(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0110232
(43) 공개일자 2020년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/00 (2006.01) *G01N 33/58* (2006.01)
G01N 33/60 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/0042 (2013.01)
G01N 33/58 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2020-0031088
(22) 출원일자 2020년03월13일
심사청구일자 2020년03월13일
(30) 우선권주장
1020190029255 2019년03월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
주식회사 셀버틱스
서울특별시 강남구 테헤란로 427, 2층 102-3호 (삼성동, 위워크타워)
(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 28층 102-2804호(한강로1가, 대우 월드마크 용산)
이용직
인천광역시 남동구 구월로 78, 8동 507호 (간석동, 극동아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 22 항

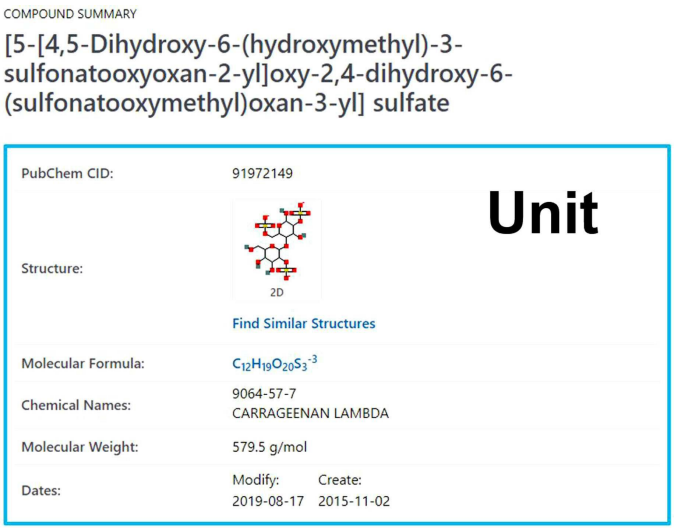
(54) 발명의 명칭 **카라지난 유도체, 대식세포 표지용 프로브 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명에 따른 카라지난 유도체는 염증 관련 대식세포의 존재유무를 신속하고 간편하게 검출 및 표지할 수 있고, 특히 초기 염증과 관련이 높은 M1형 대식세포를 정확하고 쉽게 확인가능하다.

또한 상기 카라지난 유도체는 생산이 간단하고, 유기용매의 사용이 낮아 환경오염의 발생이 최소화되고, 초기비용이 낮다는 장점이 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
G01N 33/582 (2013.01)
G01N 33/60 (2020.05)

(72) 발명자
정재민
서울특별시 서초구 신반포로 45 23동1205호(반포동, 신반포한신아파트)
이윤상
경기도 용인시 수지구 성복2로 126, 313동 202호(성복동, 성동마을 엘지빌리지3차)
박지용
인천광역시 연수구 아트센터대로97번길 75, 1304동 1102호(송도동, 송도 더샵 하버뷰 13단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A2B3013825
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원
연구과제명	심혈관 질환 조기진단을 위한 분자표적 나노조영제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

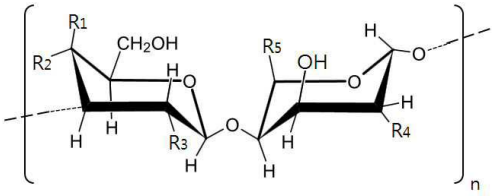
청구범위

청구항 1

요오드산화반응을 통해 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 포함하는 카라지난의 갈락토오스 또는 3,6 안하이드로갈락토오스 모이어티의 히드록시기가 알데하이드기로 산화되고,

상기 알데하이드기가 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 치환된 후, 환원되어 형성된 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체:

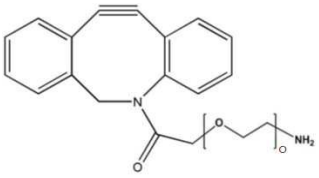
[화학식 1]



[화학식 2]



[화학식 3]



상기 화학식에서,

상기 R_1 내지 R_5는 서로 같거나, 상이하며, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고,

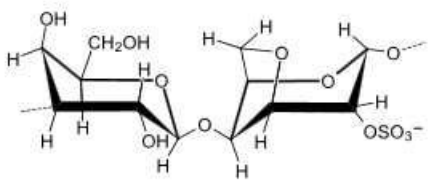
상기 n은 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

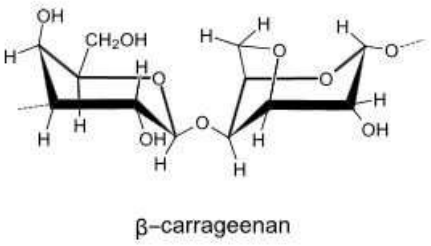
상기 화학식 1로 표시되는 카라지난은 하기 화학식 a 내지 화학식 c로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체.

[화학식 a]



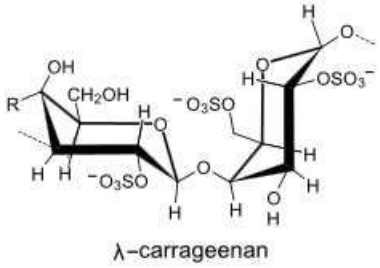
α-carrageenan

[화학식 b]



β-carrageenan

[화학식 c]



λ-carrageenan

상기 화학식에서, n은 50 내지 10,000의 정수일 수 있다.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 카라지난 유도체는 대식세포의 CD80의 리간드로 작용하는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 대식세포는 M1형 대식세포인 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체.

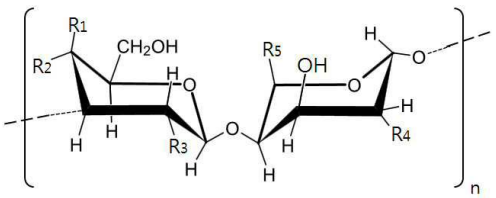
청구항 5

1) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

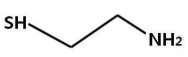
2) 상기 1) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물로 치환하는 단계; 및

3) 상기 2) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계;를 포함하는 카라지난 유도체의 제조방법.

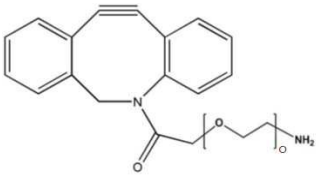
[화학식 1]



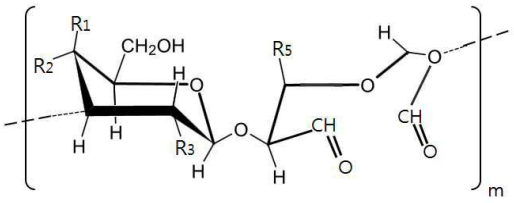
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기 화학식에서,

상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 산화제는 소듐 퍼리오데이트(Sodium periodate)인 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 산화제는 상기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난 단위체당 1 내지 10 몰(mole) 배로 첨가하는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 1) 단계는 10 내지 30 ℃에서, 1 분 내지 180 분동안 수행되는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 2) 단계에서 화학식 2 또는 화학식 3로 표시되는 화합물은 카라지난-알데하이드 1 분자당 1 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개의 분자수가 결합되도록 반응시키는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 3) 단계에서 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난 단위체당 1 내지 100 몰(mole) 배의 환원제를 첨가하는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 11

제5항에 있어서,

상기 3) 단계는 -10 내지 10 ℃에서, 1 분 내지 240 분동안 수행되는 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제

조방법.

청구항 12

제5항에 있어서,

상기 환원제는 소듐 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride, $NaCNBH_3$) 또는 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride)인 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체의 제조방법.

청구항 13

형광염료 또는 방사선 동위원소; 및 제1항에 따른 카라지난 유도체가 결합된 대식세포 표지용 프로브.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 형광염료는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), SCN-RITC, 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 대식세포 표지용 프로브.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 방사선 동위원소는 C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상인 것을 특징으로 하는 대식세포 표지용 프로브.

청구항 16

제13항에 있어서,

상기 대식세포는 염증유발인자에 의해 유도된 것을 특징으로 하는 대식세포 표지용 프로브.

청구항 17

제13항에 있어서,

상기 대식세포 표지용 프로브는 M1형 대식세포를 특이적으로 표지하는 것을 특징으로 하는 대식세포 표지용 프로브.

청구항 18

상기 대식세포 표지용 프로브;를 포함하는 대식세포 영상화용 키트.

청구항 19

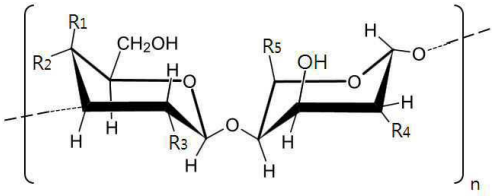
a) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

b) 상기 a) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2의 화합물로 치환하는 단계;

c) 상기 b) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

d) 상기 c) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 방사선동위원소 또는 이소티오시아네이트로 개질된 형광염료를 반응시키는 단계; 대식세포 표지용 프로브의 제조방법.

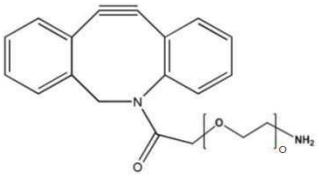
[화학식 1]



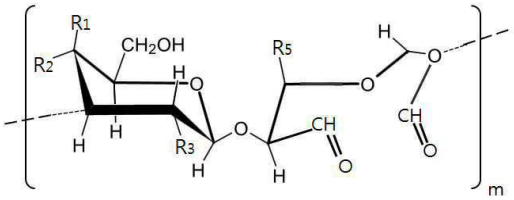
[화학식 2]



[화학식 3]



[화학식 4]



상기 화학식에서,

상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

청구항 20

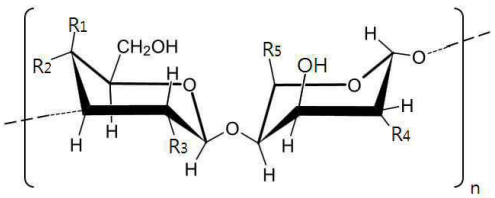
ⅰ) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

ii) 상기 ⅰ) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 3의 화합물로 치환하는 단계;

iii) 상기 ii) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

iv) 상기 iii) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물을 카퍼-프리 클릭화학(Copper-free click) 반응시키는 단계;를 포함하는 대식세포 표지용 프로브의 제조방법.

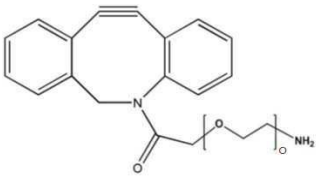
[화학식 1]



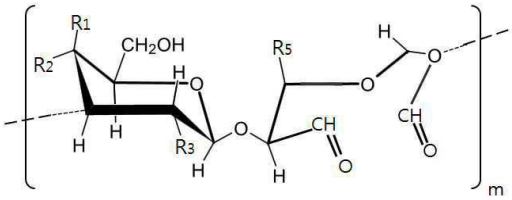
[화학식 2]



[화학식 3]



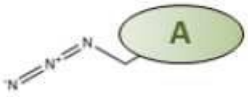
[화학식 4]



상기 화학식에서,

상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[화학식 5]



상기 화학식 5에서,

상기 A는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA, 비오틴, C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

청구항 21

제13항의 대식세포 표지용 프로브를 포함하는 조성물을 분리된 생체시료에 투여하여 대식세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 대식세포는 염증과 관련이 있는 M1 타입의 대식세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 염증에 의해 유발되는 대식세포를 특이적으로 표지할 수 있는 대식세포 표지용 프로브에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 대식세포의 표면에 특이적으로 존재하는 CD80과 상호작용함으로써, 대식세포의 존재 유무를 진단할 수 있도록 하는 카라지난 유도체, 방사성 동위원소 또는 형광염료와 결합된 복합체 형태의 대식세포 표지용 프로브, 이의 제조방법, 이를 이용하여 대식세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법,

이를 포함하는 대식세포 표지용 키트에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 염증(炎症) 또는 염(炎)은 생체 조직의 유해한 자극원 예를 들어, 병원균, 손상된 세포, 자극원에 대한 생체반응 중 하나로 면역세포, 혈관, 분자생물학적인 중간체들이 관여되어 있는 보호반응이다. 이러한 염증의 목적은 초기세포손상의 억제와 함께 상처부분의 괴사된 세포 및 상처를 입은 조직을 제거함과 동시에 조직재생을 하는데 목적이 있다.

[0003] 따라서 이들 염증세포의 움직임을 비침습적으로 추적할 수 있는 영상기술의 개발은 염증세포와 관련된 다양한 연구에 발판이 될 수 있다. 다양한 동물모델에서 염증세포에 의해 유발된 다양한 질환들을 치료하는 실험들이 진행되고 있으나, 이들 치료효과를 정량적이고 효과적으로 평가할 수 있는 영상 프로브 개발이 되지 않고 있어, 고가의 동물모델을 반복적으로 희생시켜야하는 어려움이 있다.

[0004] 여러 종의 방사성 의약품은 세포치료효과를 비침습적인 핵의학 영상기법을 통해 평가할 수 있을 뿐만 아니라 향후 임상에도 이용될 수 있어 기대가 크다.

[0005] 이 중에서도 대식세포를 효과적으로 표지할 수 있는 영상프로브 개발은 다양한 질병에 관여하는 대식세포를 비침습적인 영상기법을 통해 실시간으로 모니터링할 수 있으므로, 염증, 동맥경화, 자가면역질환, 종양 등 다양한 질병의 발명, 진행 및 치료과정을 모니터링하는데 널리 활용될 수 있으므로, 여러 가지 영상 프로브물질이 개발된 바 있다.

[0006] 대표적으로 Fluorine-18 fluorodeoxyglucose(^{18}F-FDG)을 이용하여 대식세포를 표지한 기술이 공지된 바 있다. 이는 대식세포의 대사적 특성을 이용한 것으로, 구체적으로 대식세포는 타세포에 비해 포도당(glucose)의 섭취가 증가하고, 대식세포에서 포도당 유도체인 FDG의 섭취증가에 따른 증가하게 되므로, 이를 통해 대식세포의 존재를 추적, 판별할 수 있다. 허나, ^{18}F-FDG를 이용한 대식세포의 표지 및 영상화 기술은 대식세포의 대사적 특성에 기인하고 있다는 점에서, 몇가지 한계점을 가지고 있다. 첫째로, FDG가 포도당의 일종이기 때문에, 혈중 포도당 및 대사관련 호르몬의 영향을 받으므로, 신체상태에 따라 대식세포 표지 유무에 현저한 차이를 나타내며, 이는 정확도 및 재현성에 영향을 나타낼 수 있다. 또한 진단 전에 일정한 신체상태를 유지해야한다는 문제가 있으며, 이는 정확도에 영향을 미친다. 더불어 금식 및 혈당 등의 조건 등을 맞추어야 가기 때문에 당뇨 등의 고위험군에서 사용의 제한점이 있다. 둘째로 또한, 뇌와 심장의 경우는 영양소로 혈당을 이용하기 때문에 병소가 주로 발생하는 뇌와 심장의 경우는 병소를 진단할 수 가 없다. 끝으로, FDG를 이용하는 경우는 친염증성인 M1 대식세포의 존재를 선택적으로 진단하는 것은 불가능하다.

[0007] 따라서 신체의 조건에 영향을 받지 않으면서 식세포작용(phagocytosis) 특히, 대식세포(macrophage)를 표지할 수 있는 새로운 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-1771697호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 대식세포의 CD80에 특이적으로 결합할 수 있는 변형된 구조의 카라지난 유도체를 제공하고자 하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 형광염료 또는 방사선 동위원소; 및 상기 카라지난 유도체가 결합된 대식세포 표지용 프로브를 제공하고자 하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 카라지난 유도체 및 대식세포 표지용 프로브를 쉽고 간단하게 대량 생산할 수 있는 제조방법을 제공하고자 하는 것이다.

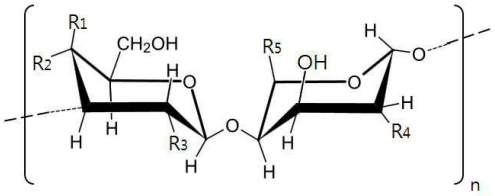
[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 대식세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, 요오드산화반응을 통해 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난의 갈락토오스 또는 3,6 안하이드로갈락토오스 모이어티의 히드록시기가 알데하이드기로 산화되고,

[0014] 상기 알데하이드기가 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 치환된 후, 환원되어 형성된 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체:를 제공한다.

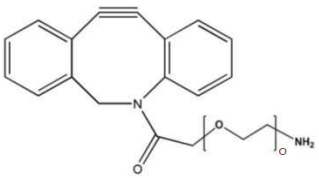
화학식 1

[0015] 

화학식 2

[0016] 

화학식 3

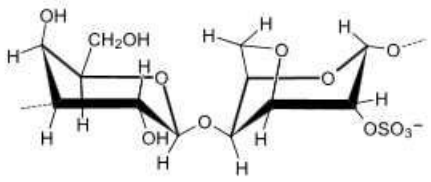
[0017] 

[0018] 상기 화학식에서,

[0019] 상기 R_1 내지 R_5는 서로 같거나, 상이하며, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n은 1 내지 10,000의 정수이다.

