



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월10일
(11) 등록번호 10-1817309
(24) 등록일자 2018년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/04 (2006.01) A61B 5/00 (2006.01)
A61K 35/15 (2014.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0423 (2013.01)
A61B 5/0073 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0052287
(22) 출원일자 2017년04월24일
심사청구일자 2017년04월24일
(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)
박일호
서울특별시 서초구 신반포로 270, 103동 1502호(반포동, 반포자이아파트)
(74) 대리인
김정수

전체 청구항 수 : 총 4 항

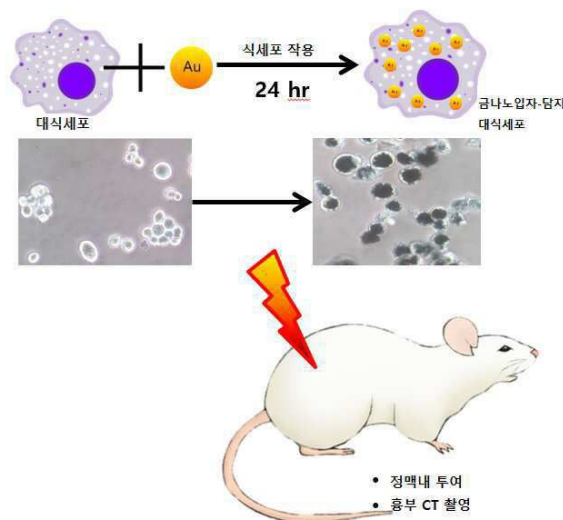
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 금나노 입자와 대식세포를 포함하는 폐질환 영상 진단용 조성물 및 이를 이용한 폐질환의 영상 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 금나노 입자 혹은 금나노 셸이 담지된 대식세포를 포함하는 폐질환 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 또한 a) 금나노 입자 혹은 금나노 셸과 대식세포를 함께 배양하여 대식세포에 금나노 입자 혹은 금나노 셸을 담지시켜 진단용 조성물을 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 얻은 진단용 조성물을 이용하여 폐의 영상을 측정하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 얻어진 영상을 분석하는 단계를 포함하는, 폐질환 진단용 정보 제공 방법을 제공한다. 본 발명의 금 나노 입자를 담지한 대식세포는 투여될 피험체에 악영향을 주지 않고, 폐로 이동하므로, 환자에서 폐질환을 진단하기 위한 영상 진단, 특히 CT촬영시 조영제로 사용될 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하면 CT 촬영만으로 단시간에 폐의 국소적인 염증 부위 및 그 염증 정도를 시각화할 수 있어 임상적 사용이 기대된다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61B 5/0082 (2013.01)

A61K 35/15 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF- 2015R1C1A1A02037328

부처명 미래 창조 과학부

연구관리전문기관 한국 연구 재단

연구사업명 신진연구

연구과제명 두경부암의 광열 치료에서 금나노입자와 대식세포를 결합한 표적 전달 시스템 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

금나노 입자 혹은 금나노 셸이 담지된 대식세포를 포함하는 천식 진단용 CT 조영제.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금나노 입자 혹은 금나노 셸이 담지된 대식세포는 500~700nm 파장 혹은 700~900nm 파장의 근적외광을 흡수하는 것을 특징으로 하는 천식 진단용 CT 조영제.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 대식세포가 1×10^7 세포/ml 내지 1×10^8 세포/ml의 농도로 투여되는 것을 특징으로 하는 천식 진단용 CT 조영제.

