추, 대퇴골 및 천골 등을 영상화 하였다. 또한, 뼈와 무릎 관절을 포함한 연골 조직에서 나노프로브의 형광 신호가 관찰되었는데, 이는 본 발명의 칼슘 결합 근적외선 형광 나노프로브가 *in vivo*에서 뼈 조직을 성공적으로 시각화함을 시사한다.

[0115] **실시예 6. 나노프로브의 *in vivo* 동맥경화반내 칼슘 표적 영상**

[0116] 나노프로브의 동맥경화반(atherosclerotic plaque) 내 칼슘 표적 특성을 평가하기 위해, 8주령 ApoE(-/-) 유전자 변형 마우스에서 총 8주간 고콜레스테롤 식이 후, 총 4주간 와파린 섭취를 통해 동맥경화반내 칼슘생성을 촉진시켰다. 이후, 생체 내 동맥경화반 분자영상 이미징을 통하여 마우스의 양측 경동맥 동맥경화반에서의 신호를 측정하였다.

[0117] 생체 내 동맥경화반 분자영상 이미징 프로토콜을 도 10(a)에 나타내었다. 구체적으로, 아래와 같은 1개의 주 실험군(①)과 총 3개의 대조군(②, ③, ④)으로 이미징 실험을 진행하였다.

[0118] ① 주 실험군(Main group)에서는 ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥에 주입 후 48시간 뒤에 생체 내 이미징을 수행하였다.

[0119] ② 첫번째 대조군은 실험동물 대조군으로 와파린 섭취를 하지 않은 마우스에서Al-PEG-Cy5.5 나노프로브 2.5 mg/kg를 꼬리 정맥에 주입 후 48시간 뒤에 생체 내 이미징을 수행하였다.

[0120] ③ 두번째 대조군은 나노프로브 물질 대조군으로 칼슘 표적 리간드를 함유하지 않은 PEG-Cy5.5 나노물질 2.5mg/kg를 꼬리 정맥에 주입 후 48시간 뒤에 생체 내 이미징을 수행하였다.

[0121] ④ 세 번째 대조군은 나노프로브 물질 대조군으로 생리식염수를 꼬리 정맥에 주입 후 48시간 뒤에 생체 내 이미징을 수행하였다.

[0122] 또한, 분자 영상 이미징은 다채널 형광현미경 생체 내 분자영상 이미징 시스템을 통하여 수행하였으며, 상기 이미징 시스템의 모식도를 도 10(b)에 나타내었다.

[0123] 구체적으로, 상기 이미징 시스템은 여러 개의 레이저 파장이 Excitation module에서 생성되고, 광학시스템을 통해 동맥경화반에 조사되어 나노프로브를 활성화시킨다. 동맥경화반내 나노프로브에서 발광된 레이저가 동일한 광학시스템을 통해서 Emission module로 전달되고, 개별 레이저 파장으로 분리되어 측정된다.

[0125] 도 11은 다채널 형광현미경 생채 내 분자영상 이미징 결과(Multichannel IVFM imaging assessment)를 나타낸 이미지이다.

[0126] 도 11(a)를 참조하면, 칼슘 생성을 촉진시킨 주 실험군(① 와파린 섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입)의 동맥경화반에서 Cy5.5 근적외선 신호가 매우 높게 측정되어, ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브의 동맥경화반내 섭취율이 높음을 확인할 수 있다. 또한, 도 11(b)를 참조하면, 칼슘 생성을 촉진시키지 않은 첫번째 대조군(② 와파린 미섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입)의 동맥경화반에서는 Cy5.5 근적외선 신호의 강도가 낮게 측정되어, 칼슘 생성을

촉진시키지 않을 경우 ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브의 동맥경화반내 섭취율이 감소함을 확인할 수 있다. 또한, 도 11(c)를 참조하면, 칼슘 생성을 촉진시킨 동맥경화반으로서, PEG-Cy5.5 나노프로브를 주입한 두 번째 대조군(③ 와파린 섭취 마우스; PEG-Cy5.5 주입)에서는 Cy5.5 근적외선 신호가 낮게 측정됨을 확인할 수 있는데, 이는 표적 리간드인 Alendronate를 함유하지 않는 경우에는 나노프로브의 동맥경화반내 섭취율이 감소함을 시사한다. 또한, 도 11(d)를 참조하면, 근적외선 발광물질인 Cy5.5을 주입하지 않은 세번째 대조군 (④ 와파린 섭취 마우스; 생리식염수 주입)에서는 Cy5.5 근적외선 신호가 검출되지 않았음을 확인할 수 있다.

[0128] 도 12는 (a) 도 11의 동맥경화반 분자영상 이미지 중 merged 이미지(FITC 형광 필터 및 NIRF-Cy5.5 근적외선 필터의 병합) 및 (b) merged 이미지에 대한 Cy5.5 근적외선 신호강도의 정량분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[0129] 도 12(a)에는 주 실험군(①)과 총 3개의 대조군(②, ③, ④)의 주요 이미징 결과를 제시하고 있다. 또한, 도 12(b)를 참조하면, 그룹별 표적-배경 신호비율(TBR; target to background ratio)을 비교한 결과, 동맥경화반 Cy5.5 근적외선 신호강도는 대조군(②, ③, ④)에 비해 주 실험군(①)에서 통계학적으로 유의미하게 높게 나타났다(p-value <0.05). 표적(target)은 동맥경화반으로 정의하였고, 배경(background)은 동맥경화반이 없는 정상 혈관으로 정의하였다. 통계분석법으로는 Kruskal-Wallis test를 수행하고, Mann-Whitney U-test로 사후 분석을 진행하였다(**P-value <0.05 by Mann-Whitney U-test, ## P-value <0.05 by Kruskal-Wallis test).