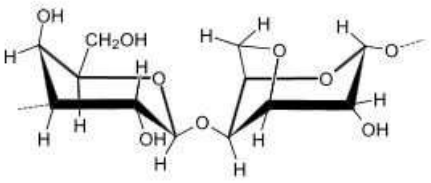
[0020] 상기 화학식 1로 표시되는 카라지난은 하기 화학식 a 내지 화학식 c로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 바람직하게는 화학식 c로 표시되는 람다-카라지난일 수 있다.

[0021] [화학식 a]

[0022] 

α-carrageenan

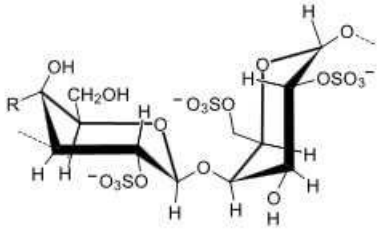
[0023] [화학식 b]



β-carrageenan

[0024]

[0025] [화학식 c]



λ-carrageenan

[0026]

[0027] 상기 화학식에서, n은 50 내지 10,000의 정수일 수 있다.

[0028] 상기 카라지난 유도체는 대식세포의 CD80의 리간드로 작용하는 것일 수 있다.

[0029] 상기 대식세포는 M1형 대식세포일 수 있다.

[0030] 상기 카리지난 유도체는 1 분자당 1 내지 2의 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물이 친화기로 결합되어 있는 것일 수 있다.

[0031] 상기 카라지난 유도체는 1 내지 40몰%의 치환도를 갖는 것일 수 있다.

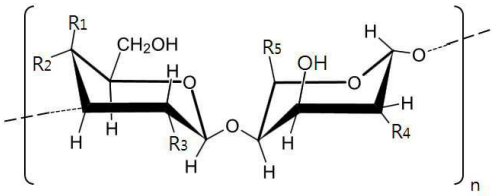
[0032] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여,

[0033] 1) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

[0034] 2) 상기 1) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물로 치환하는 단계; 및

[0035] 3) 상기 2) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계;를 포함하는 카라지난 유도체의 제조방법을 제공한다.

[0036] [화학식 1]



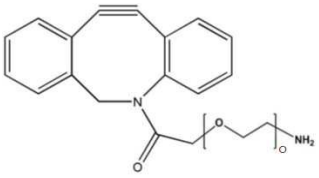
[0037]

[0038] [화학식 2]

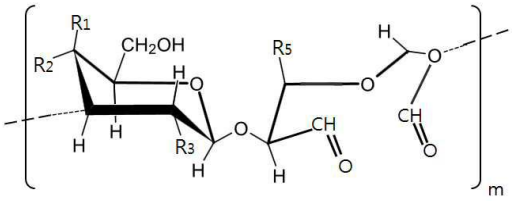


[0039]

[0040] [화학식 3]

[0041] 

화학식 4

[0042] 

[0043] 상기 화학식에서,

[0044] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0045] 상기 산화제는 소듐 퍼리오데이트(Sodium periodate)일 수 있다.

[0046] 상기 산화제는 상기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난 단위체당 1 내지 10 몰(mole) 배로 첨가하는 것일 수 있다.

[0047] 상기 1) 단계는 10 내지 30 ℃에서, 1 분 내지 180 분동안 수행되는 것일 수 있다.

[0048] 상기 2) 단계에서 화학식 2 또는 화학식 3로 표시되는 화합물은 카라지난-알데하이드 1 분자당 1 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개의 분자수가 결합되도록 반응시키는 것일 수 있다.

[0049] 상기 3) 단계에서 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난 단위체당 1 내지 100 몰(mole) 배의 환원제를 첨가하는 것일 수 있다.

[0050] 상기 3) 단계는 -10 내지 10 ℃에서, 1 분 내지 240 분동안 수행되는 것일 수 있다.

[0051] 상기 환원제는 소듐 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride, $NaCNBH_3$) 또는 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride)일 수 있다.

[0052] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 형광염료 또는 방사선 동위원소; 및 상기 카라지난 유도체가 결합된 대식세포 표지용 프로브을 제공한다.

[0053] 상기 형광염료는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0054] 상기 방사선 동위원소는 C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상일 수 있다.

[0055] 상기 대식세포는 염증유발인자에 의해 유도된 것일 수 있다.

[0056] 상기 대식세포 표지용 프로브는 M1형 대식세포를 특이적으로 표지하는 것일 수 있다.

[0057] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 상기 대식세포 표지용 프로브;를 포함하는 대식세포 영상화용 키트를 제공한다.

[0058] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여,

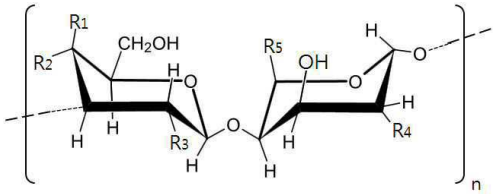
[0059] a) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

[0060] b) 상기 a) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2의 화합물로 치환하는 단계;

[0061] c) 상기 b) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

[0062] d) 상기 c) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 방사선동위원소 또는 이소티오시아네이트로 개질된 형광염료를 반응시키는 단계; 대식세포 표지용 프로브의 제조방법을 제공한다.

[0063] [화학식 1]



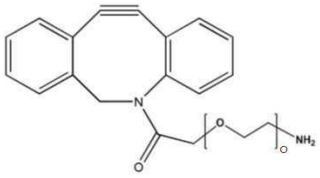
[0064]

[0065] [화학식 2]



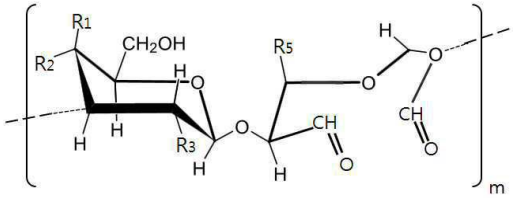
[0066]

[0067] [화학식 3]



[0068]

[0069] [화학식 4]



[0070]

[0071] 상기 화학식에서,

[0072] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0073] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여,

[0074] ⅰ) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

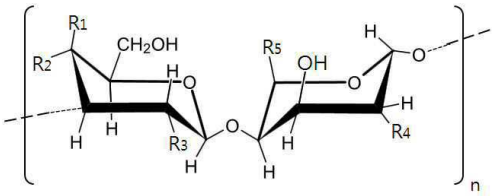
[0075] ⅱ) 상기 ⅰ) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 화학식 3의 화합물로 치환하는 단계;

[0076] ⅲ) 상기 ⅱ) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

[0077] ⅳ) 상기 ⅲ) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물을 카퍼-프리 클릭화

학(Copper-free click) 반응시키는 단계;를 포함하는 대식세포 표지용 프로브의 제조방법을 제공한다.

[0078] [화학식 1]



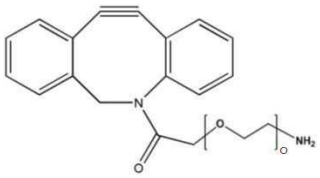
[0079]

[0080] [화학식 2]



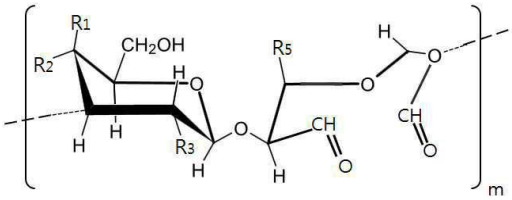
[0081]

[0082] [화학식 3]



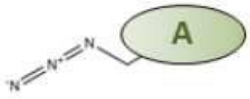
[0083]

[0084] [화학식 4]



[0085]

화학식 5



[0086]

[0087] 상기 화학식에서,

[0088] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0089] 상기 화학식 5에서,

[0090] 상기 A는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA, 비오틴, C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상의 조합이다.

[0091] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 상기 대식세포 표지용 프로브를 포함하는 조성물을 분리된 생체시료에 투여하여 대식세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0092] 상기 대식세포는 염증과 관련이 있는 M1 타입의 대식세포일 수 있다.

발명의 효과

[0093] 본 발명에 따른 카라지난 유도체는 염증 관련 대식세포의 존재유무를 신속하고 간편하게 검출 및 표지할 수 있고, 특히 초기 염증과 관련이 높은 M1형 대식세포를 정확하고 쉽게 확인가능하다.

[0094] 또한 상기 카라지난 유도체는 생산이 간단하고, 유기용매의 사용이 낮아 환경오염의 발생이 최소화되고, 초기비용이 낮다는 장점이 있다.

[0095] 또한 상기 카라지난 유도체는 종래 염증과 관련된 세포의 표지물질과는 달리, 대사에 영향을 받지 않고, 직접적으로 대식세포의 세포 표면 수용체인 CD80과 상호작용을 형성하기 때문에, 진단 전 신체상태를 유지할 필요가 없다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0096] 도 1은 Tc-99m이 결합된 실시예 1로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성 결과를 확인하기 위해 실시한 iTLC(Instant thin layer chromatography) 결과를 나타낸 것이다. 도 1a는 Citric caid에서 측정한 것이고, 도 1b는 Saline에서 측정한 것이며, 도 1c는 Acetone에서 측정한 iTLC(Instant thin layer chromatography) 결과이다.

도 2는 RITC 농도(1 ㎎/㎖~0.01 ㎎/㎖)에 따른 UV 검량 그래프이다.

도 3은 RITC가 결합된 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성 결과를 확인하기 위해 실시한 UV 흡광도 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 카라지난(Carrageenan λ, 도 4)의 평균 분자량을 나타낸 표이다.

도 5는 카라지난 λ, 제조예 2의 카라지난 유도체 및 실시예 2의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브에 대한 MALDI-TOF 결과이다.

도 6은 카라지난 λ의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이다.

도 7은 제조예 2의 카라지난 유도체의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 2의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이다.

도 9는 활성화된 백혈구(Raw264.7)에 다양한 농도의 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)와 RITC 표준용액을 처리하고 난 후, 형광현미경으로 촬영한 결과이다.

도 10은 CD80 항체를 처리한 실험군과 음성대조군의 형광 현미경 사진이다.

도 11은 TPR4 항체를 처리한 실험군과 음성대조군의 형광 현미경 사진이다.

도 12는 본 발명에 따른 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브의 작용기전을 나타낸 도면이다.

도13은 M1형으로 분화된 THP-1 대식세포에서 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)와 FITC 형광물질이 표지된 CD197(M1형 분화 마커)을 함께 염색하여 유세포분석기(Flow cytometry)에서 세포의 분포를 관찰함으로써 RITC-CGN이 M1형 대식세포에 특이적으로 반응함을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

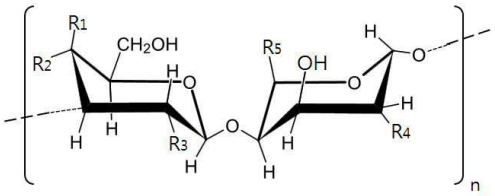
[0097] 본 발명은 대식세포(macrophages) 특히 M1형 대식세포의 세포막 수용체들 중 하나인 CD80의 리간드로 작용하는 카라지난(carrageenan) 유도체에 관한 것으로, 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난으로부터 합성되며, 대식세포를 신속하고 정확하고 반복적으로 표지할 수 있고으며, 여기에 ^{99m}Tc 동위원소나 RITC를 부착할 경우 염증 관련 대식세포 특히, M1형 대식세포를 특이적으로 영상화할 수 있다.

[0098] 본 발명자들은 종래 18F-FDG 표지물질과 달리, 본 발명의 카라지난 유도체(carrageen modified product)는 대식세포의 세포막 수용체들 중의 하나인 CD80에 직접적으로 결합함에 따라 효과를 나타내는 것으로써, 이와 같은 특성을 이용하여 대식세포 표지용 프로브 및 이의 제조방법을 개발하였다. 상기 대식세포 표지용 프로브는 염증의 기본 구성 세포인 대식세포 중에 친염증성향을 나타내는 M1형 대식세포의 존재를 분자 생물학적으로 영상화 가능함을 확인하였다.

[0099] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현예에 대해 더욱 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0100] 본 발명의 일 측면은 요오드산화반응을 통해 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 포함하는 카라지난의 칼락토오스 또는 3,6 안하이드로갈락토오스 모이어티의 히드록시기가 알데하이드기로 산화되고, 상기 알데하이드기가 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 치환된 후, 환원되어 형성된 것을 특징으로 하는 카라지난 유도체:에 관한 것이다.

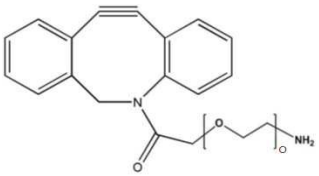
[0101] [화학식 1]

[0102] 

[0103] [화학식 2]

[0104] 

[0105] [화학식 3]

[0106] 

[0107] 상기 화학식에서,

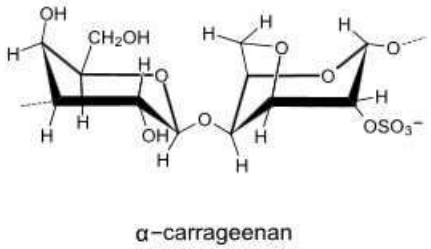
[0108] 상기 R_1 내지 R_5는 서로 같거나, 상이하며, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고,

[0109] 상기 n은 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0110] 본 발명의 상기 화학식 1로 표시되는 카라지난은 명시적인 기재가 없는 한, 그 구성의 한정은 없으나, 대식세포와의 특이적 결합을 형성하도록 카라지난 유도체를 최적화하기 위하여 바람직하게는 분자량이 10,000 내지 3,000,000Da, 더욱 바람직하게는 10,000 내지 1,000,000 Da의 분자량인 카라지난을 사용할 수 있다.

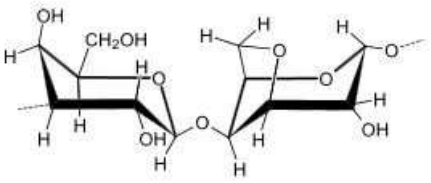
[0111] 본 발명에서 사용되는 용어 "카라지난(carrageenan)은 상기 화학식 1로 표현되는 반복단위를 갖는 고분자를 지칭하며, 카라지난의 염 형태를 모두 포함하는 의미로 사용될 수 있다. 바람직하게 상기 카라지난은 하기 화학식 a 내지 화학식 c로 표시되는 것 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0112] [화학식 a]

[0113] 

α-carrageenan

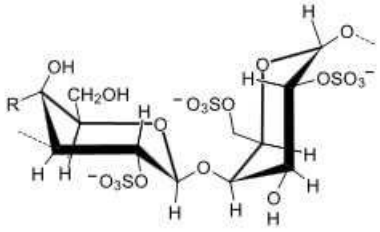
[0114] [화학식 b]



β-carrageenan

[0115]

[0116] [화학식 c]



λ-carrageenan

[0117]

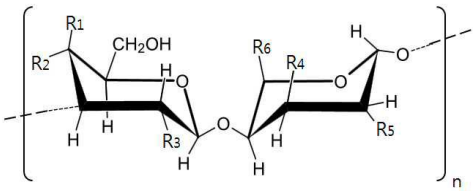
[0118] 상기 화학식에서, m은 50 내지 10,000의 정수일 수 있다.

[0119] 본 발명에서 요오드산화 반응(perriodate oxidation)은 두 개의 하이드록실기가 이웃하거나, 한 개의 하이드록실기가 알데히드 또는 케톤과 이웃하고 있거나, 각각의 알데하이드, 케톤과 동적평형을 이루는 당의 헤미아세탈과 헤미케탈이 존재하는 경우, 퍼리오데이트($NaIO_4$)와 반응하면 산화와 탄소-탄소 결합의 분해가 동시에 일어나는 반응을 의미한다.

[0120] 일반적으로 카라지난과 같은 다당류는 산화제 등에 의해 산화가 일어나면 갈락토오스 또는 3,6 안하이드로갈락토오스와 같은 지방족 고리 구조가 열리면서(ring-opening) 다당류의 2번, 3번 또는 이들 두 위치의 히드록시기가 알데히드기로 변하게 되고, 이렇게 산화되어 생겨난 다당류의 알데히드기는 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 아민기와 반응하여 이민 결합을 통해, 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 치환된 카라지난 유도체가 형성된다. 이후, 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 아민기와 카라지난의 알데하이드기가 반응한 후 생기는 이중 결합을 환원제를 통해 환원하여 본 발명의 카라지난 유도체를 얻을 수 있다.

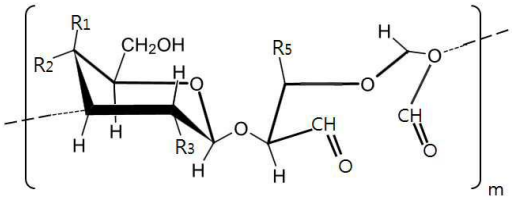
[0121] 상기 요오드산화반응을 통해 카라지난이 산화된 것을 본 발명에서는, 카라지난-알데하이드로 명명하며, 구체적으로 상기 카라지난-알데하이드는 화학식 1 및 화학식 4로 표시되는 반복단위를 포함하는 것으로 나타낼 수 있다.

