(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0022002
(43) 공개일자 2018년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 51/12 (2006.01) *A61K 33/24* (2006.01)
A61K 51/02 (2006.01) *A61K 51/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 51/1244 (2013.01)
A61K 33/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0106723
(22) 출원일자 2016년08월23일
심사청구일자 2016년08월23일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
경북대학교병원
대구광역시 중구 동덕로 130 (삼덕동2가)
(72) 발명자
임동권
서울특별시 강남구 도곡로78길 22, 112동 202호
전용현
대구광역시 수성구 청수로 213, 1511동 107호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 17 항

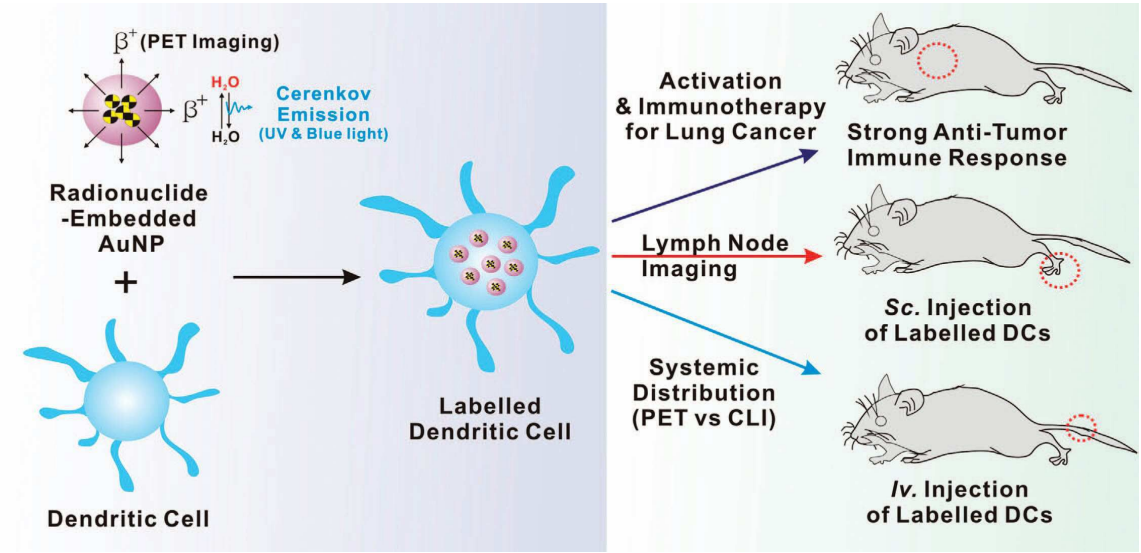
(54) 발명의 명칭 **방사성 동위원소 임베드 금 나노입자를 포함하는 복합체, 이를 포함하는 조영제 및 항암 면역 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 방사성 동위원소가 임베드된 나노 입자 (radionuclide-embeded gold nanoparticles; RIe-AuNP) 기반의 복합체, 이를 포함하는 분자영상 조영제 물질 (imaging agent) 및 이를 이용한 항암 면역 치료용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는, 방사성 동위원소가 내부에 포함된 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체, 이를 포함하는 조영제 및 항암 면역 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 복합체는 나노입자 1개당 약 2000개 이상의 방사성 동위원소가 결합되어 있어, 매우 강한 신호세기와 생체 내에서 안정적인 핵 및 광학 영상을 제공할 수 있다. 또한, 추가적으로 Au 외피를 형성하는 경우, 매우 높은 생체내 안정성을 달성할 수 있으며, 수지상 세포에 의해서 체내에 흡수되더라도 체내 세포의 생물학적 기능에 부작용을 유도하지 않으면서 강력하고 강화된 항종양 면역성을 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 51/025 (2013.01)
A61K 51/0474 (2013.01)
(72) 발명자
이상봉
대구광역시 북구 학정동로 57, 301호

이상우
대구광역시 수성구 들안로73길 50-7, 108동 1303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI16C1501
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
연구사업명 선도형특성화연구개발사업
연구과제명 선도형 당뇨병 및 대사성질환 연구사업단
기 여 율 50/100
주관기관 경북대학교병원
연구기간 2016.04.01 ~ 2021.03.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A1A1003323
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구지원사업
연구과제명 복합분자영상리포터 유전자를 이용한 수지상세포 추적술 개발
기 여 율 50/100
주관기관 경북대학교병원
연구기간 2016.04.01 ~ 2021.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

방사성 동위원소가 내부에 포함된 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복합체는 아데닌 염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드가 결합된 금 나노입자에 방사성 동위원소가 콘쥬게이션된 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 복합체는 타이로신 아미노산을 포함하는 펩티드 서열이 결합된 금 나노입자에 방사성 동위원소가 콘쥬게이션된 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 콘쥬게이션은 상기 올리고뉴클레오티드의 아데닌 염기 중 일차 아민기가 sulfosuccininmyl-3-(4-hydroxylphenyl)propionate (sulfo-SHPP)의 4-히드록시페닐기와 아미드 결합을 형성하고, 상기 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성된 것을 특징으로 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 콘쥬게이션은 상기 펩티드 서열의 타이로신 중 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성된 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 복합체는 추가적인 금 외피를 포함하는 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 방사성 동위원소는 ^{124}I, ^{125}I, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{124}I, ^{125}I 또는 그 혼합물인 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 복합체는 1 nm 내지 1000 nm의 평균 입경을 갖는 것을 특징으로 하는 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체를 포함하는 조영제.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조영제는 핵의학 영상 촬영 또는 광학 영상 촬영에 적용되는 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 핵의학 영상 촬영은 PET (positron emission tomography) 또는 SPECT (single-photon emission computed tomography)인 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 광학 영상 촬영은 CLI (Cerenov luminescence imaging)인 것을 특징으로 하는 조영제.

청구항 13

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체가 표지된 수지상 세포를 포함하는 면역치료용 약학조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 조성물은 면역 치료 중 생체 내 수지상세포의 이동을 추적할 수 있는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 수지상세포는 골수 유래 세포인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 수지상세포는 치료하고자 하는 종양의 용해물, 종양 특이적 펩타이드, 종양 RNA, 종양 특이적 항원이 인코딩된 DNA 또는 그 혼합물로 자극된 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 17

제14항에 있어서,

상기 수지상세포는 치료하고자 하는 종양의 용해물로 자극된 것을 특징으로 하는 약학조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 방사성 동위원소가 임베드된 나노 입자 (radionuclide-embeded gold nanoparticles; RIe-AuNP) 기반의 복합체, 이를 포함하는 분자영상 조영제 물질 (imaging agent) 및 이를 이용한 항암 면역 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 금 나노 입자 (gold nanoparticle; AuNP)를 기반으로 하는 조영제 (imaging agent)는 뛰어난 생체 적합성 및 고유한 광학 특성을 나타내고, 표적화 및 표면 안정화를 위한 간단한 표면 화학 특성을 갖기 때문에 분자영상

조영제로 광범위하게 연구되어 왔다 (비특허문헌 1). 신호 감도가 높은 조영제를 사용할 경우 생체 분자영상에 필요한 투여량을 상당히 감소시킬 수 있으며, 따라서 조영제 사용으로 인한 부작용 가능성을 감소시킬 수 있고, 더불어, 체내에서 오랫동안 조영제의 감도를 유지하기 위해서는 나노 입자에 결합된 방사성 동위원소의 보호가 대단히 중요하다. 이러한 이유로, 신호 감도가 높은 조영제를 제조할 수 있으면서도 이러한 신호 감도를 유지할 수 있는 효과적인 보호가 가능한, 쉽고 빠른 합성 방법들이 집중적으로 연구되고 있다 (비특허문헌 2).

[0003] 관련해서, 금 나노입자 표면에 ^{125}I를 비공유 결합에 의해서 금 나노입자 상에 콘쥬게이션시킬 경우, 나노 입자당 방사성 동위원소가 약 6개 정도로 낮게 로딩된다. 또한, PEG와 같은 폴리머로 구성된 보호층이 존재함에도 불구하고 금 나노입자 표면으로부터 방사성 동위원소가 상당량 방출되고, 이로 인해서, 다량 (10 mg/kg)의 조영제를 주입하는 것이 필요하다 (비특허문헌 3).

[0004] 비록, 모든 분자 조형제들에 있어서 신호 감도 및 안정성이 매우 중요한 문제이기는 하지만, 수지상 세포를 기반으로 하는 암 면역치료법의 분야에 있어서는, 이러한 면역치료법의 결과를 정확히 평가하기 위해서, 골수유래 수지상 세포들이 혈관계 및 림프계로 잘 이송되었는지 여부를 정밀하게 추적하는 것이 특히 중요하다 (비특허문헌 4).

[0005] 이러한 맥락에서, 핵의학 영상 (즉, 양전자 방출 단층촬영 (PET), 일광자 발광 컴퓨터 단층촬영 (SPECT)), 자기공명 및 광학 영상 (즉, 양자점, 유기 형광원 및 상향변환 발광 나노입자)을 통해서 림프절을 관찰하기 위한 수지상 세포 추적 기술들이 개발된 바 있으나 (비특허문헌 5 및 6), 생체 내에서 조영제의 감도 및 안정성 문제로 인해서 수지상 세포들을 높은 감도로 장기간 추적하는 것은 매우 어려운 과제로 남아 있다.

[0006] PET 및 SPECT는 높은 감도를 자랑하고 (SPECT: 10^{-10} M, PET: 10^{-11}-10^{-12} M), 깊이에 제한이 없기 때문에 임상 핵의학에서 일상적으로 사용되고 있으나 (비특허문헌 7), 비용이 저렴한 고감도 광학 영상 기법의 개발이라는 측면에서는, 감도 및 투과 깊이 면에서 핵 영상화에 비견할 만한 광학 기반의 영상화 기법을 개발할 필요성이 존재한다 (비특허문헌 8). 이러한 관점에서, 체렌코프 발광 영상화 방법 (Cerenkov luminescence imaging, CLI)은 유망한 광학 기반 기술인 바, 이는 대전된 입자들 (대부분은 베타$^{+}$)이 광속보다 빠른 속도로 물을 통과할 경우, 발광 방사성 핵종으로부터의 독특한 발광 특성에 기반한 기술이다 (비특허문헌 8 및 9). CLI 기반의 광학 영상 기법에 ^{64}Cu, ^{68}Ga 및 ^{124}I와 같은 PET 방사성 핵종을 사용하고자 많은 시도들이 있어왔으나 (비특허문헌 10), PET와 CLI 영상화 방법 사이의 정량적 관계는 아직 확립된 바 없는 바, 이러한 관계의 확립은 임상 적용에 CLI 기반의 영상화 방법을 적용하고자 할 때 요구되는 사항이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1: Boisselier, E. & Astruc, D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chem. Soc. Rev. 38, 17591782 (2009).

(비특허문헌 0002) 비특허문헌 2: Lim, D. K., Jeon, K.-S., Hwang, J.-H., Kim, H., Kwon, S., Suh, Y. D. & Nam, J.M.Highly uniform and reproducible surface-enhanced Raman scattering from DNA-tailorable nanoparticles with 1-nm interior gap. Nat. Nanotechnol. 6, 452460 (2011).

(비특허문헌 0003) 비특허문헌 3: Harris, J. M. & Chess, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat. Rev. Drug Discov. 2, 214221 (2003).

(비특허문헌 0004) 비특허문헌 4: Palucka, K. & Banchereau, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. Nat. Rev. Cancer 12, 265277 (2012).

(비특허문헌 0005) 비특허문헌 5: Wu, C., Xu, Y., Yang, L., Wu, J., Zhu, W., Li, D., Cheng, Z., Xia, C., Guo, Y. & Gong, Q.Negatively charged magnetite nanoparticle clusters as efficient MRI probes for dendritic cell labeling and in vivo tracking. Adv. Funct. Mater. 25, 35813591 (2015).

(비특허문헌 0006) 비특허문헌 6: Xiang, J., Xu, L., Gong, H., Zhu, W., Wang, C., Xu, J., Feng, L., Cheng, L., Peng, R. & Liu, Z. Antigen-loaded upconversion nanoparticles for dendritic cell stimulation, tracking, and vaccination in dendritic cell-based immunotherapy. ACS Nano 9, 64016411

(2015).

(비특허문헌 0007) 비특허문헌 7: Adonai, N., Nguyen, K. N., Walsh, J., Iyer, M., Toyokuni, T., Phelps, M. E., McCarthy, T., McCarthy, D. W. & Gambhir, S. S. Ex vivo cell labeling with 64Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positronemission tomography. Proc. Natl Acad. Sci. USA 99, 30303035 (2002).

(비특허문헌 0008) 비특허문헌 8: Thorek, D. L. J., Robertson, R., Bacchus, W. A., Hahn, J., Rothberg, J., Beattie, B. J. & Grimm, J. Cerenkov imagingA new modality for molecular imaging. Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 2, 163 (2012).

(비특허문헌 0009) 비특허문헌 9: Robertson, R., Germanos, M. S., Li, C., Mitchell, G. S., Cherry, S. R. & Silva, M. D. Optical imaging of Cerenkov light generation from positron-emitting radiotracers. Phys. Med. Biol. 54, N355N365 (2009).