[0131] **실시예 7. 동맥경화반내 Cy5.5 근적외선 신호에 대한 조직학적 검증(Histopathologic validation) (1)**

[0132] 나노프로브의 동맥경화반(atherosclerotic plaque) 내 Cy5.5 근적외선 신호에 대한 조직학적 검증을 하기 위해, 주 실험군 및 대조군들에 von-Kossa 염색을 수행한 후 NIRF-Cy5.5 근적외선 필터 이미지와 비교하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0133] 도 13(a)를 참조하면, 주 실험군(① 와파린 섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입)은 동맥경화반내 칼슘 침착(Von-Kossa 염색 흑색 부위)과 Cy5.5 근적외선 신호 간에 높은 일치도를 보인다. 이는 ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브를 통해 동맥경화반내 칼슘의 표적 영상화가 가능함을 시사한다. 또한, 도 13(b)를 참조하면, 첫번째 대조군 (② 와파린 미섭취 마우스; ALN-PEG-Cy5.5 주입)은 동맥경화반내 칼슘 침착이 명확하지 않고, 동맥경화반내 Cy5.5 근적외선 신호의 강도가 주 실험군에 비해 낮은 결과를 보임을 확인할 수 있다. 또한, 도 13(c)를 참조하면, 두 번째 대조군(③ 와파린 섭취 마우스; PEG-Cy5.5 주입)은 동맥경화반내 칼슘 침착(Von-Kossa 염색 흑색 부위)이 확인되었으나, 해당 부위에 Cy5.5 근적외선 신호가 검출되지 않았음을 확인할 수 있다. 이는 표적 리간드인 Alendronate를 함유하지 않는 경우에는 동맥경화반내 칼슘에 대한 표적이 제한적임을 시사한다. 또한, 도 13(d)를 참조하면, 근적외선 발광물질인 Cy5.5을 주입하지 않은 세번째 대조군 (④ 와파린 섭취 마우스; 생리식염수 주입)은 동맥경화반내 Cy5.5 근적외선 신호가 검출되지 않았음을 확인할 수 있다.

[0135] **실시예 8. 동맥경화반내 Cy5.5 근적외선 신호에 대한 조직학적 검증(2)**

[0136] 나노프로브의 동맥경화반(atherosclerotic plaque) 내 Cy5.5 근적외선 신호에 대한 조직학적 검증을 하기 위해, 주 실험군에 von-Kossa 염색을 수행한 후 NIRF-Cy5.5 근적외선 필터 이미지와 비교하였으며, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0137] 도 14(a), (c) 및 (d)를 참조하면, 주 실험군(①)의 동맥경화반내 칼슘 침착(Von-Kossa 염색 흑색 부위)과 Cy5.5 근적외선 신호 간에 전반적으로 높은 일치도를 보임을 확인할 수 있다. 형태학적으로 동맥경화반내 칼슘 침착을 고밀도 석회화(dense calcification)(도 14(a)에 점선으로 표시된 a 영역과 이를 확대한 도 14(c))과 반점 석회화(spotty calcification)(도 14(a)에 점선으로 표시된 b 영역과 이를 확대한 도 14(d))으로 분류 가능하다. ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브는 두 가지 형태의 동맥경화반내 칼슘 침착에 대해 모두 표적 영상화가 가능함을 확인할 수 있다. 또한, 도 14(b)를 참조하면, 동맥경화반내 칼슘 침착(von-Kossa)과 Cy5.5 근적외선 신호는 중증도 수준의 통계학적 상관관계(r=0.529, p<0.001)를 나타냈다.

[0138] 한편, ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브 신호가 검출되었으나, 육안적 von-Kossa 칼슘 침착이 뚜렷하지 않은 부분에 대해서는 실시예 8의 추가 조직염색을 통해 검증을 진행하였다.

[0140] **실시예 9. 동맥경화반내 대식세포 분포 및 골생성능 평가에 대한 조직학적 검증**

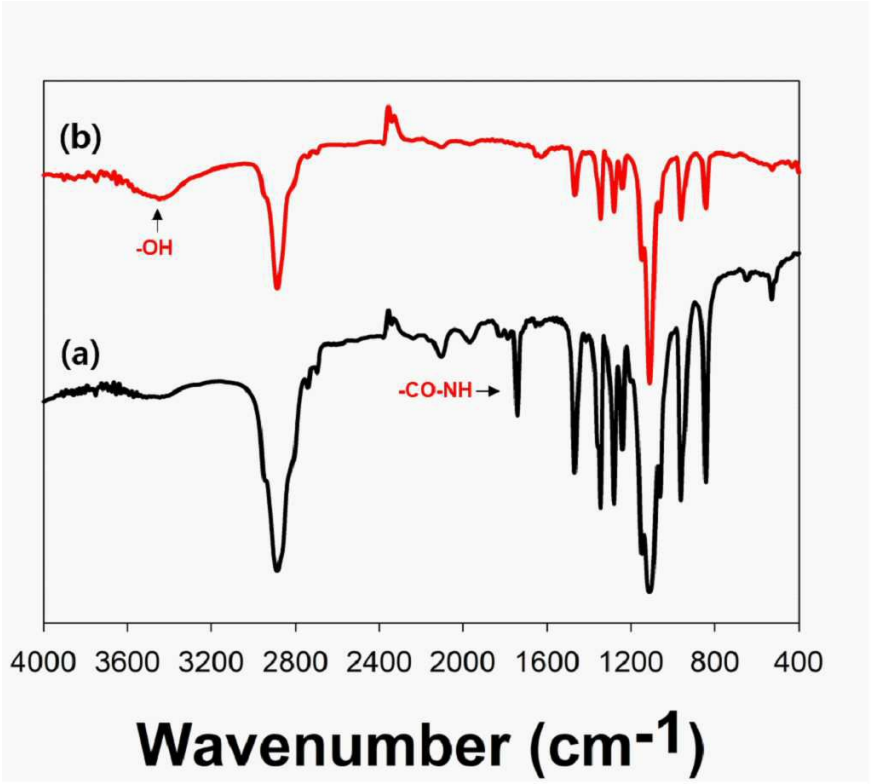
[0141] 도 15는 (a) 도 13(a)(case 1) 및 (b) 도 14(a)(case 2)에 대한, 대식세포(표지자: F4/80) 및 골형성 대식세포(표지자: RANK)의 추가적인 염색 결과를 나타낸 이미지이다.

