



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0115072
(43) 공개일자 2022년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) A61K 49/04 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0073 (2013.01)
A61K 49/0032 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0016515
(22) 출원일자 2022년02월08일
심사청구일자 2022년02월08일
(30) 우선권주장
1020210018457 2021년02월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한국과학기술원
대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)
(72) 발명자
김현구
서울특별시 서초구 반포대로39길 63-8, A-402 (반포동, 반포서래월드메르디앙라스칼라)
채위화
서울특별시 구로구 구로동로 148, 신관6층 6277호
홍부외과의국 (구로동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 무한

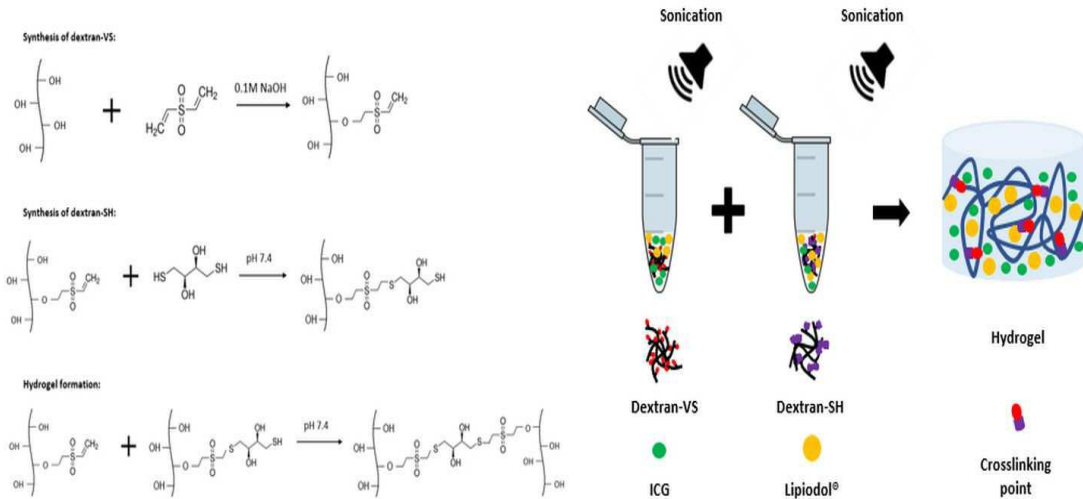
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 제한적 폐 절제술을 위한 폐 병변 국소화 다중영상조영제 조성물

(57) 요약

본 발명은 다중영상조영제 조성물과 이의 제조방법에 관한 것으로, 상기 조성물은 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤을 포함하고, 상기 하이드로젤은 형광염료 및 조영물질이 탑재된 것을 특징으로 한다. 상기 조성물은 지용성의 조영물질과 수용성의 형광염료를 동시에 탑재한 텍스트란 기반 하이드로젤을 포함하는 것으로, 폐 병변의 정확한 국소화가 가능한 장점이 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 49/0054 (2013.01)

A61K 49/0457 (2013.01)

(72) 발명자

노지윤

서울특별시 양천구 목동동로 100, 1329동 701호 (신정동, 목동신시가자아파트13단지)

최병현

서울특별시 구로구 구로동로 148, 의생명연구원 3층 흉부외과 연구실(구로동)

박지호

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

백우진

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465032792

과제번호 HI20C0835000021

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료인재양성지원사업(일반회계)(R&D)

연구과제명 폐암 표적 형광조영제 개발을 위한 융합형 글로벌 공동 연구

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.01.01 ~ 2022.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711138151

과제번호 KMDF_PR_20200901_0094-02

부처명 다부처

과제관리(전문)기관명 (재단)범부처전주기료기기연구개발사업단

연구사업명 범부처전주기료기기연구개발사업(R&D)(과기정통부, 복지부, 산업부)

연구과제명 (참여1)인공지능 기반 혈액 내 엑소좀 분석 폐암 진단 기기 제품화

기 여 율 1/2

과제수행기관명 고려대학교 산학협력단

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤을 포함하고,
상기 하이드로젤은 형광염료 및 조영물질이 탑재된 것인, 다중영상조영제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 제2텍스트란 고분자는 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 제1텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 상기 제2텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 형광염료는 시아닌계열의 형광염료인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 형광염료는 인도시아닌 그린(Indocyanine green: ICG), 알렉사 플루오르 647(Alexa Fluor 647), 알렉사 플루오르 660(Alexa Fluor 660), 알렉사 플루오르 680(Alexa Fluor 680), 알렉사 플루오르 700(Alexa Fluor 700), 알렉사 플루오르 780(Alexa Fluor 780), cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, 사이페이트(Cypate), ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, 크레실 바이올렛(Cresyl Violet), 나일 블루(Nile Blue), 옥사진 750(Oxazine 750) 및 로다민800(Rhodamine800), 텍사스 레드(Texas Red) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조영물질은 아이오다이즈드 오일인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조영물질은 하이드로젤에 대하여 30 부피% 미만으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 형광염료는 0.005 mg/mL 내지 0.02 mg/mL의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 폐 병변의 표지용인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 하이드로젤은, 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 혼합된 후 20초 내지 250초 내에 젤화되어 형성된 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물.

청구항 11

하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 제1텍스트란 고분자; 형광염료 및 조영물질을 포함하는 제1조성을 준비하는 단계(S1);

상기 제1조성에 음파처리하는 단계(S2);

하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 제2텍스트란 고분자; 형광염료 및 조영물질을 포함하는 제2조성을 준비하는 단계(S3);

상기 제2조성에 음파처리하는 단계(S4); 및

음파처리가 완료된 제1조성 및 제2조성을 혼합하여 젤화하는 단계(S5)를 포함하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 제1텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 상기 제2텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 형광염료는 시아닌계열의 형광염료인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 형광염료는 인도시아닌 그린(Indocyanine green: ICG), 알렉사 플루오르 647(Alexa Fluor 647), 알렉사 플루오르 660(Alexa Fluor 660), 알렉사 플루오르 680(Alexa Fluor 680), 알렉사 플루오르 700(Alexa Fluor 700), 알렉사 플루오르 780(Alexa Fluor 780), cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, 사이페이트(Cypate), ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, 크레실 바이올렛(Cresyl Violet), 나일 블루(Nile Blue), 옥사진 750(Oxazine 750) 및 로다민800(Rhodamine800), 텍사스 레드(Texas Red) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 조영물질은 아이오다이즈드 오일인 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 조영물질은 하이드로젤에 대하여 30 부피% 미만으로 포함되는 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 형광염료는 0.005 mg/mL 내지 0.02 mg/mL의 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 18

제11항에 있어서,

상기 S5 단계의 젤화는, 20초 내지 250초 내에 이루어지는 것인, 다중영상조영제 조성물의 제조방법.