(비특허문헌 0010) 비특허문헌 10: Xu, Y., Liu, H. & Cheng, Z. Harnessing the power of radionuclides for optical imaging: Cerenkov luminescence imaging. J. Nucl. Med. 52, 20092018 (2011).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명에서는 전술한 종래기술의 문제점을 해결하고자, 나노입자 1개 당 매우 많은 수의 방사성 동위원소가 결합됨으로써 매우 강한 신호세기를 나타내고 생체 내에서 매우 안정적일 뿐만 아니라, 생체 세포의 생물학적 기능에 부작용을 유도하지 않으면서도 강력한 항종양 면역성을 나타낼 수 있는 방사성 동위원소 임베드 금 나노입자를 포함하는 복합체, 이를 포함하는 조영제 면역 치료용 약학 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 방사성 동위원소가 내부에 포함된 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체를 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 복합체는 아데닌 염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드가 결합된 금 나노입자에 방사성 동위원소가 콘쥬게이션된 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 복합체는 타이로신 아미노산을 포함하는 펩티드 서열이 결합된 금 나노입자에 방사성 동위원소가 콘쥬게이션된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 콘쥬게이션은 상기 올리고뉴클레오티드의 아데닌 염기 중 일차 아민기가 sulfosuccininmyl-3-(4-hydroxylphenyl)propionate (sulfo-SHPP)의 4-히드록시페닐기와 아미드 결합을 형성하고, 상기 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 콘쥬게이션은 상기 펩티드 서열의 타이로신 중 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성된 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 방사성 동위원소는 ^{124}I, ^{125}I, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{124}I, ^{125}I 또는 그 혼합물일 수 있다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 복합체는 추가적인 금 외피를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 복합체는 1 nm 내지 1000 nm의 평균 입경을 가질 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체를 포함하는 조영제를 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조영제는 핵의학 영상 촬영 또는 광학 영상 촬영에 적용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 핵의학 영상 촬영은 PET (positron emission tomography) 또는 SPECT (single-photon emission computed tomography)일 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 광학 영상 촬영은 CLI (Cerenov luminescence imaging)일 수 있다.

[0021] 한편, 본 발명은 또한 상기 금 나노 입자-방사성 동위원소 복합체가 표지된 수지상 세포를 포함하는 면역치료용 약학조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 조성물은 면역 치료 중 생체 내 수지상세포의 이동을 추적할 수 있다.

[0023] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 수지상세포는 골수 유래 세포일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 수지상세포는 치료하고자 하는 종양의 용해물, 종양 특이적 펩타이드, 종양 RNA, 종양 특이적 항원이 인코딩된 DNA 또는 그 혼합물로 자극된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 수지상세포는 치료하고자 하는 종양의 용해물로 자극된 것일 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 복합체는 나노입자 1개당 약 2000개 이상의 방사성 동위원소가 결합되어 있어, 매우 강한 신호 세기와 생체 내에서 안정적인 핵 및 광학 영상을 제공할 수 있다. 또한, 추가적으로 Au 외피를 형성하는 경우, 매우 높은 생체내 안정성을 달성할 수 있으며, 수지상 세포에 의해서 체내에 흡수되더라도 체내 세포의 생물학적 기능에 부작용을 유도하지 않으면서 강력하고 강화된 항종양 면역성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 본 발명에 따른 복합체를 사용하여 수지상 세포를 표지하고, 표지된 수지상 세포를 사용하여 면역치료법, 림프절 영상화 및 생체 분포 모니터링을 수행하는 과정을 개략적으로 도시한 도면이다.

도 2는 RI-AuNP를 합성하기 위한 반응 개요도 (a), 상기 반응에서의 아데닌의 화학 구조의 변화 (b), 방사능 표지 반응을 모니터링하기 위한 경시적 TLC 크로마토그래피 (c 내지 e)를 도시한 도면이다.

도 3은 RIe-AuNP를 합성하기 위한 반응 개요도 (a), A10-AuNPs, SHPP-A10-AuNPs, RI-AuNPs (적색선) 및 방사능 핵종-임베디드 AuNPs (RIe-AuNPs, 청색선)에 대한 UV-가시 스펙트럼 (b), RIe-AuNP에 대한 XPS 데이터 (c), RIe-AuNPdp 대한 투과 전자 현미경 영상 및 Au (청색), 요오도 (적색) 및 Au와 요오드의 병합에 대한 EDX 기반 원소 맵핑 결과를 도시한 도면이다.

도 4는 코어 입자 크기의 함수로서 RIe-AuNP (^{125}I)의 방사능 활성을 나타낸 그래프 (코어 DNA-AuNP에 대해서 5 nm (흑색), 10 nm (적색) 및 20 nm (청색)) (a), 농도 (1.0 pM 내지 0.5 nM)의 함수로서 RIe-AuNP (^{125}I)의 감도를 나타낸 그래프 (b), RIe-AuNP (^{124}I) 용액의 사진 및 PET/CT 영상 (c), 농도 (1.6200 pM)의 함수로서 RIe-AuNP (^{124}I)의 감도를 나타낸 그래프 (d), 인간 혈청 중에서 RIe-AuNP (^{124}I) (1) 및 RIe-AuNP (^{124}I) (2)의 경시적 안정성을 나타낸 그래프이다 (청색 수치는 피크의 상대 면적 %를 나타냄).

도 5는 나노입자 크기와 방사성 활성 사이의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 6은 DC 중 RIe-AuNP의 흡수 효율과, DC의 생물학적 기능 및 항암 면역성에 미치는 효과를 도시한 도면으로서, 3 가지 다른 농도의 RIe-AuNP와 함께 배양한 후 (1.04.0 nM) DC의 명계 영상 (bright-field images) (a), 미표지된 DC (1) 또는 표지된 DC (2)를 함유하는 튜브 팬텀의 PET/CT 영상 (b), DC 내에서의 경시적 방사능활성 (c), RIe-AuNP 농도 (1.04.0 nM) 및 배양 시간 (24 시간 (흑색 막대) 또는 48 시간 (빈 막대))의 함수로서 DC 생존도를 표시한 그래프 (d), 표현형 마커들 (CD11c, MHC-I, MHC-II, CD86, CD54 and CCR-7)의 발현 (e), 미표지 및 비펄스화된 DC (1), 미표지 및 LLC 용해물로 펄스화된 DC (2), 표지 및 비펄스화된 DC (3), 표지 및 LLC 용해물로 펄스화된 DC (4)로 처리한 후 종양 보유 마우스 및 절개된 종양에 대한 PET/CT 영상들 (f), 종양 보유 마우스들로부터의 비장세포의 세포 독성을 생발광으로 모니터링한 도면 (LLC/effluc 세포들을 타겟 세포들로 사용하였음)이다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다 (7마리 마우스들) (*P<0.05).

도 7은 세포 흡수 효율에 대한 투여량의 영향을 도시한 그래프 (a), RIe-AuNP (2.0 nM)의 경시적 세포 흡수 효율 (b)을 도시한 그래프이다.

도 8은 0 시간 시점에서 RI-AuNP로 처리된 DC의 방사능활성 및 3 시간 경과 후 DC 및 세포 배지 중 방사능활성

의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 미표지된 DC와 표지된 DC를 24 시간 동안 배양한 후, 세포사멸 수준을 비교한 그래프로서, 세포들은 요오드화 프로피디움 (PI) 및 Annexin-V로 염색한 후 유세포 분석기로 분석하였다

도 10은 미표지된 DC 및 RIe-AuNP 표지된 DC의 표현형 마커를 분석한 도면으로서, FITC-conjugated 항-CD11c, 항-MHC I, 항-MHC II, 항-CD86, 항-CD54, 및 항-CCR-7 단클론 항체로 염색한 후에 유세포 분석을 수행한 결과이다 (흑색 그래프는 이소타입-매칭된 세포들; 수치는 마커 발현 수준에 있어서 상대적 증가 (%)를 나타냄).

도 11은 싸이토카인 (TNF-α 및 IL-6)의 수준 (a), 트랜스웰 이동 분석 결과 (표지 또는 미표지된 DC들을 상부 챔버에 가해준 다음, 2 시간 동안 CCL-19을 함유하는 하부 챔버로 이동한 DC들을 수집하고, 이를 유세포 분석기로 계수) (b), 항원 흡수 능력 (미표지 및 표지된 DC들을 Texas Red-OVA와 함께 4 또는 37 ℃에서 1 시간 동안 배양. 세포들을 PBS로 세척하고, 나노입자들의 흡수를 유세포 분석기를 사용하여 분석함) (c)을 나타낸 그래프이다.

도 12는 체내 치료법에 대한 공정 개요도로서, C57BL/6 마우스를 DC로 하기 과정에 의해서 2 주 동안 일주일에 한 번 하기와 같이 면역화시켰다: (1) 미표지 및 비펄스화된 DC, (2) 미표지 및 LLC 용해물로 펄스화된 DC, (3) 표지 및 비펄스화된 DC, (4) 표지 및 LLC 용해물로 펄스화된 DC를 각각 나타낸다. DC의 펄스화를 위해서, 총 LLC 용해물들을 반복적인 동결 및 해동을 통해서 제조한 다음, LLC 세포 용해물들 (5 ~ 10 ug/ml)을 밤새도록 DC에 처리하였다. 마우스들은 적당한 DC 제제로 일주일에 한 번 2주 동안 근육내 주사하였다. 최종 백신화 이후 1 주일 경과 시점에서, LLC 세포들을 피하주사로 마우스들에 주사하고, 지정된 시간에 촉진 (palpation) 및 ^{18}F-fludeoxyglucose (^{18}F-FDG) PET/CT로 종양의 성장을 모니터링하였다. 체내 실험들은 3회 실시하였다 (그룹 당 7마리의 마우스들).

도 13은 미표지 및 비펄스화된 DC (흑색), 미표지 및 펄스화된 DC (적색), 표지 및 비펄스화된 DC (청색) 또는 표지 및 펄스화된 DC (녹색)으로 처리한 후 캘리퍼 (caliper)로 측정한 종양 부피를 도시한 도면이다.

도 14는 체내 동물실험에 대한 공정 개요도로서, DC는 GM-CSF로 7일 동안 처리함으로써 골수 세포로부터 생성하였다. 이어서, 미성숙 DC를 LPS 및 LLC 종양 용해물로 밤새도록 활성화시켰다. 성숙 DC를 2.0 nM RIe-AuNP로 3 시간 동안 처리하고, 발바닥을 통해서 피하주사하였다. 이동된 DC들의 이동도를 PET/CT로 모니터링하였다. 체내 실험은 3회 실시하였다 (그룹 당 5마리의 마우스들).

도 15는 경시적 PET/CT, CLI, 생분포 및 조직학 연구 결과로서, 경시적 3차원-PET/CT 영상들 (상단) 및 축방향 PET/CT 영상들 (하단) (황색 원은 배수 슬와 림프절을 나타낸다) (a), 경시적 CLI 영상들 (오렌지색 원은 DPLN을 나타냄) (b), PET/CT 및 CLI 영상화에 있어서 DPLN 및 비-DPLN의 분석을 위한 관심 영역들 (c, d) (데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, n=5), 발바닥을 통한 주사 이후 전체 장기들 중 표지된 DC의 생분포 (e) (적색 박스는 DPLN 중 방사능활성의 변화를 명확하게 보여주기 위해서 확대된 데이터. %ID/g, 그램 당 주사된 투여량의 백분율), H&E로 염색된 DPLN의 조직학적 영상 (1), B-세포 영역에 대한 CD79a-특이적 항체 염색 (2), T-세포 영역에 대한 CD3-특이적 항체 염색 (3) 및 DC에 대한 S100-특이적 항체 염색 (4) (흑색 원 및 화살표는 RIe-AuNPs를 나타내며, 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었고, n=5) (f)를 도시한 도면이다.

도 16은 정맥내 주사된 표지된 DC의 경시적 PET/CT, 체렌코프 발광 영상 및 생체 분포로서, 3차원 PET/CT 영상 (상단) 및 축방향 영상 (하단) (황색 별: 폐; 적색 별: 간; 오렌지색 별: 비장) (a), 체렌코프 발광 영상은 광학 영상 시스템 (IVIS Lumina III)을 사용하여 얻었으며 (b), 마우스 중 표지된 DC의 생분포를 도시한 도면이다 (표지된 DC를 정맥주사하고 0.5 시간 (흑색), 4 시간 (적색), 1 일 (청색), 2 일 (녹색), 3 일 (오렌지색) 및 4 일 (자주색) 경과 후에 얻은 사진). 데이터는 평균 ± 표준편차 (N=5).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0029] 본 발명에서는 핵 영상화 및 체렌코프 발광 영상화 방법을 조합함으로써 이중 생체 영상화 모드로서 적용이 가능한 금 기반의 복합체 및 이를 포함하는 조영제를 제공하고자 하며, 또한 이를 제조하기 위한 방법으로서 매우 간단하고 단순한 합성 방법을 제시한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 금 나노입자 상에 존재하는 다가 아데닌-풍부 올리고뉴클레오티드 서열 (multivalent adenine-rich oligonucleotide sequences)은, 금 나노입자 당 다량의 방사성 동위원소들이 콘쥬게이션되는 것

을 가능하게 한다. 또한, 추가적인 Au 외피는 생물계에서 효소의 공격을 완벽하게 방어할 수 있는 안정적인 보호층을 생성한다.

[0031] 본 발명에 따른 복합체는 방사성 동위원소 임베드-금 나노 입자 (radioisotope embedded-AuNP; RIe-AuNP)가 높은 방사선 감도를 나타내기 때문에, 오직 소량의 Au (0.3 mg/kg) 만으로도 허용 가능한 PET 및 CLI 영상을 얻을 수 있다.

[0032] 더 나아가, 하기 실시예로부터도 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 RIe-AuNP는 수지상 세포들의 생물학적 기능에 어떠한 악영향도 미치지 않았으며, 폐암에 대해서 강력한 항암 면역 반응을 나타내었다.

[0033] 또한, RIe-AuNP의 강력한 방사능에 의해서, PET 및 CLI를 동시에 사용하여 수지상 세포들이 림프절로 이동하는 것을 감도 높게 모니터링하는 것이 가능하다. 관련해서, 하기 실시예에 서술된 바와 같이, 정맥주사를 사용하여 체내 연구를 진행하였으며, 그 결과, RIe-AuNP의 강력한 Cerenkow 발광 강도로 인해서, CLI 기반의 영상이 대응되는 PET 영상에 필적할 만한 영상을 보여주었다.