[0142] 도 15를 참조하면, 동맥경화반내 칼슘 침착(Von-Kossa 염색 흑색 부위)과 Cy5.5 근적외선 신호(NIRF-Cy5.5) 간에 전반적으로 높은 일치도를 보이는 것을 확인할 수 있다. ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브를 통해 동맥경화반내 칼슘의 표적 영상화가 가능함을 시사하나, 일부에서는 Cy5.5 근적외선 신호와 칼슘 침착 사이에 불일치하는 부분이 존재하였다.

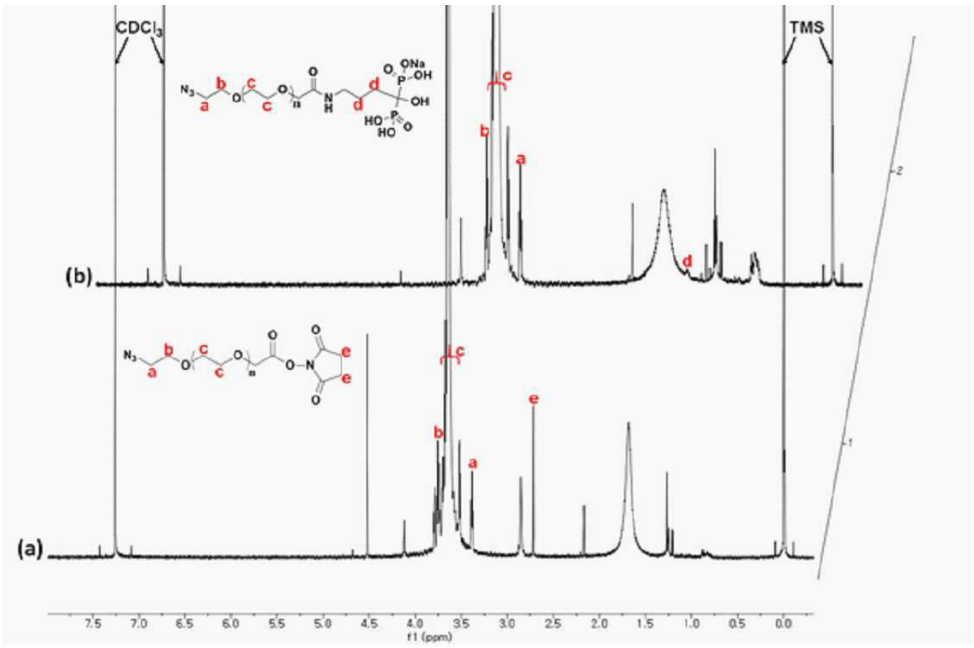
[0143] 이와 같은 불일치 부분에 대한 확인을 위하여, 추가적인 염색을 수행하였다. 추가적인 염색 결과, 칼슘 침착이 뚜렷하지 않은 부분의 Cy5.5 근적외선 신호는 동맥경화반내 대식세포(F4/80-positive 영역; 염색 부위) 및 골생성능(RANK-positive 영역; 염색 부위) 분포를 반영하는 것으로 나타났다. 이를 통하여, ALN-PEG-Cy5.5 나노프로브를 이용할 경우, 동맥경화반내 칼슘 침착뿐만 아니라, 골생성능을 가지는 골형성 대식세포(osteogenic macrophage)를 표적 영상화하는 것이 가능함을 확인하였다.

