(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년07월04일
(11) 등록번호 10-1873840
(24) 등록일자 2018년06월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/18 (2006.01) *A61K 35/15* (2014.01)
A61K 49/04 (2006.01) *A61K 51/12* (2006.01)
G01N 21/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/1818 (2013.01)
A61K 35/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0166238
(22) 출원일자 2017년12월05일
심사청구일자 2017년12월05일
(56) 선행기술조사문헌
US20150056144 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
홍석진
서울특별시 강남구 압구정로 401, 51동 402호(압구정동, 한양아파트)
김세환
경기도 성남시 분당구 서현로 181, 206동 1403호(이매동, 이매촌한신아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김정수

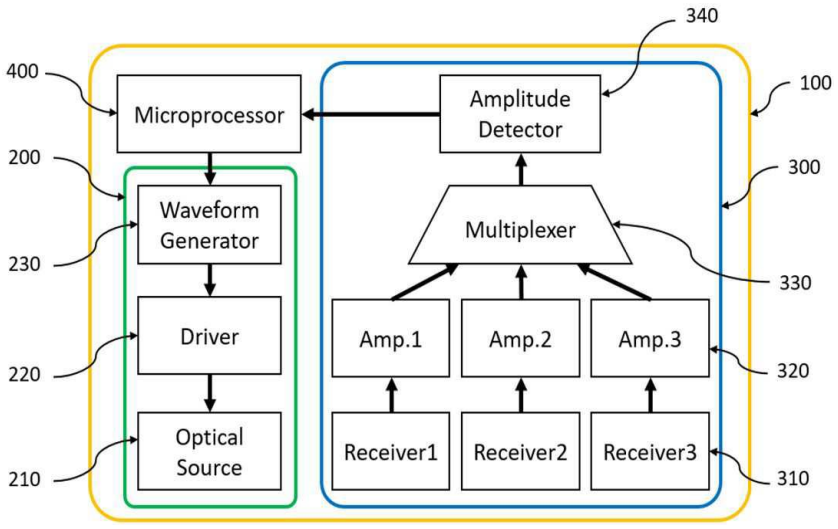
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 **금나노 입자가 담지된 대식세포와 연속광파 방식의 확산광 분광법을 이용한 폐질환 영상 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 금나노 입자와 대식세포를 함께 배양하여 대식세포에 금나노 입자를 담지시키는 방법으로 제조된 진단용 조성물을 확산광 분광 영상법을 이용하여 폐의 영상을 측정하고, 얻어진 확산광 분광 영상을 분석하여 폐질환의 진단 정보를 측정하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명의 금 나노 입자를 담지한 대식세포는 투여될 피험체에 악영향을 주지 않고 폐로 이동하므로, 환자에서 폐질환을 진단하기 위한 비침습적인 측정 방법인 확산광 분광 영상법의 조영제로 사용될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하면 인체에 무해한 근적외선을 사용하는 확산광 분광 영상법으로 빠른 시간 내에 폐의 국소적인 염증 부위 및 그 염증 정도를 시각화할 수 있어 임상적 사용이 기대된다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61K 49/0423 (2013.01)
A61K 51/1244 (2013.01)
G01N 21/25 (2013.01)
(72) 발명자
박일호
서울특별시 서초구 신반포로 270, 103동 1502호(반포동, 반포자이아파트)
이민석
대전광역시 서구 둔산로 201, 304동 101호(둔산동, 국화아파트)
박일석
경기도 화성시 동탄반석로 156, 102동 3203호(반송동, 동탄하이페리온)
강성훈
충청북도 충주시 대소원면 첨단쉼터8길 19, 502동 322호(충주첨단행복주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1C1A1A02037328
부처명 미래 창조 과학부
연구관리전문기관 한국 연구 재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 두경부암의 광열 치료에서 금나노 입자와 대식세포를 결합한 표적 전달 시스템 개발
기 여 율 1/2
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2017.07.01 ~ 2018.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2018R1C1B6008596
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구
연구과제명 면역세포와 나노입자의 표적전달 시스템을 이용한 알레르기 비염 및 천식의 바이오 이미징 진단 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 한림대학교 산학협력단
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

금 나노 입자 혹은 금 나노 쉘이 담지된 대식세포를 포함하는 천식 진단용 확산광 분광법 조영제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금 나노 입자 혹은 쉘이 담지된 대식세포는 500~700 nm 파장 혹은 700~900 nm 파장의 근적외광을 흡수하는 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대식세포가 1×10^{7} 세포/㎖ 내지 1×10^{8} 세포/㎖의 농도로 투여되는 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 6

제1항에 있어서,

약제적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 7

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 금나노 입자가 담지된 대식세포를 포함하는 폐질환 진단용 조성물 및 이를 이용한 확산광 분광법(optical diffuse spectroscopy) 영상 진단 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 금나노 입자를 담지한 대식세포가 염증 질환 등이 있는 폐에 분포하게 될 때 확산광 분광법을 이용하여 폐질환을 진단하기 위한 조영제, 및 이를 이용하여 연속광파 방식의 확산광 분광법으로 폐를 영상화하여 폐질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 기존에는 폐질환을 진단하기 위하여, 주로 폐활량 측정, 폐 용적 측정에 의한 폐기능 검사, 흉부 X선 촬영 및 흉부 CT 촬영 등을 활용하고 있으며, 특히, 천식의 경우 기관지 수축제를 흡입하여 기도의 과민성을 증명하는 천식유발 검사, 객담(가래)에 있는 알레르기 염증세포를 직접 관찰하여 기도의 알레르기 염증 정도를 측정하는 객담 검사 또는 천식 유발 검사 방법 등을 추가로 이용하여 천식 여부를 진단하고, 치료 방향을 결정하고 있다.

[0003] 폐기종, 천식 등의 폐질환을 정량화하고 분석하는 것은 임상 분야에서 점차 중요해지고 있다. 게다가 폐의 각 부분들 간에 손상 정도가 다양하므로, 폐질환의 국소적인 분포를 분석하는 것은 의학적으로 의미가 있다.

[0004] 최근에는, 다양한 질환을 진단하기 위해서, 자기공명이미지화(MRI), X-선, 컴퓨터 단층촬영(CT), 양성자방출 단

층촬영술(PET), 단일 광자 방출 촬영술(SPECT), 또는 형광 이미지화(FI) 등을 다양하게 활용하고 있으며, 상기 이미지 수단의 효과적인 적용을 위한 올인원 조영제(all-in-one contrast agents)의 개발이 요망되고 있다.

[0005] 기존에 CT 촬영에 사용되는 정맥 조영제는 요오드 성분이 들어있는 약제로, 연조직의 X선 흡수도에 차이를 주어 병변과 정상 조직이 구분되게 한다. 그러나 요오드 성분에 대한 과민 반응으로 부작용이 구토, 신장 기능 저하 등의 부작용을 유발하는 것이 알려져 있다.

[0006] 한편, 금나노 입자는 현재 영상의학에서 CT, MRI, PET(position emission tomology), PA(photo acoustic imaging), OCT(optical coherence tomology) 등에서 조영제로 두루 사용되고 있고, 특히 CT 조영제로 사용되고 있다. 금(Au)은 기존의 요오드 조영제에 비해 X선 흡수율이 높고, 분자량이 크므로 천천히 배출되어 이미지화 시간이 길며, 생체친화성이 높아 독성이 적으며, 기존의 CT 조영제보다 적은 양을 사용할 수 있어, 조영제로서의 활용성을 높일 수 있다.