청구항 19

하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 제1텍스트란 고분자; 및 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤로,

상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 상기 제2텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것인 하이드로젤.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 제한적 폐 절제술을 위한 폐 병변 국소화 다중영상조영제 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 우리나라 사람들에게 가장 많이 발생하는 암은 위암, 대장암, 폐암, 갑상선암, 간암이다. 국가 암 발생 통계를 기초로 살펴보면 평생 암에 걸릴 확률이 남성은 3명 중 1명, 여성은 4명 중 1명으로 분석되는 등 암 발생에 대한 위험이 높아지고 있다. 특히 폐암의 경우, 산업화에 따른 대기오염의 악화와 함께 흡연자의 증가, 특히 청소년과 여성들의 흡연 증가 추세로 볼 때 폐암 환자의 수는 증가할 것으로 예상된다. 미국의 경우도 암 관련 사망 가운데 남녀 모두에게 폐암은 가장 흔한 원인이다.

[0004] 주요 형태의 폐암은 소세포 폐암(SCLC) 및 비소세포 폐암(NSCLC)이다. 소세포 폐암(SCLC)은 신속히 성장하는 유형의 폐암이다. 이는 비소세포 폐암보다 훨씬 더 빨리 퍼진다. 소세포 암종(연맥 세포 암), 혼합 소세포/대세포 암종 및 복합 소세포 암종의 3가지 상이한 유형의 소세포 폐암이 존재한다. 대부분의 소세포 폐암은 연맥 세포 유형이다. 비소세포 폐암(NSCLC)은 가장 흔한 유형의 폐암이다. 선암, 편평상피세포암(squamous cell carcinoma) 및 대세포암(large-cell carcinoma)의 3가지 형태의 NSCLC가 존재한다. 선암은 폐 말초 부위에서 주로 발생하고, 여성 또는 비흡연자에게서도 잘 발생하며, 크기가 작아도 전이가 되어 있는 경우가 많고, 최근 이의 발생 빈도가 증가하는 추세에 있다. 다음으로, 편평상피세포암은 주로 폐 중심부에서 발견되고, 주로 기관지 내강으로 자라 기관지를 막는 증상을 나타내며, 남성에게 흔하고, 흡연과 밀접하게 관련된 것으로 알려져 있다. 대세포암은 폐 표면 근처(폐 말초)에서 주로 발생하고, 절반가량은 큰 기관지에서 발생하며, 전체 폐암의 4 내지 10% 정도를 차지하고, 세포 크기가 대체적으로 크며, 그 중 일부는 빠르게 증식 및 전이되는 경향이 있어 다른 비소세포 폐암에 비해 예후가 나쁜 것으로 알려져 있다. 폐암에 대한 통상의 치료는 완화 처치, 수술, 화학요법 및 방사선요법을 포함한다.

[0005] 폐암이 조기에 진단될 경우에는 약물치료 및 방사선 치료 등을 통해 회복될 수 있으나, 일정 수준으로 병증이 악화된 경우에는 수술적 절제가 필수적이고 약물치료 및 방사선 치료를 병행하게 된다. 그런데 폐암의 조기 진단율은 약 20%로 높지 아니하다. 이에, 폐암 환자의 대부분은 폐 절제술을 시행하게 되는데 폐는 그 구조적 특성에 의해 원활하게 기능하는 특징을 가지고 있어 폐 절제술 시행 시 병변의 위치 및 크기를 정확하게 파악하여 종양과 적절한 거리를 절단하되 최소 절제하는 것이 유리하다.

[0006] 한편, 영상화 기술 중 근적외선 형광 영상기술은 비침습성 질병 진단과 모니터링 기술로서 주목받고 있는데, 근적외선 영역인 700~900nm 영역이 백그라운드 자가 형광이 낮고 광산란이 적으며 깊은 조직까지 영상이 가능한 장점이 있어 이상적인 생체 영상을 수행할 수 있다. 형광 영상을 위한 형광 염료 중 인도시아닌 그린(indocyanine green, ICG)은 임상을 통해 사용이 승인된 근적외선 형광 염료로서 주로 간 혈관 및 심장 염색에 사용되고 있으며 다양한 진단 및 영상기술에 응용되고 있다.

[0007] 1999년 ICG를 수술 전 정맥 주입하면 수술 중 근적외선 형광 영상 하에서 간암의 경계면 탐색이 가능함이 알려진 이래로, 최근 실제 임상에서 사용 가능한 패시브 타겟팅(passive targeting) 형광조영제를 이용한 암 탐색법이 활발하게 이용되고 있다.

[0008] 그러나, 정맥 주사를 통한 형광조영제의 주입은 암 탐색을 위하여 최소 5mg/kg의 고농도 형광조영제가 주입되어야 하며, 대장암, 유방암, 피부암, 폐암 등 여러 암종에서 일률적으로 적용되고 있지만, 폐암의 경우 그 탐색율이 매우 낮은 문제가 있다. 구체적으로, 폐암은 암 조직이 폐 표면으로부터 1 cm 이상의 깊이에 주로 위치하고 있어 암 탐색율이 10% 밖에 되지 않음을 보고되었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Onda N, Kimura M, Yoshida T, Shibutani M. Preferential tumor cellular uptake and retention of indocyanine green for in vivo tumor imaging. Int J Cancer. 2016 Aug 1;139(3):673-82. doi:

10.1002/ijc.30102. Epub 2016 Apr 4. PMID: 27006261.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 수용성의 형광염료와 지용성의 조영물질이 동시에 탑재되어, 우수한 폐 병변 표지 효과를 갖는 다중영상조영제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형광염료와 조영물질이 탑재되는 하이드로젤을 제공하는 것이다.
- [0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤을 포함하고, 상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 상기 제2텍스트란 고분자는 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 하이드로젤을 제공한다.
- [0017] 상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환될 수 있고, 상기 제2텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤을 포함하고, 상기 하이드로젤은 형광염료 및 조영물질이 탑재된 것인, 다중영상조영제 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 제2텍스트란 고분자는 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 제1텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 상기 제2텍스트란 고분자는, 하이드록실기의 10 내지 30 몰%가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광염료는 시아닌 계열의 형광염료인 것일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광염료는 인도시아닌 그린(Indocyanine green: ICG), 알렉사 플루오르 647(Alexa Fluor 647), 알렉사 플루오르 660(Alexa Fluor 660), 알렉사 플루오르 680(Alexa Fluor 680), 알렉사 플루오르 700(Alexa Fluor 700), 알렉사 플루오르 780(Alexa Fluor 780), cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, 사이페이트(Cypate), ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, 크레실 바이올렛(Cresyl Violet), 나일 블루(Nile Blue), 옥사진 750(Oxazine 750) 및 로다민 800(Rhodamine800), 텍사스 레드(Texas Red) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조영물질은 아이오다이즈드 오일인 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조영물질은 하이드로젤에 대하여 30 부피% 미만으로 포함되는 것일 수 있다. 상기 조영물질이 30 부피% 이상인 경우에는 불안정한 에멀전 형태가 되며(도 8), 상(phase)이 분리되어 체 내에 투여하기 부적합할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 형광염료는 0.005 mg/mL 내지 0.02 mg/mL의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 농도 범위를 벗어나는 경우에는 형광 세기가 감소하는 문제점이 발생할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 조성물은 폐 병변의 표지용인 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또다른 구현예로서, 상기 하이드로젤은, 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 혼합된 후 20 초 내지 250초 내에 젤화되어 형성된 것일 수 있다. 상기 시간을 벗어나는 경우, 임상 적용이 어려운 문제점이

발생할 수 있으며, 바람직하게는 20초 내지 250초 내에, 더욱 바람직하게는 20초 내지 180초, 가장 바람직하게는 30초 내지 40초 내에 젤화될 수 있어 임상에서 사용 시 빠른 젤화가 가능한 바 유용하게 사용될 수 있다.

- [0028] 또한, 본 발명은 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 제1텍스트란 고분자; 조영물질 및 형광염료를 포함하는 제1조성을 준비하는 단계(S1);
- [0029] 상기 제1조성에 음과처리하는 단계(S2);
- [0030] 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 제2텍스트란 고분자; 조영물질 및 형광염료를 포함하는 제2조성을 준비하는 단계(S3);
- [0031] 상기 제2조성에 음과처리하는 단계(S4); 및
- [0032] 음과처리가 완료된 제1조성 및 제2조성을 혼합하여 젤화하는 단계(S5)를 포함하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0034] 본 발명은 암탐색법에서 사용되었던 종래 형광조영제의 폐암의 탐색률이 낮았던 문제를 해결한 것으로, 본 발명의 다중영상조영제는 지용성 조영물질 및 수용성 형광염료를 동시에 탑재하는 하이드로젤을 포함한다. 상기 하이드로젤은 빠른 속도로 젤화되어 임상에서 사용이 용이하고, 폐암의 병변 부위에 장시간 유지되는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은 텍스트란 기반 하이드로젤에 ICG 및 아이오다이즈드 오일이 탑재된 하이드로젤의 모식도를 나타낸 것이다.
- 도 2는 하이드로젤 합성 방법(a) 및 ICG 와 아이오다이즈드 오일을 하이드로젤에 탑재하는 방법(b)을 나타낸 것이다.
- 도 3은 비닐설폰기로 치환된 텍스트란 고분자의 핵자기공명분석 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 4는 비닐설폰기 및 티올기로 치환된 텍스트란 고분자의 핵자기공명분석 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 5는 젤 농도 및 작용기 치환 정도에 따른 젤화 되는 시간을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 10%와 20%의 아이오다이즈드 오일이 함유된 젤의 생체 내(in-vivo) 촬영 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 각각 다른양의 아이오다이즈드 오일이 포함된 하이드로젤의 젤화 되는 시간을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 각기 다른 양의 아이오다이즈드 오일이 함유된 하이드로젤의 안정성을 CT 시그널로 나타낸 것이다.
- 도 9는 ICG 농도에 따른 형광 세기를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 ICG 및 아이오다이즈드 오일의 방출시간을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 11은 본 발명의 조영제의 적용시 사용하는 듀얼 시린지를 나타낸 것이다.
- 도 12는 생체 내(In-vivo) 개 모델에서 다중영상조영제의 효능을 최적화한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 13은 생체 내(In-vivo) 토끼 폐암 모델에서 다중영상조영제의 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] CT (computed tomography) 스크리닝의 증가에 따른 초기 폐 결절 환자의 증가로 제한적 폐 절제술의 필요성이 증가됨에 따라, 수술 전 병변 위치를 확인하여 표지하는 폐 병변 국소화 (localization)의 중요성도 증가되었다. 따라서 수술 전 CT 유도 하에 방사선 조영제(radiocontrast)인 아이오다이즈드 오일이나 후크와이어(hookwire) 등을 이용한 폐 병변의 위치를 미리 표지하는 국소화 연구들이 활발히 진행되고 있지만 현재 사용

되고 있는 폐 병변 국소화 방법들은 통증, 기흉과 같은 합병증을 유발, 기기사용의 번거로움, 폐 절제면 탐색의 어려움 등의 어려움을 겪고 있다.

[0038] 이와 같은 어려움을 줄이고자, 최근 ICG(indocyanine green)의 형광성질을 이용한 형광 영상 유도 하 폐 병변의 국소화를 진행한 연구들이 진행되고 있다. 상기 ICG는 FDA 승인 물질로서, 방사선 피폭이 없으며 흉강경을 이용한 수술 중 형광 영상 수술 장비를 이용하여 폐 병변의 위치를 쉽게 확인할 수 있는 조영제로 알려졌다. ICG를 이용하여 폐 결절을 국소화 할 경우, 수술 중 근적외선 형광 흉강경을 통해 실시간으로 폐 병변의 위치를 쉽게 파악할 수 있다.