[0034] 따라서, 본 발명은 방사성 동위원소 임베드-금 나노 입자 (RI-AuNP)를 포함하는 복합체를 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 RI-AuNP는 아데닌 염기를 포함하는 올리고뉴클레오티드가 결합된 금 나노입자, 또는 타이로신 아미노산을 포함하는 펩티드 서열이 결합된 금 나노입자에 방사성 동위원소가 콘쥬게이션됨으로써 제조될 수 있는 바, 상기 콘쥬게이션은 상기 올리고뉴클레오티드의 아데닌 염기 중 일차 아민기가 sulfosuccininmyl-3-(4-hydroxylphenyl)propionate (sulfo-SHPP)의 4-히드록시페닐기와 아미드 결합을 형성하고, 상기 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성되거나, 또는 상기 펩티드 서열의 타이로신 중 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치가 방사성 동위원소로 치환됨으로써 형성될 수 있다.

[0035] 또한, 하기 실시예에서도 후술하는 바와 같이, 본 발명에 따른 복합체 (RI-AuNP)의 표면에 추가적인 금 외피를 형성 (RIe-AuNP)함으로써 체내에서 더욱 우수한 안정성을 달성하는 것도 가능하다.

[0036] 본 발명에 따른 복합체에 임베드되는 방사성 동위원소로는, 이에 제한되는 것은 아니지만, ^{124}I, ^{125}I, ^{64}Cu, ^{68}Ga 또는 그 혼합물을 예로 들 수 있으며, 바람직하게는 ^{124}I, ^{125}I 또는 그 혼합물을 예로 들 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명에 따른 복합체는 1 nm 내지 1000 nm의 평균 입경을 가질 수 있다.

[0038] 한편, 본 발명은 상기 금 나노입자-방사성 동위원소 복합체를 포함하는 조영제를 제공하는 바, 본 발명에 따른 조영제는 핵의학 영상 촬영 또는 광학 영상 촬영에 효과적으로 사용될 수 있으며, 또한 핵의학 영상 촬영 및 광학 영상 촬영을 조합한 형태의 이중 생체 영상 촬영에도 효과적으로 적용될 수 있다. 이때, 상기 핵의학 영상 촬영으로는, 이에 제한되는 것은 아니지만, PET (positron emission tomography) 또는 SPECT (single-photon emission computed tomography)를 예로 들 수 있으며, 상기 광학 영상 촬영으로는 CLI (Cerenov luminescence imaging)를 예로 들 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명에 따른 조영제의 표면에 친수성 기능기, 표적 결합리간드 등과 같은 다양한 리간드를 결합시켜서 분자영상 조영제로 활용하는 경우, 이를 이용해서 다양한 질병을 진단하는 것이 가능하다.

[0040] 더 나아가, 본 발명에서는 또한 상기 복합체가 표지된 수지상세포를 포함하는 면역치료용 약학조성물을 제공하는 바, 하기 실시예에서도 상세히 서술한 바와 같이, 본 발명에 따른 면역치료용 약학조성물은 면역 치료 중 생체 내 수지상세포의 이동을 매우 정확하게 추적할 수 있다.

[0041] 상기 수지상세포는, 이에 제한되는 것은 아니지만, 골수 유래 세포일 수 있으며, 그 치료 효율을 높이기 위해서, 치료하고자 하는 종양의 용해물, 종양 특이적 펩타이드, 종양 RNA, 종양 특이적 항원이 인코딩된 DNA 또는 그 혼합물로 자극된 것일 수도 있다.

[0042] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.

[0043] **실험 과정**

[0044] **재료 및 시약**

[0045] 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 구연산염으로 안정화한 금 나노 입자 (20 nm)는 Ted Pella Inc. (Redding, CA, USA)에서 구입하였다. Sulfosuccimidyl-3-[4-hydroxyphenyl]propionate

(sulfo-SHPP)는 Thermo Scientific (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 방사성 요오드화 나트륨 ($Na^{125}I$)은 Perskin Elmer (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, 방사성 요오드화 나트륨 ($Na^{124}I$)은 Duchem Bio (대한민국, 대구)와 KIRAMS (대한민국, 서울)에서 구입하였다. 골수세포의 분화에 의해 생성되는 골수 유래 수지상세포를 모든 실험에 사용하였다. 설치류 루이스 폐 암종 (Lewis lung carcinoma: LLC) 세포와 경부암 세포는 10 % 열 비활성화 소태아 혈청 (HyClone), 50 μg/mL 젠타마이신 (Gibco, Grand Island, NY, USA), 및 1.0 % 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco)으로 보충한, 완전한 Dulbecco modified Eagle medium (HyClone, Logan, UT, USA)에서 배양하였다. 실험을 위해서 SLC Inc. (Shizuoka, Japan)에서 입수한 무균, 6 주령의 면역전능성 (immunocompetent) C57BL/6 쥐를 사용하였다. 모든 동물 실험 절차는 동물 연구에 대한 해당 기관 지침을 엄격히 준수하여 실시하였다. 프로토콜은 국립 경북대학교의 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다 (승인 번호: KNU 2012-43).

[0046] **RIe-AuNP의 합성 (올리고뉴클레오티드 결합 AuNP 기반 합성)**

[0047] 환원된 티올화 아데닌-풍부 올리고뉴클레오티드 (3'-HS-$(CH_2)_3$-A_{10}-5')를 표준 염 숙성 과정 (standard salt aging procedures)을 통하여 구연산염-AuNP (20 nm)에 부가하였다. 이어서, 요오드화 나트륨 ($Na^{125}I$ 또는 $NA^{124}I$) 등의 방사성 동위원소와 콘쥬게이션시키기 위하여 AuNP 상의 아데닌-풍부 올리고뉴클레오티드의 아민기 (A_{10}-AuNP)를 sulfo-SHPP으로 개질하였다 (도 2). 20.0 mL의 SHPP 개질된 AuNP (1.0 nM)를 제조하기 위해서, 금방 제조된 A_{10}-AuNP 용액 (20 mL)을 실온에서 12 시간 동안 sulfo-SHPP (1.0 mg)와 반응시켰고, 그런 다음 원심 분리로 (12,000 rpm/15 분) 정제하였다. 상등액을 제거하였고, 침전물을 증류수 (20 mL) 중에서 재분산시켰다. 입자 농도는 UV-가시 광선 분광 광도계를 사용하여 확인하였다. 방사성 동위원소 표지를 위하여, SHPP-AuNP (1.0 nM, 1 mL)를 실온에서 2 시간 동안, 90 μL의 클로르아민-T (3 mg/mL)와 100 μL의 1 % 황산 도데실 나트륨의 존재 하에서, 150 μL의 $Na^{125}I$ (129.5 MBq) 또는 $NA^{124}I$ (81.4 MB1)와 반응시켰고, 이어서 원심 분리 (12,000 rpm/15 분)로 정제하였다. 상등액을 제거하고, 침전물을 증류수 중에 재분산시켰다. 붕괴 보정 방사화학 수율 (decay-corrected radiochemical yield)은 90-95 %인 것으로 나타났다 ($NA^{125}I$ (116.5-118.4 MBq), $Na^{124}I$ (73.2-74 MBq)). 그 후, 1 mL의 방사성 동위원소-금 나노 입자 (radioistope-AuNP; RI-AuNP) (1.0 nM)를 500 μL의 1.0% (w/v) poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) 용액 (M_w 40kDa)과 혼합하고, 100 μL의 100 mM 인산 완충액 (pH 7.4)과 165 μL의 2.0 M NaCl을 첨가하여, ^{125}I 또는 ^{124}I를 포함하는 방사성 동위원소 임베드-금 나노 입자 (RIe-AuNP)를 제조하였다. 마지막으로, 용액을 434 μL의 수산화아민 염산염 (10 mM)과 434 μL의 $HAuCl_4$ (5 mM)와 반응시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 30 분간 교반하여 혼합하고, 원심 분리 (6,000 rpm/15 분)로 정제하였다. 상등액을 제거하고, 침전물을 증류수 (1 mL) 중에 재분산시켰다 (도 2 및 도 3).

[0048] **RIe-AuNP의 합성 (타이로신 결합 AuNP 기반 합성)**

[0049] 시트르산-결합 AuNP (20 nm) 20 ml 용액에 타이로신아미노산 10개가 연속적으로 연결된 아미노산 말단에 시스테인 서열이 결합된 아미노산 1 mg을 가하여 12시간 동안 반응하였다. 원심분리 (12000 rpm/15분)를 통해 상층액을 제거하고, 20 ml의 증류수를 가하여 타이로신 결합 금나노입자 20ml를 제조한다. 방사성 동위원소 표지를 위하여, 타이로신 결합 금나노입자 (1.0 nM, 1 mL)를 실온에서 2 시간 동안, 90 μL의 클로르아민-T (3 mg/mL)와 100 μL의 1 % 황산 도데실 나트륨의 존재 하에서, 150 μL의 $Na^{125}I$ (129.5 MBq) 또는 $NA^{124}I$ (81.4 MB1)와 반응시켰고, 이어서 원심 분리 (12,000 rpm/15 분)로 정제하였다. 상등액을 제거하고, 침전물을 증류수 중에 재분산시켰다. 붕괴 보정 방사 화학 수율 (decay-corrected radiochemical yield)은 90-95 %인 것으로 나타났다 ($NA^{125}I$ (116.5-118.4 MBq), $Na^{124}I$ (73.2-74 MBq)). 그 후, 1 mL의 방사성 동위원소-금 나노 입자 (radioistope-AuNP; RI-AuNP) (1.0 nM)를 500 μL의 1.0% (w/v) poly(*N*-vinyl-2-pyrrolidone) 용액 (M_w 40kDa)과 혼합하고, 100 μL의 100 mM 인산 완충액 (pH 7.4)과 165 μL의 2.0 M NaCl을 첨가하여, ^{125}I 또는 ^{124}I를 포함하는 방사성 동위원소 임베드-금 나노 입자 (RIe-AuNP)를 제조하였다. 마지막으로, 용액을 434 μL의 수산화아민 염산염 (10 mM)과 434 μL의 $HAuCl_4$ (5 mM)와 반응시켰다. 반응 혼합물을 실온에서 30 분간 교반하여 혼합하고, 원심 분리 (6,000 rpm/15 분)로 정제하였다. 상등액을 제거하고, 침전물을 증류수 (1 mL) 중에 재분산시켰다.

[0050] **RIe-AuNP의 분석**

[0051] UV-Vis 분광 분석계, X선 광전자 분광법, 에너지 분산 X선 기반 원소 매핑, 및 투과 전자 현미경법을 통해서, 전술한 바와 같이 제조된 RIe-AuNP의 물에서의 분산성, 화학적 조성 및 구조 분석을 수행하였다 (도 3).

[0052] **방사능 감도 및 인 비트로(*In vitro*) 안정성**

[0053] 감마 카운터 (Gamma-10; Sinjin Medics, 대한민국)를 사용하여 다양한 농도의 RIe-AuNP (1.0 pM-0.5 nM)로 SPECT 및 PET의 신호 강도 변화를 조사하였다 (도 4 및 도 5). 인 비트로 안정성 실험의 경우, 37 ℃에서 RI-AuNP (100 μL, 1.0 nM) 및 RIe-AuNP (100 μL, 1.0 nM)를 인간 혈청 (900 μL)과 함께 배양하였다. 그런 다음, 박층 크로마토그래피 (용리액: 아세톤)를 사용하여 방출된 방사성 동위원소를 정량하였고, 스캐너 (AR-2000; Bioscan, USA)를 사용하여 결과를 기록하였다 (도 4).

[0054] **수지상 세포에서 RIe-AuNP의 흡수 효율 및 세포 독성**

[0055] RIe-AuNP를 0.5-4.0 nM의 다양한 농도에서 세포 배양 배지에 희석하고, 37 ℃에서 3 시간 동안 수지상 세포 (DC)와 함께 배양하였다. 배양 후, 인산 완충액으로 DC를 세척하였고, 2 회 원심 분리 (1,300 rpm/5 분) 후, 상등액에서 유리 RIe-AuNP를 제거하였다. DC에서 RIe-AuNP의 흡수 효율은 감마 카운터 (Gamma-10; Sinjin Medics, 대한민국)로 측정하였다. 2.0 nM 농도의 RIe-AuNP를 사용하여 경시적 흡수 효율을 조사하였다 (도 7). 시간 경과에 따른 상등액의 방사능을 측정함으로써, DC에서 방사능의 경시적 변화를 확인하였다 (도 4 및 도 8).

[0056] 한편, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Dojindo Laboratories, Tokyo, Japan)을 사용하여 세포 증식 분석을 수행함으로써, DC에서 RIe-AuNP의 세포 독성을 평가하였다. 세포사멸 분석 (apoptosis analysis)은, FITC-콘쥬게이트 아넥신 V와 프로피디움 요오드화물 (BD Biosciences)로, 유세포 분석기 (Accuri C6, BD Biosciences)를 사용하여 수행하였다 (도 9).

[0057] **DC의 생물학적 기능**

[0058] *표현형 마커 분석 (phenotype marker analysis)*: 미표지된 DC 또는 RIe-AuNP (2.0 nM)로 표지된 DC를 4 ℃에서 30분 간, 피코에리트린-콘쥬게이트 CD11c, H-2Kb (MHC-I) 또는 I-A/I-E (MHC-II), CD86, 및 CD54, 알로피코시아닌-Cy7-콘쥬게이트 CD197 (CCR-7) 항체 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 염색하였다. 유세포 분석법을 사용하여, 세척한 세포를 분석하였다. 대조군으로서 아이소타입-매치 단클론 항체 (isotype-matched monoclonal antibodies)를 사용하였다. FlowJo 분석 소프트웨어 (FlowJo, USA)를 사용하여 데이터를 분석하였다 (도 10).

[0059] *사이토카인 분석 (cytokine analysis)*: 미성숙한 DC를 12 시간 동안 리포다당류 (1.0 μg/mL)로 자극하였다. 배양 플레이트에 RIe-AuNP로 표지된 성숙한 DC 또는 미표지된 성숙한 DC를 접종하였다. 24 시간 후, 상등액 중 TNF-α 및 인터류킨-6의 함량을, 멀티플렉스 비드 기반 면역 분석 (BDTM Cytometric Bead Array) 시스템과 유세포 분석법 (BD Biosciences)으로 정량하였다 (도 11).