[0007] 한편, 대식세포는 면역 세포의 일종으로, 혈류량이 많고 호흡을 통해 미세먼지 등과 같은 다량의 항원이 흡입되는 폐에 분포도가 매우 높은 것으로 알려져 있다. 폐에 상주하는 대식세포는 평소에는 심각하지 않은 자극원에 대해서는 과다 반응을 일으키지 않기 위해, 활성 억제 상태(dampened state)로 유지된다. 그러나, 폐염증 등의 질환이 발병하면, 기존의 폐에 상주하는 대식세포는 억제 상태에서 벗어나며 신체의 다른 기관에서 이동해온 대식세포까지 합쳐져 항원들과 과다 반응하며, 이로 인해, 염증 매개자들이 방출되고 폐 표피 세포의 사멸이 유도되고, 세포외 기질의 분해 및 면역 병리 현상이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 빛이 인체조직에 조사되면 흡수, 반사, 산란 등을 통해 확산되어가며, 산란된 빛의 세기 등의 특성을 측정함으로써, 인체조직의 구성 성분을 알아낼 수 있다. 인체조직은 산소결합 헤모글로빈(HbO_2), 산소 미결합 헤모글로빈(HbR), 물, 지방 등 여러 성분으로 구성되어 있으므로, 여러 파장의 광을 사용하여 각 파장마다 흡수되는 정도를 측정하여 각 성분의 농도를 계산할 수 있으며, 이러한 원리로 조직의 위치에 따른 확산광 분광 영상을 얻을 수 있다. 이때 사용되는 광원은 가시광 대역에서 근적외선 대역의 광이 주로 사용되어, 인체에 무해하고 비침습적인 측정이 가능하다는 장점이 있다.

[0009] 확산광 분광 영상에 사용되는 측정 방법으로는, 크게 시간 영역(Time Domain) 방식과 주파수 영역(Frequency Domain) 방식과 연속광파(Continuous Wave) 방식이 사용된다. 시간영역 방식의 경우, 나노초(nanosecond) 이하의 광 펄스를 인체조직에 입사시킨 후 확산광의 시간적 분포 형태를 통해 측정하게 되며, 정확한 측정이 가능하지만 낮은 신호대 잡음비로 인해 측정 시간이 오래 걸리고 시스템의 가격이 고가인 단점이 있다. 주파수 영역 방식의 경우, 수십에서 수백 MHz 대의 RF(Radio Frequency) 신호로 광을 입사시킨 후 확산광의 진폭과 위상 변화를 측정하며 시간영역 방식에 비해 빠른 측정이 가능하고 장비의 가격이 싸지만 RF 신호 품질에 대한 관리가 어렵다. 연속광파 방식의 경우, 비교적 낮은 주파수의 일정한 광 신호를 인체조직에 입사하여 확산광의 진폭을 측정하며 가장 간단하고 저렴하며 빠르게 측정이 가능하기 때문에 실시간 측정이 가능하지만 정확한 산란계수와 흡수계수를 분리하여 측정할 수 없다는 단점이 있다. 광원과 검출기 사이의 간격을 바꾸어가며 측정하는 경우에는 대략적인 산란계수와 흡수계수 계산이 가능하다.

[0010] 종래에는 금나노 입자의 장점과 생체 벡터로서의 대식세포의 기능성을 활용하여 폐질환을 진단하는 확산광 분광 영상법에 관한 기술 내용이 개시된 바 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0865667호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Circulation. 2008; 17:379-387

(비특허문헌 0002) Contrast Media Mol Imaging. 2010; 5(4): 231~236.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 폐의 염증 발생 시 대식세포가 폐로 이동하는 특성에 착안하여, 금나노 입자를 포함한 대식세포 조성물과 비침습적인 측정 방법인 확산광 분광 영상법을 통해 폐질환을 진단할 수 있는 폐질환 영상진단 방법을 제공하고자 한다.

[0014] 금나노 입자는 빛의 파장에 따라 흡수, 산란, 반사 또는 형광되는 스펙트럼 성질을 가지고 있으며, 이러한 금나노 입자를 식세포 작용(phagocytosis)에 의해 담지한 대식세포가 생체내 벡터로서 폐의 염증 부위로 이동하게 되면, 염증 부위에 존재하는 금나노 성분을 확산광 분광 영상법을 통해 측정하고, 이에 의해 폐의 질환을 진단할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명은 금 나노 입자 혹은 금 나노 쉘이 담지된 대식세포를 포함하는 폐질환 진단용 확산광 분광법 조영제를 제공한다.

[0016] 일 실시예에서, 상기 금 나노 입자 혹은 쉘이 담지된 대식세포는 500~700 ㎚ 파장 혹은 700~900 ㎚ 파장의 근적외광을 흡수하는 것일 수 있다.

[0017] 일 실시예에서, 상기 폐질환은 대엽성 폐렴, 기관지 폐렴, 급성 괴사성 폐렴, 급성 간질성 폐렴, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 폐농양, 폐결핵 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0018] 일 실시예에서, 상기 폐질환이 천식인 것을 특징으로 하는 확산광 단층촬영 조영제일 수 있다.

[0019] 일 실시예에서, 상기 대식세포가 1×10^{7} 세포/㎖ 내지 1×10^{8} 세포/㎖의 농도로 투여될 수 있다.

[0020] 일 실시예에서, 상기 조영제에는 약제적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 추가로 포함될 수 있다.

[0021] 본 발명은 상기 폐질환 진단용 조영제와 확산광 분광법을 이용한 폐질환 진단용 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 금나노 입자를 담지한 대식세포 조성물과, 비침습적인 측정 방법인 확산광 분광 영상법을 통해 폐질환을 진단할 수 있는 폐질환 영상 진단 방법에 대한 것이다.

[0023] 금나노 입자를 담지한 대식세포의 광학적인 특성에 따라 확산광 분광 영상법 을 이용하여 단시간 내에 폐질환 환자의 폐 면적 중 국소적인 염증 부위 및 그 염증 정도를 시각화할 수 있다. 확산광 분광 영상법은 인체에 무해한 근적외선 대역의 빛을 주로 사용하며 비침습적인 측정이 가능하고, 연속 광파 방식의 확산광 분광 방법은 측정 장치가 간단하고 빠르게 측정할 수 있으므로 넓은 영역을 빠르게 진단할 수 있다.

[0024] 상기 확산광 분광법은 방사선을 사용하지 않기 때문에 인체에 무해하며, 비침습적 측정이 가능하다. 특히 연속광 방식의 확산광 분광법을 사용할 경우, 영상 측정 장치를 소형화할 수 있어 휴대성이 용이하고, 임상 현장에서 즉시 활용이 가능한 장점이 있다.

[0025] 또한, 본 발명에 사용되는 조성물은 독성이 적어 투여될 피험체에 해로운 영향을 주지 않고 염증이 있는 폐로 이동하고 천천히 배출되므로, 환자에서 폐질환을 진단하기 위한 광 영상 진단용 조영제로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1a은 본 발명에 사용된 금나노 입자의 구조를 나타낸 것이다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 본 발명에 사용된 금 나노입자는 금 이온을 중심으로 트리소듐시트레이트가 표면을 감싸 안정된 입자를 형성한다.

도 1b는 본 발명에 사용된 금나노 쉘의 구조를 나타낸 것이다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 사용된 금나노쉘은 금으로 된 코어와 실리카, 및 입자 표면 상의 상자성 지질, 폴리에틸렌글리콜, 형광 탐지 물질(Cy5.5)을 갖는다.