청구항 7

제1항에 있어서,

약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 천식 진단용 CT 조영제.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 금나노 입자와 대식세포를 포함하는 폐질환 영상 진단용 조성물 및 이를 이용한 영상 진단 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 금나노 입자와 대식세포를 포함하는 CT 영상 진단용 조성물 및 이를 이용한 CT 진단 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[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] 흉부 CT에서 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 단층촬영술(PET), 단일 광자 방출 촬영술(SPECT), 또는 형광 이미징(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 이미징화 시간이 길며, 생체친화성이 높아 독성이 적으며, 기존의 CT 조영제보다 적은 양을 사용할 수 있어, CT 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 발생하면, 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, 세포의 기질의 분해 및 면역 병리 현상이 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0008] 종래에는 CT 조영 성분으로서의 금나노 입자의 장점과 생체 벡터로서의 대식세포의 가능성을 모두 가진 폐질환 진단 방법에 관한 기술내용이 개시된 바 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0865667호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Circulation. 2008; 17:379-387

(비특허문헌 0002) Contrast Media Mol Imaging. 2010; 5(4): 231.236.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자는 폐의 염증 발생시 대식세포가 폐로 이동하는 특성에 착안하여, 대식세포와 금나노 입자를 포함한 폐질환의 영상진단용 조성물 및 이를 이용한 영상진단 방법을 제공하고자 한다. 본 발명은 식세포 작용(phagocytosis)으로 기존의 금나노 입자를 담지한 대식세포를, 생체내 벡터로서 폐의 염증 부위로 이동하게 하여 염증 부위에 존재하는 금나노 성분을 CT로 촬영하는 원리에 의한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명은 금나노 입자가 담지된 대식세포를 포함하는 폐질환 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 일 실시예에서, 상기 조성물 중의 금나노 입자가 담지된 대식세포는 500~700 nm 파장의 근적외광을 흡수할 수 있으며, 금나노 셸이 담지된 대식세포는 700~900 nm 파장의 근적외광을 흡수할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에서, 상기 진단은 CT 촬영에 의한 진단일 수 있다.
- [0015] 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.
- [0016] 일 실시예에서, 상기 폐질환은 천식일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에서, 상기 조성물 중의 대식세포의 투여 농도는 1×10^7 세포/ml 내지 1×10^8 세포/ml일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명은 a) 금나노 입자와 대식세포를 함께 배양하여 대식세포에 금나노 입자를 담지시켜 진단용 조성물을 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 얻은 진단용 조성물을 이용하여 폐의 영상을 측정하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 얻어진 영상을 분석하는 단계를 포함하는, 폐질환 진단에 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0020] 일 실시예에서, 상기 진단은 CT 촬영을 이용한 진단일 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 조성물은 금 나노 입자를 담지한 대식세포를 포함함에 따라, CT 촬영만으로 단시간 내에 폐질환 환자의 폐 면적 중 국소적인 염증 부위 및 그 염증 정도를 시각화할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명에 따른 조성물은 투여될 피험체에 해로운 영향을 주지 않고 폐로 이동하므로, 환자에서 폐질환을 진단하기 위한 영상 진단, 특히 흉부 CT 촬영을 위한 조영제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1a는 본 발명에 사용된 금나노 입자의 구조를 나타낸 것이다. 도 1에 나타난 바와 같이, 본 발명에 사용된 금 나노입자는 금이온을 중심으로 트리소프시트레이트가 표면을 감싸 안정된 입자를 형성한다.
- 도 1b는 본 발명에 사용된 금나노 셸의 구조를 나타낸 것이다. 도 1b에 나타난 바와 같이, 본 발명에 사용된 금 나노셸은 금으로 된 코어와 실리카, 및 입자 표면 상의 반자성 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 셸의 흡수 파장(c)을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명의 금 나노 입자를 담지한 대식세포 조성물의 폐염증모델에서의 생체내 분포(도 3a) 및 염증을 유발한 폐에서의 분포(도 3b)를 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 농도 12.5, 5, 2.5, 1.25, 및 0.635 pmol/l)에서 시험하였다.
- 도 6은 본 발명의 금 나노입자 및 대식세포를 포함한 조성물을 투여한 천식 모델 마우스의 마이크로 CT 사진을 나타낸 것이다. 동그라미로 나타낸 부분은 폐이며, 폐에서도 염증이 심한 부위일수록 금 나노입자에 의해 밝게 나타난다.
- 도 7은 본 발명에 의한 영상 진단 방법의 일 예를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 금나노 입자가 담지된 대식세포를 포함하는 폐질환 진단용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