[0060] *트랜스웰 (Transwell) 이동 분석*: 24 시간 동안 1.0 μg/mL 프로스타글란딘 E2 (Sigma)와 함께 DC를 배양하고, CCL 19 (Pepro Tech)를 함유한 배양 배지를 하부 챔버에 첨가한 다음, 5 μm 기공을 갖는 폴리카보네이트 막을 포함하는 상부 챔버에 $2x10^5$ 세포를 첨가하였다 (BD Falcon). 37 ℃에서 2 시간 동안 배양한 후, 하부 챔버로 이동하는 세포들을 수집하고, 유세포 분석법으로 계수하였다. 고정된 시간 (60 초) 동안 발생하는 이벤트를 FlowJo 분석 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0061] *항원 흡수 효율*: 미표지된 DC 또는 RIe-AuNP로 표지된 DC를 37 ℃에서 1 시간 동안 100 μg/mL의 Texas Red albumin (Life Technologies, Grand Island, NY, 미국)과 함께 배양하였다. 표지 후, 인산 완충 염으로 세포를 세척한 후, BD Accuri C6 유세포 분석기 (BD Biosciences)를 사용하여 분석하였다.

[0062] **체내 DC 기반 암 면역 요법**

[0063] 도 12에서 자세히 설명하듯이, 치료 체계에 따라서 쥐를 4 개 집단으로 분류하였다: 1) 미표지 비펄스 DC, 2) 미표지 LLC 용해물로 펄스한 DC, 3) 표지 비펄스 DC 및 4) 표지 LLC 용해물로 펄스한 DC. DC의 펄스를 위해서, 전체 LLC 용해물을 반복적인 동결 및 해동을 통해서 제조하였으며, 이어서 제조된 LLC 세포 용해물 (5-10 μg/mL)을 DC에 밤새도록 처리하였다. 마우스들에 해당 DC 제제들을 1 주일에 한번 간격으로 2주 동안 근육내 주사하였다. 최종 접종 이후 1 주일 경과 시점에서, LLC 세포들을 마우스에 피하주사로 주입하였으며, 지정된 시

간에 촉진 (palpation) 및 ^{18}F-fludeoxyglucose (^{18}F-FDG) PET/CT로 종양의 성장을 모니터링하였다. 종양의 크기 (mm^3)는 (A x B^2)/2로 계산하였으며, 여기에서 A는 장방향 직경이고, B는 단방향 직경이다 (도 13).

[0064] 세포 독성 T 림프구 분석을 위해서, 종양-보유 쥐로부터 수집한 비장 세포를 4 일 동안 총 LLC 용해물과 IL-2로 재자극하였다. LLC/effluc 세포를 대상 세포로 사용하였다. 대상 세포를 흑색의 투명 바닥 96-웰 플레이트에 접종하였다 (1 x 10^4 세포). 밤새도록 배양한 후, 효과물질 (effector)로서 비장 세포를, 효과물질과 대상 세포의 비율을 10:1로 함유하는 웰에 첨가하였다. 11 시간 후, IVIS Lumina III instrument (Perkin Elmer)로 루시퍼라아제 활성을 측정하였다.

[0065] **체내 PET 영상 및 Cerenkov 발광 영상**

[0066] 림프절 영상 촬영을 위해서, 쥐의 뒷발바닥에 피하 주사를 통해서 30 ng TNF-α를 주사하였고, 그런 다음 1 일 차에, 발바닥 피하 주사를 통해서 RIe-AuNP 표지된 DC (쥐 당 50 μL의 세포 (3 x 10^6 세포, 6.44 μg (Au), 0.2 mg/kg))를 주입하였고, 지정된 시간에 PET/CT 영상 촬영을 실시하였다 (도 14). 체내 실험은 3회 실시하였다.

[0067] PET와 CLI의 정량적 비교를 위해서, 꼬리 정맥 주사를 통해서 RIe-AuNP 표지한 DC (쥐 당 50 μL의 세포 (3 x 10^6 세포, 6.44 μg (Au), 0.2 mg/kg))를 주입하였고, 지정된 시간에 PET/CT 영상 촬영을 실시하였다. PET/CT 영상 촬영을 위하여, Triumph II PET-CT system (LabPET8; Gamma Medica-Ideas, Waukesha, WI, USA)으로 20 분간 스캔 (DC 영상 촬영)을 실시하였다. CT 스캔은 PET 영상을 획득한 바로 직후에 X선 탐지기로 실시하였다. PET 영상은 3D-OSEM 반복적 영상 재구성을 통해서 재구성하였고, CT 영상은 여과 역투영법으로 재구성하였다. 모든 쥐들은 영상 촬영을 하는 동안 1-2 %의 아이소플로레인 가스로 마취하였다. PET 영상은 3차원 (3D) 영상 시각화 및 분석 소프트웨어 (VIVID: Gamma Medica-Ideas, Northridge, CA, USA)를 사용하여 해부학적 CT 영상과 함께 등록하였다. 관심 용량에 대한 흡수율 (%ID/cc)을 측정하기 위해서, VIVID와 PMOD 소프트웨어 (PMOD Technologies, Zurich, 스위스)를 모두 사용하여 함께 등록된 CT 영상으로부터, 각 영상에서 관심 용량을 수동으로 세분화하였고, 관심 영역에서 흡수율을 PMOD 3.5 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

[0068] Cerenkov 발광 영상 촬영은 IVIS Lumina III 영상 촬영 시스템 (Perkin Elmer)을 사용하여 수행하였다. 흑백 사진 영상과 생물 발광 칼라 영상을 LIVINGMAGE (버전 2.12, Perkin Elmer)과 IGOR 영상 분석 FX 소프트웨어 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA)를 사용하여 중첩시켰다. CLI 신호는 스테라디안 당 초 당 cm^2 당 광자 단위로 표시하였다 ($P/cm^2/s/sr$).

[0069] **생물 분포 연구 및 체외 영상 촬영**

[0070] 발바닥 또는 꼬리 정맥을 통해서 표지한 DC를 투여한 후에 지정된 시간에 쥐를 희생시켰다. 관심 기관을 분리하여, 무게를 달고, 감마 카운터를 사용하여 방사능을 분석하였다. 결과는 조직의 그램 당 주입한 투여량의 비율 (%ID/g)로 표시하였다. 영상을 입수한 후, 쥐를 희생시켰고, 배수 슬와 림프절 (draining popliteal lymph node, DPLN)을 잘라 냈다. 각각 잘라 낸 림프절을 튜브에 넣고, 5 분 간 체외 PET/CT 영상 촬영을 실시하였다. 체외 실험은 3회 실시하였다.

[0071] **조직학적 데이터 및 면역 조직 화학**

[0072] 배수 및 비배수 림프절 (draining and non-draining lymph nodes) (포르말린 고정, 파라핀-임베디드)에서 조직학적 데이터를 입수하였고, 헤마톡실린 및 에오신 (H&E) 염색 슬라이드를 현미경으로 검토함으로써 분석하였다. Benchmark XT 슬라이드 염색기 (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA)를 사용하여 면역 조직 화학적 염색을 제조업체의 가이드라인에 따라 실시하였다. 림프절의 전체 절단 슬라이드에 항-CD3 (1:200 희석; 클론 SP7; Thermo Fisher Scientific), 항-CD79a (사전 희석; 클론 SP18; Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AZ, USA), 항-S-100 (1:400 희석; 클론 B-8; Dako, Glostup, Denmark)을 가하였다.

[0073] **결과 및 검토**

[0074] **RIe-AuNP의 합성**

[0075] 올리고뉴클레오티드-개질 AuNP는 나노 입자 당 높은 로딩 능력을 갖기 때문에, 고감도 바이오센서 또는 유전자 전달 플랫폼으로서 광범위하게 연구되어 왔다. 본 발명에서는, 방사성 표지화를 위한 반응 부위로서 사용할 수

있는 AuNP 상의 올리고뉴클레오티드 염기의 화학적 기능에 초점을 두었다. 아데닌 염기에서 일차 아민기는 sulfosuccininmyl-3-(4-hydroxylphenyl)propionate (sulfo-SHPP)로 관능화할 수 있으며, 이로 인해서 4-히드록시페닐기와 아데닌의 일차 아민 사이에서 아미드 결합이 형성된다 (도 2). 4-히드록시페닐 고리의 2,5-위치들은 $Na^{124}I$ 또는 $Na^{125}I$로 용이하게 요오드화될 가능성이 있다. $AuNP^{22}$ 당 단일 올리고뉴클레오티드 및 다중 올리고뉴클레오티드 가닥에서의 복수개의 아데닌 염기들은 이러한 요오드화를 위해서 많은 반응 부위를 제공한다. 예를 들어, 20 nm의 AuNP를 수십 개의 아데닌 염기 (A_{10})로 구성된 티올화 올리고뉴클레오티드로 개질하게 되면, A_{10}-올리고 가닥 당 20개의 반응 부위, 그리고 AuNP 당 100 A_{10}의 올리고 가닥이 있기 때문에, 각 금 나노 입자에 2,000개의 요오드 분자를 부가할 수 있다. 그러므로, 아데닌이 풍부한 DNA 개질 AuNP (A_{10}-AuNP)는 AuNP로의 요오드 로딩을 개선할 수 있는 유망한 전략이 될 수 있다. 또한, 추가적인 금 외피는, 방사성 동위원소를 금 외피로 임베딩시킴으로써, 살아 있는 세포에 존재하는 효소 또는 기타 인자들에 의한 분해 가능성을 예방하기 때문에, AuNP 상의 방사성 표지된 DNA의 체내 안정성을 현저하게 개선할 수 있다.

[0076] 요오드화 반응은 SHPP-A_{10}-AuNP 용액에 $Na^{124}I$ 또는 $Na^{125}I$를 도입하여 방사성 핵종-AuNP (도 3의 a)를 제조함으로써 수행하였다. radio-TLC (용리액: 아세톤) 스캐너를 사용하여 모니터한 바와 같이, 반응은 120 분 이내에 완료되었다 (도 2). 반응이 완료된 후, 용액을 원심 분리하여 미반응 방사성 NaI를 제거하였다. 동위원소 표지 반응의 방사성 화학 수율은 99%인 것으로 나타났다 (도 2). 또한, RIe-AuNP를 생성하기 위해서 추가적인 Au 껍질 형성 반응을 수행하였다. 본 발명에서는 RIe-AuNP의 안정성을 특성화하기 위해서 ^{125}I를 사용했으며, ^{124}I는 PET와 CLI를 결합한 영상 촬영을 위해서 선택하였다. SHPP-A_{10}-AuPN와 RI-AuNP의 UV-가시 스펙트럼은 도 3의 b에 도시된 바와 같이, A_{10}-AuNP의 스펙트럼과 동일했으며, 이는 방사성 핵종 표지 반응을 하는 동안 어떠한 유의미한 입자 응집도 발생하지 않았음을 의미한다. Au 외피가 형성된 후, RIe-AuNP는 540 nm에서 특징적인 흡수 대역을 보였으며, 이는 구 형태를 의미한다 (도 3의 b). 개질의 결과로 유체 역학적 반경이 약간 증가하였는 바, A_{10}-AuNP, RI-AuNP와 RIe-AuNP의 유체 역학적 반경은 각각 29.3±0.8 nm, 41.2±1.1 nm, 및 65.7±1.2 nm이었다 (데이터 미도시). Au (4f, $4p^1$) 및 요오드 ($3d^5$)에 상응하는 두 가지 특징적인 피크들이 X선 광전자 분광 분석에서 관찰되었다 (도 3의 c). 투과 전자 현미경 영상에서 관찰할 수 있듯이, RIe-AuNP는 구 형태를 갖고 있었으며, 에너지 분산 X선 매핑은 AuNP 주변에 요오드의 분산을 명확하게 보여 주었다 (도 3의 d).

[0077] **RIe-AuNP의 SPECT 및 PET 감도 및 인 비트로 안정성**

[0078] RI-AuNP와 RIe-AuNP에 대한 방사능 감도를 심도있게 조사하였다. SPECT 및 감마 카운터에 의한 ^{125}I의 검출의 경우 (도 4의 a 및 b), RI-AuNP (중심 직경 5 및 10 nm)는 티올화 DNA가 AuNP에 적게 로딩되는 관계로 낮은 방사능을 나타내었다. RI-AuNP (중심 직경 20 nm)는 가장 강력한 방사능활성 신호를 나타내었다. AuNP 크기와 방사능활성 사이에는 뚜렷한 선형 관계가 있음을 파악할 수 있었다 (도 5).

[0079] 한편, RI-AuNP (5, 10, 20 nm 코어) 상에 Au 외피를 형성하여 제조한 RIe-AuNP (직경 42 nm)는 약간 감소하였지만 강력한 방사능을 나타내었다 (도 4의 a). NP 농도 (1.0 pM-0.5 nM)의 함수로서 RIe-AuNP (직경 42 nm)의 감마 카운트 반응은 선형적이었다 (도 4의 b). RIe-AuNP는 1.0 pM에서도 감지되었으며, 카운트는 1.0×10^5였다 (도 4의 b의 삽입도면). AuNP 당 방사성 동위원소의 수밀도 (number density)는 AuNP 당 2,681 요오드 분자로 계산되었다. PET/CT에 의한 ^{124}I 감지의 경우 (도 4의 c 및 d), 1.6 pM의 RIe-AuNP 농도에서는 용액이 관찰 가능한 색상을 띠지 않았지만, RIe-AuNP을 함유한 튜브 팬텀 (phantom)의 PET/CT 영상은 강력한 방사능 신호를 나타내었다 (도 4의 c). 튜브 팬텀의 PET/CT 영상에 따르면, 감마 카운터를 사용한 방사능의 측정은 RIe-AuNP의 농도 (1.6-200 pM)와 방사능활성 사이에 양호한 상관 관계를 증명해 보였다 (도 4의 d). 생체에서 입자 상의 방사성 핵종의 안정성은 장기간 동안 민감하고 안정적으로 생체 영상을 획득하는데 있어서 대단히 중요하기 때문에, 인간 혈청 중에서 방사능 표지된 RI-AuNP (또는 RIe-AuNP)의 안정성을 조사하였다. 분리된 방사능 핵종이 RI-AuNP에서는 30분 이내에 신속하게 나타났다 (도 4의 e(1)). 이와는 대조적으로, RIe-AuNP는 37 ℃에서 24 시간 후에도, 방사능 TLC에서 오직 미세한 변화만을 나타내었으며, 이는 Au 외피로 인하여 RIe-AuNP 중에서 방사능 표지물질들이 탁월한 안정성을 나타낸다는 것을 의미한다 (도 4의 e(2)).