도면

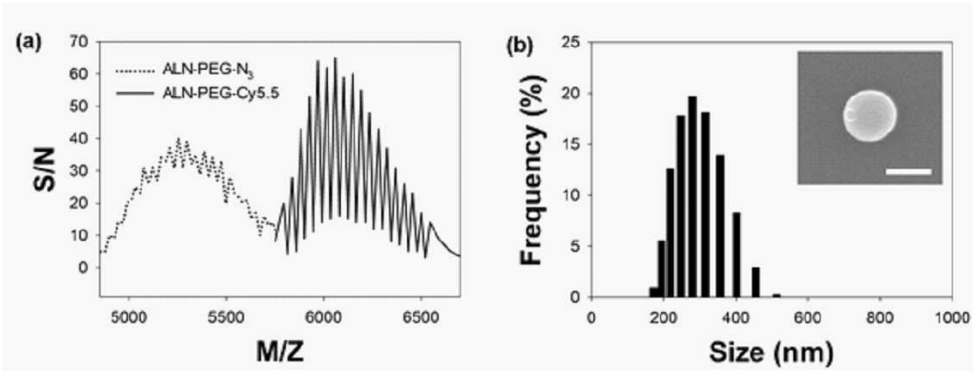
도면1



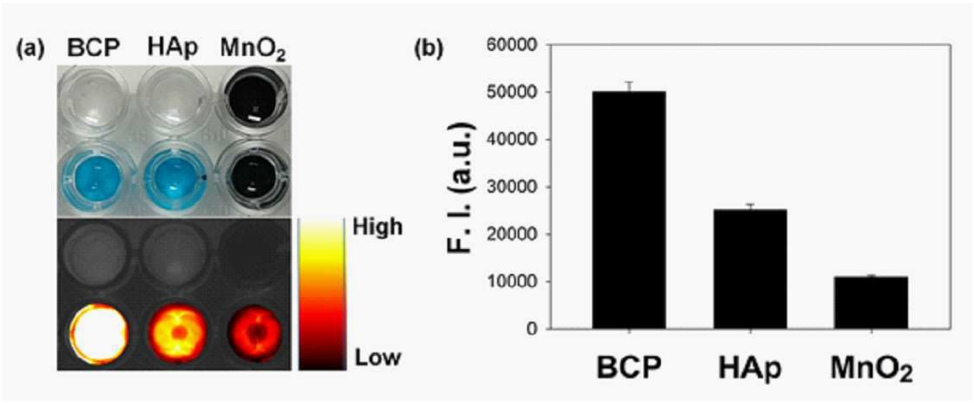
도면2


CDCl3
TMS
(b)
(a)
f1 (ppm)

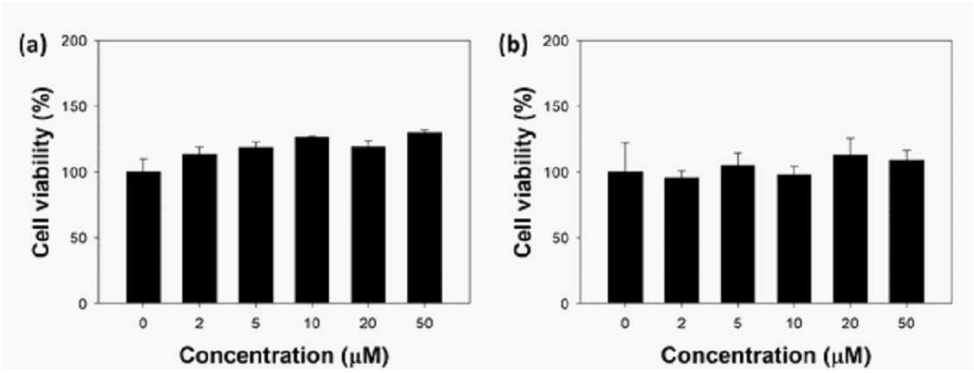
도면3


(a)
ALN-PEG-N3
ALN-PEG-Cy5.5
S/N
M/Z
(b)
Frequency (%)
Size (nm)

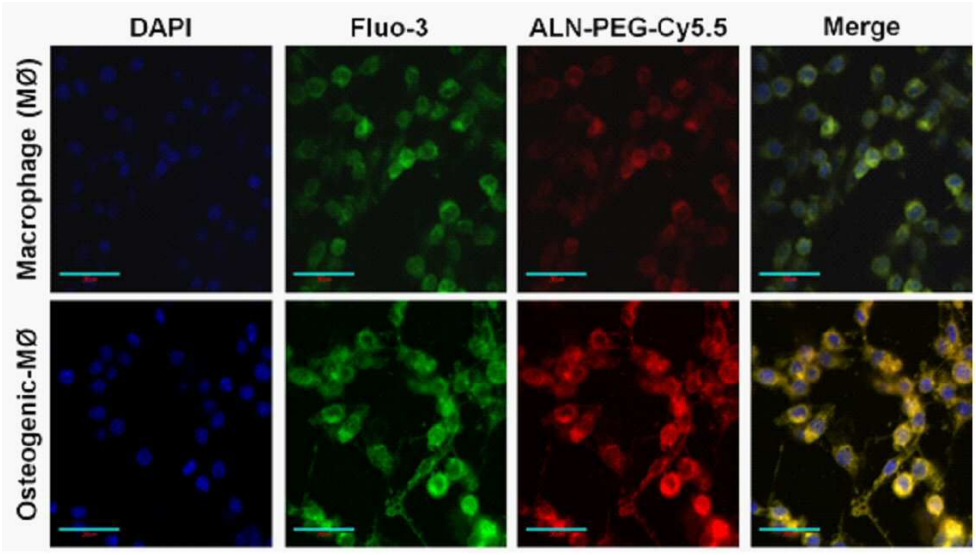
도면4


(a)
BCP
HAp
MnO2
High
Low
(b)
F. I. (a.u.)
BCP
HAp
MnO2

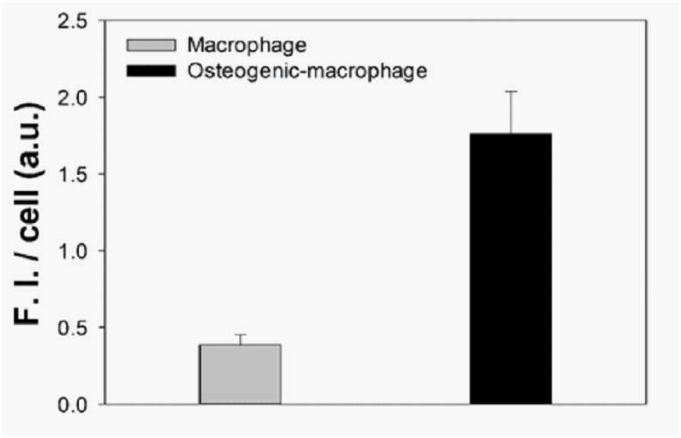
도면5


(a)
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
0
2
5
10
20
50
Concentration (μM)
(b)
Cell viability (%)
200
150
100
50
0
0
2
5
10
20
50
Concentration (μM)