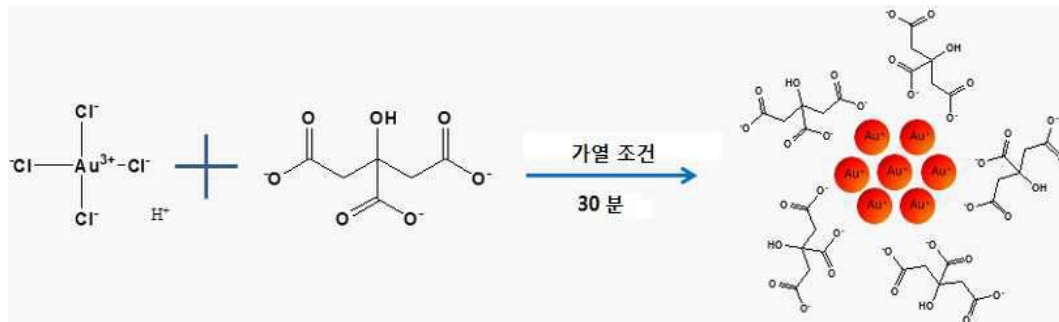
- [0025] 상기 금나노 입자는 합성이 용이하고 생체적합성이 있는 소재로서, MRI, CT, PET, SPEC, 또는 FI 등과 같은 다중 기술에 의해 쉽게 감지될 수 있고, 나노 입자는 약제의 나노-담체 등과 같이 생의학적으로 이용된다.
- [0026] 상기 금나노 입자는 도 1a에 나타낸 바와 같이, 금으로 이루어진 코어와 상기 금 코어를 둘러싼 트리소프시트레이트층을 포함하는 구조를 가져 마이크로 CT와 같은 다중 영상 진단 기술에 의해 감지될 수 있다.
- [0027] 특히, 상기 금나노 셀은 도 1b에 나타낸 바와 같이, 금으로 이루어진 코어와 상기 금 코어를 둘러싼 실리카 셀층을 포함하는 구조를 가지며, 상기 셀 층의 표면에는 반자성 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.
- [0028] 상기 금 나노 입자는 통상 근자외선광(500~700nm 파장)을 흡수하는 특성이 있고, 특히, 500~600nm 파장 범위에서 강한 흡수 피크를 나타내며, 금 나노셀은 근자외선광(700~900nm 파장)을 흡수하는 특성을 가지며, 특히, 750~850nm 파장 범위에서 강한 흡수피크를 나타낸다. 상기와 같은 다중 진단 기술에 도입되어 사용될 수 있다.
- [0029] 일 실시예에서, 상기 조성물 중의 금나노 입자가 담지된 대식세포는 500~700 nm 파장의 근적외광을 흡수하고 금나노 셀이 담지된 대식세포는 700~900 nm 파장의 근적외광을 흡수하는 것을 특징으로 한다. 상기 금나노 입자와 금나노 셀은 대식세포의 식세포 작용(phagocytosis)을 통해 상기 대식세포 내에 담지될 수 있다.
- [0030] 일 실시예에서, 상기 진단은 CT(computerized tomology) 촬영, 바람직하게는 흉부 CT 촬영을 이용한 진단일 수 있다.
- [0031] 일반적으로, CT는 인체의 단면 주위를 돌면서 X선을 투사하고 X선이 인체를 통과하면서 감소되는 양을 측정하여 내부 구조를 영상화하는 것으로, 단순 X선 촬영과 달리 인체를 가로로 자른 횡단면상을 획득한다. CT는 단순 X선 촬영에 비해 구조물이 겹쳐지는 것이 적어 구조물 및 병변을 좀더 명확히 볼 수 있는 장점이 있어, 대부분의 장기 및 질환에서 병변이 의심되고 정밀검사를 시행해야 할 필요가 있을 때 기본이 되는 검사법이다.