도 2a는 본 발명에 사용된 금나노 입자를 담지한 대식세포 조성물의 흡수 파장(a), 및 금나노 입자 증가에 따른

금 이온의 중량 증가(b)를 나타낸 것이고, 도 2b는 금나노 쉘의 흡수 파장(c)을 나타낸 것이다.

도 3a는 본 발명의 금 나노 입자를 담지한 대식세포 조성물의 폐염증 모델에서의 생체내 분포를 나타낸 것이고, 도 3b는 염증을 유발한 폐에서의 분포를 나타낸 것이다.

도 4는 금 나노입자의 대식세포에 대한 시험관내 독성 시험의 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 금 나노 입자가 담지된 대식세포의 적혈구에 대한 용혈 시험 결과를 나타낸 것이다. PBS 및 Triton X-100는 각각 양성 대조군과 음성 대조군으로 사용되었고, 금 나노 입자가 담지된 대식세포는 각각 다른 농도인 12.5, 5, 2.5, 1.25, 0.635 pmol/ℓ에서 시험하였다.

도 6은 본 발명에 의한 영상 진단 방법의 한 예를 나타낸 것이다.

도 7은 광이 인체조직 등에 입사되었을 때 흡수, 산란, 반사 등을 통해 확산되는 과정을 나타낸 것이다.

도 8은 연속광파 방식의 확산광 측정 방법의 원리를 나타낸 것이다. 일정한 주파수를 가진 광 신호를 인체조직에 입사하여 확산광의 진폭을 측정하며, 광원으로부터 멀어질수록 측정되는 확산광의 진폭은 작아진다.

도 9는 연속광파 방식의 확산광 측정을 위한 기기의 내부 블록 다이어그램의 한 예를 나타낸 것이다.

도 10a은 금나노 입자를 담지한 대식세포를 포함한 조성물을 투여한 마우스에 대한 확산광 단층 촬영의 실제 사진(A)과, 실험에 사용된 마우스에서의 측정 거리(B)를 나타낸 것이다.

도 10b는 금나노 입자 담지 대식세포를 포함한 조성물을 투여한 마우스의 폐염증 모델을 연속광파 방식의 확산광 측정 장치를 사용하여 측정하고, 파장에 따라 영상화한 결과를 나타낸 것이다. 각 그래프의 y축에서 좌측은 상기 도 10b(B)에 기재된 마우스에서의 측정 거리이고, 우측은 흡광도를 나타낸다. 붉은 색으로 나타난 부분이 금나노 입자가 많이 탐지되는 부분으로서, 대식 세포가 다수 분포하는 염증 부위로 볼 수 있다.

도 11은 마우스의 폐염증 모델에 본 발명의 금나노 입자 담지 대식세포를 포함한 조성물을 투여하여 연속광파 방식의 확산광 방법으로 측정하고, 파장에 따라 이를 영상화하는 방법을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 폐의 염증 발생 시 대식세포가 폐로 이동하는 특성에 착안하여, 금나노 입자 또는 금나노 쉘을 담지한 대식세포 조성물을 폐질환 진단 용도로 사용할 수 있는 확산광 분광법 조영제를 제공한다.

[0028] "확산광 분광법(diffuse optical spectroscopy)"은 인체조직에 조사된 빛이 흡수, 반사, 산란 등을 통해 확산될 때, 산란된 빛의 세기 등의 특성을 측정함으로써, 인체조직의 구성 성분을 알아낼 수 있다. 인체조직은 산소결합 헤모글로빈(HbO_2), 산소 미결합 헤모글로빈(HbR), 물, 지방 등 여러 성분으로 구성되어 있으므로, 여러 파장의 광을 사용하여 각 파장마다 흡수되는 정도를 측정하여 각 성분의 농도를 계산할 수 있으며, 이러한 원리로 조직의 위치에 따른 확산광 분광 영상을 얻을 수 있다. 이때 사용되는 광원은 가시광 대역에서 근적외선 대역의 광이 주로 사용된다.

[0029] 상기 금나노 입자는 합성이 용이하고 생체적합성이 있는 소재로서, MRI, CT, PET, SPEC, 또는 FI 등과 같은 다중 기술에 의해 쉽게 감지될 수 있고, 나노 입자는 약제의 나노-담체 등과 같이 생의학적으로 이용된다.

[0030] 상기 금나노 입자는 도 1a에 나타낸 바와 같이, 금으로 이루어진 코어와 상기 금 코어를 둘러싼 트리소듐시트레이트 층을 포함하는 구조를 가진다.

[0031] 특히, 상기 금나노 쉘은 도 1b에 나타낸 바와 같이, 금으로 이루어진 코어와 상기 금 코어를 둘러싼 실리카 쉘 층을 포함하는 구조를 가지며, 상기 쉘 층의 표면에는 상자성 지질, 폴리에틸렌글리콜, Cy5.5 등과 같은 형광 탐지 물질 또는 친수성 작용기 등이 도입되어 MRI, CT, PET, SPEC, 또는 FI 등과 같은 다중 영상 진단 기술에 의해 감지될 수 있다.

[0032] 일 실시예에서, 상기 금 나노 입자 혹은 쉘이 담지된 대식세포는 500~700 nm 파장 혹은 700~900 nm 파장의 근적외광을 흡수하는 것일 수 있다.

[0033] 상기 금 나노 입자는 통상 520nm 파장에서 가장 높은 흡광 특성을 가지고 있으며, 이 금나노 입자가 담지된 대식세포는 500~700 nm 파장의 근적외광을 많이 흡수하는 특성을 나타낸다. 금나노 쉘은 800nm 파장에서 강한 흡수피크를 나타내어 광을 가장 많이 흡수하며, 금나노 쉘이 담지된 대식세포는 700~900 nm 파장의 근적외선 광

을 다른 파장에 비해 많이 흡수하는 특성을 나타내므로, 광을 사용한 진단 기술에 도입되어 사용될 수 있다.

[0034] 상기 금나노 입자와 금나노 쉘은 대식세포의 식세포 작용(phagacytosis)을 통해 상기 대식세포 내에 담지될 수 있다(도 6 참고).

[0035] 일 실시예에서, 상기 폐질환은 대엽성 폐렴, 기관지 폐렴, 급성 괴사성 폐렴, 급성 간질성 폐렴, 만성 폐쇄성 폐질환, 천식, 폐농양, 폐결핵 및 폐암으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

[0036] 일 실시예에서, 상기 폐질환이 천식인 것을 특징으로 하는 확산광 단층촬영 조영제일 수 있다.

[0037] 일 실시예에서, 상기 대식세포가 1×10^{7} 세포/㎖ 내지 1×10^{8} 세포/㎖의 농도로 투여될 수 있다.

[0038] 일 실시예에서, 상기 조성물은 약제적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 락토덱스트린 용액, 글리세롤 및 에탄올을 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명은 상기 폐질환 진단용 조영제와 확산광 분광법, 바람직하게는 연속방식의 확산광 분광법을 이용한 폐질환 진단용 정보 제공 방법을 제공한다.