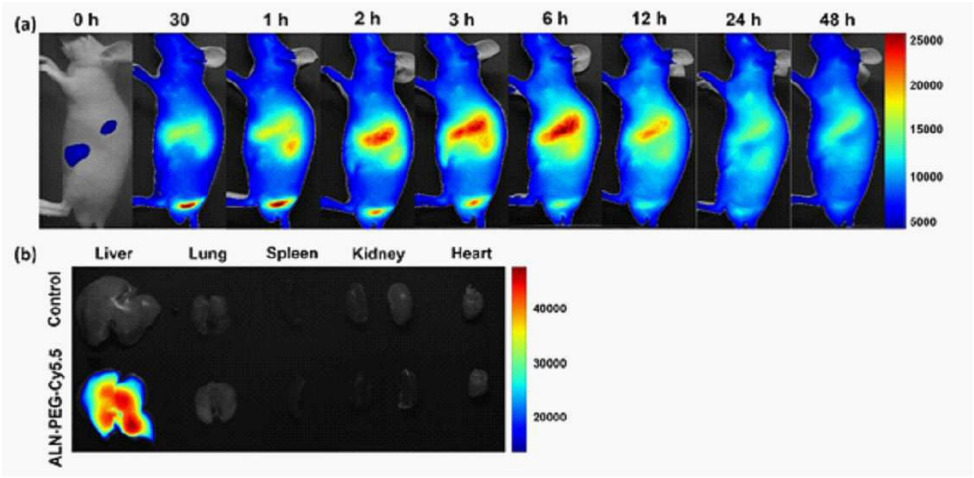
도면6


DAPI
Fluo-3
ALN-PEG-Cy5.5
Merge
Macrophage (MØ)
Osteogenic-MØ

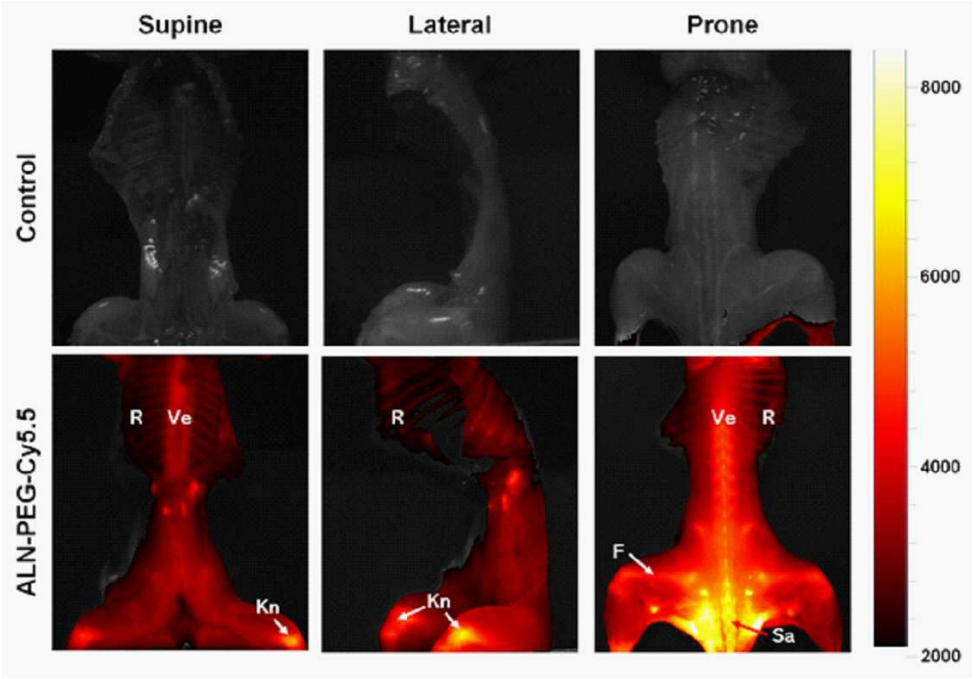
도면7


Macrophage
Osteogenic-macrophage
F. I. / cell (a.u.)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