- [0032] 단면상을 얻는다는 점에서 MRI와 CT는 공통점이 있지만, MRI가 좀더 고해상도를 얻을 수 있으나, 고비용 및 사용되는 조영물의 강한 독성 등의 단점이 있다. 최근 다중채널 CT(MDCT, multi-detector CT)가 보급되면서 촬영 후 영상을 재구성하여 MRI처럼 원하는 단면상 및 입체적인 삼차원(3D) 영상도 자유로이 얻을 수 있게 되었다.
- [0033] 일 실시예에서, 상기 조성물은 CT 조영제로서 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 투여될 피험체에 해로운 영향을 주지 않고 폐 염증 부위로 이동하므로, 환자에서 폐질환 진단용 위한 영상 촬영, 특히 흉부 CT 촬영을 위한 조영제로 사용될 수 있다.
- [0034] 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 이상인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 천식일 수 있다.
- [0035] 일 실시예에서, 상기 조성물 중의 대식세포의 투여 농도는 1×10^7 세포/ml 내지 1×10^8 세포/ml인 것을 특징으로 한다.
- [0036] 일 실시예에서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로스 용액, 락토텍스트린 용액, 글리세롤 및 에탄올을 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명은 a) 금나노 입자 혹은 금나노 셀을 대식세포를 함께 배양하여 대식세포에 금나노 입자를 담지시켜 진단용 조성물을 제조하는 단계; b) 상기 단계 a)에서 얻은 진단용 조성물을 이용하여 폐의 영상을 측정하는 단계; 및 c) 상기 단계 b)에서 얻어진 영상을 분석하는 단계를 포함하는 폐질환 진단용 정보 제공 방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0038] 일 실시예에서, 상기 진단은 CT(computerized tomology) 촬영, 바람직하게는 흉부 CT 촬영에 의한 것일 수 있다.
- [0039] 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.