[0040] 일 실시예에서, 상기 폐질환 진단용 정보 제공 방법은 a) 금나노 입자 혹은 금나노 쉘을 대식세포를 함께 배양하여 대식세포에 금나노 입자를 담지시켜 진단용 조성물을 제조하는 단계(S100); b) 상기 단계에서 얻은 진단용 조성물을 피험체에 투여하는 단계(S200); c) 확산광 측정 기기의 광파장, 광파워, 광원과 광검출기 사이의 거리 등을 설정하는 단계(S300); d) 측정 지점에 따라 확산광 측정 기기를 이동해가며 반복해서 측정하는 단계(S400); e) 측정 지점과 광 파장에 따라 확산광의 흡수량을 계산하는 단계(S500); 및 f) 측정 지점과 광 파장에 따라 상기 단계에서 계산된 확산광의 흡수량을 이용하여 영상화하고 분석하는 단계(S600)를 포함하는 것일 수 있다(도 11 참고).

[0041] 일반적으로, 광이 인체조직 등에 입사되었을 때 흡수, 산란, 반사, 형광 등을 통해 확산되는 과정을 나타낸 것으로, 내부 구성 물질과 입사되는 광의 파장에 따라 투과 또는 반사되어 출력되는 광의 특성은 달라진다(도 7 참고).

[0042] 도 8은 연속광파 방식의 확산광 측정 방법을 나타낸 것으로, 일정한 주파수를 가진 광신호를 인체조직 등에 입사하고 출력되는 확산광의 진폭을 측정할 수 있으며, 광원으로부터 멀어질수록 확산광의 진폭은 작아진다. 여러 개의 파장을 가진 광원을 사용하여 빛을 금나노 입자 및 대식세포를 포함한 조성물을 투여한 마우스 폐염증 모델에 입사시킨 후 금나노 입자가 담지된 대식세포의 광 파장별 흡광 특성에 따라 확산되고 반사되어 나오는 확산광의 세기를 측정할 수 있다.

[0043] 도 9는 연속광파 방식의 확산광 측정을 위한 기기(100)의 내부 블록다이어그램의 한 예이다. 기능에 따라 광송신부(200), 광검출부(300), 마이크로프로세서(400)의 세 부분으로 나눌 수 있다. 광원으로는 여러 파장의 발광소자를 사용한 다파장 광원(210)을 사용하며, 광검출기(310)로는 PIN 포토다이오드(PIN photo diode) 또는 아발란치 포토다이오드(avalanche photodiode) 등의 광검출 소자를 사용한다. 확산광은 1개 이상의 광검출기를 통해 수신되고 증폭기(320)에서 증폭된 후 멀티플렉서(330)를 통해 순차적으로 진폭검출기(340)에 입력되어 상기 마이크로프로세서(400)로 출력된다. 상기 마이크로프로세서(400)는 상기 다파장 광원(210) 구동을 위한 파형 발생기(230)와 드라이버(220)를 제어하고, 상기 진폭검출기(340)로부터 입력되는 신호를 아날로그-디지털 변환하여 확산광의 진폭을 측정한다. 상기 다파장 광원(210)으로는 레이저 다이오드, LED, VCSEL 등을 사용하여 여러 파장으로 구성될 수 있다. 상기 다파장 광원(210)과 상기 광검출기(310) 사이의 간격은 일정하게 유지하고, 광검출기는 1개 이상이 될 수 있으며, 측정 지점을 이동해 가면서 넓은 면적을 빠르게 측정할 수 있다.

[0044] 일 실시예에서, 상기 폐질환 진단용 정보 제공 방법은 금나노 입자 및 대식세포를 포함한 조성물을 투여한 마우스 폐염증 모델에, 연속광파 방식의 확산광 분광법으로 다파장 광원을 사용하여 빛을 입사시킨 후, 금나노 입자가 담지된 대식세포의 광 파장별 흡광 특성에 따라 확산되고 반사되어 나오는 확산광의 세기를 측정하여, 측정 지점과 파장에 따른 확산광의 흡수량을 영상화함으로서 실시될 수 있다(도 11 참고).

[0045] 일 실시예에서, 상기 단계 b)의 투여 방법은 동맥 주사, 정맥 주사, 경피 주사, 비강내 투여, 경 기관지 투여 또는 근육내 투여로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 정맥 주사일 수 있으나, 이에 제한되지 않고 통상의 투여 방법을 이용할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] <실험 및 결과>

[0050] 1. 사용된 금 나노 입자와 금 나노 쉘의 특성

[0051] 실시예에 따른 방법으로 조성물을 제조하기 위해서, 20nm 두께의 금 입자로 이루어진 금 나노 입자 또는 금 나노 쉘을 사용하였다(도 1a 또는 1b 참고).

[0052] 상기 금 나노입자는 트리소듐시트레이트에 의해 보호되어 응집이 방지되고, 500~600 nm에서 피크 흡광도가 나타나는 특성을 갖는다. 또한, 상기 금 나노쉘은 120nm 직경의 실리카 입자 코어(silica core)와 이를 둘러싼 12~15nm 두께의 금 쉘로 이루어진 금 나노쉘 (나노스펙트라 바이오사이언스 사, Nanospectra Bioscience, Inc.)을 사용하였다(도 1b 참고). 상기 금 나노입자는 PEG화되어 응집이 방지되고, 790nm 내지 820nm에서 피크 흡광도가 나타나는 특성을 갖는다.

[0053] 구체적으로, 상기 금나노 입자와 금나노 쉘은 진단 이미지(광열 치료 (photothermal therapy), X-선, 초음파, CT)를 위한 조영제로도 사용될 수 있다. 금 나노입자의 조영제로서의 장점은 기존의 요오드 조영제에 비해 분자량이 커서 천천히 배출되어 이미징 시간이 길어지고, 사용량을 줄일 수 있다는 점이다.

[0055] 2. 대식세포의 준비

[0056] 래트 대식세포주 NR8383 (ATCC, CRL-2192)는 고 글루코스, 10% FBS, 25mM HEPES 버퍼(기브코(Gibco)사), 100U/㎖ 페니실린, 및 100㎍/㎖ 스트렙토마이신이 보강된 DMEM 배지 중에 보관하였다. 마우스 대식세포 RAW 274.7 (ATCC, TIB-71)을 사용할 수도 있다. 대식세포의 장점은 혈관 약물 전달 시스템의 제한(예를 들어, 뇌혈관 장벽(BBB))을 극복할 수 있어, BBB를 통과하여 뇌에 전달될 수 있고, 종양 및 염증질환 그리고 폐질환에 대한 표적 특성을 갖고, 폐에 많은 대식세포가 상주해있으며, 식균 작용을 이용하여 약물 흡수가 용이하다는 점이다.

[0058] 3. 금나노 입자가 담지된 대식세포의 제조

[0059] (1) 대식세포와 금 나노입자의 배양

[0060] 대식세포는 10㎖의 배양 배지가 담긴 1 디쉬당 1×10^{6} 세포의 밀도가 되도록 100mm 세포 배양 디쉬에 접종한다. 밤새 배양하여, 대식세포가 바닥에 부착되게 한 후, 배양 배지를 500㎕의 PEG화 금나노입자 혹은 쉘 (2.8×10^{11} 입자/㎖)가 포함된 10㎖의 배양 배지로 교체한다. 상기 세포를 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 염화 칼슘 및 염화 마그네슘을 포함하는 한스 평형 염 용액(Han's Balanced Salt Solution, HBSS)(기브코사)으로 3번 씻어내어 잔여(non-ingested) 나노쉘을 제거한다. 금 나노쉘-담지 대식세포는 TrypLE Express(인비트로겐사, Invitrogen)로 떼어내고, 세척하고, 그 갯수를 세었다.