[0039] 그러나 수용성 물질인 ICG를 폐 병변 국소화에서 단독 사용 시 주변 폐 조직으로 쉽게 퍼져 폐 병변의 정확한 위치 파악과 폐 절제면 확인이 어렵고, 1 cm 이상 깊이에 주입될 경우 ICG의 낮은 침투성(penetration) 때문에 수술 중 폐 병변의 위치 확인이 어렵다는 단점이 있다.

[0040] 반면, 임상에 주로 사용되는 X-선 조영제(X-ray contrast agent)인 아이오다이드 오일은 지용성(lipophilic) 물질이라, 수용성인 ICG 및 하이드로젤에 탑재가 용이하지 않다는 한계점을 내포하고 있다.

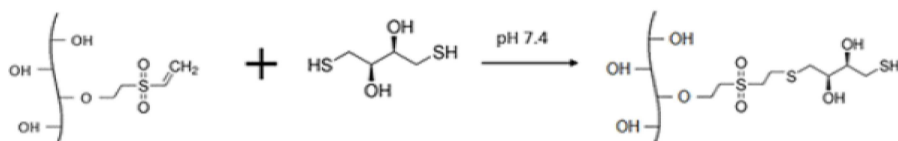
[0041] 그러므로 기존에 폐 병변 국소화에 사용되는 물질들의 한계를 극복할 수 있으며 ICG와 아이오다이드 오일을 동시에 탑재할 수 있는 형태의 조영제를 개발하기 위해 예의 연구한 결과, 하이드로젤 형태에 주목하였다.

[0042] 하이드로젤(hydrogel)이란, 수용성 고분자가 화학적 공유결합을 통해 3차원 구조를 형성한 후 많은 양의 물을 포함할 수 있는 물질이다. 이와 같은 특성 때문에 다년간 조직공학 (tissue engineering), 재생의료(regenerative medicine), 진단의학(diagnostics) 및 약물전달(drug delivery) 분야에서 하이드로젤이 응용, 사용되고 있다. 특히 유기화학적 작용기 혹은 고분자의 물리화학적 특성을 변형하여 만든 “주사가능(injectable)”한 하이드로젤은 임상적으로 중요하게 고려되고 있다.

[0043] 따라서, 본 발명은, 제1텍스트란 고분자 및 제2텍스트란 고분자가 가교되어 형성된 하이드로젤을 포함하고, 상기 하이드로젤은 형광염료 및 조영물질이 탑재된 것인, 다중영상조영제 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에서 상기 제1텍스트란 고분자는 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 것이고, 제2텍스트란 고분자는 하이드록실기가 비닐설폰기 및 티올기로 치환된 것이다. 상기 제1텍스트란고분자는 하이드록실기 중 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기로 치환되고, 상기 제2텍스트란고분자는 하이드록실기 중 10 내지 30 몰%가 비닐설폰기 및 티올기로 치환된 것을 특징으로 한다. 상기 제1텍스트란 고분자와 제2텍스트란 고분자의 티올기 및 하이드록실기가 가교(crosslinking)되어, 하이드로젤이 형성될 수 있다. 즉, 상기 하이드로젤의 하이드록실기 중 10 내지 30 몰%가 치환된 형태인 것일 수 있다. 본 명세서에서 “하이드록실기가 비닐설폰기 및 티올기로 치환”되었다는 것은 구체적으로 하이드록실기에 비닐설폰기가 치환된 후, 상기 비닐설폰기의 이중결합탄소 부위에 티올기가 첨가반응한 것을 의미한다. 그 바람직한 예시를 하기 화학식 1에 나타내었다.

[0045] [화학식 1]



[0046]

[0048] 본 발명의 형광염료는 수용성 염료로서, 시아닌계열의 형광염료일 수 있다. 상기 형광염료는 인도시아닌 그린(Indocyanine green: ICG), 알렉사 플루오르 647(Alexa Fluor 647), 알렉사 플루오르 660(Alexa Fluor 660), 알렉사 플루오르 680(Alexa Fluor 680), 알렉사 플루오르 700(Alexa Fluor 700), 알렉사 플루오르 780(Alexa Fluor 780), cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, 사이페이트(Cypate), ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, 크레실 바이올렛(Cresyl Violet), 나일 블루(Nile Blue), 옥사진 750(Oxazine 750) 및 로다민800(Rhodamine800), 텍사스 레드(Texas Red) 및 이들의 혼합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 조영물질은 지용성의 조영물질로서, 바람직하게는 아이오다이드 오일일 수 있다.

[0049] 본 발명의 조성물은 보다 상세하게 CT 촬영이 가능한 수용성 염료인 ICG와 X-ray 조영제인 지용성의 조영물질로 아이오다이드 오일을 포함하여, 깊은 위치에 있는 폐 병변의 위치를 쉽게 파악할 수 있으며, 장시간 유지가

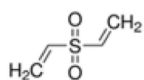
가능한 장점이 있다.