- [0041] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] <실험 및 결과>
- [0043] 1. 사용된 금 나노 입자와 금 나노 셸의 특성
- [0044] 실시예에 따른 방법으로 조성물을 제조하기 위해서, 20nm 두께의 금 입자로 이루어진 금 나노입자를 사용하였다 (도 1 참고). 상기 금 나노입자는 트리소듐시트레이트에 의해 보호되어 응집이 방지되고, 500nm 내지 600nm에서 피크 흡광도가 나타나는 특성을 갖는다.
- [0045] 또한, 120nm 직경의 실리카 입자 코어(silica core)와 이를 둘러싼 12~15nm 두께의 금 셸로 이루어진 금 나노셸 (나노스펙트라 바이오사이언스사, Nanospectra Bioscience, Inc.)을 사용하였다. 상기 금 나노입자는 PEG화되어 응집이 방지되고, 790nm 내지 820nm에서 피크 흡광도가 나타나는 특성을 갖는다.
- [0046] 구체적으로, 상기 금나노 입자와 금나노 셸은 진단이미지(광열(photo thermal), 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.
- [0048] 2. 대식세포의 준비
- [0049] 래트 대식세포주 NR8383 (ATCC, CRL-2192)는 고 글루코스, 10% FBS, 25mM HEPES 버퍼(기브코(Gibco)사), 100U/ml 페니실린, 및 100 μ g/ml 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, 중앙 및 염증질환 그리고 폐질환에 대한 표적 특성을 갖고, 폐에 많은 대식세포가 상주해있으며, 식균 작용을 이용하여 약물 흡수가 용이하다는 점이다.
- [0051] 3. 금나노 입자가 담지된 대식세포의 제조
- [0052] (1) 대식세포와 금 나노입자의 배양
- [0053] 대식세포는 10ml의 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 μ l의 PEG화 금나노입자 혹은 셸 (2.8×10^{11} 입자/ml)가 포함된 10ml의 배양 배지로 교체한다. 상기 세포를 37℃에서 24시간 동안 배양하고, 염화 칼슘 및 염화마그네슘을 포함하는 한스 평형 염 용액(Han's Balanced Salt Solution, HBSS)(기브코사, Gibco)으로 3번 씻어내어 잔여(non-ingested) 나노셸을 제거한다. 금 나노셸-담지 대식세포는 TrypLE Express(인비트로젠사, Invitrogen)로 떼어내고, 세척하고, 그 갯수를 세었다.
- [0055] (2) 대식세포로의 금 나노입자 혹은 셸의 담지 여부 측정
- [0056] 상기 배양된 금 나노입자 혹은 셸-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 나노셸의 경우는 약 700~900nm 범위에서 흡광 피크가 나타났고, 특히 810nm에서 특징적인 피크가 뚜렷이 관찰되었다. 그리고 금 나노셸-담지 대식세포에서도 700~900nm에 걸친 완만한 흡광 피크가 나타났고, 810nm에서 특징적인 피크가 관찰되었다. ICP-mass를 이용한 금이온 양의 정량 분석은 금나노입자 담지 세포를 왕수 처리와 증류수를 이용한 희석처리를 걸쳐 측정을 실시하였고, 측정결과를 바탕으로 대식세포 내의 금나노입자 담지량을 계산하여 나타내었다.(도 2B 참조)
- [0058] (3) 대식세포에 대한 금나노 입자의 시험관내 독성 시험
- [0059] 대식세포에 대한 금나노입자의 시험관내 독성 시험의 경우 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석방법을 이용하였으며, 대식세포를 금나노입자에 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 금나노입자가 대식세포에 세포 독성을 가지지 않음을 나타낸다.(도 4 참조)