[0122] [화학식 1]



[0123]

[0124] [화학식 4]

[0125] 

[0126] 상기 화학식에서, 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n, m은 상기 반복단위의 개수로 1 내지 10,000의 정수이다.

[0127] 상기 카라지난-알데하이드를 구성하는 반복단위의 몰%는 화학식 1의 반복단위 60~99 몰%, 화학식 3의 반복단위 1 내지 40 몰%일 수 있고, 바람직하게는 화학식 1의 반복단위 80~90 몰%, 화학식 3의 반복단위 10 내지 25 몰%일 수 있다.

[0128] 상기 카라지난-알데하이드에 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물을 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 치환하는데 있어서, 치환도가 적용되며, 본 발명에서 용어 "치환도"는 각각 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 변형/치환된 정도를 나타낸다.

[0129] 상기 화학식 2로 표시되는 화합물인 경우에는 작용기로 개질된 형광염료, 방사선동위원소가 결합될 수 있다. 상기 작용기는 티오시아네이트(-SCN) 또는 이소티오시아네이트기(-NCS)일 수 있다. 형광염료는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0130] 또한 상기 화학식 3으로 표시되는 화합물인 경우에는 카퍼-프리 클릭화학(Copper-free click)을 통해 형광염료, 방사선 동위원소가 결합될 수 있다. 이때 상기 형광염료 또는 방사선 동위원소는 하기 화학식 4로 표시되는 화합물(아자이드 화합물)로부터 도입될 수 있다.

[0131] 상기 카라지난 유도체는 대식세포 특히, M1형 대식세포의 세포 표면에 존재하는 CD80과 특이적으로 상호작용을 형성하여, 염증 관련 세포 표면에 효과적으로 결합하기 때문에, 이를 이용해 염증 유무를 판별 및 진단하는데 활용될 수 있다.

[0132] 일반적으로, 유도체의 표면에 NHS, 아크릴레이트, 티올, 또는 말레이미드기를 도입하여 세포 표면에 존재하는 단백질의 아민기나 티올기에 공유 결합하여 세포에 결합시킴으로써 세포의 구분없이 상호작용을 형성하는데 반해, 본 발명은 염증과 관련이 있는 대식세포에 특이적으로 결합하도록 카라지난을 치환 및 환원하여 합성된 카라지난 유도체를 사용하였다. 이를 통해 염증과 관련이 있는 대식세포 특히 M1형 대식세포와 특이적으로 상호작용을 형성할 수 있다.

[0133] 상기 카라지난 유도체를 합성하는 과정은 다음과 같다.

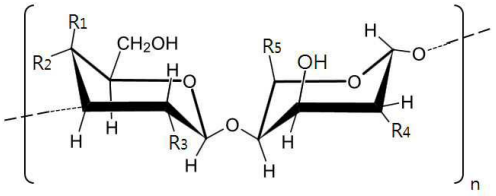
[0134] 1) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

[0135] 2) 상기 1) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2 또는 3의 화합물로 치환하는 단계; 및

[0136] 3) 상기 2) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계.

[0137] 1) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조한다.

[0138] [화학식 1]



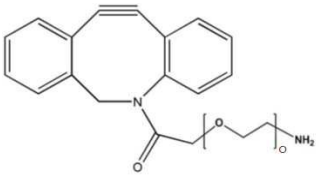
[0139]

[0140] [화학식 2]



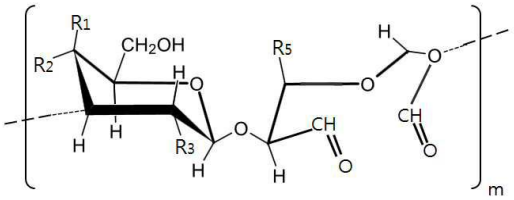
[0141]

[0142] [화학식 3]



[0143]

[0144] [화학식 4]



[0145]

[0146] 상기 화학식에서,

[0147] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0148] 상기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난은 엉김현상을 방지하기 위하여 10 ㎎/㎖ 미만의 농도인 것을 사용하는 것이 바람직하고, 1 내지 5 ㎎/㎖의 농도가 가장 바람직하다.

[0149] 상기 1) 단계를 통해 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난은 산화제에 의해 산화가 일어나고, 이러한 요오드산화 반응을 통해 카라지난의 갈락토오스 또는 3,6 안하이드로갈락토오스와 같은 지방족 고리 구조가 열리면서(ring-opening) 2번, 3번 또는 이들 두 위치의 히드록시기가 알데히드기로 변하여, 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드가 제조된다. 구체적으로, 전체 카라지난 반복단위 중 카라지난의 고리 구조가 오픈되어 알데하이드기가 형성된 반복단위(화학식 4)의 몰 비율(%)로 정의된 카라지난-알데하이드 산화도는 정의상 0 초과 1 이하의 수치 또는 0몰% 초과 100몰% 미만의 수치로 표현될 수 있다. 바람직하게 상기 1) 단계를 실시한 후 상기 카라지난-알데하이드를 구성하는 반복단위의 몰%는 화학식 1의 반복단위 60~99 몰%, 화학식 4의 반복단위 1 내지 40 몰%일 수 있고, 바람직하게는 화학식 1의 반복단위 80~90 몰%, 화학식 4의 반복단위 10 내지 25 몰%일 수 있다.

[0150] 상기 화학식 1 및 화학식 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드의 반복단위의 몰%가 적용될 경우, 결합가능한 형광염료 및 방사선 동위원소를 충분히 확보할 수 있을 뿐만 아니라, 대식세포 내 CD80과 충분히 상호작용을 형성할 수 있어 기대한 대식세포 표적화(targeting) 효과를 얻을 수 있다는 장점이 있다.

[0151] 상기와 같이 생체적합성, 생분해성 고분자인 카라지난을 이용하여, 인체에 안전하게 적용할 수 있을 뿐만 아니라, 대식세포에 특이적으로 결합하는 카라지난의 골격 구조는 남겨둔 채, 링 구조를 오픈하여 형광염료 또는 방사선동위원소를 컨쥬게이션함으로써, 카라지난의 대식세포 특이적 전달 특성을 최대화하여, 염증관련 세포인 대식세포를 특이적으로 표지할 수 있으므로, 초기 염증관련 대식세포를 검출 및 진단할 수 있는 다양한 응용예로

활용될 수 있다.

[0152] 상기 산화제는 히알루론산의 고리 구조를 깰 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않으며, 바람직하게는 소듐 퍼리오데이트(Sodium periodate, NaIO4)를 사용할 수 있다.

[0153] 바람직하게는 상기 산화제는 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난의 단위체당 1 내지 10 몰(mole) 배로 첨가될 수 있고, 더욱 바람직하게는 1 내지 5몰 배로 첨가될 수 있다. 바람직하게는 상기 산화제 1 분 내지 180 분 동안 반응시킬 수 있고, 바람직하게는 10 내지 60 분 동안 반응 시킬 수 있다.

[0154] 본 발명에서의 카라지난 유도체는 최종적으로 Tc-99m 또는 형광이 표지되는지 표지되지 않는지가 중요하므로, 90%이상 표지가 되기 위하여 최소 상기 산화제의 농도는 1 내지 10몰배 첨가되는 것이 바람직하다.

[0155] 상기 산화제와의 반응 이후에, 바람직하게는 증류수로 투석하여 정제하는 공정을 더욱 수행할 수 있다.

[0156] 이후, 2) 상기 1) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물로 치환한다.

[0157] 구체적으로 상기 1) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 증류수에 용해시킨 후, 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물을 첨가하여 반응시켰다. 예를 들어 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물을 첨가하여 카라지난-알데하이드 내 포함된 알데하이드기와 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물의 아민기를 반응시킨 것일 수 있다. 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물은, 예를 들어 시스테아민 또는 DBCO에는 아민기가 존재하므로, 2) 단계에서 사용되는 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물은 별도의 준비 과정이 없이 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물 그 자체로 사용될 수 있다. 또한 카라지난-알데하이드 및 화학식 2 또는 화학식 3의 화합물은 수용성이므로 물에 용해시켜 수용액 상태로 반응시켜 결합될 수 있다.

[0158] 상기 카라지난-알데하이드에 존재하는 알데하이드기는 반응성이 매우 좋은 특성이 있으므로 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응하지 않고 남아있게 될 경우, 추후 대식세포의 CD80과 상호작용을 형성함에 있어서, 방해작용을 하여 정확도를 저하시키는 문제가 발생할 수 있다.

[0159] 따라서, 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물을 과량으로 혼합하는 것이 바람직하며, 상기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물은 상기 카라지난-알데하이드의 산화도에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 구체적으로 카라지난-알데하이드의 알데하이드기의 1 배 내지 100 몰 배 첨가할 수 있고 10 내지 240 분, 바람직하게는 30 내지 180 분 동안 반응시킬 수 있다.

[0160] 상기 2) 단계 후에도 카라지난-알데하이드에서의 반응하지 않은 알데하이드기가 남아있는 경우에는 이를 블로킹(blocking)하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 블로킹을 위해 사용되는 물질은 카르복실기나 알데하이드기와 반응할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않고 사용 가능하나, 바람직하게는 아민류, 더욱 바람직하게는 상기 아민류는 탄소수 1 내지 5인 직쇄 또는 분지쇄 알킬 카바자이트(alkyl carbazate), 또는 탄소수 1 내지 5인 저급 알칸올아민일 수 있다.

[0161] 바람직하게는 상기 2) 단계는 증류수 혹은 완충용액 내에서 수행될 수 있다. 상기 완충용액은 pH 5 내지 7, 더욱 바람직하게는 pH 5 내지 6.5의 일 수 있다.

[0162] 본 발명의 화학식 2 또는 화학식 3로 표시되는 화합물은 카라지난 알데히드 또는 카라지난 고분자당 1 내지 10개, 바람직하게는 2 내지 6개의 분자수가 결합되도록 반응시킬 수 있다.

[0163] 이후, 3) 상기 2) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시켜 카라지난 유도체를 제조한다.

[0164] 상기 2) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체에 환원제를 첨가하여 반응시킬 수 있다. 상기 환원제는 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 아민기와 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기가 반응하여 형성된 이중 결합을 환원시키는 역할을 한다.

[0165] 상기 환원제는 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물로 변형/치환된 정도를 의미하는 치환도에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 구체적으로 치환된 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물의 2 배 내지 100 몰 배, 바람직하게는 10 내지 50 몰 배로 첨가할 수 있고 10 내지 240 분, 바람직하게는 30 내지 180 분 동안 반응시킬 수 있다.

[0166] 상기 환원제는 소듐 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride, $NaCNBH_3$) 또는 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride)일 수 있다.

[0167] 상기 환원제와의 반응 이후에, 바람직하게는 증류수로 투석하여 정제하는 공정을 더욱 수행할 수 있다.

[0168] 상기 카라지난 유도체를 제조하기 위해서는 Tc-99m 또는 형광이 표지되는지가 가장 중요한 요소이므로, 90% 이상 표지가 되기 위해서는 각 단계에서 사용되는 산화제 뿐만 아니라, 화학식 2 또는 3의 화합물 및 환원제의 농도가 중요하게 작용한다. 따라서 상기 단계에서 사용되는 화학식 2 또는 3의 화합물 및 환원제의 농도는 상술한 바와 같은 범위에서 사용되는 것이 바람직하다. 또한 상기와 같이 제조된 상기 카라지난 유도체는 클릭화학반응을 통해 대식세포 표지용 프로브를 얻을 수 있는데, 바람직하게 상기 카라지난 유도체 1 몰을 기준으로 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물을 1 몰배 이상 도입할 수 있고, 가장 바람직하게는 1 내지 10 몰배 도입할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0169] 본 발명의 다른 측면은 형광염료 또는 방사선 동위원소; 및 상기 카라지난 유도체가 결합된 대식세포 표지용 프로브 및 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트에 관한 것이다.

[0170] 본 발명에 따른 대식세포 표지용 프로브는 종래의 기술인 18F-FDG를 이용한 염증 진단의 한계점을 극복하고, 더불어 염증이 악화되는 과정인지, 추유되고 있는 과정인지를 알 수 있다. 첫째로, FDG가 포도당의 일종이기 때문에 혈중 포도당 및 대사관련 호르몬의 영향을 받을 수 있기 때문에 진단을 위한 일정한 신체상태를 조절하는 데 한계가 있어 이를 검사하기 위하여, 금식이 필요하며, 동시에 당뇨 등의 고혈당 경우는 사용의 제한 점이 있으나, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브를 사용하는 경우는 대사적 제한이 없기 때문에 금식이 필요없고, 기타 대사관련 호르몬 상태와 연관성이 없기 때문에 당뇨 등의 경우에도 죽상경화의 진단을 위한 사용제한이 없다. 더불어 FDG의 경우에는 뇌와 심장의 병소에서는 대사적 특성상 죽상경화의 병소를 진단할 수가 없으나, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브의 경우는 사용제한이 없다. 또한, FDG를 이용하는 경우는 친염증성인 M1 대식세포의 존재를 선택적으로 진단하는 것은 불가능하지만, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브의 경우는 염증상태를 보다 정확하게 진단도 가능하므로 염증의 단계까지도 파악이 가능하다.

[0171] 구체적으로 생체내의 대식세포는 식균작용에 의한 이물, 노폐물의 제거, 또는 자연면역에 중심적인 역할을 하고 있는 것과 더불어, 항원처리기능에 의해, 획득면역의 조절에도 중요한 역할을 하고 있다. 한편, 대식세포의 활성 혹은 기능의 항진이, 생체에 있어 병적인 상태를 가져오는 경우가 있는 것도 알려져 있다.

[0172] 이러한 대식세포는 단핵구로부터 분화되며 조직 미세환경에 따라 다양한 표현형을 가지게 된다. 지질다당질(lipopolysaccharide, LPS)과 T 림프구가 분비하는 인터페론(IFN)-γ와 같은 사이토카인의 영향 하에서 염증성 사이토카인 분비와 탐식작용을 통해 조직 파괴 및 염증반응에 작용하는 M1형 대식세포로 분화한다. 이에 반해 염증 조절 사이토카인인 IL-4나 IL-13이 지배적인 환경에서는 만노스 수용체나 dectin-1, arginase 등을 발현하며 조직수복에 관여하는 M2 대식세포로 분화하게 된다. 이러한 대식세포의 다양한 표현형은 주변 염증환경에 따라 결정되며 단핵구의 대식세포로의 분화를 조절하는 전체적인 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았다.

[0173] 즉, M1 대식세포는 초기 단계 동안 더 존재하고(abundant) 기타 작동 세포의 정리(clearance) 및 모집을 매개하는 반면에, M2 대식세포는 염증의 끝을 향해 우세하고 혈관 신생 및 새로운 조직 형성을 촉진하므로, 앞서 설명한 바와 같이. 대식세포 특히, M1형 대식세포를 표지함으로써, 염증상태를 보다 정확하게 진단 및 파악할 수 있음을 알 수 있다.

[0174] 즉, 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 대식세포의 구조 및 목적하는 대식세포의 CD80의 발현 위치, 정도 및 기간등을 시각화할 수 있도록 주변과 대비되는 특이적인 광학적 성상의 영상신호를 발생시키는 것으로, 상기 대식세포 표지용 프로브와 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 상기 카라지난 유도체와 결합한 방사선 동위원소 또는 형광염료에서 발생하는 형광 및 형광전환성을 이용하여 생체내 자연발생적으로 존재하는 형광물질들에 의한 배경 노이즈와 구별되는 특징이 있어 신뢰도 높은 생체 영상화를 가능하게 한다.

[0175] 따라서 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 상기 대식세포를 표지함으로써, 관련 질환을 진단 및 검출할 수 있고, 진단할 수 있는 질환으로는, 아테롬성 동맥경화증, 울혈성 심부전, 허혈성 질환, 재협착, 고혈압, 섬유성 혈관장애(당뇨병, 전신성 에리테마토데스 등), 신경변성질환(예를 들면, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 파킨슨병, 척수소뇌변성증, 근위축성측색경화증 등), 뇌손상, 뇌혈관사상(예를 들면, 졸중, 발작, 신경상해 및 중추신경계 내부에서의 재생 등), 조혈장애, 성인호흡궁박증후군(ARDS), 암(특히 성인 T세포 백혈병을 포함하는 백혈병) 및 고형암, 자기면역질환, 감염(예를 들면, HIV감염 및 AIDS 등), 섬유증식장애(예를 들면, 건선 등), 만성 및 급성 염증 질환(예를 들면, 관절 류머티즘, 크론병, 염증성 장 증후군 등), 사구체 질환, 패혈증, 이식편거절반응, 이식편대숙주질환, 뼈질환, 변형성 섬유증식/염증응답에 의해 특징지어

지는 경우가 있는 심장혈관 및 심장혈관 이외의 혈관의 병태, 예를 들면 산소 또는 글루코오스 결핍 조직 등의 병에 의해 손상된 부위로의 백혈구의 침윤에 의해 특징지어지는 질환(예를 들면, 뇌졸중 및 심근경색 등) 등을 들 수 있다.