[0062] (2) 대식세포로의 금 나노입자 혹은 쉘의 담지 여부 측정

[0063] 상기 배양된 금 나노입자 혹은 쉘-담지 대식세포의 용액의 흡수 파장의 UV-vis 스펙트럼과 ICP-mass(Inductively coupled plasma mass spectrometry)를 이용한 금 이온의 양을 측정하였다. 금 나노입자만을 포함한 대조군에서는 약 500~600nm 범위에서 흡광 피크가 나타났고, 특히 520nm에서 특징적인 피크가 뚜렷이 관찰되었다. 이에 반해, 금 나노입자-담지 대식세포에서는 500~700nm에 걸친 매우 완만한 흡광 피크가 나타났고, 650nm 부근에서 약하게 특징적인 피크가 관찰되었다(도 2 참고). 그리고 금 나노쉘의 경우는 약 700~900 nm 범위에서 흡광 피크가 나타났고, 특히 810nm에서 특징적인 피크가 뚜렷이 관찰되었다. 그리고 금 나노쉘-담지 대식세포에서도 700~900nm에 걸친 완만한 흡광피크가 나타났고, 810nm에서 특징적인 피크가 관찰되었다. ICP-mass를 이용한 금 이온 양의 정량 분석은 금나노입자 담지 세포를 왕수처리와 증류수를 이용한 희석처리를 걸쳐 측정을 실시하였고, 측정결과를 바탕으로 대식세포내의 금나노입자 담지량을 계산하여 나타내었다(도 2b 참조).

[0065] (3) 대식세포에 대한 금나노 입자의 시험관내 독성 시험

[0066] 대식세포에 대한 금나노 입자의 시험관내 독성 시험의 경우 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석방법을 이용하였으며, 대식세포를 금나노 입자에 농도별(1.25, 2.5, 5, 10, 20 pmol/ml)로 24시간 노출한 후 대식세포의 생존율을 측정하였다. 결과적으로 모든 농도에서 95%이상의 대식세포 생존율을 확인하였으며, 이는 금나노 입자가 대식세포에 세포 독성을 가지지 않음을 나타낸다(도 4 참조).

[0068] (4) 금나노 입자가 담지된 대식세포의 적혈구 용혈 시험

[0069] Balb/c 마우스로부터 채취한 혈액을 헤파린-코팅된 튜브에 모았다. 1500 rpm에서 5분 동안 원심분리함으로써 혈액에서 혈청을 분리한 후, PBS 용액으로 3회 씻어내었다. 세정 후, 적혈구를 금나노 입자가 담지된 대식세포 시료와 함께 재현탁하였다. 3시간 동안 배양 후, 상기 시료를 2분 동안 4000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액은 541 nm에서 UV-vis 스펙트로스코프로 흡광도를 측정하였다. 그 결과 금나노 입자가 담지된 대식세포는 적혈구를 용혈시키지 않아, 생체내에 투여하였을 경우 혈관과 혈관내 부유세포에 대한 독성을 가지는 등의 해로운 영향을 나타내지 않을 것으로 판단되었다(도 5 참고).

[0071] 4. 금나노 입자가 담지된 대식 세포의 투여

[0072] 본 발명에서는 금나노 입자가 담지된 대식세포를 10^7 ~ 10^8 개/200㎕의 PBS로 분산하여 주사가 가능하며, 주사의 방법은 정맥주사, 동맥주사, 복강주사, 비강내투여, 기관지내 투여 등에 의해 사용가능하나, 정맥주사를 권장한다.

[0073] 상기 적혈구 용혈 시험 결과에서 알 수 있듯이, 본 발명의 금나노 입자가 담지된 대식세포는 혈액 중에 투여하여도 피험체의 적혈구를 용혈하지 않으므로, 정맥 투여 등의 혈관 투여도 가능할 것으로 사료되었다.

[0075] 5. 염증 모델 생체 분포

[0076] (1) 마우스 염증 모델을 제조하기 위하여, 모든 마우스에 5mg/kg의 리포폴리사카라이드(LPS)를 정맥주사로 처리하였다. 하루간의 배양이후 금나노 입자가 담지된 대식세포를 10^7 ~ 10^8 개/200㎕의 PBS로 분산하여 정맥주사를 하였다. 이후 시간(0.5, 6, 12, 24, 48 시간)에 따라 해부를 실시하여 분석하고자 하는 주요장기(뇌, 간, 심장, 폐, 신장, 비장)를 적출하여 분석한다.

[0077] 금나노 입자의 축적량을 분석하는 방법으로는 ICP-mass를 이용하였으며, 모든 장기를 PBS와 함께 갈아주고 5배의 부피로 왕수 처리를 행한다. 이후 증류수를 이용하여 100배의 희석용액을 만들어준 이후 ICP-mass 분석을 실시한다.

[0078] (2) 본 발명의 금나노 입자가 담지된 대식세포는 생체내 여러 장기 중에서 폐에 현저하게 높은 수준으로 분포함을 알 수 있었다(도 3a 및 도 3b 참고).

[0079] (3) 이 결과로부터 폐염증 질환 환자에게 본 발명의 금나노 입자가 담지된 대식세포를 투여할 경우 폐의 병변의 진단에 사용할 수 있을 것이다. 다만, 폐에는 평소에도 대식세포가 다수 상주하는바, 폐질환의 병변 및 그 염증 정도를 보다 정밀하게 판독하기 위해서는 투여하는 금나노 입자가 담지된 대식세포의 농도 또는 대식 세포에 담지될 금나노 입자의 농도를 조절할 필요가 있을 것이다.

[0081] 6. 상기 금나노 입자가 담지된 대식세포를 이용한 확산광 분광 영상 진단

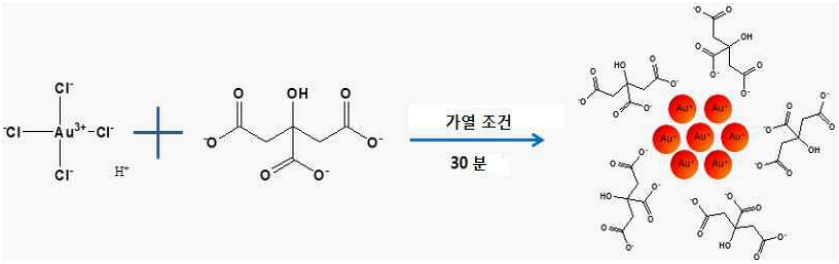
[0082] 확산광 분광 영상진단을 위해 사용된 기기는 연속광파 방식의 확산광 측정 장치를 사용하여 측정되었다. 다파장 광원으로는 685nm, 785nm, 830nm, 852nm, 920nm, 980nm로 이루어진 6개 파장의 레이저 다이오드를 사용하였으며, 8 kHz 주파수로 평균 10 mW 세기의 광을 입사하였다. 광 검출기로는 PIN 포토 다이오드를 사용하였다.

[0083] 폐질환이 유발된 마우스에 금나노 입자가 담지된 대식세포를 포함하는 조성물을 투여한 후, 연속광파 방식의 확산광 측정기기를 통해, 도 10b에 나타난 바와 같은 폐 영상을 수득하였다. 685nm 파장의 광으로 측정했을 때, 무처리된 마우스의 대조군(control)에 비해 금나노 입자가 담지된 대식세포를 투여한 염증모델 마우스의 실험군(AuNP)의 영상에서 흡광이 높게 나타남을 볼 수 있다.