[0080] **DC의 생물학적 기능에 RIe-AuNP 표지가 미치는 영향**

[0081] DC를 RIe-AuNP로 표지하여 실시간으로 림프계에서 그 이동을 가시화하는데 사용하였다. 이러한 목표를 달성하

기 위해서, 세포의 생존 능력뿐 아니라 DC의 생물학적 기능에 대해서 RIe-AuNP에 의한 세포 표지가 미치는 영향을 분석하였는 바, 이는 효율적인 암 면역 요법 및 영상 촬영 적용을 위해서 매우 중요한 요인들이기 때문이다. DC 상의 RIe-AuNP의 세포 흡수 효율은 도 6의 a에서 볼 수 있듯이, RIe-AuNP의 농도에 의존한다. RIe-AuNP의 농도가 증가할수록 (1.0-4.0 nM) DC가 더 진한 색상을 나타낸다. RIe-AuNP 표지된 DC에서 강력한 PET 신호를 관찰할 수 있었다 (도 6의 b(2)). RIe-AuNP의 최적 농도 및 배양 시간은 각각 2.0 nM과 3 시간인 것으로 나타났다 (도 7).

[0082] 더욱 중요한 것은, DC의 정량적인 장기간의 추적을 위해서는 RIe-AuNP가 DC 내부에 잔류해야 한다는 점이다. DC 내에서 시간 경과에 따른 RIe-AuNP의 방사능활성 분석 결과, 방사능활성이 점차적으로 감소하는 것으로 나타났다. 그러나, RIe-AuNP는 3 일 후에도 세포 내에서 초기 방사능의 60 % 이상을 유지하였으며, 이는 Au 외피에 의한 효과적인 보호로 인해서, DC 내에서 방사능 표지된 RIe-AuNP가 탁월한 안정성을 나타낸다는 사실을 의미한다 (도 6의 c). 반면에, DC 내의 RI-AuNP는, 짧은 시간 (3 시간) 경과 후에도, DC 내에서 급격한 방사능활성 감소를 나타내었는 바, 이는 보호층이 존재하지 않기 때문이다 (도 8).

[0083] 세포 생존 능력 실험 결과, 48 시간에 걸쳐 RIe-AuNP (1.0-4.0 nM)의 모든 농도에서, 표지된 DC와 미표지 DC 사이에서 몇몇 차이점들이 관찰되었다. 더 나아가, RIe-AuNP는 DC에서 세포 사멸을 유도하지 않았다 (도 9). CD11c, MHC I, MHC II, CD86, CD54 및 CCR7과 같은 적응 T-세포 면역 반응들에 관련된 표현형 마커들의 발현은 도 6의 e와 도 10에 도시된 바와 같이, RIe-AuNP 표지와 관계 없이 차이가 나지 않았다. 여러 가지 사이토카인 농도, 세포 이동 및 항원 흡수 능력은 DC에서 RIe-AuNP의 흡수에 의해서 변화되지 않았다 (도 11).

[0084] **RIe-AuNP 표지된 DC의 항 종양 면역 반응**

[0085] 더욱 중요하게, 본 발명에서는 설치류 LLC로 마우스 모델 중에서 RIe-AuNP 표지된 DC에 의해서 야기되는 항종양 면역 반응을 조사하였다. LLC와 관련된 항 종양 면역성을 일으킬 수 있는, DC 기반의 종양 백신을 제조하기 위해서, 도 12에 도시된 바와 같이, LLC 세포의 전체 용해물로 DC를 펄스하였다. 미표지 및 비펄스화된 DC, 미표지 및 LLC 용해물로 펄스한 DC, 표지 및 비펄스화된 DC, 그리고 표지 및 LLC 용해물로 펄스한 DC를 비교하였다 (도 6의 f-g). 항종양 효과는 캘리퍼 측정 및 ^{18}F-fludeoxyglucose (^{18}F-FDG) PET/CT 영상 촬영을 통해서 확인하였다. ^{18}F-FDG는 암 글루코오스 대사 작용을 모니터링 하는데 사용할 수 있으며, 세포 증식에 대한 대용물이다. 그 결과, 표지 또는 미표지한 채 LLC 용해물로 펄스 한 DC (도 6의 f(2), (4))로 면역화한 쥐에서는 종양의 성장이 효과적으로 억제되었지만, 표지 도는 미표지한 채 LLC 용해물로 비펄스한 DC (도 6의 f(1), (3))로 면역화한 쥐에서는 그렇지 않았다. 흥미롭게도, LLC 용해물로 펄스하고 표지한 DC로 면역화한 쥐가 가장 작은 크기의 종양을 보였으며, 이는 RIe-AuNP로 표지한 DC의 강력한 항종양 활성을 의미한다 (도 6의 f(4)). 항 종양 면역성과 세포 독성 T 림프구 세포의 사멸 활성 간의 관계를 더 자세히 확인하기 위해서, 이펙터와 타겟의 비율을 10:1로 하여 생체 발광 영상 촬영을 통해서 모니터링함으로써, 강화된 반딧불이 루시퍼라아제-발현 LLC 세포들 (타겟으로서 LLC/effluc)을 사용한 세포 독성 분석을 실시하였다. 체내 요법에서의 결과와 일관되게, 펄스 DC로 면역화된 쥐의 비장 세포에서 루시퍼라아제 활성은 (도 6의 g(2), (4)) 펄스 하지 않은 DC로 면역화된 쥐의 비장 세포에서의 활성보다 (도 6의 g(1), (3)) 더 낮았다. 게다가, LLC 용해물로 펄스하고 표지한 DC로 면역화된 쥐의 세포 독성 T 림프구의 사멸 활성이 약간 증가하였는 바 (도 6의 g(4)), 이는 쥐에서 가장 작은 종양 크기 (도 6의 f(4))의 결과와 일치하였다. 이를 종합적으로 고려해 보면, 이러한 결과는 RIe-AuNP로 DC를 표지하는 것이 DC의 항 종양 면역성에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 실제로, 이렇게 강화된 항종양 면역성을 설명하는 정확한 메커니즘이 알려진 바는 없지만, 증가된 항종양 활성이 관찰되었다. 이와 같이 강화된 항 종양 면역성은 RIe-AuNP에 의해 조절되는 DC의 자극 면역 반응에서 기인하는 것으로 판단된다.

[0086] **PET와 CLI에 의한 배수 림프절로의 DC의 이동 추적**

[0087] DC 추적을 위한 체내 조영제로서의 RIe-AuNP의 효능을 PET/CT 및 Cerenkov 발광 (CLI) 영상 촬영을 조합하여, 그리고 생체 분산 연구를 사용하여 평가하였다 (도 14). RIe-AuNP로 표지한 DC를 쥐의 발바닥을 통해 피하 주사로 주입하여 배수 슬와 림프절 (DPLN)으로의 DC의 이동을 추적하였다. PET/CT 영상으로부터, 이르면 주입 6 시간 경과 후 DPLN으로 표지된 DC가 매우 선택적으로 이동하는 것으로 나타났으며, 3 일차에 그 이동이 정점에 달하고, 방사성 신호가 4 일차에는 감소하였다 (도 15의 a). 표지된 DC 대부분이 주입된 발바닥에 머물러 있었지만, DC의 고유한 특성 때문에, 표지된 DC는 주로 DPLN에서 발견되었다. 본 발명과는 대조적으로, NIR 형광 나노 물질 또는 MR 영상을 사용하는, 배수 림프절로의 DC 이동을 모니터링 하는 통상적인 영상 촬영 방법은 DPLN을 명확히 가시화하기 위해서 더 긴 축적 시간을 필요로 한다 (전이 후 최소 12 또는 24 시간). 비록 CLI

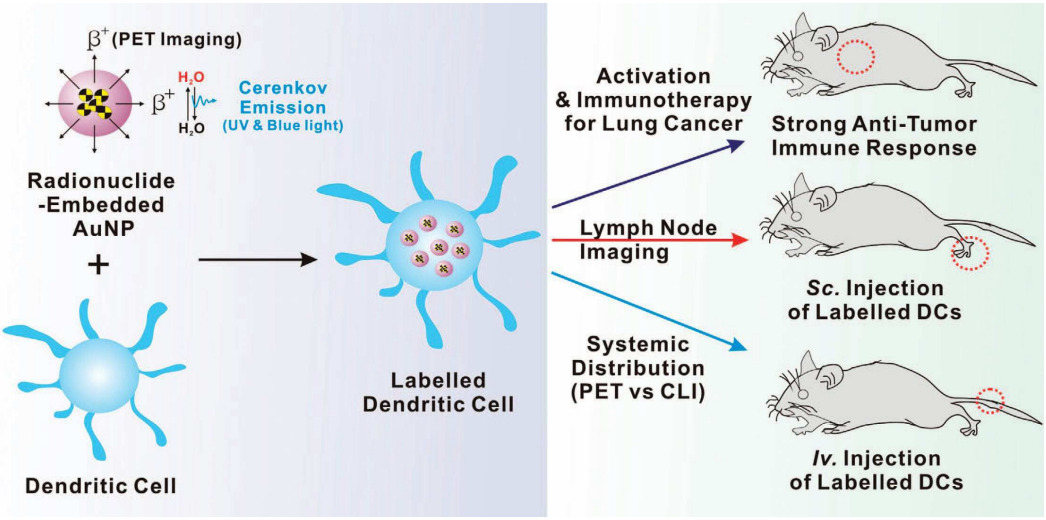
는 PET와 비교하여 상대적으로 더 낮은 광학 영상 감도를 갖기 때문에 전달 후 6 시간 후에 표지된 DC가 DPLN으로 이동하는 것을 시각화하는데 사용할 수 없지만, CLI 기반의 영상은 PET/CT 영상 촬영과 일관되게, DPLN으로의 DC의 이동을 명확하게 보여 주었다 (도 15의 b). PET 신호의 경시적 변화와 CLI 신호의 강도 사이에 강한 상관관계가 존재한다는 점은 새로운 광학 조영제로서 RIe-AuNP의 우수한 가능성을 보여주는 것이다 (도 15의 c, d). 생체 분포 연구 결과 또한 조합된 PET/CT 영상 및 CLI 데이터와 잘 일치하였다 (도 15의 e). DC의 대부분은 (55-60 %) 주입 부위 (발바닥)에 남아 있었으며, DC의 2-3.5 %가 DPLN으로 이동하였다. 조직학적 평가를 통해서 DPLN 중 표지된 DC의 위치를 더 자세히 확인하였다 (도 15의 f(1), (4)). DPLN의 조직학적 분석 결과, 항-CD79a-특이 항체로 착색한 B-세포 구역 (도 15의 f(2)), 그리고 항-CD3-특이 항체로 염색한 T-세포 구역 (도 15의 f(3))을 명확하게 확인할 수 있었다. 주목할 만한 점은, DPLN의 대표적인 면역 조직 화학적 평가로부터, 주로 T-세포 구역 내에, 다만 B-세포 구역은 제외하고, RIe-AuNP로 표지한 S-100 (DC-특이적 마커) 양성 DC의 존재를 확인할 수 있었으며, 이러한 DC는 짙은 갈색의 입자를 포함하고 있었다 (도 15의 f(4) 삽입 도면). 이러한 결과는 DC가 DPLN의 T-세포 구역을 향해서 활발히 이동하였음을 보여 주는 것이다.

[0088] **PET와 CLI 영상 사이의 정량적 비교**

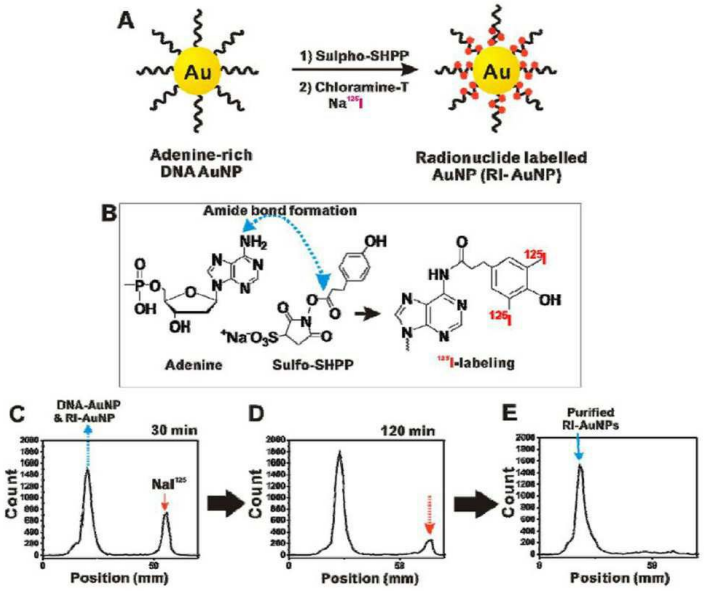
[0089] 정맥 주입 후 표지된 DC의 전신적 생체 분포를 조사하여 조합 PET/CT 및 CLI 영상에 대한 RIe-AuNP의 가능성을 전체적으로 평가하였다 (도 16). RIe-AuNP로 표지된 DC는 전이 후 0.5 시간 만에 폐와 간, 그리고 비장에서 명확한 국소화를 보이며, 표지된 DC는 4 일차에 분명히 탐지할 수 있었다 (도 16의 a). 기존에 다양한 영상 촬영 양식을 사용하여 DC의 폐, 비장 및 간으로의 확산을 증명한 보고들이 존재하지만, 기존의 조영제의 낮은 감도로 인하여 전이 후 0.5 시간 이내에 비장에서 국소화한 DC를 탐지하기는 불가능했다. Au 외피에 임베딩시키는 기술을 활용한 방사능 표지 시스템이 갖는 탁월한 안정성으로 인해서, 갑상선에서 방사능 요오드의 축적은 관찰되지 않았다. 체내 CLI 영상 촬영 또한 전이 후 0.5 시간에 폐, 간과 비장에서 강력한 광학 신호를 보였으며, 여기서 영상 촬영의 품질은 PET/CT 영상의 품질과 동일하였다 (도 16의 b). 통상적으로, 깊이 한계로 인하여, 광학 영상 촬영 방식을 사용하여 폐, 비장 및 간 등의 깊은 조직에서 이동하는 세포를 탐지하기는 어렵다. 그러나, RIe-AuNP를 사용하는 체내 CLI는 짧은 기간 동안 (즉, 0.5 시간 및 4 시간) 깊은 조직에서 DC의 위치를 분명히 밝혀냈으며, 이는 이중 방식의 (핵 및 광학) 영상 촬영 플랫폼으로서 RIe-AuNP의 강력한 가능성을 증명해 보인다. PET와 비교할 때 CLI가 갖는 높은 공간 해상도, 저비용 및 고속 영상화 능력을 갖는다는 점을 고려하면, CLI는 유망한 영상화 방법이라 할 수 있다. 또한, 체내 PET/CT 영상과 일관되게, 생체 분포 데이터는 전이 후 0.5 시간에 폐에서 DC를 명확히 보여 주었으며, 그 후에 간과 비장에서도 빠른 국소화를 보여 주었다 (도 16의 c 및 d).