[0176] 상기 형광염료는 작용기로 개질된 형광염료일 수 있다. 상기 작용기는 티오시아네이트(-SCN) 또는 이소티오시아네이트기(-NCS)일 수 있다. 형광염료는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0177] 상기 방사선 동위원소는 C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상일 수 있다.

[0178] 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 추가적으로, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다.

[0179] 상기 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환, 알루미나, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조영제 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제 또는 보존제 등 을 추가로 포함할 수 있다.

[0180] 상기 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소디움 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 덱스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.

[0181] 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트의 다른 바람직한 양태는 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면, 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.

[0182] 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트는 생체 또는 시료에 투여될 수 있고, 상기 생체 또는 시료로부터 방사선 동위원소 또는 형광염료에 의해 발산되는 신호를 감지하여 영상을 수득할 수 있고 자외선 조사로 광전환성을 유도하여 배경 노이즈를 제거할 수 있다. 이를 통해 원하는 특정 타겟 부위의 형광 여부를 통해 암 및 특정 질병의 진단, 생체신호의 메카니즘 연구 및 줄기세포의 분화 연구 등에 적용 가능한 생체 이미징 용도로 이용 가능할 것이다.

[0183] 상기에서 사용된 용어 "시료"는 진단하고자 하는 대상으로부터 분리한 조직 또는 세포를 의미한다. 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트를 생체 또는 시료에 주입하는 단계는 의약 분야에서 통상적으로 이용되는 경로를 통해 투여될 수 있으며, 비경구 투여가 바람직하고 예를 들어 정맥내, 복강내, 근육내, 피하 또는 국부 경로를 통하여 투여할 수 있다. 또한, 실험용 세포를 배양시 배양액에 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트를 첨가하여 세포 중에서 대식세포의 CD80에 결합한 것을 광전환성을 이용하여 관찰함으로서 대식세포 특히 M1형 대식세포의 연구에 대한 중요한 정보를 얻는 용도로 이용 가능할 것이다.

[0184] 상기 이용방법에 있어서, 본 발명의 상기 대식세포 표지용 프로브 또는 이를 포함하는 대식세포 영상화용 키트에 의해 발산되는 신호는 단일광자방출단층촬영술(SPECT), 양전자방출단층촬영술(PET), 마이크로-PET, 컴퓨터 단층 촬영(CT), 자기공명영상(MRI) 또는 방사선 진단기기의 표적영상에 의해 감지되거나, 형광신호를 감지할 수 있는 형광 현미경, 공초점 형광 현미경, 분광광도계, 형광측정기, CCD 카메라, 실시간 생체 세포 관찰용 현미경

(Delta Vision) 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 장비에 의해서 감지될 수 있고, 상기 대식세포 영상화용 키트에 이를 포함할 수 있다.

[0185] 본 발명의 또 다른 측면은

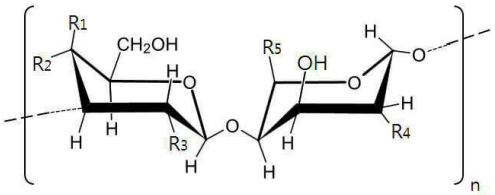
[0186] a) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

[0187] b) 상기 a) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 2 또는 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 2 또는 3의 화합물로 치환하는 단계;

[0188] c) 상기 b) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

[0189] d) 상기 c) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 방사선동위원소 또는 이소티오시아네이트로 개질된 형광염료를 반응시키는 단계; 대식세포 표지용 프로브의 제조방법에 관한 것이다.

[0190] [화학식 1]



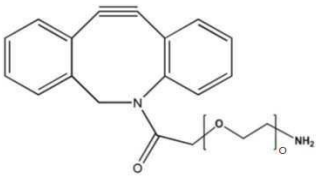
[0191]

[0192] [화학식 2]



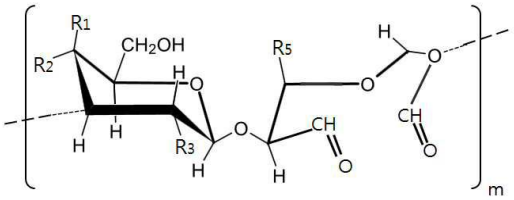
[0193]

[0194] [화학식 3]



[0195]

[0196] [화학식 4]



[0197]

[0198] 상기 화학식에서,

[0199] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0200] 상기 1), 2), 3) 단계로 구성된 카라지난 유도체의 제조과정은 앞서 설명한 카라지난 유도체의 제조과정(a, b, c)와 반복되는 내용이므로, 이를 참고로 하며, 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0201] 상기 방사선 동위원소는 C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상일 수 있는데 바람직하게는 Tc-99m일 수 있다. 상기 Tc-99m는 반감기가 6시간으로 비교적 짧고, 감마 영상을 얻기에 적절한 140 keV의 감마선 에너지만을 방출하기 때문에 인체에 대한 독성이 적으면서도 투과력이 커서 인체에 투

여하여 영상을 얻는데 바람직하다.

[0202] 상기 방사선 동위원소 특히 Tc-99m는 +5가의 전자배열을 가질 경우, 화합물을 구성하는 원자들 중 전자주게(electron donor) 성질을 가지고 있는 질소 또는 황 등의 원자들과 배위결합을 이룰 수가 있다. 따라서, 금속과 배위결합을 이루기 어려운 산소와 탄소밖에 없는 카라지난은 Tc-99m와 안정된 배위결합을 이루기가 이렵다. 그러나 상술한 과정을 통해 제조된 카라지난 유도체는 화합물내에 황이나 질소등의 원자가 존재하므로, Tc-99m와 안정적인 배위결합을 이룰 수 있다. 발생기로부터 용출될 때의 Tc-99m의 산화상태는 +7가이므로 환원제를 이용하여 +5로 환원시킨 뒤에는 질소 또는 황을 함유하는 글루코스 유도체와 배위결합이 가능하다. 방사성 동위원소 188 Re 및186 Re 도 상기와 같은 방법으로 표지할 수 있다.

[0203] 상기 환원제는 아스코빅산, 황산구리수화물(CuSO4·5H2O), 염화주석수화물(SnC12·2H2O) 및 황산주석(SnSO4)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있다. 상기 환원제는 방사성 동위원소를 환원시켜 상기 카라지난 유도체에 방사성 동위원소의 표지화 반응을 촉진하는 역할을 한다.

[0204] 이렇게 제조된 대식세포 표지용 프로브는 대식세포의 영상화를 위해 사용할 때 표지 효율이 떨어지지 않는 장점이 있다. 또한, 분자구조내에 함유하고 있는 방사선 동위원소는 X-레이 발생원을 이용하여 영상화시킬 수 있다.

[0205] 따라서, 본 발명에 따른 대식세포 표지용 프로브는 카라지난 유도체가 금속 킬레이트화제로 역할을 수행하므로, 방사선 동위원소와의 결합력이 뛰어나므로 조영제에 사용되는 방사선 동위원소와 안정한 결합을 형성할 수 있다. 이러한 결합과정의 하나의 예로써, 실시예 1의 반응식 2를 참고할 수 있다.

[0206] 한편 상기 형광염료는 분자 고유의 파장에서 광여기에 의해 여기(excitation) 상태가 되면, 흡수한 에너지를 특정 파장의 빛으로 방출(emission)하며 기저 상태(ground level)로 되돌아가는 것을 특징으로 하는 물질로, 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA 및 비오틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0207] 상기 카라지난 유도체와 상기 형광염료를 반응시켜 제조되고, 상기 형광염료는 하나 이상의 작용기로 화학적으로 개질시킨 것일 수 있다.

[0208] 상기 작용기로 개질된 형광염료는 티올기(-SH), 아민기(-NH2), 시아나이드기(-CN), 이소시아나이드(-CNO), 티오시아네이트(-SCN), 이소티오시아네이트(-NCS), 다이설파이드(-SS-) 또는 아자이드기(-N3)로 개질된 것일 수 있고, 바람직하게는 이소티오시아네이트기로 개질된 것일 수 있다.

[0209] 상기 개질된 형광염료는 상기 카라지난 유도체의 메르캅토기와 반응하여 안정적인 티오우레아를 형성함으로써, 안정적인 구조의 대식세포 표지용 프로브가 제조될 수 있다.

[0210] 상술한 과정을 통해 상기 카라지난 유도체가 하나 이상의 형광염료 또는 방사선 동위원소와 결합하여, 형성된 대식세포 표지용 프로브는 생-세포 영상화 및 진단 영상화를 위해 염증과 연관된 대식세포 특히, M1형 대식세포를 표적화/표지할 수 있다.

[0211] 본 발명의 또 다른 측면은

[0212] ⅰ) 하기 화학식 1로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난을 산화제와 반응시켜 하기 화학식 1 및 4로 표시되는 반복단위를 갖는 카라지난-알데하이드를 제조하는 단계;

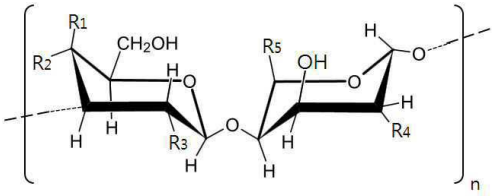
[0213] ii) 상기 ⅰ) 단계로부터 제조된 카라지난-알데하이드를 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물과 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드의 알데하이드기를 하기 화학식 3의 화합물로 치환하는 단계;

[0214] iii) 상기 ii) 단계에서 제조된 치환된 카라지난 유도체를 환원제와 반응시키는 단계; 및

[0215] iv) 상기 iii) 단계로부터 제조된 카라지난 유도체와 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물을 카퍼-프리 클릭화학(Copper-free click) 반응시키는 단계;를 포함하는 대식세포 표지용 프로브의 제조방법에 관한 것이다.

[0216] 상기 ⅰ), ii), iii) 단계로 구성된 카라지난 유도체의 제조과정은 앞서 설명한 카라지난 유도체의 제조과정(a, b, c)와 반복되는 내용이므로, 이를 참고로 하며, 반복되는 내용은 생략하기로 한다.

[0217] [화학식 1]



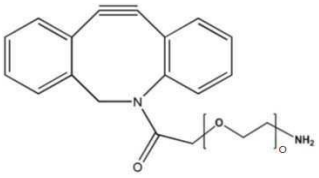
[0218]

[0219] [화학식 2]



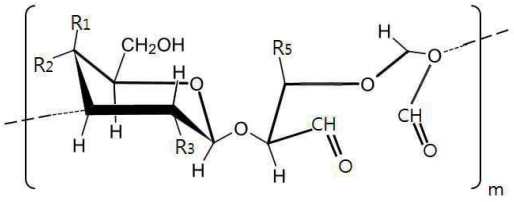
[0220]

[0221] [화학식 3]



[0222]

[0223] [화학식 4]

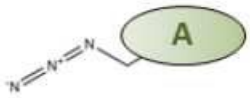


[0224]

[0225] 상기 화학식에서,

[0226] 상기 R_1 내지 R_5는 각각 독립적으로, -H, -OH, $-CH_3$, $-CH_2OH$, -COOH 또는 $-OSO_3^-$ 음이온기로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이고, 상기 n 및 m은 각각 1 내지 10,000의 정수이고, o는 1 내지 10의 정수이다.

[0227] [화학식 5]



[0228]

[0229] 상기 화학식 5에서,

[0230] 상기 A는 싸이3(Cy3), 싸이5(Cy5), 플루오레세인 아이소티오시안산염(FITC), 테트라메틸로다민 아이소티오시안산염(RITC), 알렉사(Alexa), 4,4,-다이플루오로-4-보로-3a,4a-다이아자-s-인다센(BODIPY), 텍사스 레드(Texas Red), NOTA, 비오틴, C-11, F-18, Ga-67, Ga-68, Cu-64, I-123, I-124, I-125, Zr-89, In-111, Tc-99m, Y-90, Re-186, Re-188, Lu-177, Ac-225, At-211 및 I-131로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이다.

[0231] 구체적으로 상기 카라지난 유도체와 형광염료 또는 방사선 동위원소가 표지된 아자이드 화합물(화학식 5)을 카퍼-프리 클릭화학 반응을 통하여 빠른 반응속도와 높은 방사화학수율로 결합시켜, 대식세포 표지용 프로브를 제조할 수 있다.

[0232] 보다 구체적으로 상기와 같이 제조된 카라지난 유도체는 화학식 3으로 표시되는 디벤조시클로옥틴(dibenzocyclooctyne, DBCO)을 가지고 있고, 이를 하기 화학식 5로 표시되는 아자이드기($-N_3$) 화합물과 빠른 시간내에 높은 수율로 카퍼-프리 클릭화학 반응을 진행할 수 있으므로, 상기와 같이, 디벤조시클로옥틴 화합물(화학식 3)으로 치환된 카라지난 유도체라면 특별히 제한되지 않고, 본 발명의 형광염료 또는 방사선 동위원소가

표지된 아지이드 화합물을 이용하여 방사성 동위원소와 형광염료를 용이하게 결합 및 접합시켜, 대식세포 표지용 프로브를 제조할 수 있다.

[0233] 상기 형광염료 또는 방사성 동위원소가 표지된 아자이드 화합물은 공지의 어떠한 합성방법에 의해 합성될 수 있으며, 그 합성방법이 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0234] 또한 본 발명의 iv) 단계는 본 발명의 형광염료 또는 방사선 동위원소가 표지된 아자이드 화합물(화학식 5)을 이용하여 카퍼-프리 클릭화학 반응이 일어날 수 있는 본 발명의 카라지난 유도체라면 특별히 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 디벤조시클로옥틴을 포함하는 카라지난 유도체가 바람직하다.

[0235] 상기 카퍼-프리 클릭화학 반응은 상기 형광염료 또는 방사선 동위원소가 표지된 아자이드 화합물과 디벤조시클로옥틴으로 치환된 상기 카라지난 유도체를 카퍼-프리 클릭화학 반응시켜, 형광염료 또는 방사선 동위원소가 결합/접합된 카라지난 유도체(대식세포 표지용 프로브)를 수득하여 수행되는 것이다.

[0236] 본 발명의 다른 실시양태에 의하면, 본 발명은 상기 대식세포 표지용 프로브를 분리된 생체시료에 투여하여, 색깔, 근적외선 형광, 방사선 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 신호가 발생되는 위치를 확인하는 단계를 포함하는, 대식세포의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0237] 본 발명의 용어 "개체"란, 염증이 유도되어, 염증과 관련된 증상 빛 병변이 나타난 것일 수 있고, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브 또는 키트가 투여될 수 있는 살아있는 유기체를 의미한다.

[0238] 본 발명에서 제공하는 대식세포 표지용 프로브를 생체내에 투여할 경우, 생체 내 염증관련 대식세포 특히 M1형 대식세포에 결합되어 대식세포 위치를 색깔, 근적외선 형광, 방사능 또는 이들의 조합을 통하여 표지할 수 있고, 상기 표지를 검출함으로써 대식세포의 위치, 크기 등을 실시간으로 검출할 수 있으므로, 염증관련 질환을 진단하고, 염증상태 및 염증진행정도를 관찰할 수 있다.

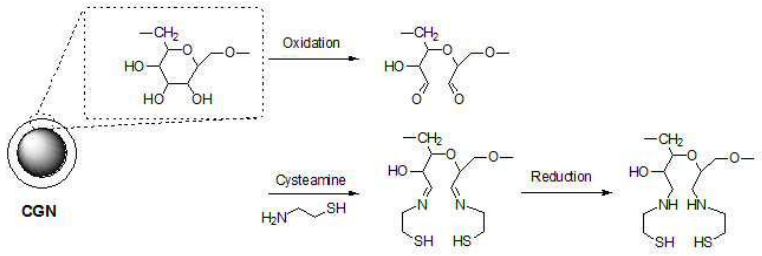
[0239] 아울러, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브는 다른 물질에 생체조직 염색용 색소를 결합시킨 복합체에 비하여, 생체내의 대식세포를 선택적으로 표지할 수 있고, 대사작용과 관계없이 대식세포를 표지할 수 있으므로, 환자의 상태에 제한없이, 뇌와 심장의 병소에서도 높은 정확도로 용이하게 대식세포의 위치를 확인할 수 있다.

[0240] 이하에서 실시예 등을 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 하며, 다만 이하에 실시예 등에 의해 본 발명의 범위와 내용이 축소되거나 제한되어 해석될 수 없다. 또한, 이하의 실시예를 포함한 본 발명의 개시 내용에 기초한다면, 구체적으로 실험 결과가 제시되지 않은 본 발명을 통상의 기술자가 용이하게 실시할 수 있음은 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연하다.

[0241] 또한 이하에서 제시되는 실험 결과는 상기 실시예 및 비교예의 대표적인 실험 결과만을 기재한 것이며, 아래에서 명시적으로 제시하지 않은 본 발명의 여러 구현예의 각각의 효과는 해당 부분에서 구체적으로 기재하도록 한다.