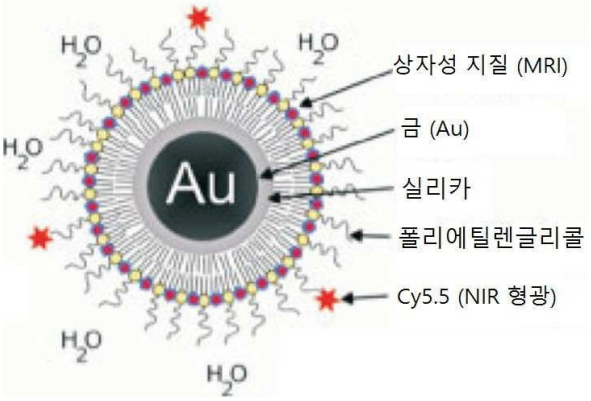
[0084] 종합하면, 금나노 입자의 흡수 파장인 685nm을 사용하여 측정시, 마우스에서 폐가 위치하는 1.5~2.0 cm 측정 거리에서 다른 파장에 비해 흡광도가 상대적으로 높게 나타나는 점으로 볼 때, 폐에 금나노 입자를 담지한 대식세포의 분포가 높고, 폐에 염증이 발생한 것으로 볼 수 있다. 상기 실험을 반복하면, 폐 염증의 정도 및 위치를 좀 더 구체적으로 판단할 수 있어 폐질환의 진단에 사용가능할 것으로 보인다.

도면

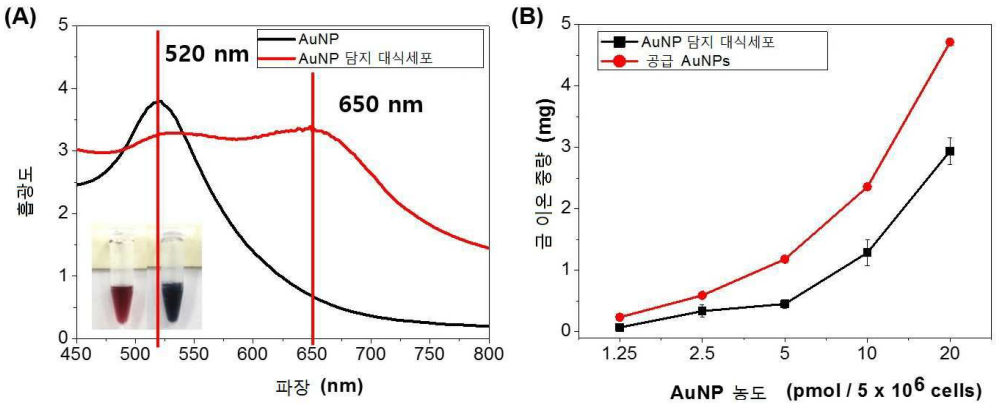
도면1a



도면1b



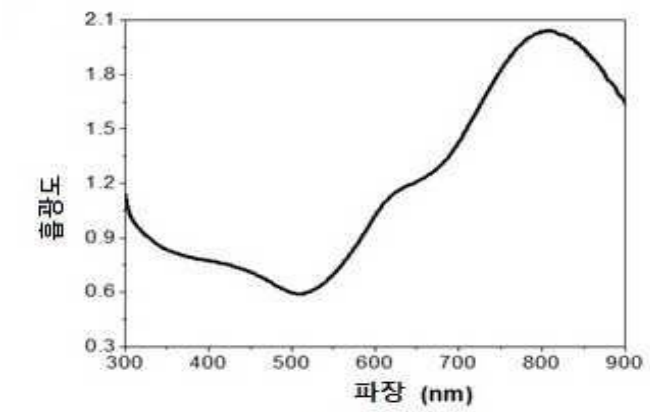
도면2a



(A) AuNPs 및 AuNPs 담지 대식세포 (RAW 264.7 세포주)의 광학 이미지 및 UV-vis 스펙트럼

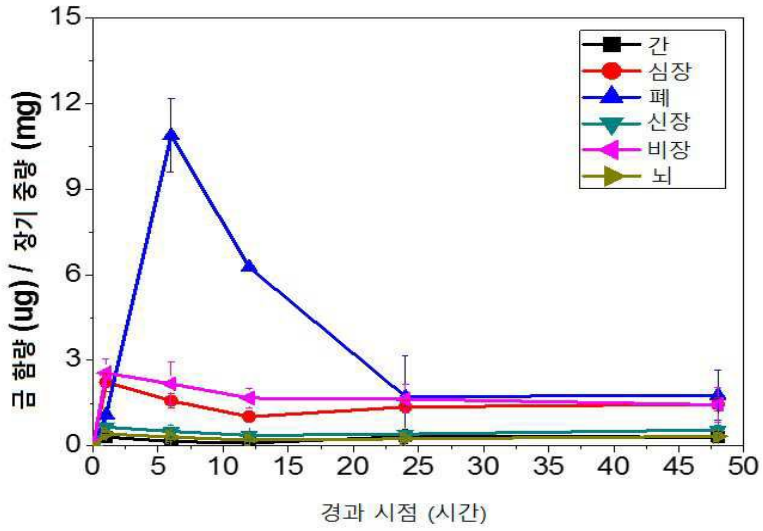
(B) ICP-질량 분석에 의한 5×10^6 의 대식세포 (RAW 264.7) 중의 AuNPs 포함량