- [0050] 상기 조영물질은 하이드로젤에 대하여 30 부피% 미만으로 포함되는 것일 수 있다. 바람직하게는 0.01 이상 30부피% 미만으로 포함될 수 있다. 상기 조영물질이 30 부피% 이상인 경우 상(phase)이 분리된 불안정한 에멀전 형태가 되어 사용이 어려운 문제점이 발생할 수 있다.
- [0051] 상기 형광염료는 0.005 mg/mL 내지 0.02 mg/mL의 농도로 하이드로젤에 포함되는 것으로, 상기 농도 범위에서 최상의 세기(intensity) 값이 확인된다.
- [0052] 본 발명은 또한, 하이드록실기가 비닐설폰기로 치환된 제1텍스트란 고분자; 조영물질 및 형광염료를 포함하는 제1조성을 준비하는 단계(S1);
- [0053] 상기 제1조성에 음파처리하는 단계(S2);
- [0054] 하이드록실기가 티올기 및 비닐설폰기로 치환된 제2텍스트란 고분자; 조영물질 및 형광염료를 포함하는 제2조성을 준비하는 단계(S3);
- [0055] 상기 제2조성에 음파처리하는 단계(S4); 및
- [0056] 음파처리가 완료된 제1조성 및 제2조성을 혼합하여 젤화하는 단계(S5)를 포함하는, 다중영상조영제 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 S5단계의 젤화는, 20초 내지 250초 내에, 바람직하게는 20초 내지 180초, 더욱 바람직하게는 30초 내지 40초 내에 젤화될 수 있어 임상에서 사용 시 빠른 젤화가 가능한 바 유용하게 사용될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조영제 조성물은 유효성분으로서 상술한 조영물질과 형광염료 이외에 공지된 조영물질 및 형광염료를 추가로 포함할 수 있고, 폐 질환의 병변에 대한 구체적인 정보 획득을 위한 공지된 다른 진단방법과 병용될 수 있다.
- [0059] 한편, 본 발명의 형광 조영제가 근적외선 형광 다이(near infra-red fluorescent dye)인 경우, 근적외선 파장영역에서 형광 특성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 조성물은 당해 분야의 기술자에게 공지된 근적외선 형광 영상(NIR imaging)방법을 통해 이미지를 획득할 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 예를 들어 근적외선 광학영상 측정장치(NIR optical imaging system)를 이용하여 영상을 촬영하고, 형광 분광계(Fluorescence Spectrophotometer)를 이용하여 근적외선 형광 스펙트럼을 측정할 수도 있다.
- [0061] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0063] **실시예 1. 하이드로젤의 제조방법**

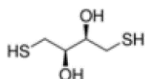
- [0064] 본 실시예에서는, 도 2a에 나타낸 것과 같이 하이드로젤의 합성을 위해 텍스트란 고분자의 하이드록실(hydroxyl) 작용기를 클릭화학기법(click chemistry)을 활용하여 하기 화학식 2의 비닐설폰기(전구체 1) 및 하기 화학식 3의 티올기(전구체 2)를 갖고 있는 고분자로 변형시켰다.

- [0065] [화학식 2]



- [0066]

- [0067] [화학식 3]



- [0068]

- [0069] 보다 상세하게는, 텍스트란 고분자에 포함된 하이드록실기의 몰수 대비 1.25배의 다이비닐설폰(divinylsulfone, MW: 118.16 g/mol)을 0.1M NaOH (~pH 11 이상)에서 넣어준 후 원하는 비닐설폰기 치환 정도에 따라 반응시간을 달리하여 합성을 진행하였다. 상기 화학반응을 반응 시간에 따라 종료할때는 6M HCl을 넣어주어 pH를 7 이하로 떨어뜨려 주는 것으로 하였다. 이렇게 비닐설폰기로 치환된 텍스트란 고분자를 3일 정도 물로 투석(dialysis)시켜 주어 (3.5kDa molecular weight cut-off dialysis membrane) 반응시 소모되지 않은 화학물들을 제거해 주었다. 투석 후 동결건조를 통해 비닐설폰기로 치환된 고체형태의 제1 텍스트란 고분자를 획득하였다. 비닐설폰기로 치환이 잘 되었는지의 여부는 핵자기공명(^1H NMR) 분석을 통해 확인하였다.
- [0070] 도 3에 각각 10몰%, 20몰%, 그리고 30몰%의 비닐설폰기로 치환된 텍스트란 고분자의 ^1H NMR 스펙트럼을 나타내었다. 여기서 치환 정도는 $\delta = 6.9$ 와 at $\delta = 2$ 에 해당하는 피크(peak)의 곡선아래면적(area under curve)를 적분 후 비교하여 확인하였다.
- [0071] 비닐설폰기 및 티올기로 치환된 제2 텍스트란 고분자를 합성하기 위해, 상기 10몰%, 20몰%, 그리고 30몰%의 비닐설폰기로 치환된 제1 텍스트란 고분자를 1M 포스페이트 버퍼(phosphate buffer saline)를 이용하여 pH 7.4로 맞추어 주었다. 치환된 비닐설폰기의 몰수 대비 5배 이상의 다이티오프레이톨(dithiothreitol, MW: 154.253 g/mol)을 첨가해 주어 약 40분간 반응을 진행하여 모든 비닐설폰기에 티올기가 첨가될 수 있도록 하였다. 40분 뒤 1M HCl을 첨가해 주어 pH를 약산성의 조건으로 만든 뒤 3일간의 투석(dialysis)을 통해 반응시 소모되지 않은 다이티오프레이톨을 제거해 주었다. 투석 후 티올기와 비닐설폰기로 치환된 제2 텍스트란 고분자를 동결건조하였다. 성공적인 티올기 치환 여부는 핵자기공명(^1H NMR)을 활용하여 $\delta = 6.9$ 피크가 사라지는지 여부를 통해 확인하였다 (도 4).
- [0072] 그 다음, 제조된 동결건조 상태의 제1 텍스트란 고분자 및 제2 텍스트란 고분자를 각각 PBS에 녹인 후, 각각 ICG 및 아이오다이즈드 오일을 첨가하였다. 이후 지용성인 아이오다이즈드 오일의 에멀전(emulsion)화를 위해 음파처리(sonication)를 각각 5분 동안 진행하였다. 음파처리 이후 얻어진 동일한 부피의 제1 텍스트란 고분자 용액과 제2 텍스트란 고분자 용액을 혼합하여 젤화될 수 있도록 하였다. 혼합조건은 pH 7.4 (생체 pH), 상온(room temperature)에서 혼합하여 약 30 내지 40초 후에 젤 형성이 완료되었다 (도 2).
- [0074] **실시예 2. 젤농도 및 작용기 치환 정도의 최적화**
- [0075] 상기 방법에서 젤화되는 시간을 최적화하기 위하여, 고분자의 농도 및 작용기 치환 정도에 따른 젤화 시간을 확인하여 도 5에 나타내었다. 고분자의 농도는 PBS에 대하여 w/v %로 나타내었고, 작용기 치환정도(DM)는 각각 10, 20 및 30 몰%이다.
- [0076] 실험결과 10%(w/v)의 고분자 농도에서, 제1 텍스트란 고분자 및 제2 텍스트란 고분자의 작용기 치환 정도가 20 몰%인 하이드로젤이 약 30초 정도의 임상적으로 최적화된 젤화시간을 갖는 것으로 확인되었다.
- [0078] **실시예 3. 아이오다이즈드 오일 함유량에 따른 하이드로젤의 최적화**
- [0079] 아이오다이즈드 오일의 함유량에 따른 하이드로젤의 물성을 확인하였다. 아이오다이즈드 오일은 젤의 총 부피를 기준으로 각각 0, 10, 20 및 30%(v/v)로 실험하였으며, 30%(v/v) 이상이 되면 고르지 못한 에멀전(emulsion)이 되는 것이 확인되었다 (도 6 및 도 8). 또한 20%(v/v) 미만일때는 생체 내 실험결과상 젤의 부피에 따라 CT 시그널 확인이 되지 않는 것을 확인하였다 (도 6). 따라서 20%(v/v)의 아이오다이즈드 오일 농도를 최적화된 농도로 설정하였다. 20%(v/v)의 아이오다이즈드 오일 함유 시 젤화되는 시간이 변화없이 약 30초정도로 유지되는 것을 확인하였다(도 7).
- [0081] **실시예 4. ICG 농도의 최적화**
- [0082] 또한 ICG 농도 설정을 위해, Hironobu Wada 등의 'Minimally Invasive Electro-Magnetic Navigational Bronchoscopy-Integrated Near-Infrared-Guided Sentinel Lymph Node Mapping in the Porcine Lung (PLoS ONE 10(5): e0126945. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126945>)' 논문을 참고하는 동시에 직접 최적화 실험을 진행하였다. 이때, ICG 농도가 약 0.005 mg/ml ~ 0.02 mg/ml 일 때 최상의 세기(intensity)값을 보이는 것