[0242] **제조예 1. 카라지난 유도체 합성**

[0243] [반응식 1]



[0244]

[0245] 대식세포의 CD80의 리간드역할을 하는 카라지난 유도체를 합성하기 위하여 카라지난(Carrageenan, CGN)의 산화, 치환, 및 환원하여 제조하는 일련의 합성과정을 도시한 것으로, 하기에서 구체적인 합성공정을 설명하기로 한다.

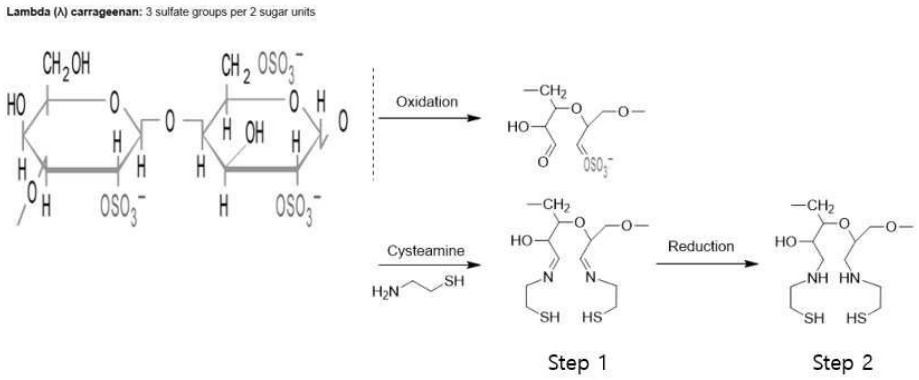
[0246] 합성전에, 10 ㎎/㎖의 CGN 용액(in DW)을 이용하여 물성(용해성)을 확인하고자 하였고, DLS(동적광산란)으로 확인한 결과, 엉김을 확인하였다.

[0247] 상술한 물성결과바탕으로, 2.5 ㎎/㎖ 농도의 CGN 수용액을 10 ㎖ 준비하였다. 상기 CGN 수용액을 2 ㎖씩 분주하

여 각각 반응시켰다. 상기 CGN 수용액에 소듐 퍼리오데이트(Sodium periodate) 산화제(oxidation)를 0.02 mmole(4.3 mg)를 투여하고, 상온에서 30 분동안 산화처리하여 카라지난의 고리구조를 열어, 카라지난-알데하이드를 제조하였다. 상기 카라지난-알데하이드를 PD-10 컬럼으로 증류수를 사용하여 여과하였다. 이후, 여과된 용액에 시스테아민(Cysteamine)을 0.02 mmole(1.5 mg) 투입하고, 상온에서 1 시간동안 반응시켜, 상기 카라지난-알데하이드에서 알데하이드기가 시스테아민기로 치환된 카라지난을 합성하였다. 다음으로, 상기 시스테아민기로 치환된 카라지난에 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride) 환원제(reduction)를 0.02 mmole(0.75 mg) 투여한 뒤, 얼음통(ice bath)을 이용해 저온에서 1 시간동안 반응시켜 카리지난 유도체를 합성하였다. 상기 카라지난 유도체에 농축된 HCL(Concentrated HCl)을 첨가하여 중화(neutralized)한 다음 PD-10 컬럼으로 증류수를 사용하여 여과하였다. 이때 각각의 화합물들은 최소량을 같은 몰 수로 처리하였다.

[0248] **제조예 2. 람다 카라지난으로부터 카라지난 유도체 합성**

[0249] [반응식 2]



[0250]

[0251] 대식세포의 CD80의 리간드역할을 하는 카라지난 유도체를 합성하기 위하여 람다 카라지난(Lambda(λ) Carrageenan, CGN)의 산화, 치환, 및 환원하여 제조하는 일련의 합성과정을 도시한 것으로, 하기에서 구체적인 합성공정을 설명하기로 한다. 람다 카라지난은 2개의 당 반복단위(sugar unit)당 3개의 설페이트기를 가지고 있는 중합체이다.

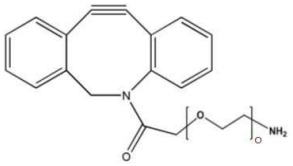
[0252] 상기 람다-카라지난 용액(7 mg/mℓ) 5 mℓ에 $NaIO_4$(3.9 mg, 0.018 mmol)과 H_2SO_4(2 ㎕) 혼합액을 첨가하여 반응시켰다. 상기 반응물을 상온에서 30 분 동안 교반한 뒤, 상기 반응혼합물을 PD-10 컬럼(Sephadex™ G-25 Medium, GE Healthcare Bio-Sciences Corp, NJ, USA)을 사용해 정제하였다. 이때 1 mℓ씩 세 번 연속 분획물(Three serial fractions)을 회수하여, 카라지난-알데하이드를 제조하였다. 상기 카라지난-알데하이드를 증류수에 용해하여 카라지난-알데하이드 용액 2.5 mℓ를 준비하였다. 다음으로 상기 용액에 포함된 산화된 람다-카라지난에 대해 100배 과량의 몰랄농도를 갖는 시스테아민(2.1 mg, 0.018 mmol)을 혼합하였다. 이를 상온에서 60분 동안 교반한 뒤, 수소화붕소나트륨(Sodium borohydride)($NaBH_4$, 0.687 mg, 0.018 mmol)을 첨가하여 반응 혼합액을 제조하였다. 상기 반응 혼합액은 얼음 중탕(ice-cold water bath)에서 60분 동안 교반하여, 카라지난 유도체를 합성하였다.

[0253] **제조예 3. DBCO-카라지난 유도체 합성**

[0254] 제조예 1, 2의 카라지난 유도체의 제조방법과 달리, 클릭반응을 통해 대식세포 표지용 프로브를 제조하기 위한 카라지난 유도체를 제조할 수 있다.

[0255] 상기 제조예 1에서 시스테아민 대신에 하기 화학식 3으로 표시되는 화합물을 첨가하는 것을 제외하고는 모두 제조예 1과 동일하게 하여 DBCO-카라지난 유도체를 합성하였다.

[0256] [화학식 3]

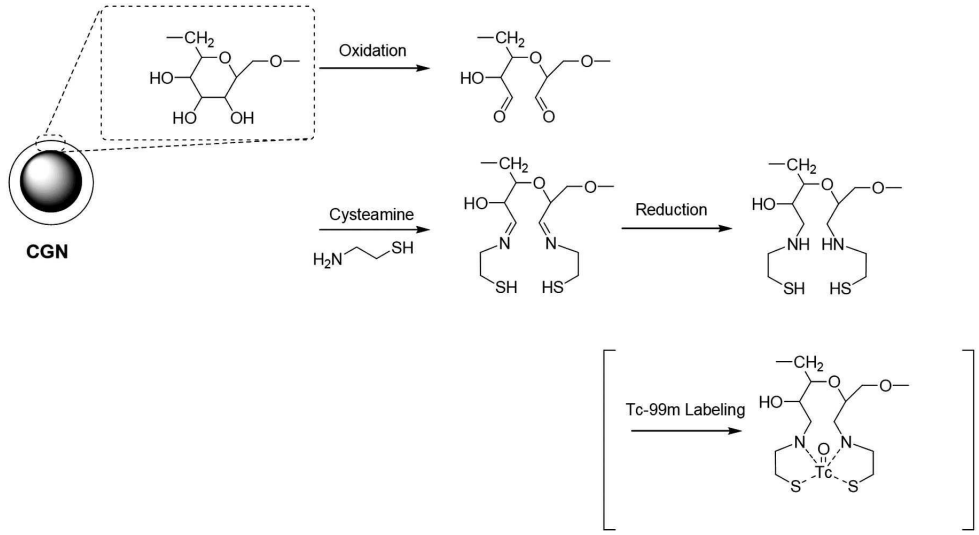


[0257]

[0258] 본 제조예 3에서의 상기 화학식 3은, 상기 o가 1인 것을 사용하였다.

[0259] **실시예 1. Tc-99m가 결합된 대식세포 표지용 프로브**

[0260] [반응식 3]



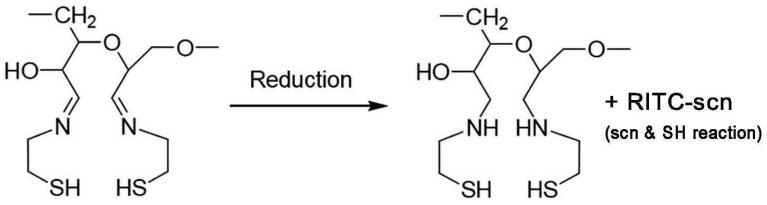
[0261]

[0262] 대식세포 표지용 프로브를 합성하기 위하여 제조예 1로부터 합성된 카라지난 유도체(Modificed Carrageenan이라고도 한다)의 제조과정과 이를 Tc-99m으로 라벨링하는 일련의 합성과정을 도시한 것으로, 하기에서 구체적인 합성공정을 설명하기로 한다.

[0263] 우선 2.5 mg/mℓ의 $SnCl_2$ 용액을 준비하였고, 2.5 mg/mℓ의 제조예 1로부터 합성된 카라지난 유도체 용액도 준비하였다. 이때, 콜로이드(colloid) 현상을 방지하기 위하여 0.1 M HCl을 용매로 이용하였다. 상기 제조예 1로부터 합성된 카라지난 유도체 용액 200 ㎕에 미리 준비해두었던 $SnCl_2$ 용액(10 ㎕)을 첨가하고, 여기에 ^{99m}Tc(20 ㎕, 140 μCi in Saline)을 넣어 혼합액을 제조한 뒤, 이를 볼텍싱(voltexing)하였다. 상기 혼합액을 상온에서 20분간 반응시킨 다음, 염류용액(Saline)과 구연산(Citric acid)을 혼합한 전개액으로 방사선 박층 크로마토그래피(radio-TLC)를 수행하였다. 1 시간(최대 2 시간)까지 반응시간을 늘려 수행하였다. 이때 Free 확인을 위해, 구연산염(Citrate), 염류용액(saline), 아세톤(Acetone)에 의해 전개를 추가하였다.

[0264] **실시예 2. RITC가 결합된 대식세포 표지용 프로브.**

[0265] [반응식 4]



[0266]

[0267] RITC가 결합된 대식세포 표지용 프로브를 합성하기 위하여, 제조예 2로부터 합성된 카라지난 유도체를 RITC로 라벨링하는 일련의 합성과정을 도시한 것으로, 카라지난 유도체(제조예 1 및 제조예 2 모두 해당됨)에 RITC를 라벨링하기 위해서는 RITC를 이소티오시아네이트(isothiocyanate)로 개질된 RITC를 사용하여야한다. 즉, 카라지난 유도체의 메르캅토기(sulfhydryl)와 RITC의 이소티오시아네이트가 반응하여 안정적인 티오우레아(thiourea)

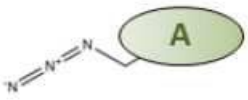
를 형성하는 기전을 통해 카라지난 유도체과 RITC의 결합되어 대식세포 표지용 프로브가 제조되는 것이다. 하기에서 구체적인 합성공정을 설명하기로 한다.

[0268] 제조예 2로부터 합성된 카라지난 유도체는 M 소듐카보네이트 완충액(sodium carbonate buffer)(pH=9.5) 및 scn-RITC(1 mg, 0.0018 mmol)와 함께 교반한 뒤, 밤새 반응시켜, PBS를 사용하여 정제하여, RITC가 결합된 대식세포 표지용 프로브를 제조하였다. 상기 RITC가 결합된 대식세포 표지용 프로브는 나노드롭(nano-drop)을 사용하여 RITC 농도를 확인하였다(실험예 2).

[0269] **실시예 3. 클릭화학반응을 통해 제조된 대식세포 표지용 프로브.**

[0270] 제조예 3으로부터 제조된 DBCO-카라지난 유도체 7 nmol(1 mg)을 하기 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물 70 nmol(0.02 mg, Click Chemistry Tools로부터 구입)을 증류수 0.1 ㎖에 녹여, 코퍼-프리 클릭화학반응을 수행함으로써, 손쉽게 형광염료 또는 방사선 동위원소를 도입한 대식세포 표지용 프로브를 얻었다. 본 실시예에서는 하기 화학식 5로 표시되는 아자이드 화합물의 A가 Cy3, NOTA인 것을 사용하였다.

[0271] [화학식 5]

[0272] 

[0273] 실시예 1 및 2와 같이 동위원소 또는 형광염료를 도입할 경우, 목적에 따라 카라지난 유도체를 각각 준비해야 하는 단점이 있다. 그러나, 클릭화학반응을 통해 대식세포 표지용 프로브를 제조할 경우에는 제조예 3의 카라지난 유도체를 활용해 동위원소뿐만 아니라 형광염료 도입이 모두 가능하다는 제조상 장점이 있다.

[0274] **실험예 1. 실시예 1로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 표지효율 분석**

[0275] 실시예 1로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성결과를 확인하기 위하여, ^{99m}Tc 표지 효율을 확인하고자 하였다.

[0276] 도 1은 Tc-99m이 결합된 실시예 1로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성 결과를 확인하기 위해 실시한 iTLC(Instant thin layer chromatography) 결과를 나타낸 것이다. 이는 구연산(Citric acid), 염류용액(saline) 및 아세톤(Acetone)으로 각각 전개함으로써 확인할 수 있었고, 표지 결과는 >90%임을 나타낸다.

[0277] 도 1에 나타난 바와 같이, iTLC (Instant thin layer chromatography)-실리카 겔(Silica gel, SC)을 이용하여 구연산(Citric acid), 염류용액(saline) 및 아세톤(Acetone)으로 각각 5 분동안 전개하여 확인할 수 있었고, 표지율은 >90%임을 확인할 수 있었다(Free: free form of ^{99m}Tc). 상기 그래프에서 free로 표기된 free form의 ^{99m}Tc을 나타내는 피크가 거의 없어진 것으로 보아, 카라지난 유도체에 90% 이상 ^{99m}Tc가 결합되었음을 알 수 있다.

[0278] **실험예 2. 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 분석**

[0279] 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성결과를 확인하기 위하여, RITC 표지 효율을 확인하고자 하였다. 피크가 뚜렷하게 관찰되지 않으므로, PD-10 컬럼을 이용해 효율을 계산하고자 하였다.

[0280] 도 2는 RITC 농도(1 mg/㎖~0.01 mg/㎖)에 따른 UV 검량 그래프이고, 도 3은 RITC가 결합된 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 합성 결과를 확인하기 위해 실시한 UV 흡광도 스펙트럼 결과를 나타낸 것이다.

[0281] 도 2는 카라지난 유도체와 RITC 결합을 통해 대식세포 표지용 프로브가 제조되었는지를 확인하기 위해, RITC를 1 mg/㎖부터 0.01 mg/㎖ 농도로 희석한 용액을 나노드랍하여 UV 흡광도를 측정하여 나타낸 검량그래프이다. 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 UV 흡광도를 측정하여, 도 2의 검량 그래프에 대입한 결과, 실시예 2의 대식세포 표지용 프로브에서 RITC 농도는 0.2 mg/㎖인 것으로 보아, 카라지난 유도체에 RITC가 결합되었음을 알 수 있다.

[0282] **실험예 3. 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 MALDI-TOF/TOF MS 분석**

[0283] 실시예 2로부터 제조된 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브에서, 카라지난에 접합된 시스테아민(제조예 2의 카라지난 유도체)과 RITC 부분의 유닛트 수를 결정하기 위해 MALDI-TOF/TOF MS를 수행하였다.

[0284] 우선, 0.1 % TFA(1:1, v/v)를 함유하는 아세토니트릴 및 물의 혼합물에서 샘플용액(10 μL)의 분취량을 α-시아노-4-하이드록시-신남산(CHCA)의 포화용액과 혼합하고, 상기 혼합액 1 μL 씩을 MALDI 플레이트에 스팟팅한 후, 실온에서 완전히 건조시켰다. 그 후, 질량 분석기를 이용하여 상기 플레이트를 분석하였다, 하기 검출 조건으로, 각 스팟에 대한 스펙트럼을 수집하였다. 25 kV의 가속 전압으로 선형 모드에서 측정을 수행하였고, 스팟은 337 nm 질소 레이저(nitrogen laser)로 처리한 다음, 스캔(scan) 당 20 회의 레이저 샷(laser shot)을 취하였고, 스캔은 125 개 스캔으로 수행하였다. 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(즉, 개질된 카라지난 화합물)과 유닛 물질로써 카라지난(Carrageenan λ, 도 4)의 평균 분자량은 2500 레이저 샷(laser shot)으로부터의 결과에 대한 평균으로 계산하였고, 이는 표 1에 나타내었다.

[0285] 도 5는 카라지난 λ, 제조예 2의 카라지난 유도체 및 실시예 2의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브에 대한 MALDI-TOF 결과이고, 도 6은 카라지난 λ의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이고, 도 7은 제조예 2의 카라지난 유도체의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이며, 도 8은 실시예 2의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브의 MALDI-TOF_RAW DATA를 나타낸 그래프이다.