도면2b

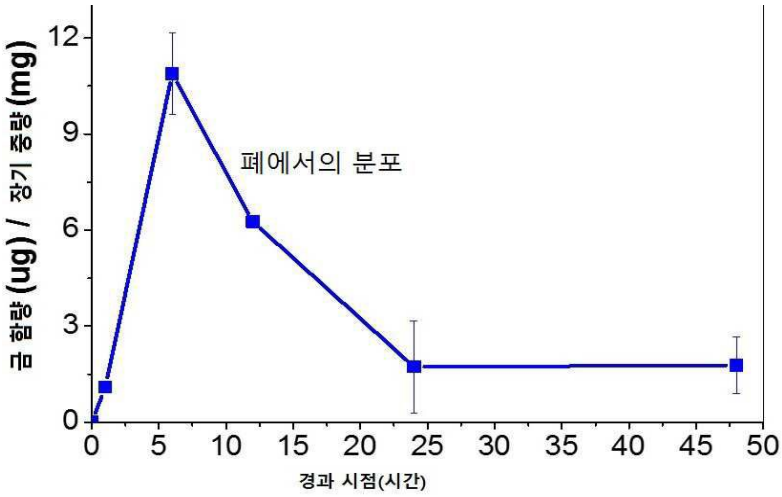


<AuShell UV/Vis 스펙트럼>

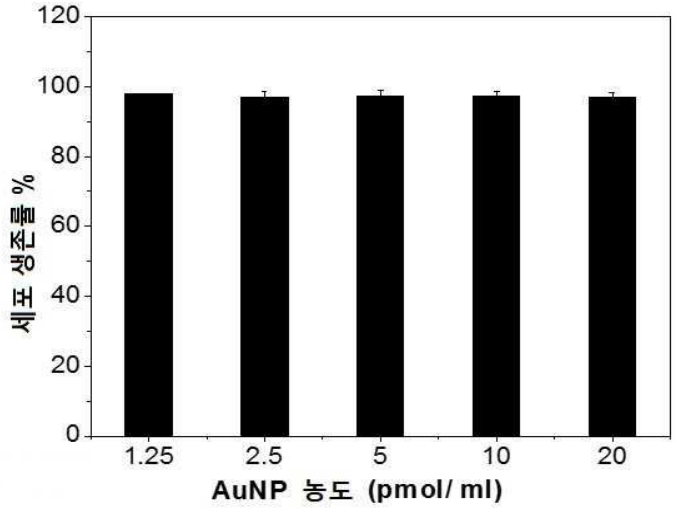
도면3a



도면3b

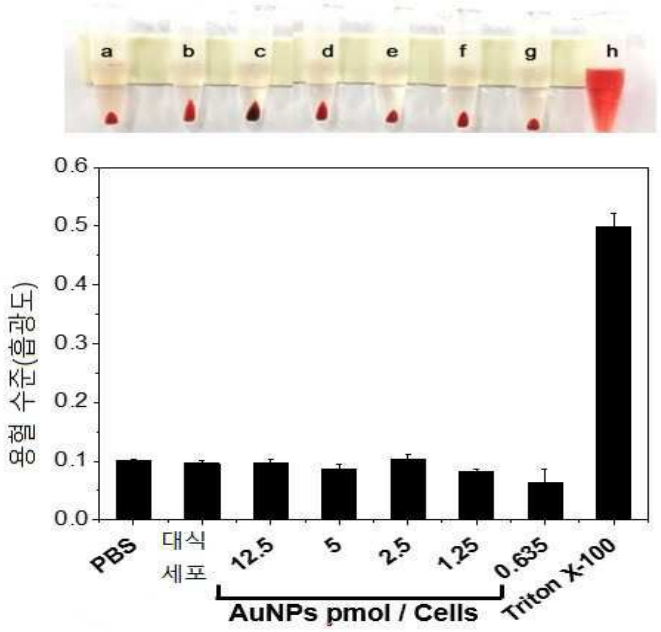


도면4

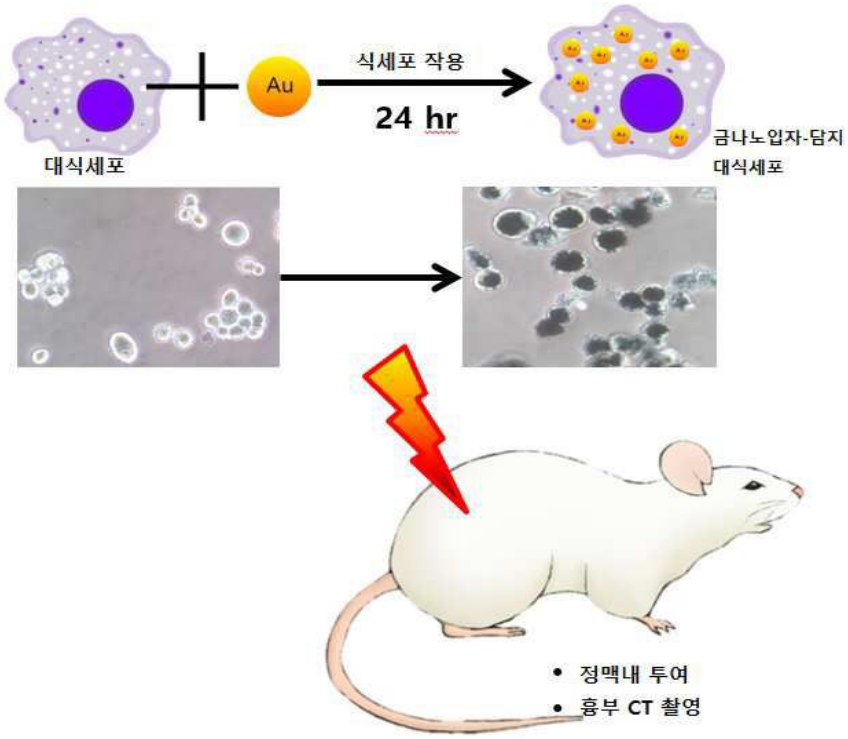


24, 48, 72 시간 동안 AuNP의
대식세포주(RAW 264.7)에 대한 시험관내 독성 시험

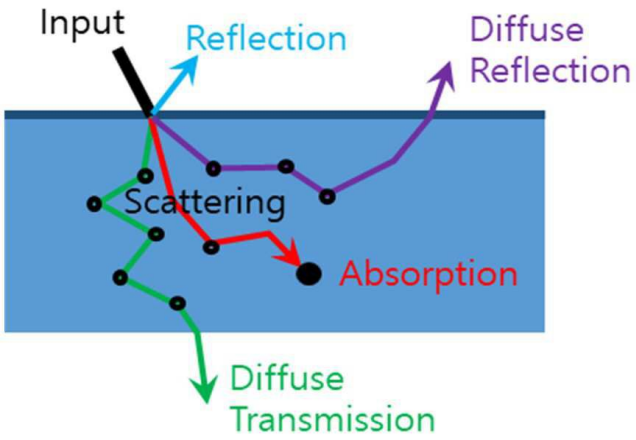
도면5



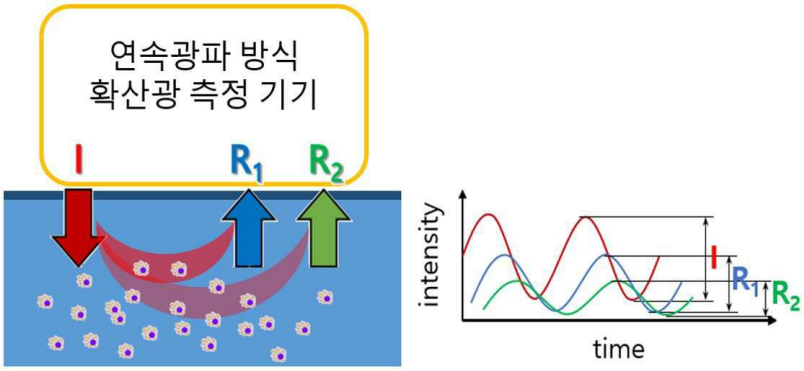
도면6


Au
식세포 작용
24 hr
대식세포
금나노입자-담지
대식세포
• 정맥내 투여
• 흉부 CT 촬영

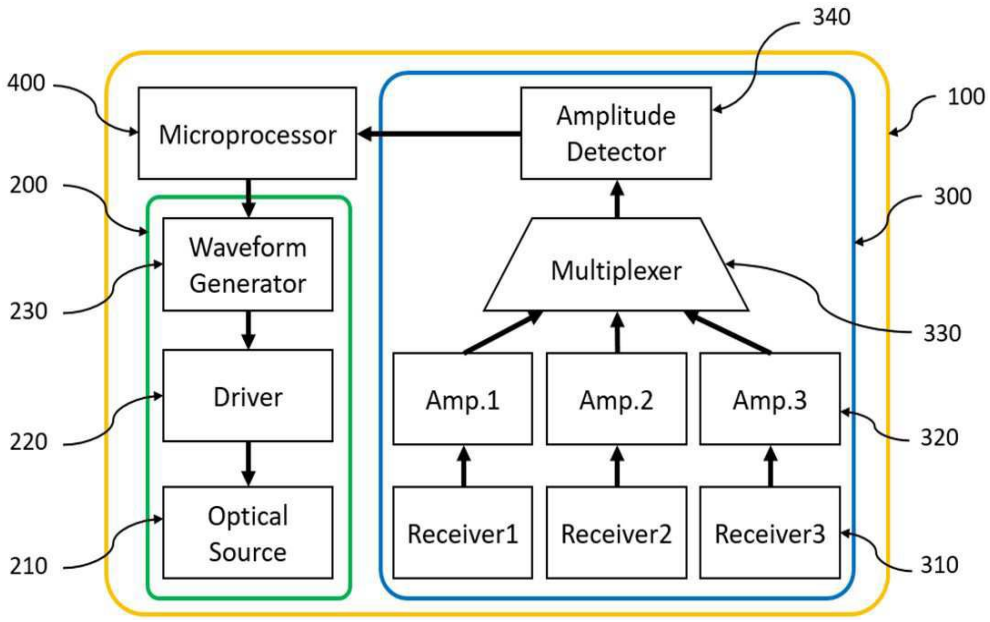
도면7


Input
Reflection
Diffuse
Reflection
Scattering
Absorption
Diffuse
Transmission

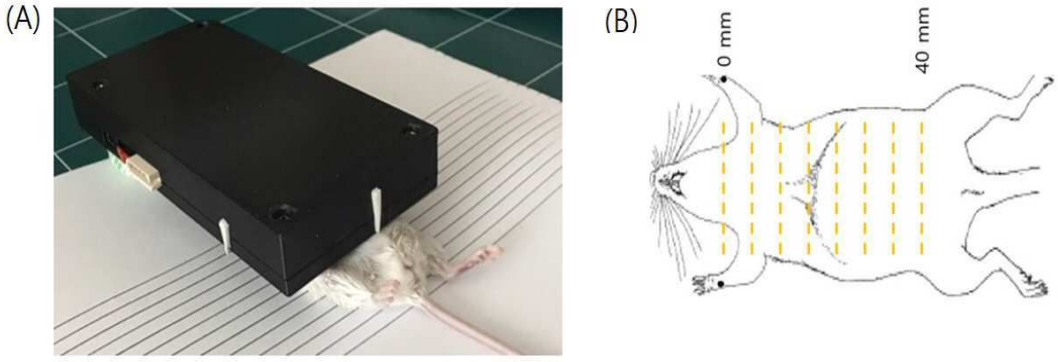
도면8


연속광파 방식