을 확인하였다 (도 9).

[0084] **실시예 5. ICG 및 아이오다이즈드 오일의 농도에 따른 하이드로젤의 형광성능 확인**

[0085] 상기 결과들로부터, 0.01mg/ml의 ICG 및 20%의 아이오다이즈드 오일을 포함하는 하이드로젤에 가장 효과적인 형광 성능이 있을 것임을 예상할 수 있다. 이에 0.01mg/ml의 ICG 및 20%의 아이오다이즈드 오일을 탑재한 하이드로젤 제형을 합성 후, ICG 및 아이오다이즈드 오일의 방출시간을 24시간동안 37 °C의 PBS(Phosphate Buffered Saline)에서 확인하였다.

[0086] 그 결과, ICG 및 아이오다이즈드 오일이 24시간동안 성공적으로 하이드로젤에 탑재가 된 결과를 확보하였다 (도 10).

[0088] **실시예 6. 다중영상조영젤의 생체 내(in-vivo) 효과 확인**

[0089] 상기에서 최적화된 제형의 다중영상조영젤의 효능을 생체 내(in-vivo) 실험(개 및 토끼 폐암 모델)을 통해서도 확인하였다. 폐에 주입 후, ICG 및 아이오다이즈드 오일을 함유하고 있는 제1 텍스트란 고분자 용액과 제2 텍스트란 고분자 용액이 만나 하이드로젤 형성이 될 수 있도록 하기 위하여 듀얼 시린지(dual syringe)를 제작, 이를 in-vivo실험에 활용하였다(도 11).

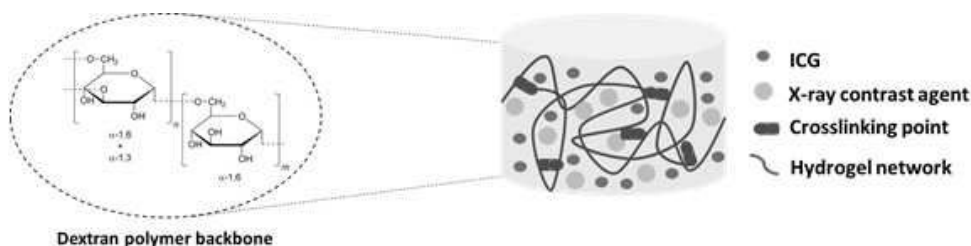
[0090] 구체적으로, 0.01mg/ml의 ICG를 포함하며, 0%, 10% 또는 20%의 아이오다이즈드 오일을 탑재한 하이드로젤을 이용하여 in vivo 실험을 수행하였다. 개를 활용한 in-vivo실험 결과 대조군(하이드로젤 없이 아이오다이즈드 오일 및 ICG로만 에멀전(emulsion)을 만든 제형) 대비 다중영상조영젤 사용 시 아이오다이즈드 오일 및 ICG가 주입된 폐 조직에서 잘 유지되고 있는 것을 확인하였다 (도 12). 더불어 시험관 내(in-vitro) 실험의 결과와 마찬가지로 10%의 아이오다이즈드 오일을 함유하고 있는 하이드로젤은 C-arm 촬영 시 거의 보이지 않았고, 20%의 아이오다이즈드 오일을 함유하고 있는 젤은 ICG 시그널과 병변 부위에 잘 유지됨과 동시에 병변 부위를 식별할 수 있는 CT 시그널을 보였다 (도 12).

[0091] 개를 활용한 추가적인 in-vivo 최적화 단계를 거쳐 토끼 폐암 모델에서의 다중영상조영젤의 효과를 확인한 결과 24시간 동안 아이오다이즈드 오일 및 ICG가 폐암 병변 부위에서 잘 유지되고 있음을 확인하였다 (도 13).