표 1

[0286]

Type	MW(mean)	Molecular weight of Unit	Number
카라지난 λ	16928.5	579.5/카라지난	29-30 per polymer
제조예 2의 카라지난 유도체	17387.0	77.15/시스테아민	5.94 ((제조예 2-카라지난 λ)/77.15)
실시예 2의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브	17935.5	389.38/RITC-SCN	1.40((실시예 2-제조예 2)/389.38)
MALDI-TOF based molecular weight			

[0287] 표 1, 도 5 내지 8에 따르면, 카라지난의 unit당 분자량은 579.5 g/mol이며, 카라지난 폴리머당 29-30개의 unit 화합물로 결합되어 카라지난 고분자의 분자량은 16928.5 g/mol 이다.

[0288] 제조예 2의 카라지난 유도체(시스테아민 카리기난)는 제조과정을 통해, 카라지난 고분자당 분자량이 77.15 g/mol인 시스테아민이 평균 5.94개가 붙음으로써, 제조예 2의 카라지난 유도체 분자량이 17387.0 g/mol로 증가하였음을 알 수 있다.

[0289] 실시예 2로부터 제조된 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브는, 분자량이 389.38 g/mol인 RITC-SCN이 카리지난 고분자-시스테아민에 평균 1.4개 붙음으로써, 분자량이 17935.5 g/mol로 증가된, RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브가 합성되었음을 확인할 수 있다.

[0290] 즉, 본원발명에 따른 대식세포 표지용 프로브는 카라지난 λ 29-30 유닛당 시스테아민으로 개질된 카라지난 유닛이 평균 1 내지 20개 존재하며, 이 중에서도 RITC가 결합된 카라지난 유닛은 평균 1 내지 10개인 것이 바람직하다. 특히 카라지난 λ 29-30 유닛당 시스테아민으로 개질된 카라지난 유닛이 평균 5 내지 10개 존재하며, 이 중에서도 RITC가 결합된 카라지난 유닛은 평균 1 내지 5개인 것이 보다 바람직하다.

[0291] **실험예 4. 생체 외(*in vitro*)에서 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 타겟활성 분석**

[0292] 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브가 실질적으로 대식세포를 표지하는지 여부를 확인하고자 하였다. 이를 위해 다음과 같이 평가를 수행하였다.

[0293] 우선, 8웰 챔버 슬라이드(well chamber slide)에 Raw264.7 세포를 웰(well) 당 5000 개(cell) 정도 분주하였다. 이를 PBS 완충용액으로 세척한 후, 차게 식힌(ice cold) 메탄올(methanol, MeOH)를 15분 동안 처리하여 세포를 고정하였다. 이후, PBS 완충용액으로 다시 한번 세척한 다음, 상기 각 웰에 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN) 또는 RITC 표준용액(standard)을 30 분동안 농도 별로 처리하였다. 반응이 종료된 후, 상기 웰을 PBS 완충용액으로 150초 동안 세척한 다음, 각 웰을 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0294] 이때, 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)를 0.1, 1, 10, 100 ㎍/㎖로 희석한 용액을 사용하였고, 해당하는 농도로 도 9에 표시하였다. 1000 ug/ml은 1000 ㎍/㎖농도의 RITC 표준용액을 사용한 것이며, 희석시에는 PBS 완충용액(pH9.5, 0.1 M sodium carbonate buffer)을 사용하였다. ctrl은 아무것도 처리하지 않은 RaW264.7 세포이다.

[0295] 도 9는 활성화된 백혈구(Raw264.7)에 다양한 농도의 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)와 RITC 표준용액을 처리하고 난 후, 형광현미경으로 촬영한 결과이다.

[0296] 도 9에 나타난 바와 같이, 생체 외(*in vitro*) 실험에서 타겟 대상인 백혈구세포에 실시예 2의 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)의 비특이적 부착이 농도의존적으로 증가하고 있음을 확인하였다.

[0297] 구체적으로 정상적인 세포표면에는 수많은 아민(amine, NH_2)이 존재하기 때문에, RITC만 처리하여도 세포에 쉽게 부착될 수 있다. 그러나 본 발명에서와 같이 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)는 티오우레아 형태이기 때문에, RITC는 카라지난 유도체의 아민에 이미 화학적으로 결합되어 안정한 티오우레아(thiourea) 형태로 형성되어 있으므로, 타겟 대상이 아닌 세포막의 아민에는 더 이상 RITC가 결합되지 않는다. 나아가 본 발명에 따른 대식세포 표지용 프로브는 타겟 대상인 대식세포의 CD80에 대해 리간드 역할을 하는 카라지난 유도체가 존재하므로, 본 발명의 대식세포 표지용 프로브에 의해 표지된 세포는 세포막 표면에 CD80이 존재하는 대식세포에 한정되며, 일반 정상세포에 대해서는 결합이 형성되지 않으므로, 색상이 발현되지 않음을 확인할 수 있다.

[0298] **실험예 5. 생체 외(*in vitro*)에서 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 M1 대식세포에 대한 타겟활성 분석**

[0299] 1) 실험군(Added 0.001 ㎍/㎖ Lipopolysaccharide)

[0300] 8웰 챔버 슬라이드(well chamber slide)에 Raw264.7 세포를 웰(well) 당 5000 개(cell) 정도 분주하였다. 1 내지 2 일 배양한 뒤, 각 웰에 0.001 ㎍/㎖ 농도의 LPS(염증 유발물질) 용액을 처리하고, 24 시간동안 배양하였다. 상기 LPS 용액은 10% FBS 및 1% 항생-항진균 용액이 보충된 RPMI 배지에 혼합하여 최종 부피 200 ㎕로 투여하였다.

[0301] 다음으로, 상기 웰에서 배양액을 제거하고, PBS 완충용액으로 세척한 다음, 차게 식힌(ice-cold) 메탄올(methanol)로 15 분 동안처리하여 세포를 고정하였다. 이후 PBS 완충용액으로 5분 동안 1회 세척하고, 블로킹 항체(blocking antibody)를 1시간 동안 처리하였다.

[0302] 상기 항체로 TLR4(abcam, ab47093)를 0.025 ㎍/㎕, 0.005 ㎍/㎕, 0.01 ㎍/㎕로 각각 처리하였고, CD80(NOVUS, B7-1, AF740)를 0.025 ㎍/㎕, 0.005 ㎍/㎕, 0.01 ㎍/㎕로 각각 처리하였다.

[0303] 이후, 상기 웰을 PBS 완충용액으로 5분 동안 1회 세척하고, 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)(카라지난 유도체를 기준으로 0.5 ㎎/㎖)를 20분 동안 처리하였다. 이후 PBS로 3 분 동안 2차례에 걸쳐 세척한 다음, 100~200 ㎕의 PBS 완충용액을 부어, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0304] 2) 음성대조군(No Lipopolysaccharide)

[0305] 다만, 염증이 발생하지 않은 세포에 대해서도 타겟활성을 나타내는지 비교하기 위해(음성대조군), LPS를 처리하지 않은 Raw264.7 세포(No Lipopolysaccharide)를 사용하는 것을 제외하고는 상기 1) 단계와 동일하게 제조하였다.

[0306] 이후, 상기 웰을 PBS 완충용액으로 5분 동안 1회 세척하고, 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)(카라지난 유도체를 기준으로 0.5 ㎎/㎖)를 20분 동안 처리하였다. 이후 PBS로 3 분 동안 2차례에 걸쳐 세척한 다음, 100~200 ㎕의 PBS 완충용액을 부어, 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0307] 3) 실험 결과

[0308] 도 10은 CD80 항체를 처리한 실험군과 음성대조군의 형광 현미경 사진이다. 도 11은 TPR4 항체를 처리한 실험군과 음성대조군의 형광 현미경 사진이다.

[0309] 도 10 및 11에 나타난 바와 같이, 생체 외(in vitro) 실험에서, 대식세포에 L PS(lipopolysaccharide)를 처리하여, M1형의 대식세포로 발현을 유도한 후, M1 대식세포의 수용체 선택성 CD80 bloking 항체를 처리하고, 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(CGN-RITC)를 투여하였다. 그 결과 M1형 대식세포의 표면에 존재하는 CD80을 blocking 할수록 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브(CGN-RITC)로 표지되는 양(밝기)이 점차 줄어드는 것을 확인하였다. 이에 반해 M1형 대식세포의 표면에 존재하는 TLR4를 blocking한 경우에는 표지되는 양에 차이가 없었다. 이를 통해 본 발명에 따른 대식세포 표지용 프로브(실시예 2)는 M1 대식세포의 CD80에 특이적으로 결합한다는 것을 알 수 있다.

[0310] **실험예 6. 실시예 2로부터 제조된 대식세포 표지용 프로브의 M1 대식세포(M1 polarized THP-1 cell)에 대한 타**

겟활성 분석

[0311] 1) M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포 준비

[0312] 우선, THP-1 세포의 분화를 유도하였다. 구체적으로 12웰 플레이트(12-well plate)에 THP-1 세포를 웰(Well)당 500,000개(cell) 분주하였다. 이후 각 웰에 PMA(Phorbol 12-myristate 13-acetate)(최종농도 100 ng/㎖) 용액을 처리하고, 72 시간동안 배양하였다. 상기 PMA 용액은 10% FBS 및 1% 항생-항진균 용액이 첨가된 RPMI 1640 배지에 혼합한 후, 최종 부피 1,000 ㎕로 투여하였다. 이때 PMA는 THP-1 세포의 상태를 Monocyte에서 Macrophage로 분화하는 분화유도물질로 작용한다.

[0313] 다음으로, M1 대식세포 분극화((M1 polarized THP-1 cell)를 유도하였다. 구체적으로 상기 분화된 THP-1 세포가 있는 각 웰의 배양액을 모두 제거한 후, PBS 완충용액으로 1회 세척하였다. 이후 각 웰에 LPS(Lipopolysaccharide)(최종 농도 1,000 ng/㎖)와 IFNγ(Interferon-gamma)(최종 농도 20 ng/㎖)을 처리하고, 24 시간동안 배양하였다. 상기 LPS와 IFNγ은 10% FBS 및 1% 항생-항진균 용액이 보충된 RPMI 1640 배지에 혼합한 다음, 최종 부피 1,000 ㎕로 투여하였다.

[0314] 다음, 실험을 위해 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포를 준비하였다. 구체적으로 M1 polarized THP-1 cell이 존재하는 플레이트 웰로부터 배양액이 포함된 상태로 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포만을 모아 1.7 ㎖ 튜브에 옮겼다. 상기 튜브를 12,000 rpm, 1 min 원심분리기로 원심분리하여 펠렛을 제외한 상층액만 제거하였다. 상기 펠렛이 남아있는 튜브에 PBS 완충용액 1 ㎖를 넣어, 세포를 세척하고, 다시 원심분리기로 상층액과 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포(펠렛 형태)를 분리하고, 상층액을 제거하고 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포만을 회수하였다.

[0315] 2) 실험

[0316] 본 발명의 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브가 M1형 대식세포 특이적으로 작동하는지를 판단하기 위하여, 상기 과정을 통해 회수된 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포에 각각의 시료를 첨가하여 유세포분석기로 관찰하였다.

[0317] 대조군으로 아무것도 처리하지 않은 비염색군(Un-staining), 비교군으로 기존 M1 대식세포 표지항체 FITC-CD197 20 ㎕/㎖를 처리한 CD197-staining군, 제1 실험군으로 실시예 2로부터 제조된 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN) 0.5 mg/㎖ 처리한 CGN-staining군, 및 제2 실험군으로 RITC-CGN(실시예 2)와 FTIC-CD197을 동시에 처리한 CD197+CGN-staining군을 준비하였다. 상기 각각의 시료를 첨가하고, 4℃에서 30분 동안 반응시킨 후, 500 ㎕의 PBS 완충용액을 넣고, 유세포분석기(Flow cytometry)로 관찰하였다.

[0318] 3) 실험 결과

[0319] 도 13은 M1 대식세포 분극화된 THP-1 세포에, M1 대식세포 표지항체 FITC-CD197, 실시예 2로부터 제조된 RITC 결합된 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN) 및 이들의 혼합물을 첨가하여 각 군을 제조하고, 이를 유세포분석기로 분석한 결과 데이터이다.

[0320] 도 13에 따르면, 비염색군(Un-staining)을 통해 M1 대식세포의 특성을 확인할 수 있다. 비염색군(Un-staining)에서 측정된 세포의 분포를 기준으로 나머지 비교군, 제1 실험군, 제2 실험군의 세포 분포를 비교하였다.

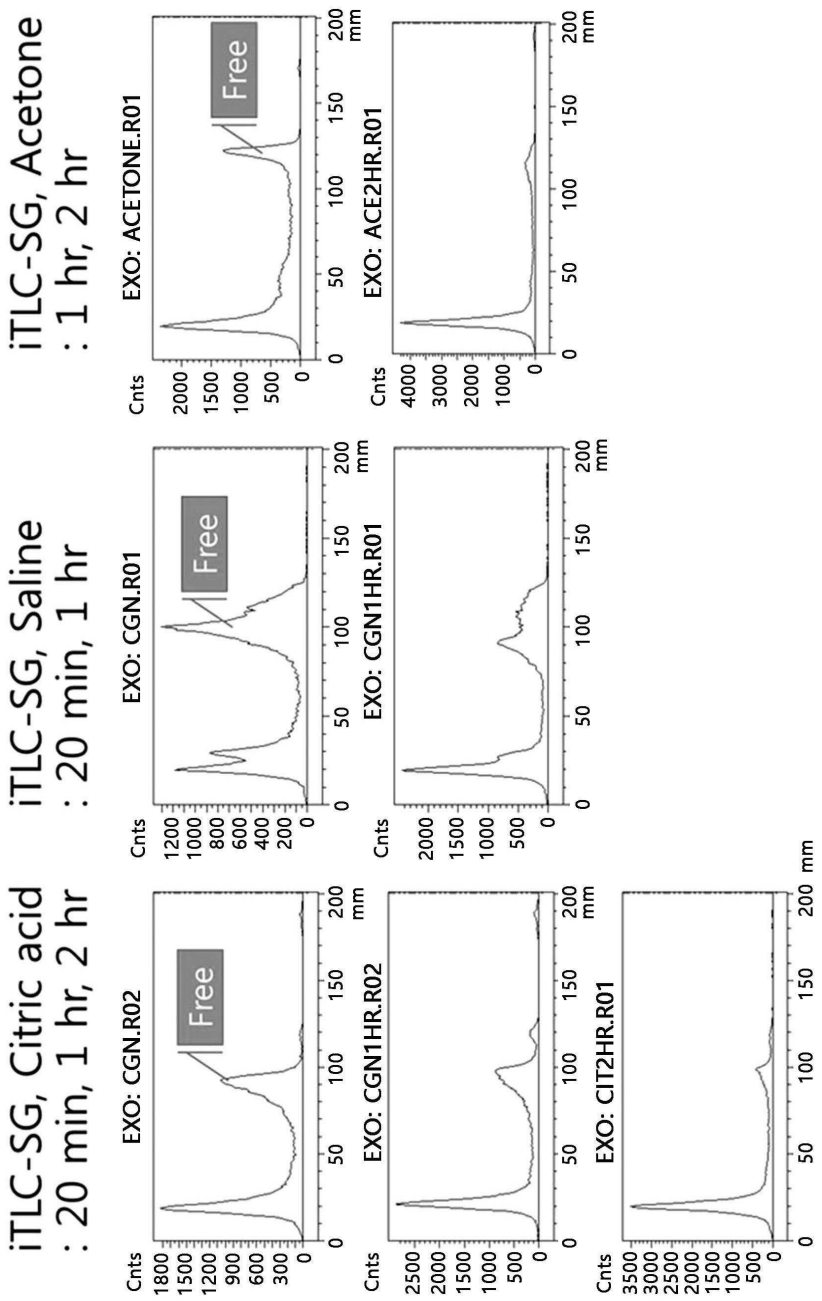
[0321] 비교군(CD197-staining)은 세포의 분포가 Q1, Q2로 이동하였다(Un-staining: 0.985%, CD197-staining: 46.92%). 다음으로, 제1 실험군(CGN-staining)은 세포의 분포가 Q2, Q3으로 이동함을 관찰하였다(Un-staining: 0.415%, CGN-staining: 71.1%).

[0322] 제2 실험군(CD197+CGN-staining)은 기존 M1 대식세포 표지항체 FITC-CD197와 실시예 2로부터 제조된 M1대식세포 표지용 프로브 RITC-CGN을 혼합한 것으로, 이의 결과를 살펴보면, 세포의 분포가 Q2로 이동되었음을 관찰할 수 있다(CD197+CGN-staining: 31.3 %).