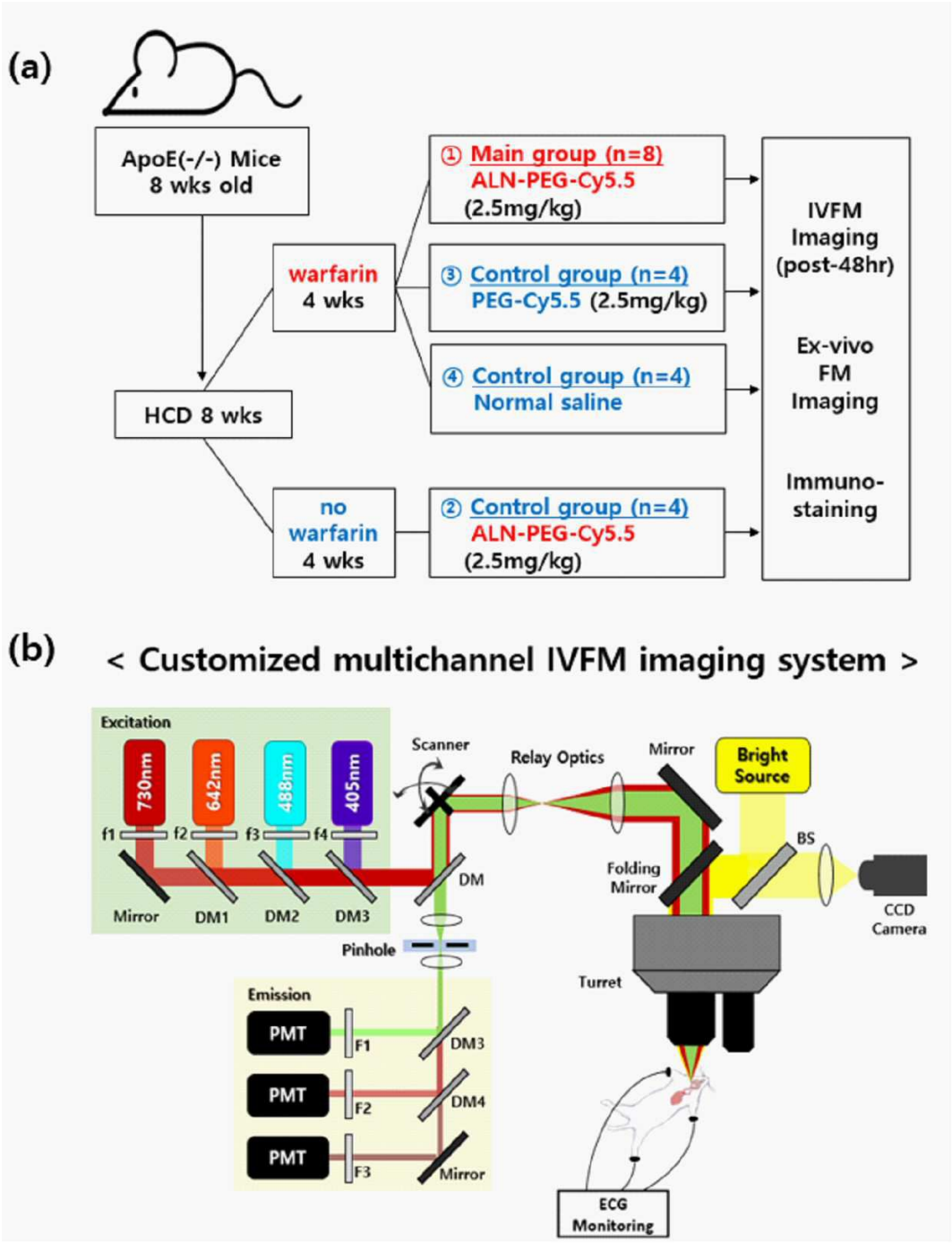
도면8


(a)
0 h
30
1 h
2 h
3 h
6 h
12 h
24 h
48 h
25000
20000
15000
10000
5000
(b)
Liver
Lung
Spleen
Kidney
Heart
Control
ALN-PEG-Cy5.5
40000
30000
20000

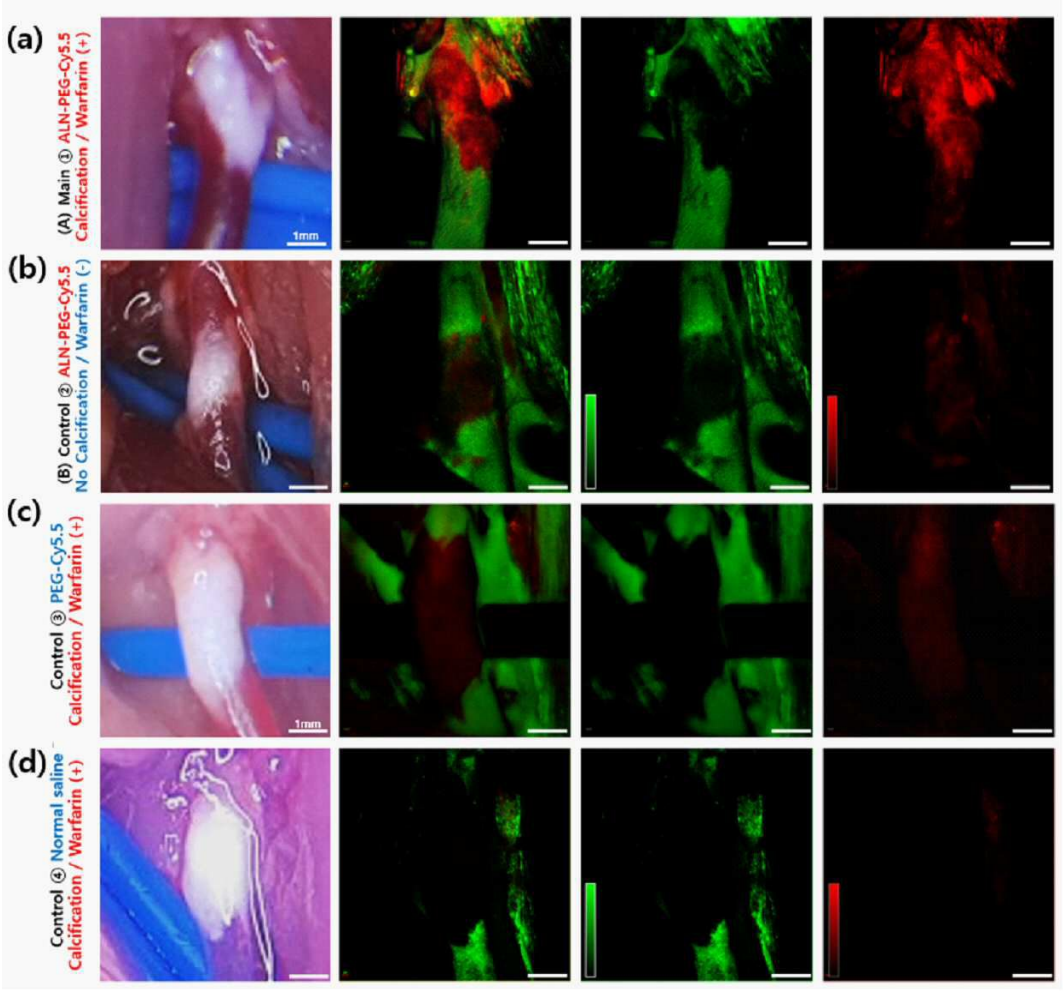
도면9


Supine
Lateral
Prone
Control
ALN-PEG-Cy5.5
R
Ve
Kn
R
Kn
Ve
R
F
Sa
8000
6000
4000
2000