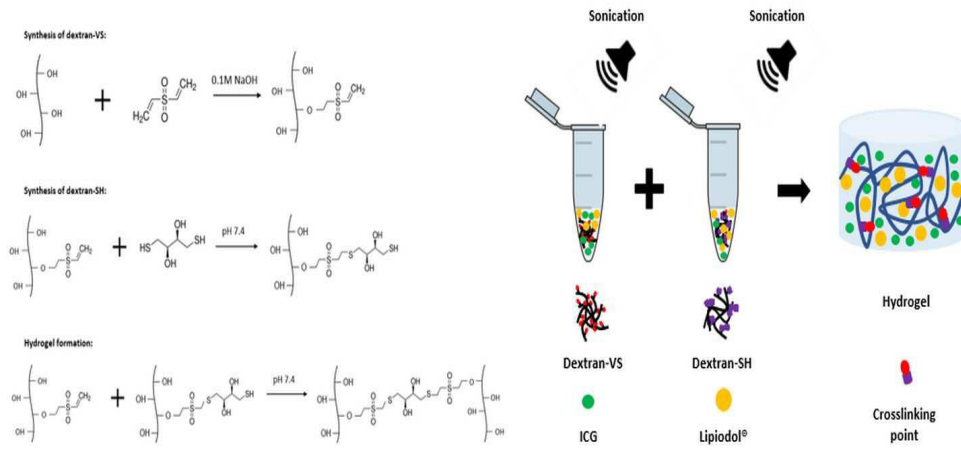
[0093] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