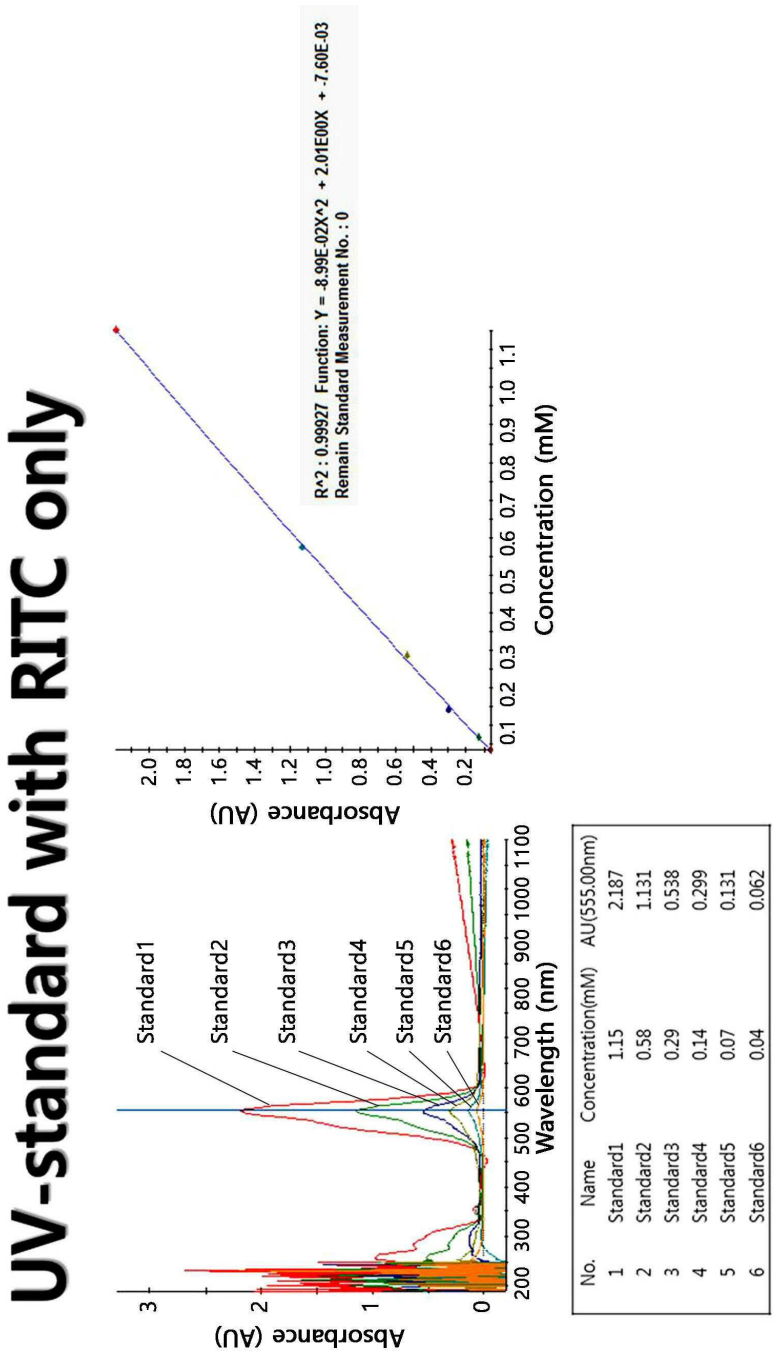
[0323] 따라서 본 실험을 통해, 실시예 2로부터 제조된 M1 대식세포 표지용 프로브(RITC-CGN)는 M1 대식세포에 특이적으로 반응한다는 것을 확인할 수 있다.

도면

도면1

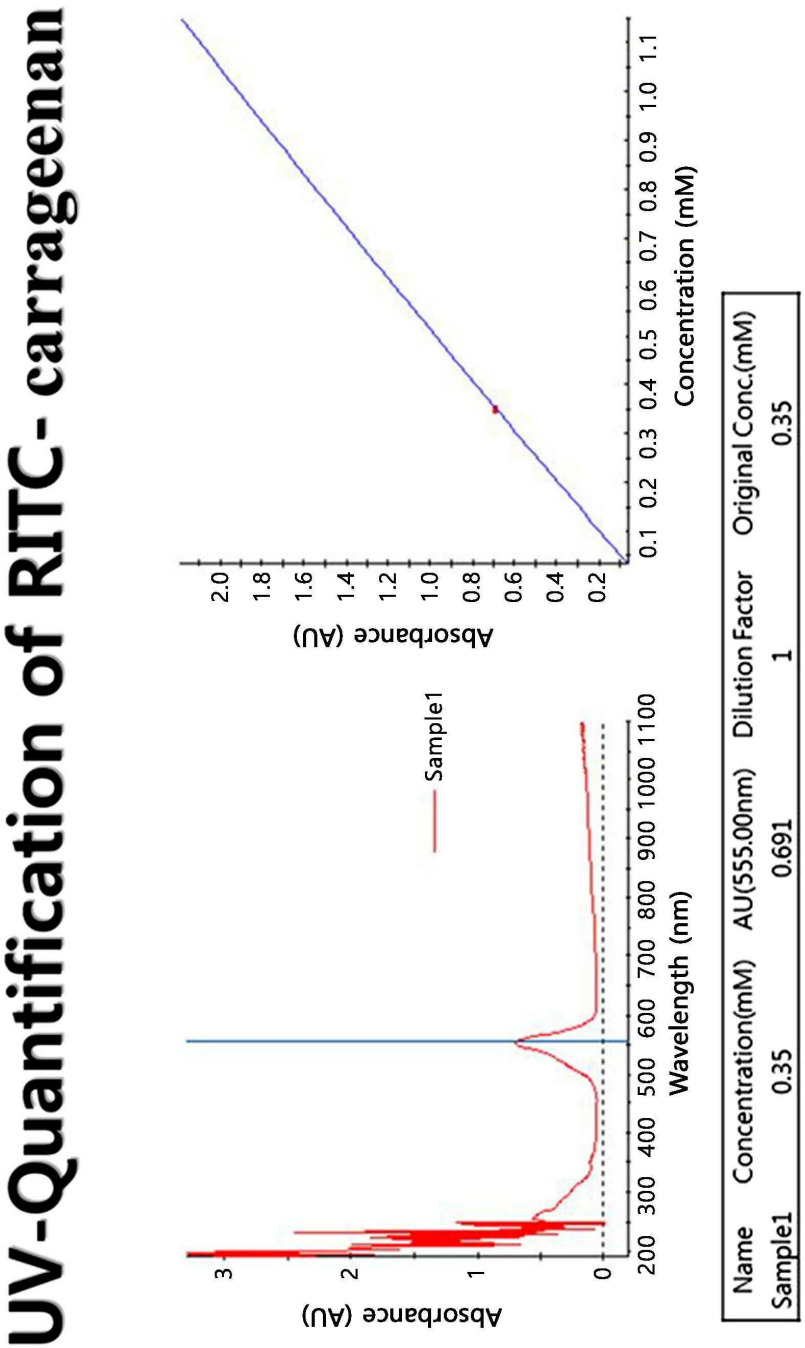

iTLC-SG, Citric acid
: 20 min, 1 hr, 2 hr
iTLC-SG, Saline
: 20 min, 1 hr
iTLC-SG, Acetone
: 1 hr, 2 hr
EXO: CGN.R02
EXO: CGN.R01
EXO: ACETONE.R01
EXO: CGN1HR.R02
EXO: CGN1HR.R01
EXO: ACE2HR.R01
EXO: CIT2HR.R01
Free
Cnts
mm

도면2



No.	Name	Concentration(mM)	AU(555.00nm)
1	Standard1	1.15	2.187
2	Standard2	0.58	1.131
3	Standard3	0.29	0.538
4	Standard4	0.14	0.299
5	Standard5	0.07	0.131
6	Standard6	0.04	0.062

도면3

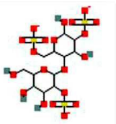


Name	Concentration(mM)	AU(555.00nm)	Dilution Factor	Original Conc.(mM)
Sample1	0.35	0.691	1	0.35

도면4

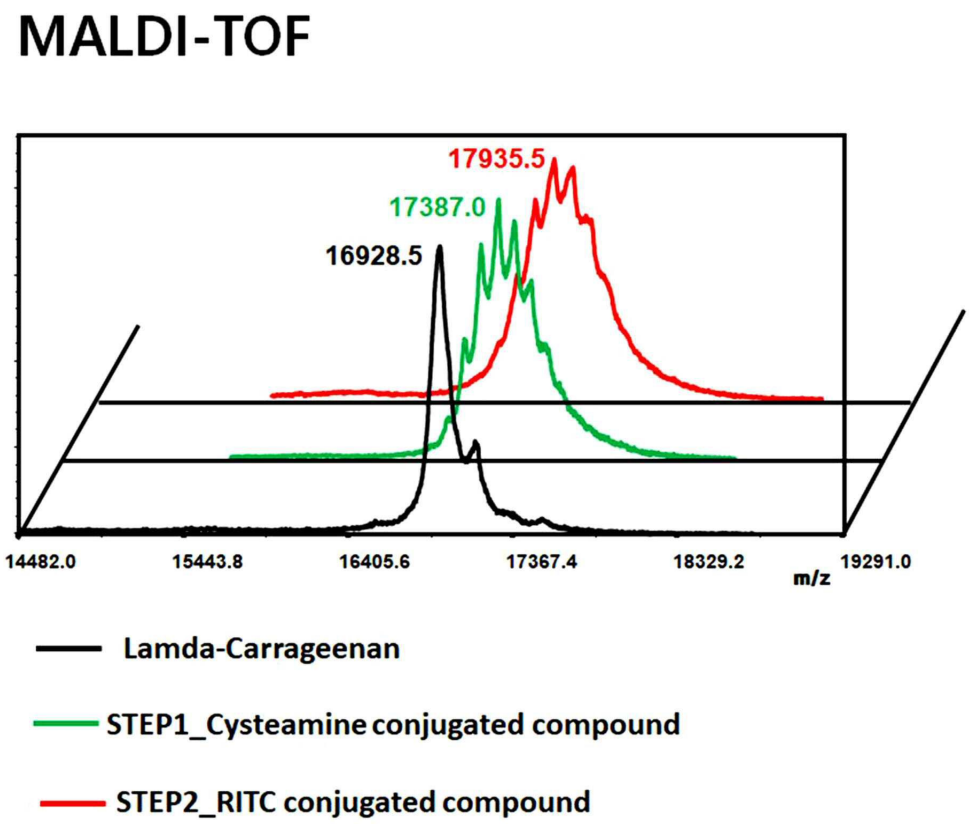
COMPOUND SUMMARY

[5-[4,5-Dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-sulfonatooxyoxan-2-yl]oxy-2,4-dihydroxy-6-(sulfonatooxymethyl)oxan-3-yl] sulfate

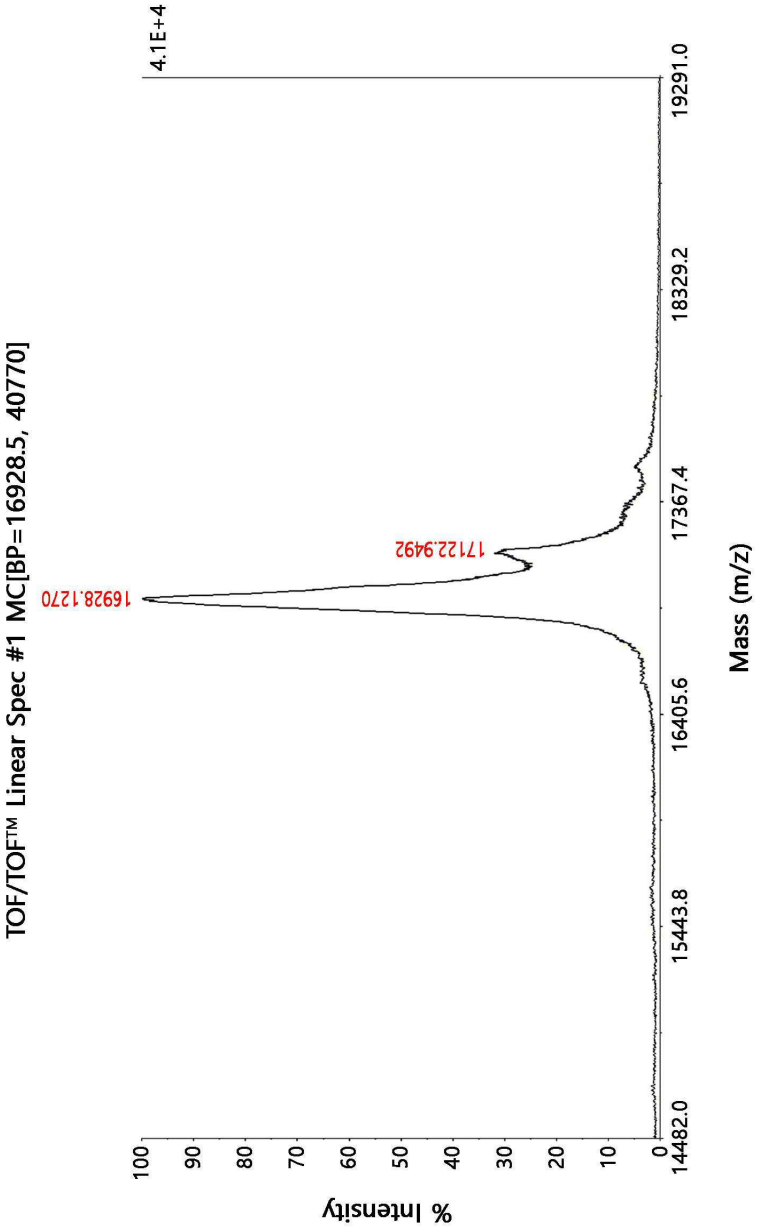
PubChem CID:	91972149
Structure:	 2D
	Find Similar Structures
Molecular Formula:	$C_{12}H_{19}O_{20}S_3^{-3}$
Chemical Names:	9064-57-7 CARRAGEENAN LAMBDA
Molecular Weight:	579.5 g/mol
Dates:	Modify: 2019-08-17 Create: 2015-11-02