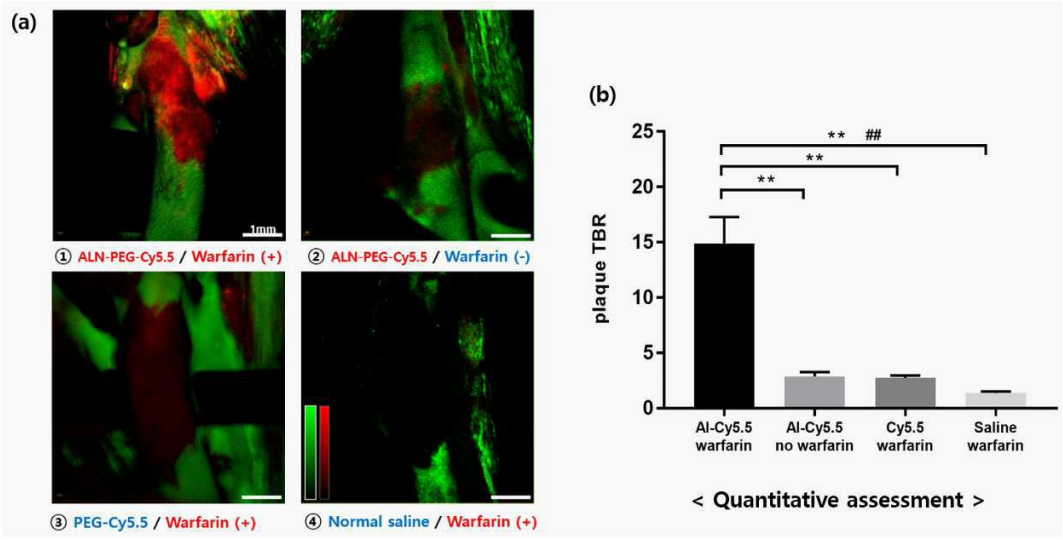
도면10


(a)
ApoE(-/-) Mice
8 wks old
HCD 8 wks
warfarin
4 wks
no
warfarin
4 wks
① Main group (n=8)
ALN-PEG-Cy5.5
(2.5mg/kg)
③ Control group (n=4)
PEG-Cy5.5 (2.5mg/kg)
④ Control group (n=4)
Normal saline
② Control group (n=4)
ALN-PEG-Cy5.5
(2.5mg/kg)
IVFM
Imaging
(post-48hr)
Ex-vivo
FM
Imaging
Immuno-
staining
(b)
< Customized multichannel IVFM imaging system >
Excitation
730nm
642nm
488nm
405nm
f1
f2
f3
f4
Mirror
DM1
DM2
DM3
Scanner
Relay Optics
Mirror
Bright
Source
DM
Folding
Mirror
BS
CCD
Camera
Pinhole
Turret
Emission
PMT
PMT
PMT
F1
F2
F3
DM3
DM4
Mirror
ECG
Monitoring

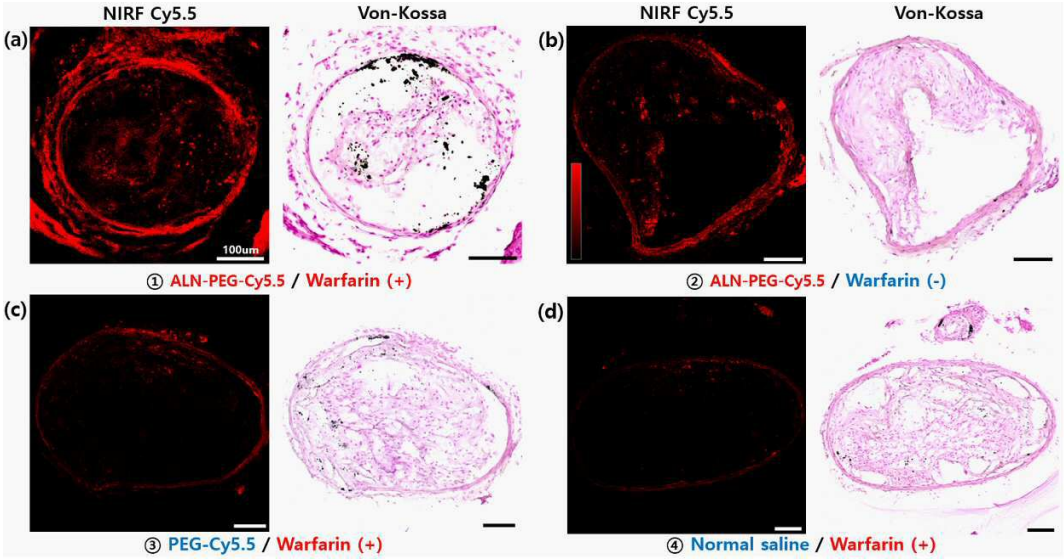
도면11


(a)
(A) Main ① ALN-PEG-Cy5.5 Calcification / Warfarin (+)
(b)
(B) Control ② ALN-PEG-Cy5.5 No Calcification / Warfarin (-)
(c)
Control ③ PEG-Cy5.5 Calcification / Warfarin (+)
(d)
Control ④ Normal saline Calcification / Warfarin (+)
1mm