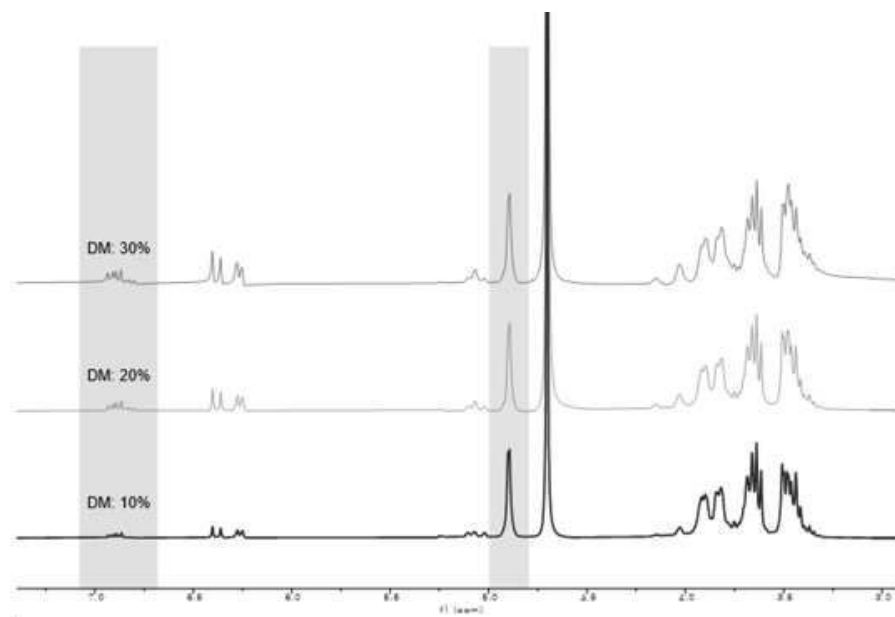
도면1



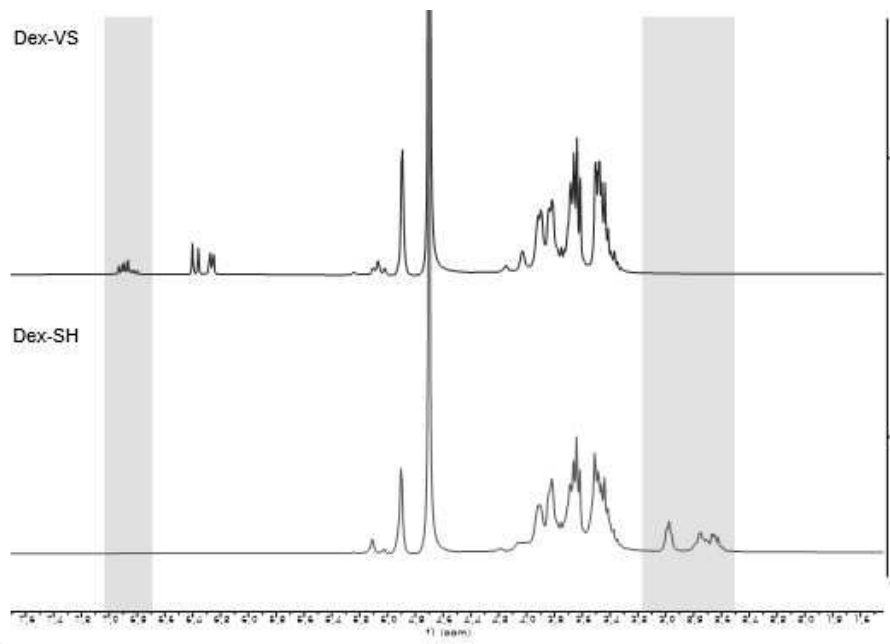
도면2



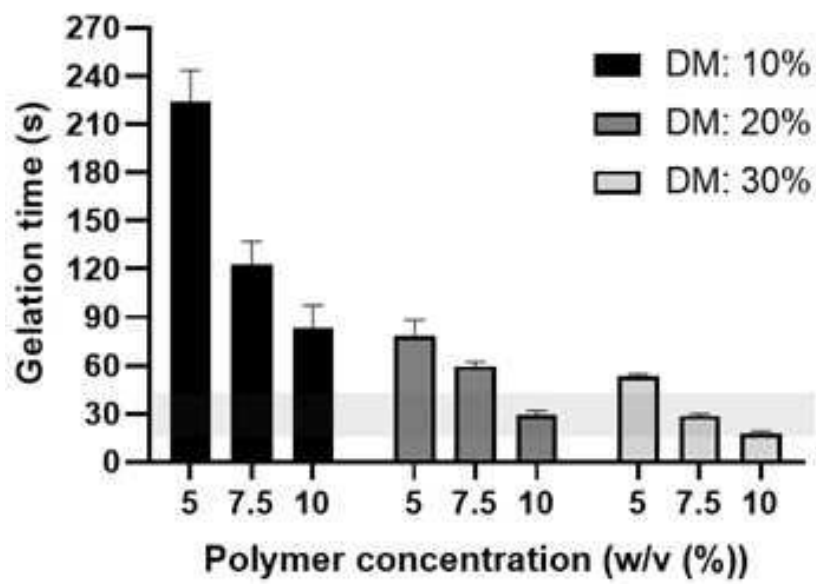
도면3



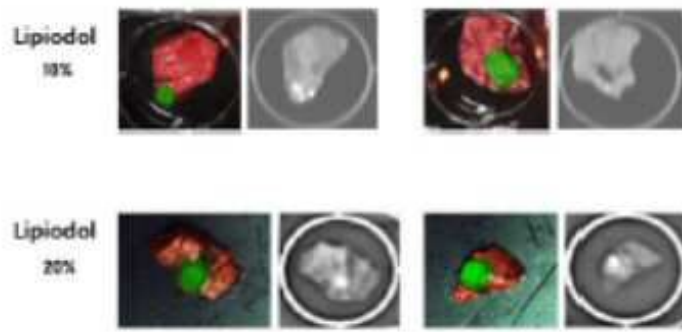
도면4



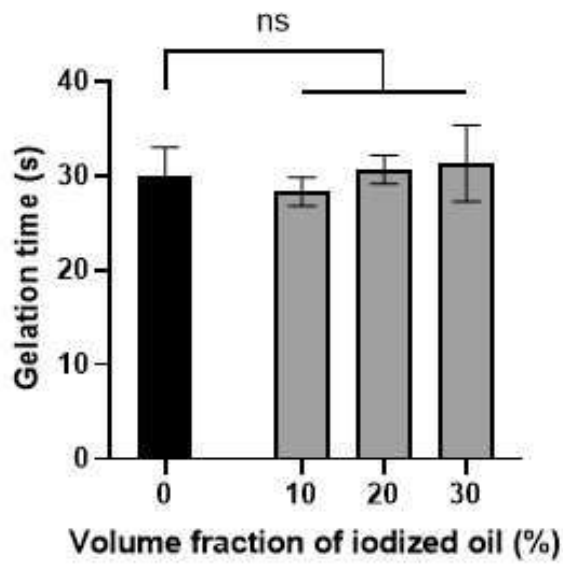
도면5



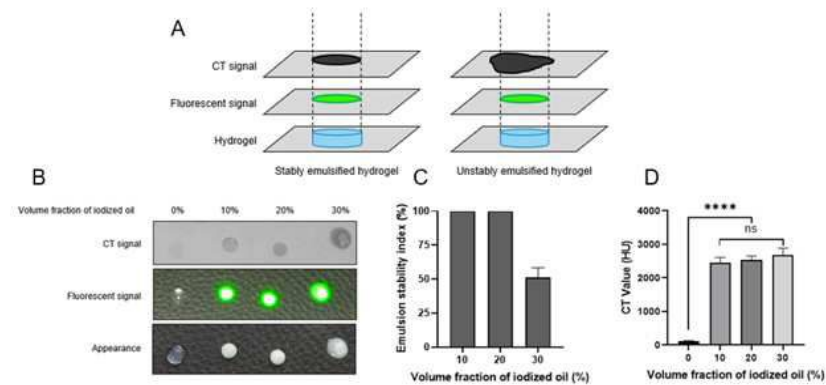
도면6



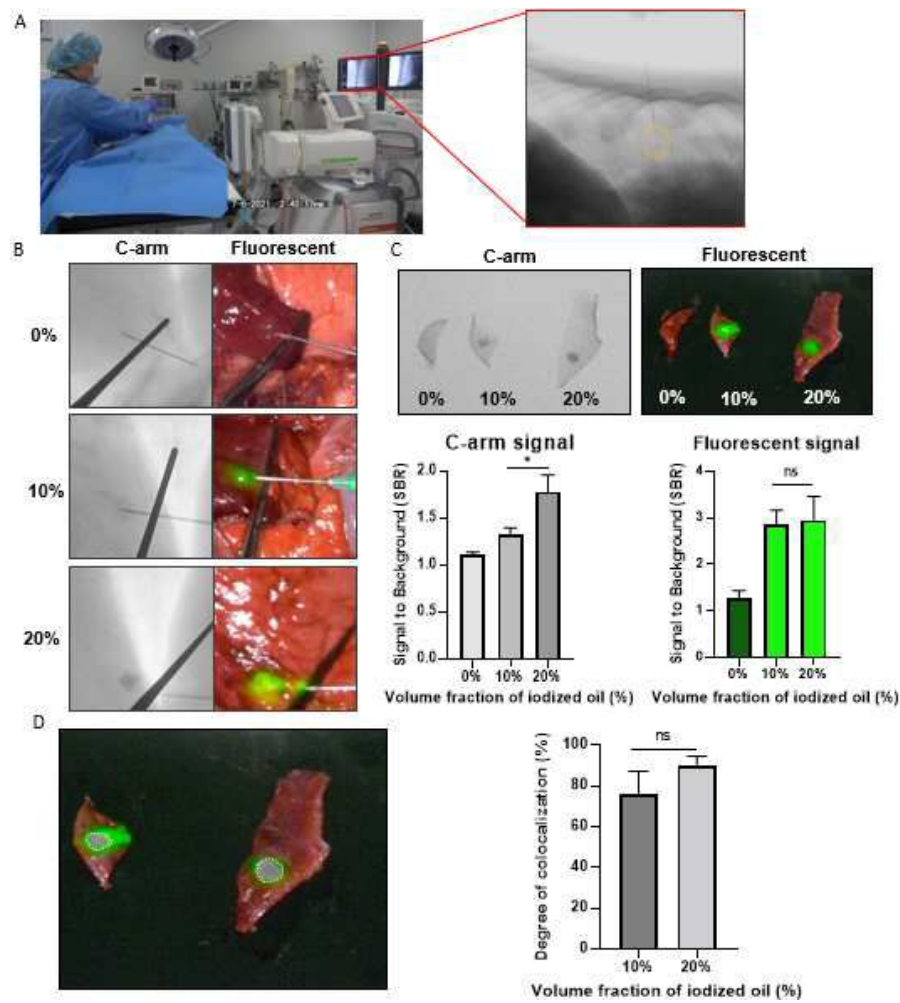
도면7



도면8



도면12



도면13