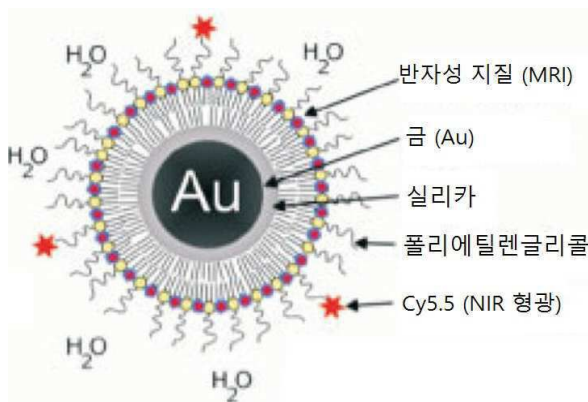
- [0061] (4) 금나노 입자가 담지된 대식세포의 적혈구 용혈 시험
- [0062] Balb/c 마우스로부터 채취한 혈액을 헤파린-코팅된 튜브에 모았다. 1500rpm에서 5분 동안 원심분리함으로써 혈액에서 혈청을 분리한 후, PBS 용액으로 3회 씻어내었다. 세정 후, 적혈구를 금나노 입자가 담지된 대식세포 시료와 함께 재현탁하였다. 3시간 동안 배양 후, 상기 시료를 2분 동안 4000 rpm에서 원심분리하였다. 상등액은 541nm에서 UV-vis 스펙트로스코프로 흡광도를 측정하였다. 그 결과 금나노 입자가 담지된 대식세포는 적혈구를 용혈시키지 않아, 생체 내에 투여하였을 경우 혈관과 혈관내 부유 세포에 대한 독성을 가지는 등의 해로운 영향을 나타내지 않을 것으로 판단되었다(도 5 참고).
- [0064] 4. 금나노 입자가 담지된 대식세포의 투여
- [0065] 본 연구개발에서는 금나노입자가 담지된 대식세포를 10^7 개~ 10^8 개/ $200\mu\text{l}$ 의 PBS로 분산하여 주사가 가능하며, 주사의 방법은 정맥주사, 동맥주사, 복강주사, 비강내투여, 기관지내 투여 등을 사용할 수 있으나, 정맥주사를 이용할 것을 권장한다.
- [0066] 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.
- [0068] 5. 염증 모델 생체 분포
- [0069] (1) 모델을 제조하기 위하여 모든 마우스에 5mg/kg의 리포폴리사카라이드(LPS)를 정맥주사로 처리하였다. 하루 동안 배양한 후 금나노 입자가 담지된 대식세포를 10^7 개~ 10^8 개/ $200\mu\text{l}$ 의 PBS로 분산하여 정맥주사를 하였다. 이후 시간(0.5, 6, 12, 24, 및 48시간)에 따라 해부를 실시하여, 분석하고자 하는 주요장기(뇌, 간, 심장, 폐, 신장, 비장)를 적출하여 분석한다.
- [0070] 금나노입자의 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.
- [0071] (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).
- [0072] (3) 이 결과로부터 폐염증 질환 환자에게 본 발명의 금나노 입자가 담지된 대식세포를 투여할 경우 폐의 병변을 CT로 찍어 진단에 사용할 수 있을 것이다. 다만, 폐에는 평소에도 대식세포가 다수 상주하는바, 폐질환의 병변 및 그 염증 정도를 보다 정밀하게 관측하기 위해서는 투여하는 금나노 입자가 담지된 대식세포의 농도 또는 대식세포에 담지될 금나노 입자의 농도를 조절할 필요가 있을 것이다.
- [0074] 6. 상기 금나노 입자가 담지된 대식세포를 이용한 영상 진단
- [0075] (1) 영상진단을 위해 사용된 기기는 마이크로 CT (micro Computerized Tomography, 제조사; NIKON METROLOGY)로 70kV, $140\mu\text{A}$, 632ms의 조건을 통해 관측되었다.
- [0076] 폐질환이 유발된 래트에 금나노 입자가 담지된 대식세포를 포함하는 조성물을 투여한 후, CT 방법을 통해, 도 6에 나타난 바와 같은 래트의 폐 영상을 획득하였다.
- [0077] (2) 도 6에서 알 수 있듯이, 본 발명의 금나노 입자가 담지된 대식세포가 투여된 마우스에서 폐 부분에서 밝은 부분이 나타나는데, 이는 폐로 이동한 금나노 입자-담지의 대식세포로 인한 것이다. 폐 면적 중 국소적인 염증 부위 및 염증의 정도를 CT 영상의 밝기 차이로 알 수 있을 것이다. 다만, 폐에는 평소에도 대식세포가 다수 상주하는바, 폐질환의 병변 및 그 염증 정도를 보다 정밀하게 관측하기 위해서는 CT 장비, 해상도 조절 기타의 영상 촬영 조건, 촬영될 단면 간격, 금나노 입자 혹은 금 나노셸과 대식세포의 농도 등을 조절할 필요가 있을 것으로 보인다.