확산광 측정 기기
I
R1
R2
intensity
time

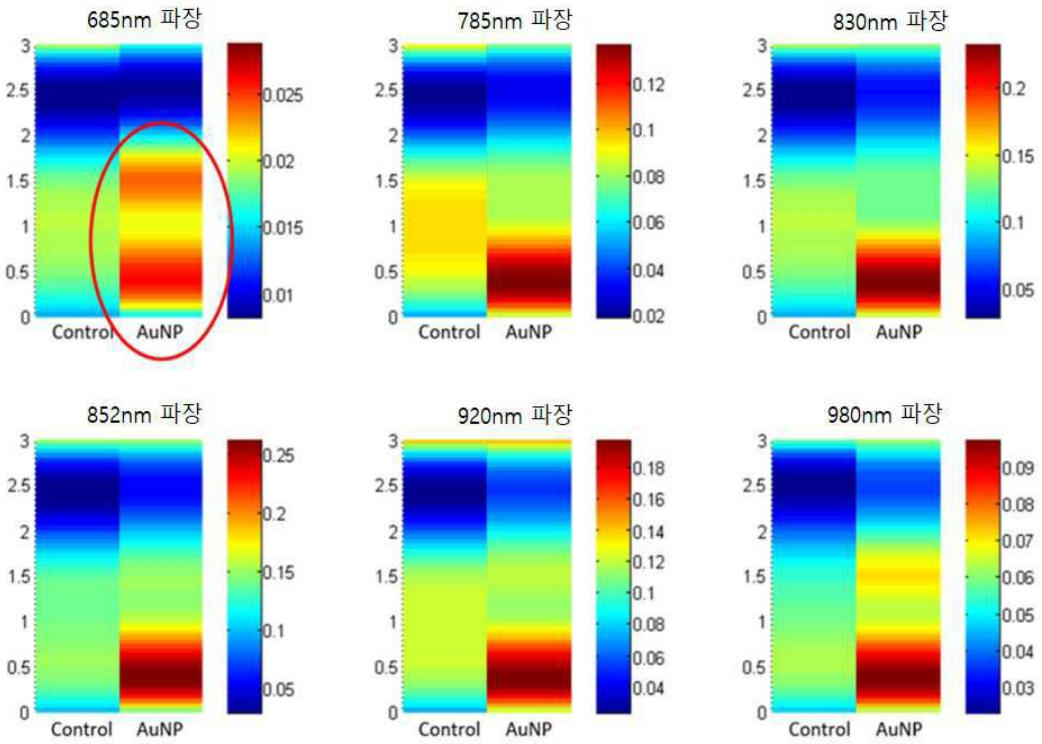
도면9


340
400
Microprocessor
Amplitude Detector
100
200
Waveform Generator
300
Multiplexer
230
330
Driver
Amp.1
Amp.2
Amp.3
220
320
Optical Source
Receiver1
Receiver2
Receiver3
210
310

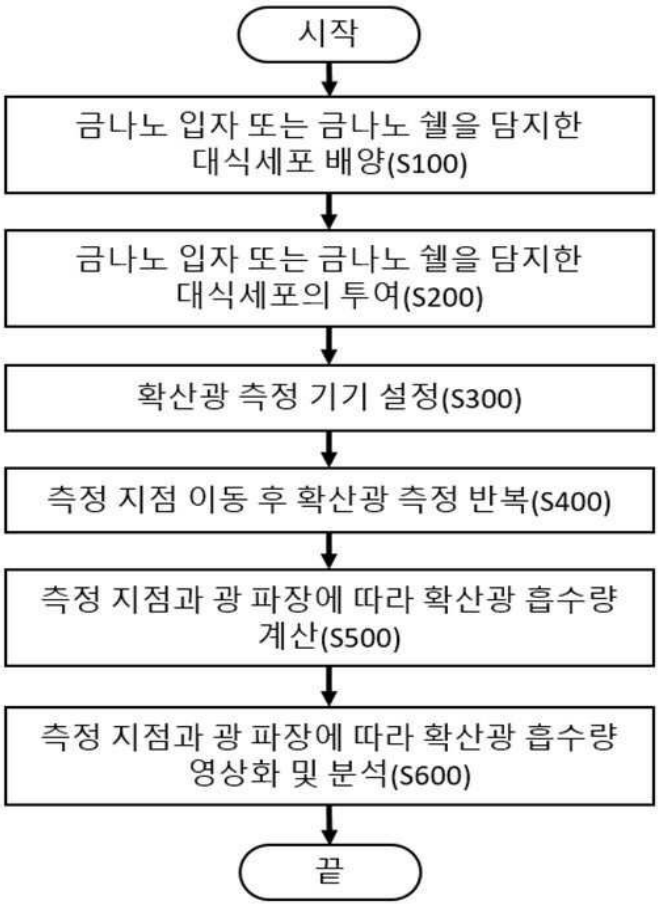
도면10a


(A)
(B)
0 mm
40 mm

도면10b


685nm 파장
785nm 파장
830nm 파장
852nm 파장
920nm 파장
980nm 파장
Control
AuNP

도면11


시작
금나노 입자 또는 금나노 쉘을 담지한 대식세포 배양(S100)
금나노 입자 또는 금나노 쉘을 담지한 대식세포의 투여(S200)
확산광 측정 기기 설정(S300)
측정 지점 이동 후 확산광 측정 반복(S400)
측정 지점과 광 파장에 따라 확산광 흡수량 계산(S500)
측정 지점과 광 파장에 따라 확산광 흡수량 영상화 및 분석(S600)
끝