도면

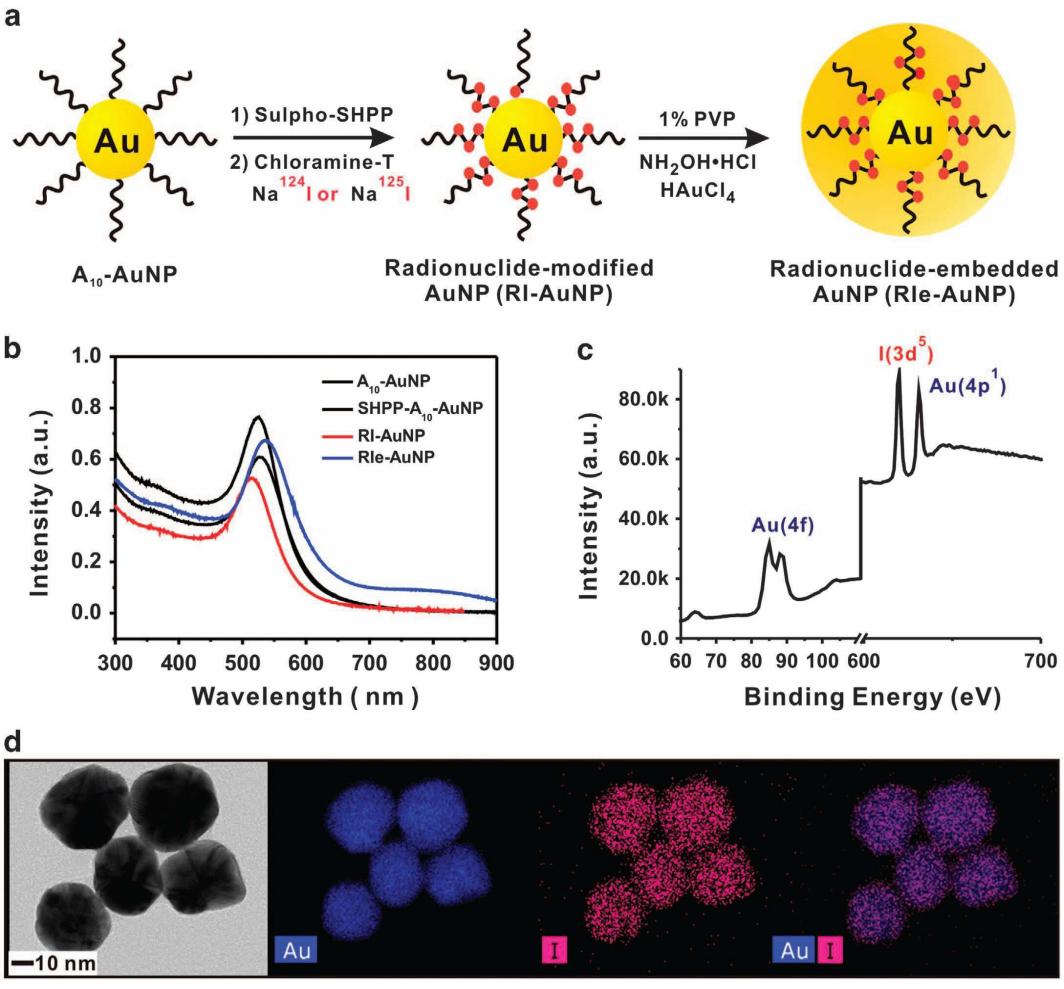
도면1



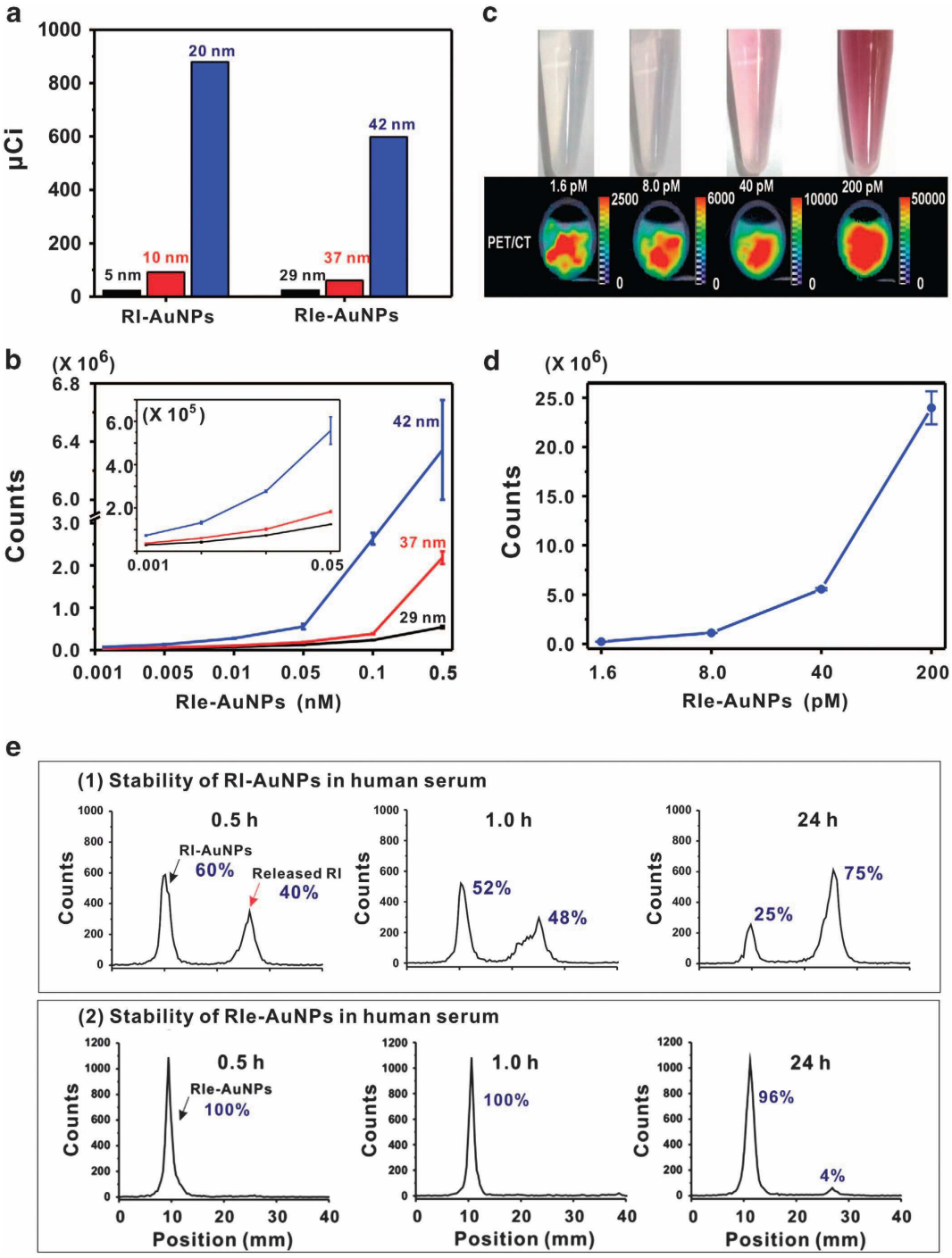
도면2


A
Au
1) Sulpho-SHPP
2) Chloramine-T
Na125I
Au
Adenine-rich
DNA AuNP
Radionuclide labelled
AuNP (RI-AuNP)
B
Amide bond formation
Adenine
Sulfo-SHPP
125I-labeling
C
DNA-AuNP
& RI-AuNP
30 min
NaI125
Count
Position (mm)
D
120 min
Count
Position (mm)
E
Purified
RI-AuNPs
Count
Position (mm)

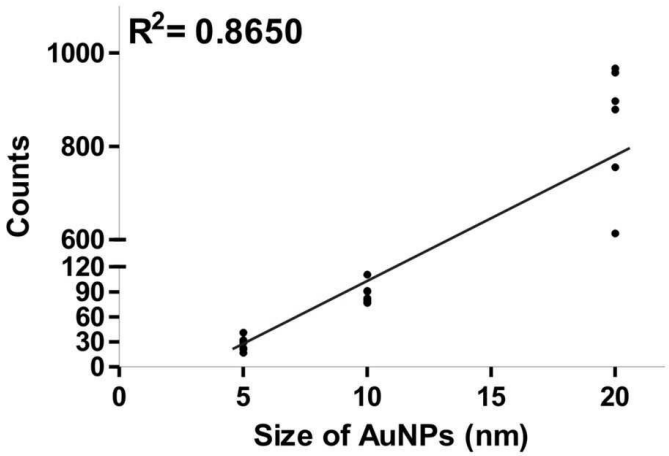
도면3


a
Au
1) Sulpho-SHPP
2) Chloramine-T
Na124I or Na125I
Au
1% PVP
NH2OH•HCl
HAuCl4
Au
A10-AuNP
Radionuclide-modified
AuNP (RI-AuNP)
Radionuclide-embedded
AuNP (RIe-AuNP)
b
A10-AuNP
SHPP-A10-AuNP
RI-AuNP
RIe-AuNP
Intensity (a.u.)
Wavelength (nm)
c
I(3d5)
Au(4p1)
Au(4f)
Intensity (a.u.)
Binding Energy (eV)
d
10 nm
Au
I
Au I

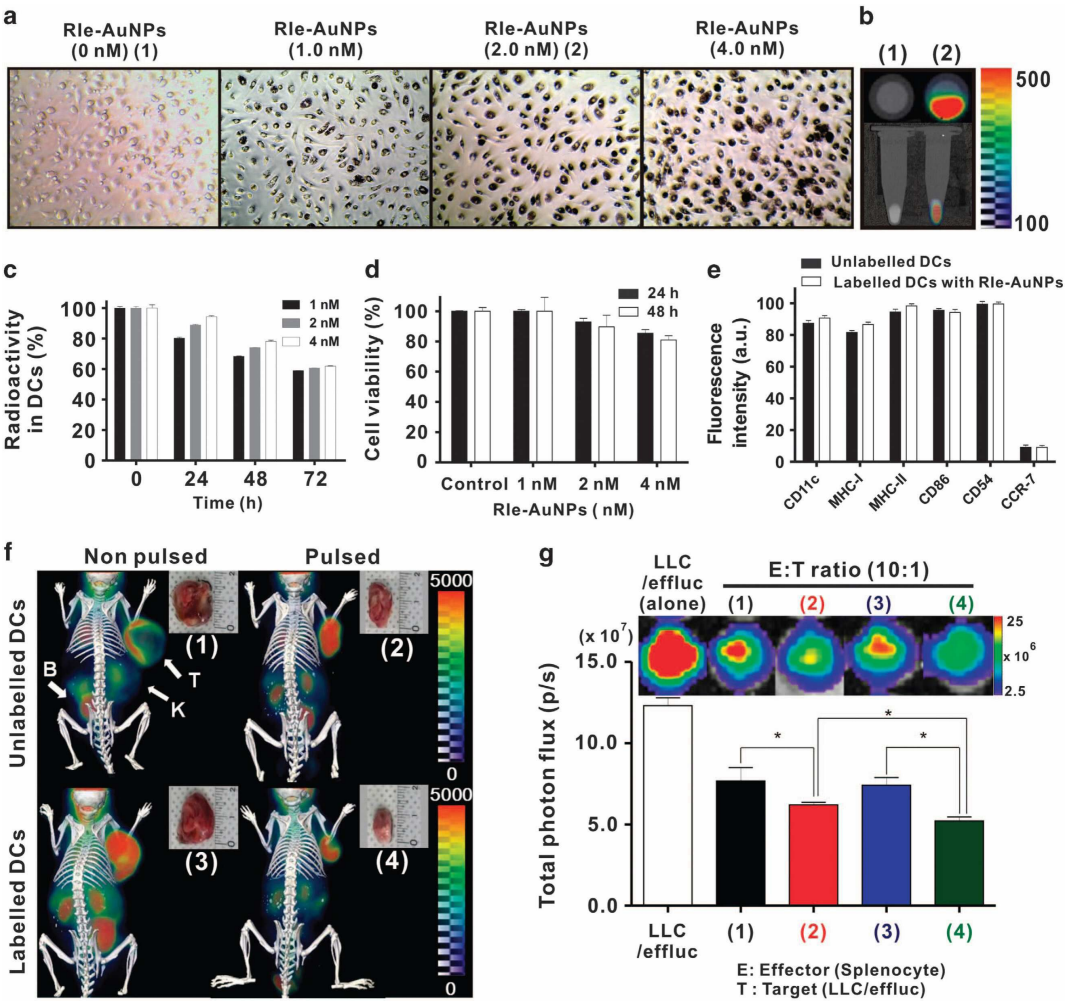
도면4


a
μCi
1000
800
600
400
200
0
20 nm
42 nm
10 nm
37 nm
5 nm
29 nm
RI-AuNPs
RIe-AuNPs
c
1.6 pM
8.0 pM
40 pM
200 pM
2500
6000
10000
50000
PET/CT
b
(X 10^6)
Counts
(X 10^5)
42 nm
37 nm
29 nm
RIe-AuNPs (nM)
d
(X 10^6)
Counts
RIe-AuNPs (pM)
e
(1) Stability of RI-AuNPs in human serum
0.5 h
RI-AuNPs
60%
Released RI
40%
1.0 h
52%
48%
24 h
25%
75%
(2) Stability of RIe-AuNPs in human serum
0.5 h
RIe-AuNPs
100%
1.0 h
100%
24 h
96%
4%
Position (mm)