도면

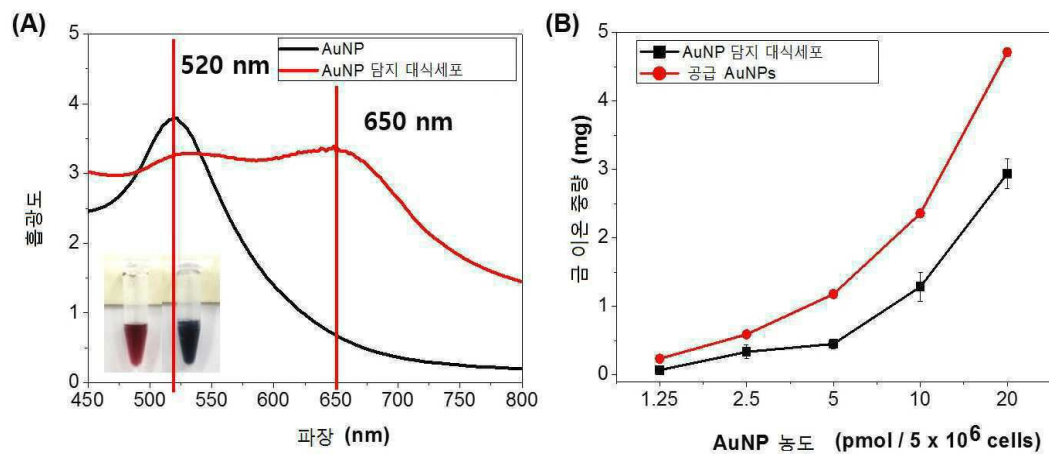
도면1a



도면1b



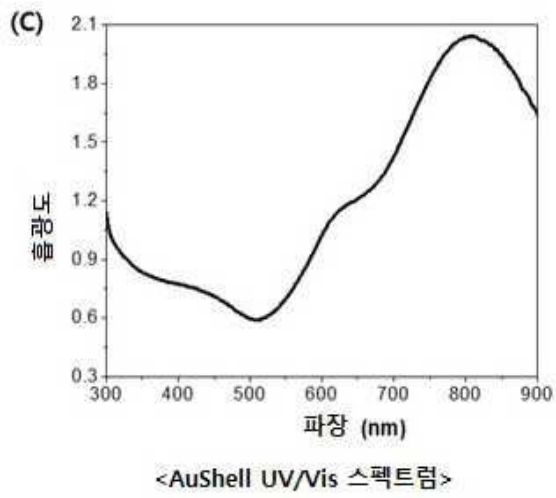
도면2a



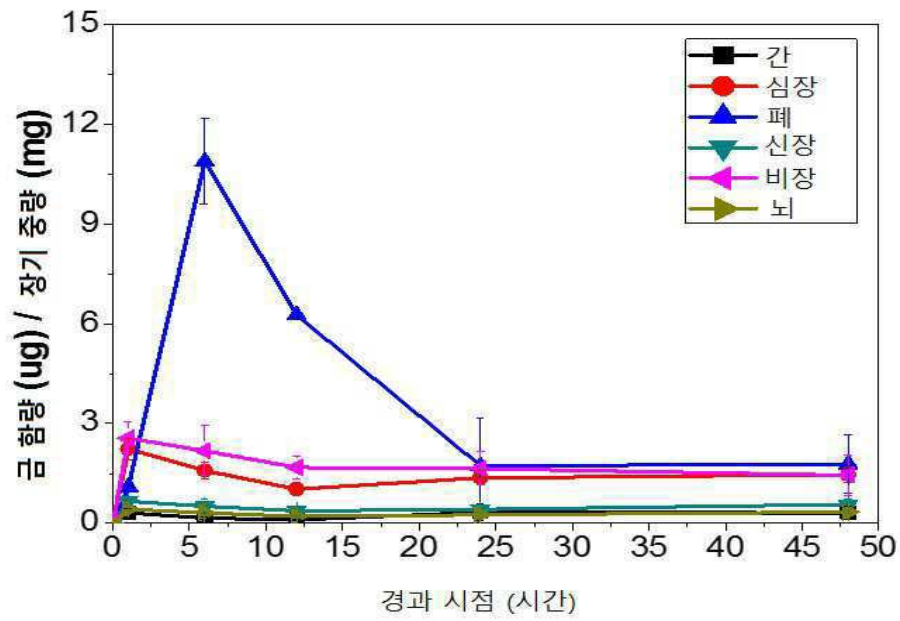
(A) AuNPs 및 AuNPs 담지 대식세포 (RAW 264.7 세포주)의 광학 이미지 및 UV-vis 스펙트럼