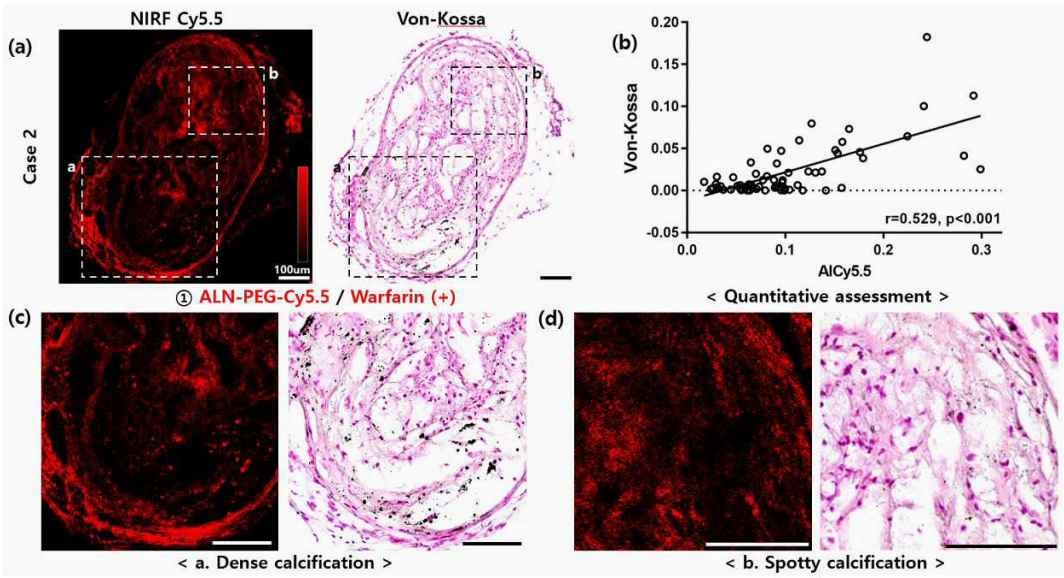
도면12


(a)
1mm
① ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)
② ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (-)
③ PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)
④ Normal saline / Warfarin (+)
(b)
plaque TBR
25
20
15
10
5
0
** ##
**
**
Al-Cy5.5 warfarin
Al-Cy5.5 no warfarin
Cy5.5 warfarin
Saline warfarin
< Quantitative assessment >

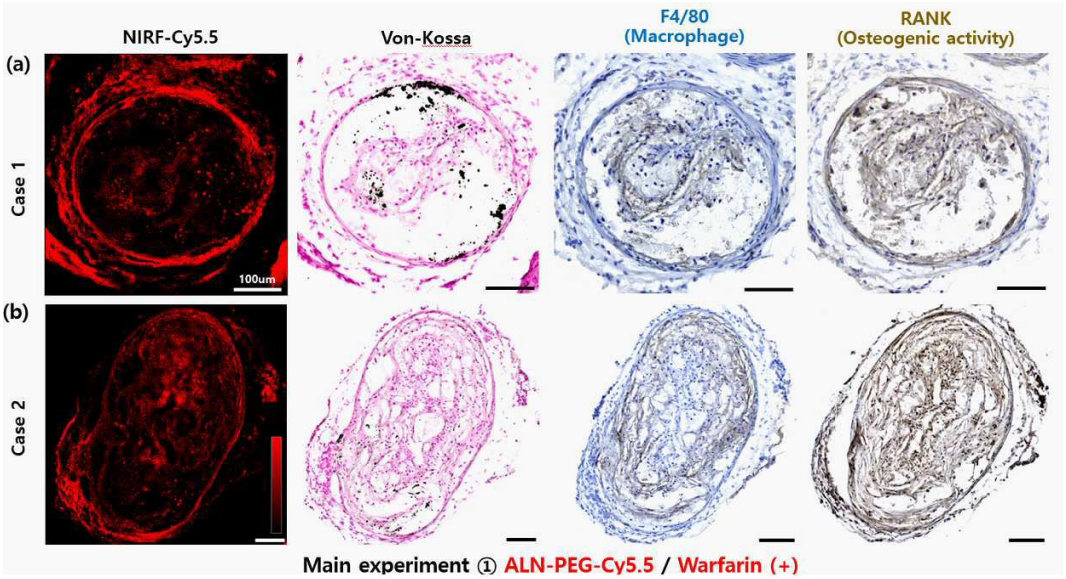
도면13


NIRF Cy5.5
Von-Kossa
NIRF Cy5.5
Von-Kossa
(a)
(b)
100um
① ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)
② ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (-)
(c)
(d)
③ PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)
④ Normal saline / Warfarin (+)

도면14


NIRF Cy5.5
Von-Kossa
(a)
(b)
Case 2
a
b
100um
① ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)
Von-Kossa
AlCy5.5
r=0.529, p<0.001
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-0.05
0.0
0.1
0.2
0.3
< Quantitative assessment >
(c)
(d)
< a. Dense calcification >
< b. Spotty calcification >

도면15


NIRF-Cy5.5
Von-Kossa
F4/80
(Macrophage)
RANK
(Osteogenic activity)
(a)
Case 1
100um
(b)
Case 2
Main experiment ① ALN-PEG-Cy5.5 / Warfarin (+)