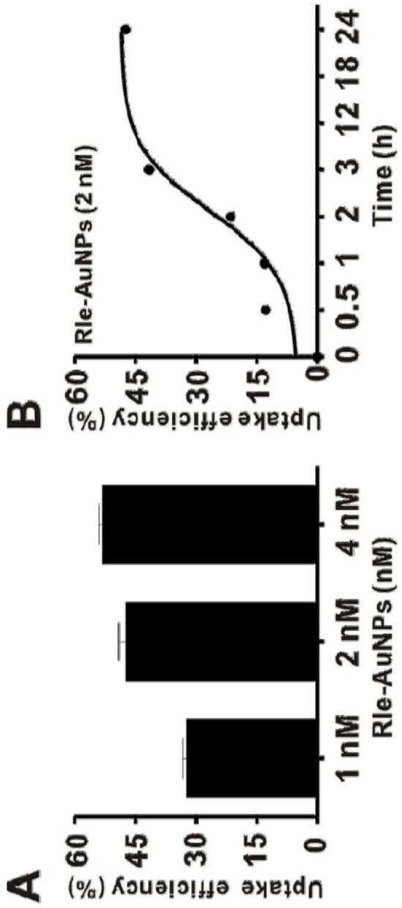
도면5


R²= 0.8650
Counts
1000
800
600
120
90
60
30
0
0
5
10
15
20
Size of AuNPs (nm)

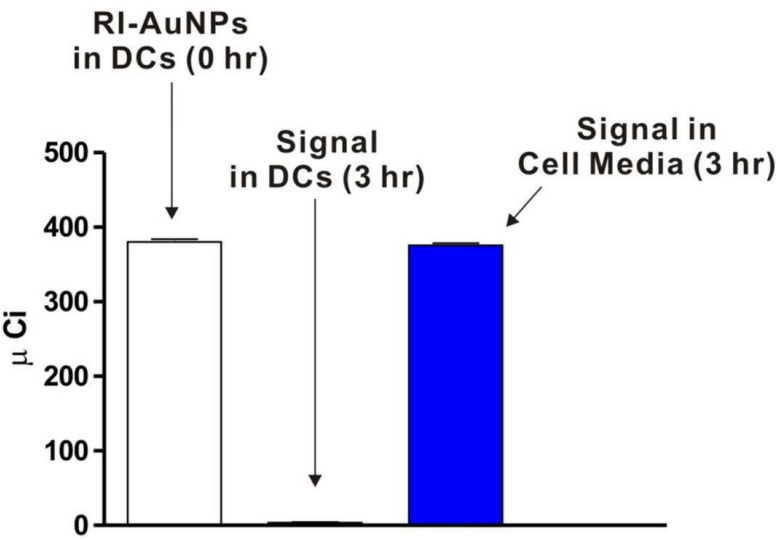
도면6


a
RIe-AuNPs (0 nM) (1)
RIe-AuNPs (1.0 nM)
RIe-AuNPs (2.0 nM) (2)
RIe-AuNPs (4.0 nM)
b
(1)
(2)
500
100
c
Radioactivity in DCs (%)
1 nM
2 nM
4 nM
Time (h)
d
Cell viability (%)
24 h
48 h
Control
1 nM
2 nM
4 nM
RIe-AuNPs (nM)
e
Unlabelled DCs
Labelled DCs with RIe-AuNPs
Fluorescence intensity (a.u.)
CD11c
MHC-I
MHC-II
CD86
CD54
CCR-7
f
Non pulsed
Pulsed
Unlabelled DCs
Labelled DCs
B
T
K
5000
0
g
LLC /effluc (alone)
E:T ratio (10:1)
(1)
(2)
(3)
(4)
Total photon flux (p/s)
LLC /effluc
E: Effector (Splenocyte)
T : Target (LLC/effluc)

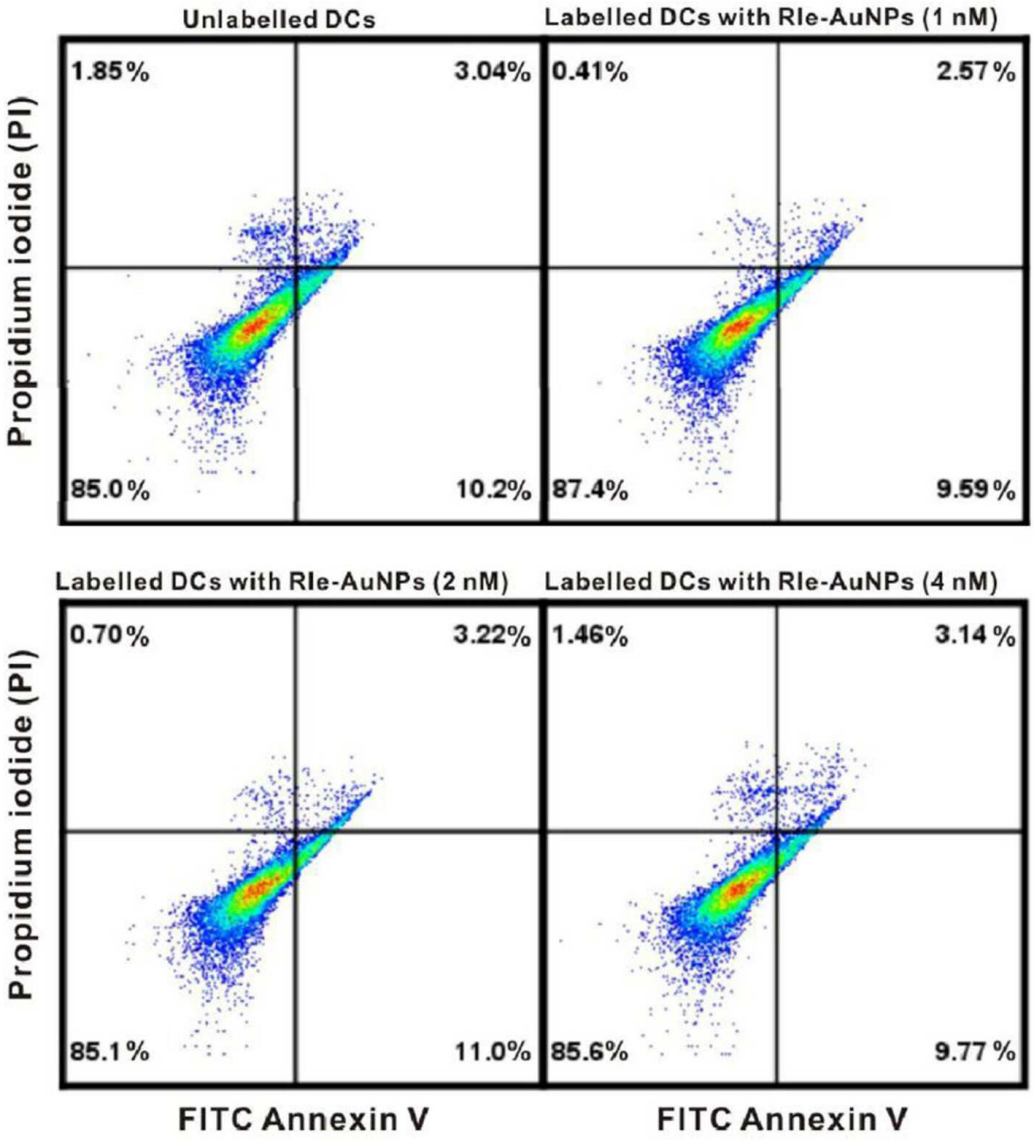
도면7


B
Uptake efficiency (%)
0
15
30
45
60
RIe-AuNPs (2 nM)
0 0.5 1 2 3 12 18 24
Time (h)
A
Uptake efficiency (%)
0
15
30
45
60
1 nM
2 nM
4 nM
RIe-AuNPs (nM)

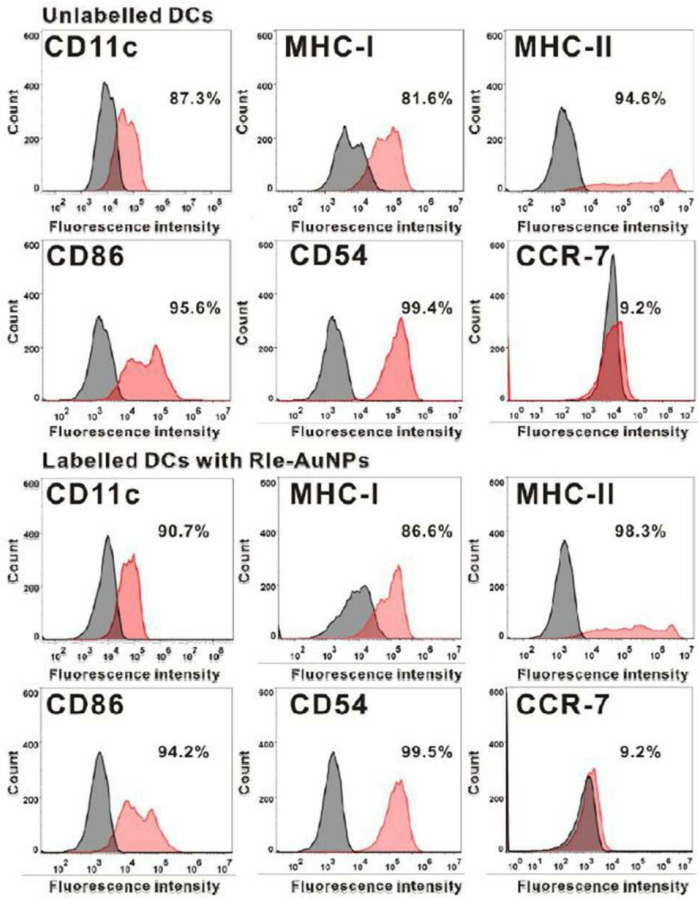
도면8


RI-AuNPs
in DCs (0 hr)
Signal
in DCs (3 hr)
Signal in
Cell Media (3 hr)
μ Ci
0
100
200
300
400
500

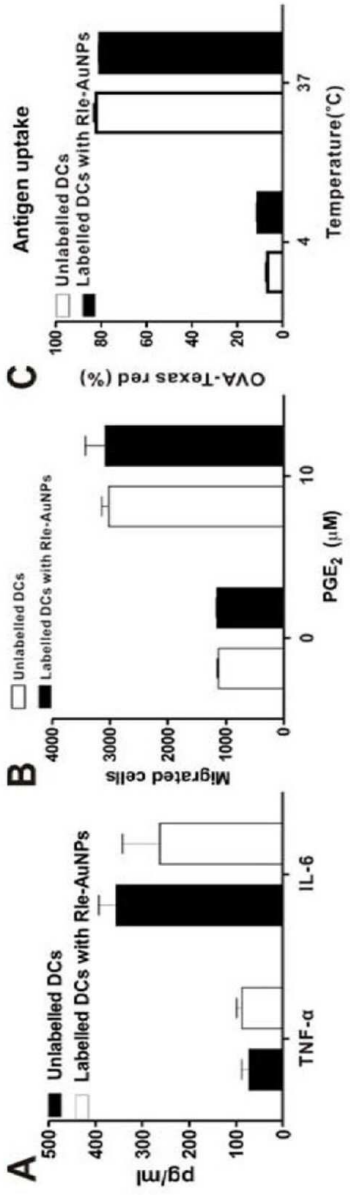
도면9


Unlabelled DCs
Labelled DCs with RIe-AuNPs (1 nM)
Labelled DCs with RIe-AuNPs (2 nM)
Labelled DCs with RIe-AuNPs (4 nM)
Propidium iodide (PI)
Propidium iodide (PI)
1.85%
3.04%
85.0%
10.2%
0.41%
2.57%
87.4%
9.59%
0.70%
3.22%
85.1%
11.0%
1.46%
3.14%
85.6%
9.77%
FITC Annexin V
FITC Annexin V