(B) ICP- 질량 분석에 의한 5 × 10⁶의 대식세포 (RAW 264.7) 중의 AuNPs 포함량

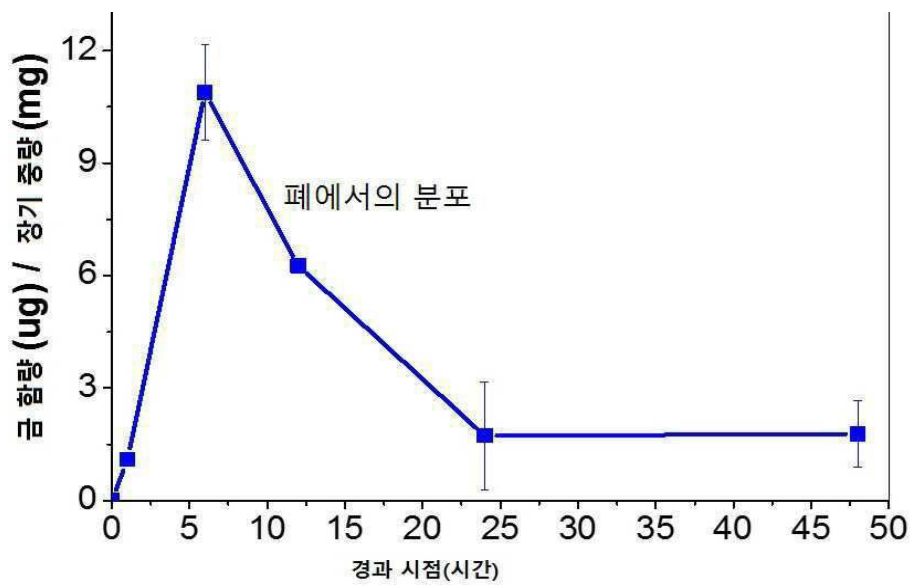
도면2b



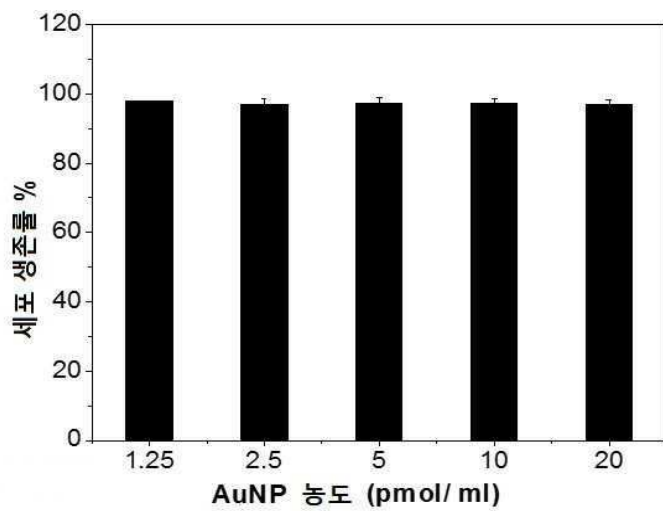
도면3a



도면3b

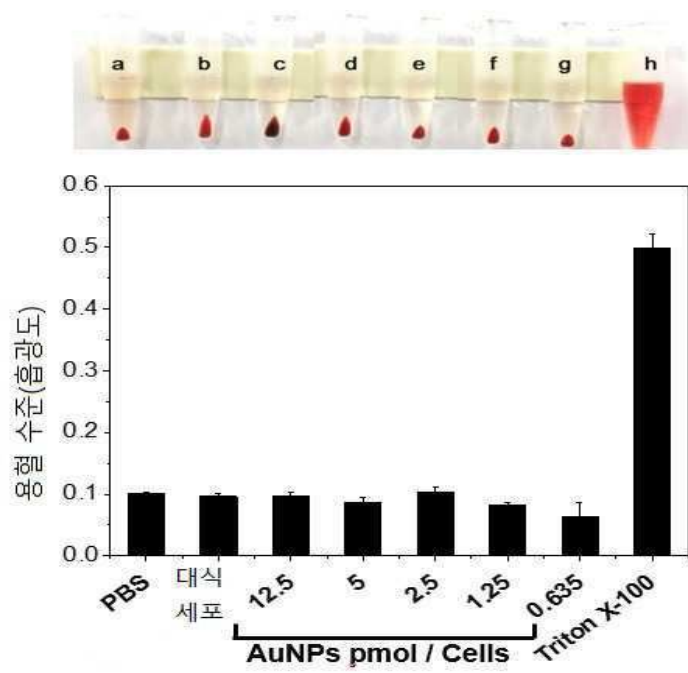


도면4



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

도면5



도면6



도면7