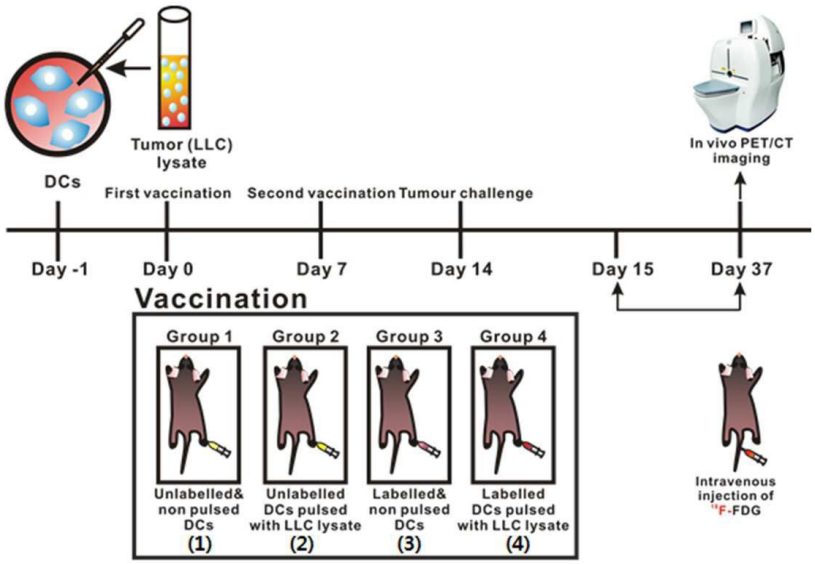
도면10


Unlabelled DCs
CD11c
87.3%
MHC-I
81.6%
MHC-II
94.6%
CD86
95.6%
CD54
99.4%
CCR-7
9.2%
Labelled DCs with RIe-AuNPs
CD11c
90.7%
MHC-I
86.6%
MHC-II
98.3%
CD86
94.2%
CD54
99.5%
CCR-7
9.2%
Count
Fluorescence intensity

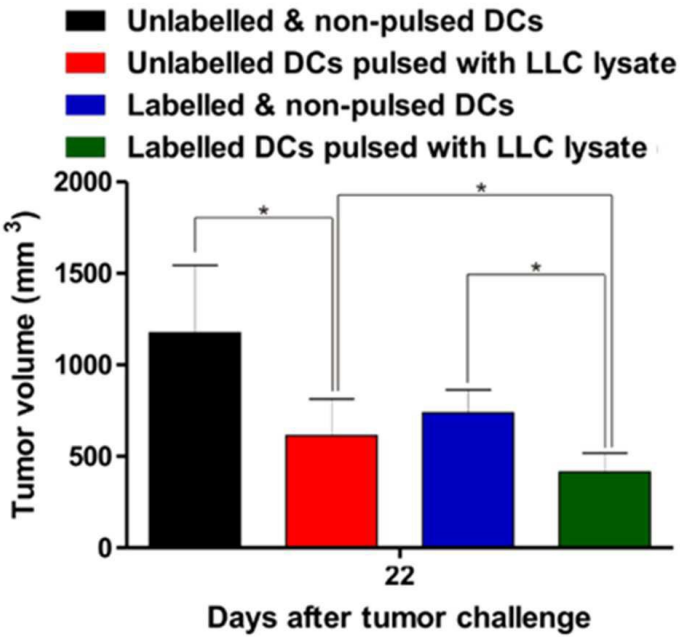
도면11


A
pg/ml
500
400
300
200
100
0
Unlabelled DCs
Labelled DCs with Rle-AuNPs
TNF-α
IL-6
B
Migrated cells
4000
3000
2000
1000
0
Unlabelled DCs
Labelled DCs with Rle-AuNPs
0
10
PGE2 (μM)
C
Antigen uptake
OVA-Texas red (%)
100
80
60
40
20
0
Unlabelled DCs
Labelled DCs with Rle-AuNPs
4
37
Temperature(℃)

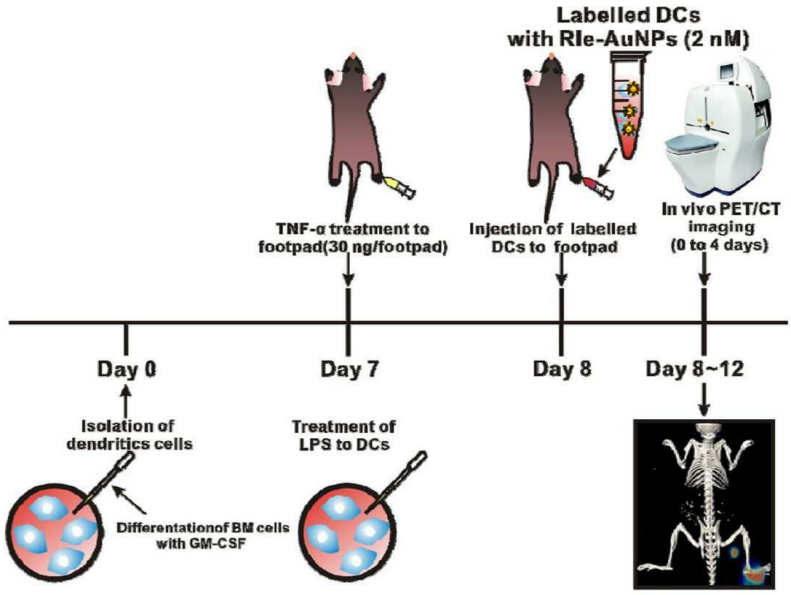
도면12


Tumor (LLC) lysate
DCs
First vaccination
Second vaccination
Tumour challenge
In vivo PET/CT imaging
Day -1
Day 0
Day 7
Day 14
Day 15
Day 37
Vaccination
Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Unlabelled& non pulsed DCs (1)
Unlabelled DCs pulsed with LLC lysate (2)
Labelled& non pulsed DCs (3)
Labelled DCs pulsed with LLC lysate (4)
Intravenous injection of 18F-FDG

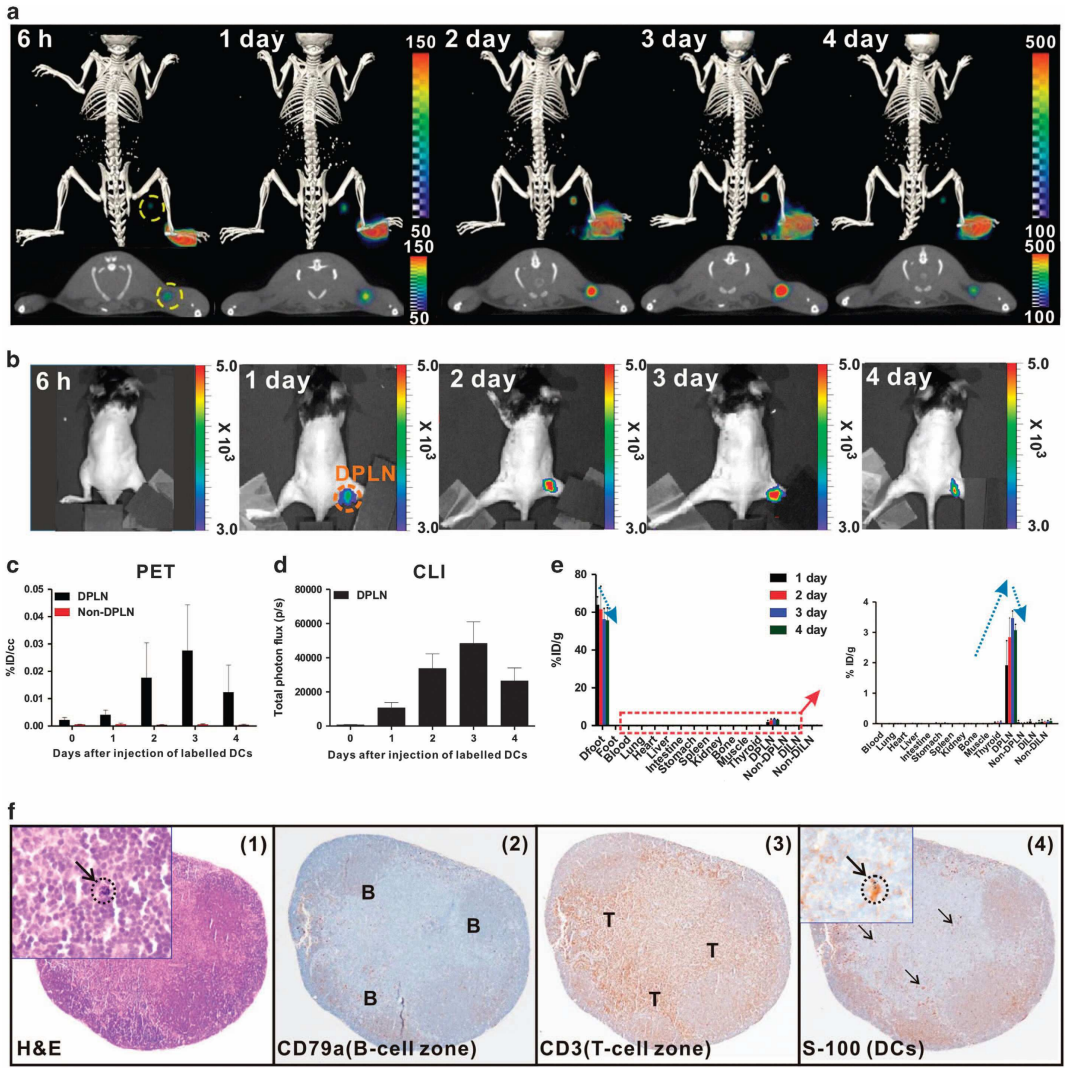
도면13


Unlabelled & non-pulsed DCs
Unlabelled DCs pulsed with LLC lysate
Labelled & non-pulsed DCs
Labelled DCs pulsed with LLC lysate
Tumor volume (mm3)
2000
1500
1000
500
0
*
*
*
22
Days after tumor challenge

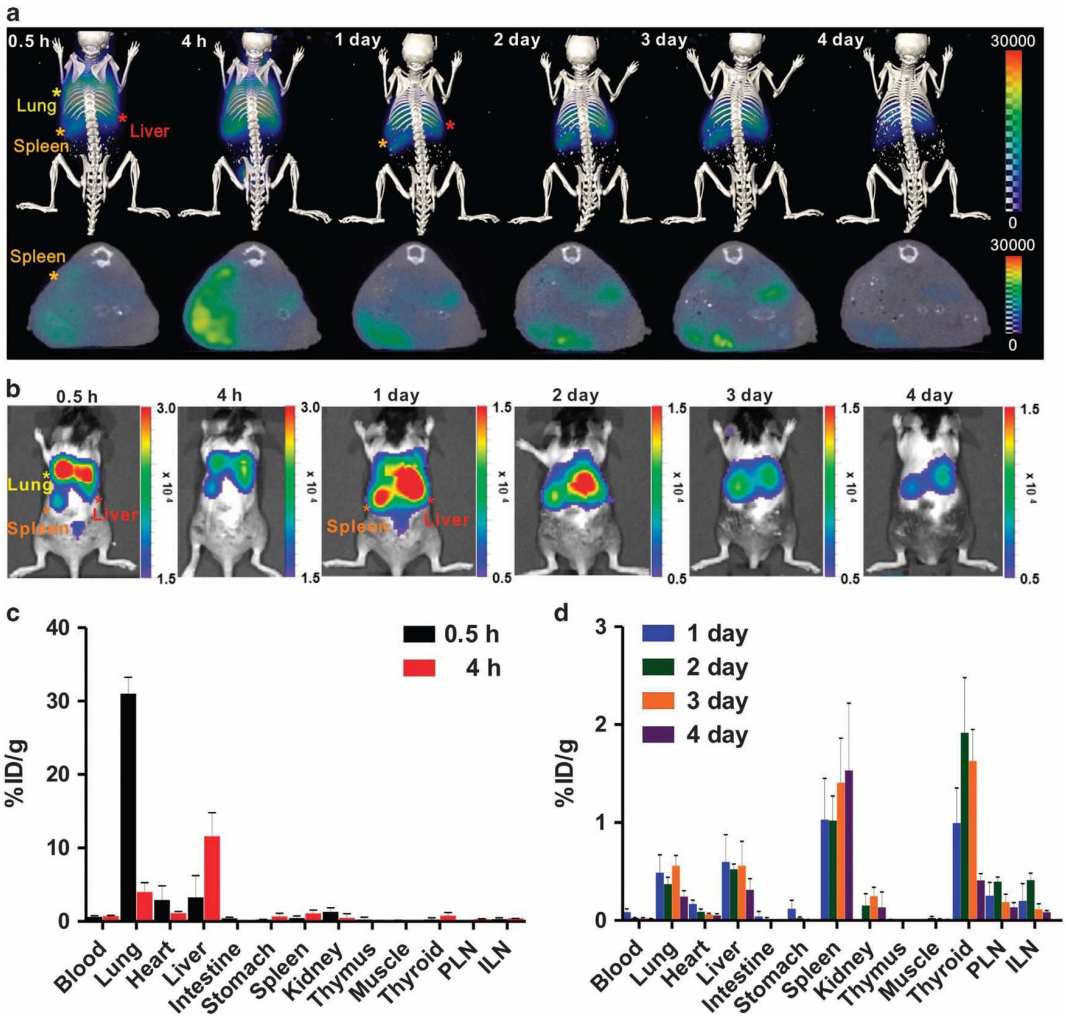
도면14


Labelled DCs
with RIe-AuNPs (2 nM)
TNF-α treatment to
footpad(30 ng/footpad)
Injection of labelled
DCs to footpad
In vivo PET/CT
imaging
(0 to 4 days)
Day 0
Day 7
Day 8
Day 8~12
Isolation of
dendritics cells
Treatment of
LPS to DCs
Differentationof BM cells
with GM-CSF

도면15


a
6 h
1 day
2 day
3 day
4 day
150
50
150
50
500
100
500
100
b
6 h
1 day
2 day
3 day
4 day
DPLN
5.0
X 10³
3.0
c
PET
DPLN
Non-DPLN
%ID/cc
Days after injection of labelled DCs
d
CLI
DPLN
Total photon flux (p/s)
Days after injection of labelled DCs
e
1 day
2 day
3 day
4 day
%ID/g
f
(1)
(2)
(3)
(4)
B
T
H&E
CD79a(B-cell zone)
CD3(T-cell zone)
S-100 (DCs)

도면16


a
0.5 h
4 h
1 day
2 day
3 day
4 day
Lung
Liver
Spleen
30000
0
b
c
%ID/g
0.5 h
4 h
Blood
Lung
Heart
Liver
Intestine
Stomach
Spleen
Kidney
Thymus
Muscle
Thyroid
PLN
ILN
d
1 day
2 day
3 day
4 day