Unit

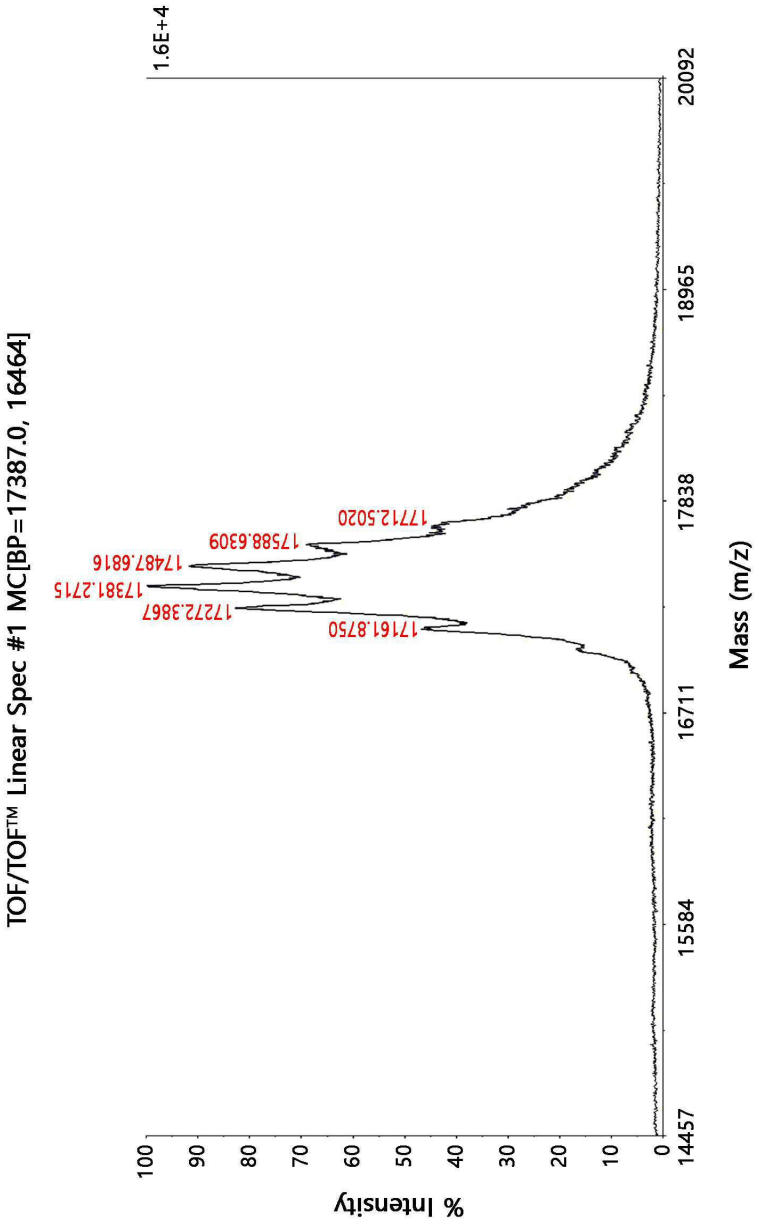
도면5



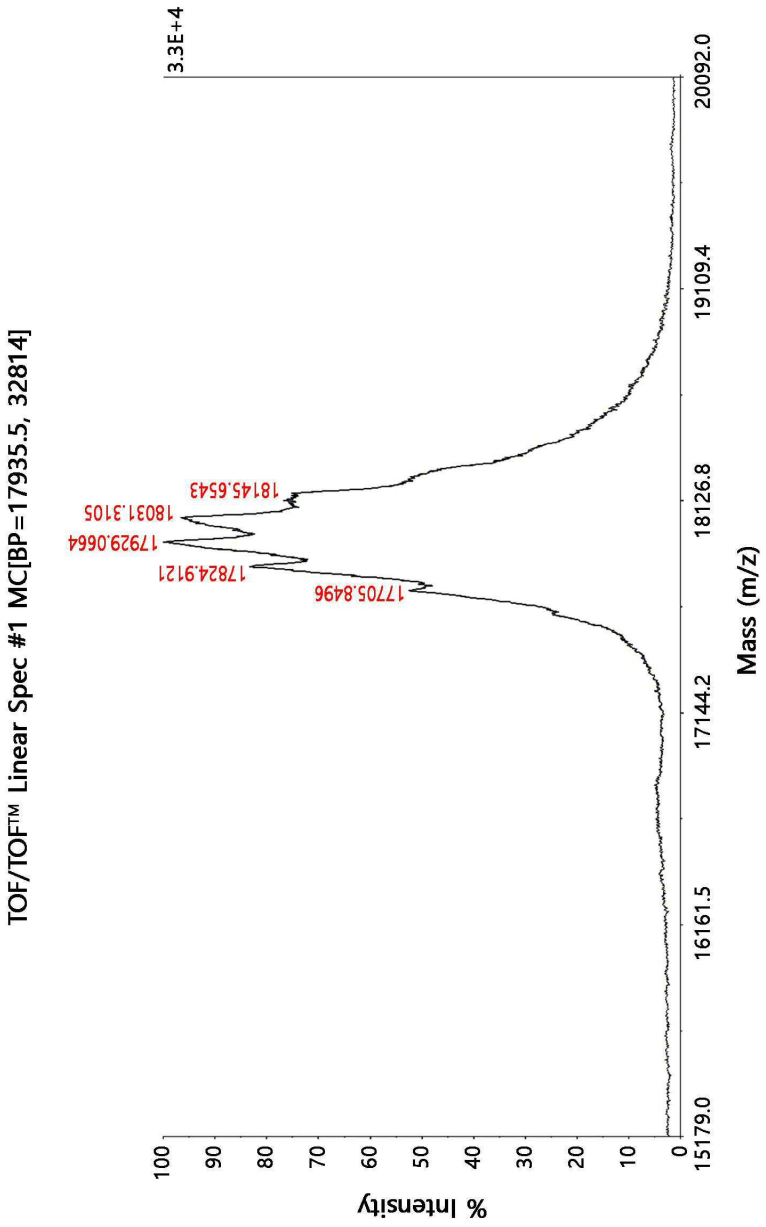
도면6


TOF/TOF™ Linear Spec #1 MC[BP=16928.5, 40770]
4.1E+4
% Intensity
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
14482.0
15443.8
16405.6
17367.4
18329.2
19291.0
Mass (m/z)
16928.1270
17122.9492

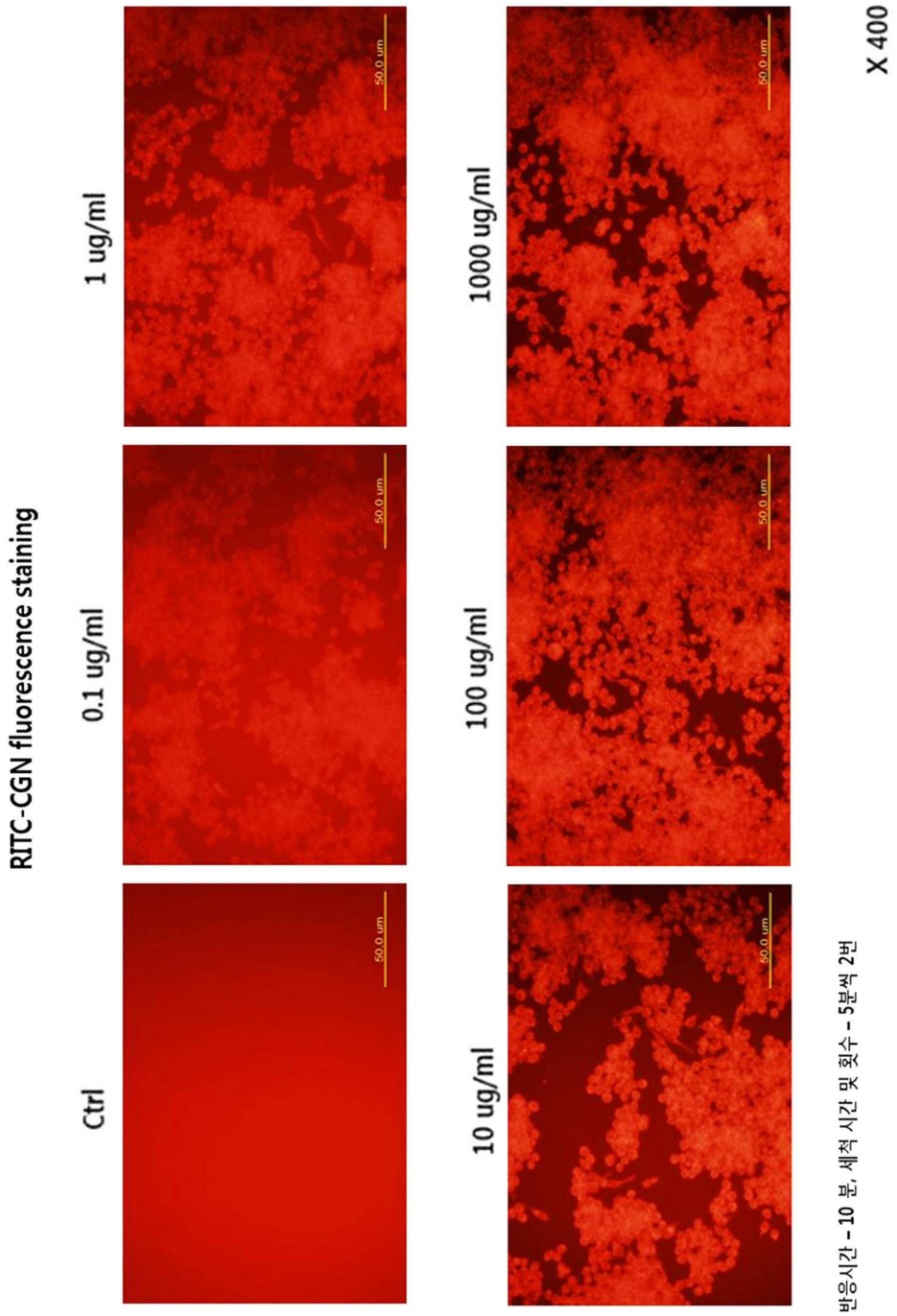
도면7


TOF/TOF™ Linear Spec #1 MC[BP=17387.0, 16464]
1.6E+4
% Intensity
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
14457
15584
16711
17838
18965
20092
Mass (m/z)
17161.8750
17272.3867
17381.2715
17487.6816
17588.6309
17712.5020

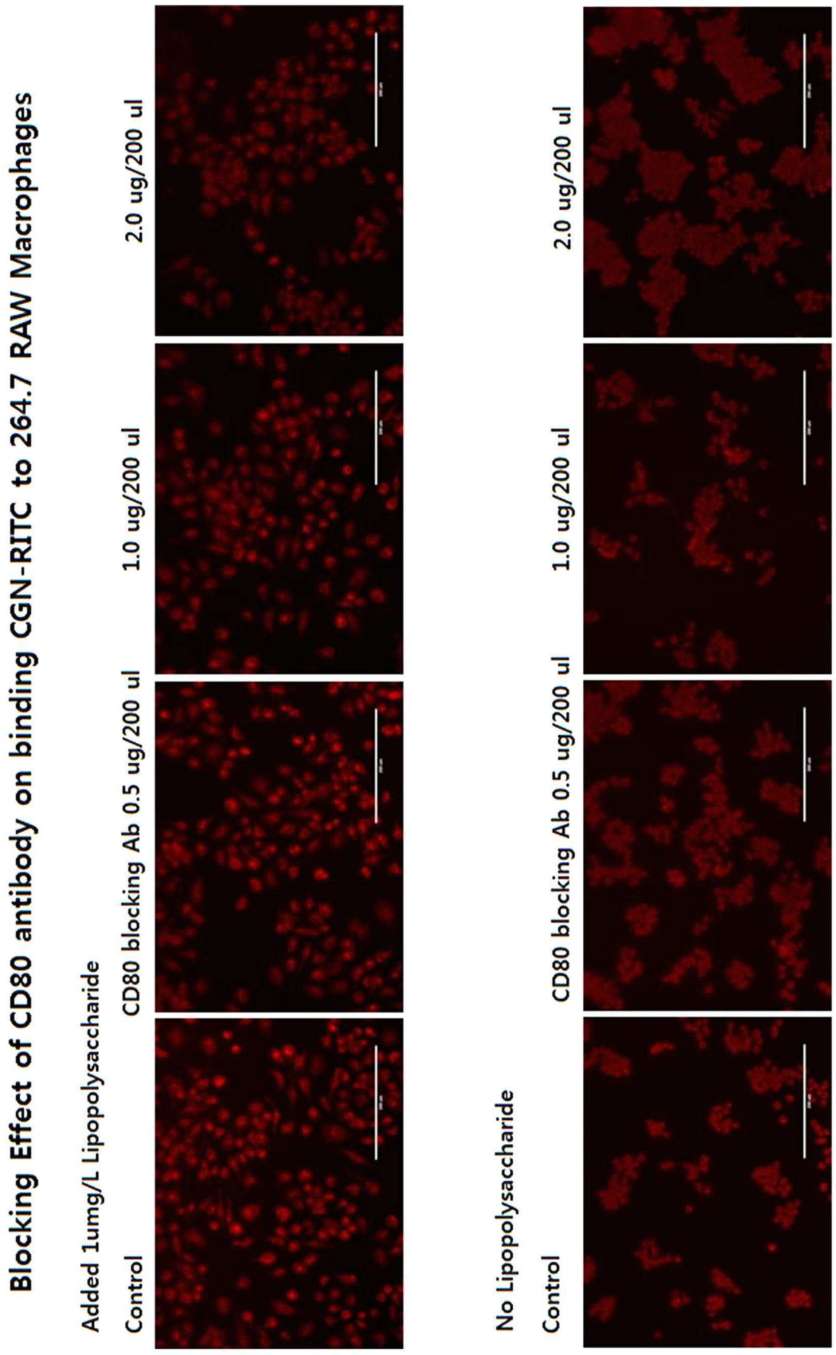
도면8


TOF/TOF™ Linear Spec #1 MC[BP=17935.5, 32814]
3.3E+4
% Intensity
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
15179.0
16161.5
17144.2
18126.8
19109.4
20092.0
Mass (m/z)
17705.8496
17824.9121
17929.0664
18031.3105
18145.6543

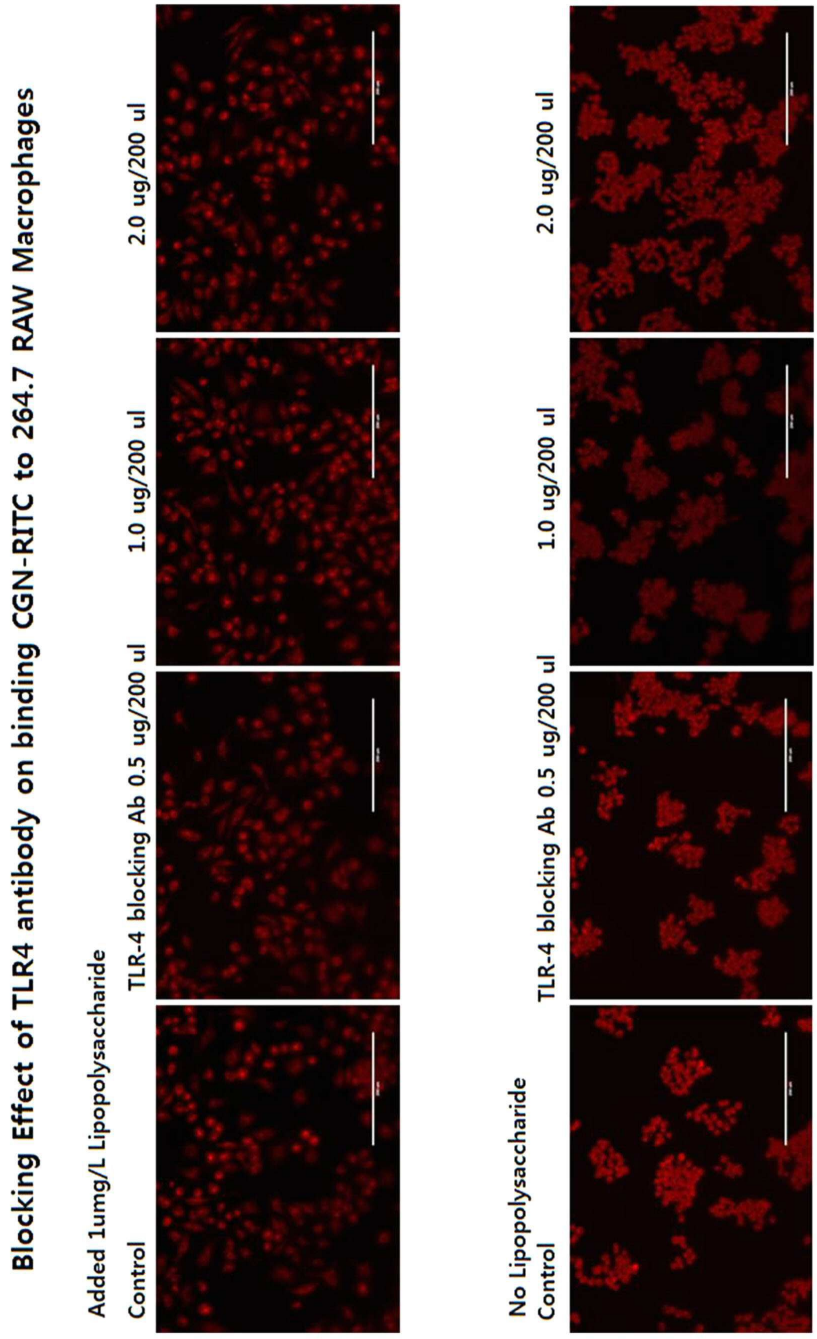
도면9


RITC-CGN fluorescence staining
Ctrl
0.1 ug/ml
1 ug/ml
10 ug/ml
100 ug/ml
1000 ug/ml
50.0 um
반응시간 - 10 분, 세척 시간 및 횟수 - 5분씩 2번
X 400

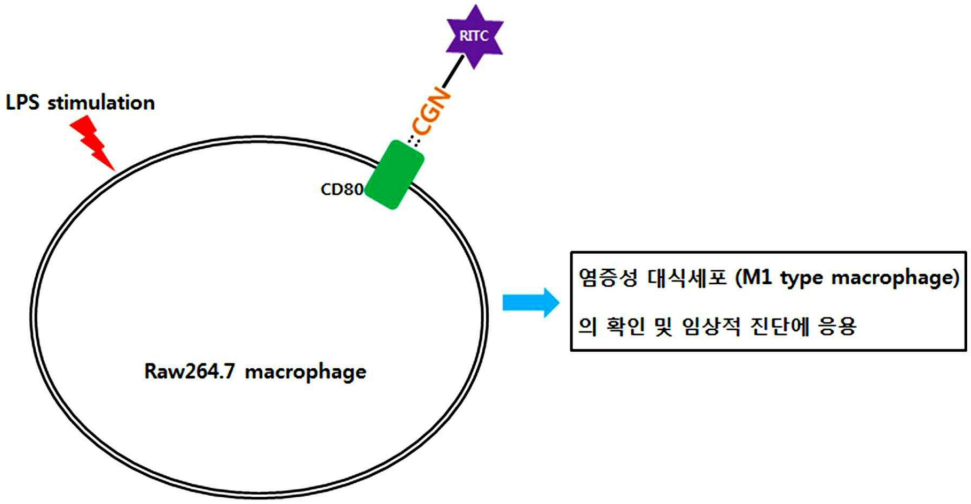
도면10


Blocking Effect of CD80 antibody on binding CGN-RITC to 264.7 RAW Macrophages
Added 1umg/L Lipopolysaccharide
Control
CD80 blocking Ab 0.5 ug/200 ul
1.0 ug/200 ul
2.0 ug/200 ul
No Lipopolysaccharide
Control
CD80 blocking Ab 0.5 ug/200 ul
1.0 ug/200 ul
2.0 ug/200 ul

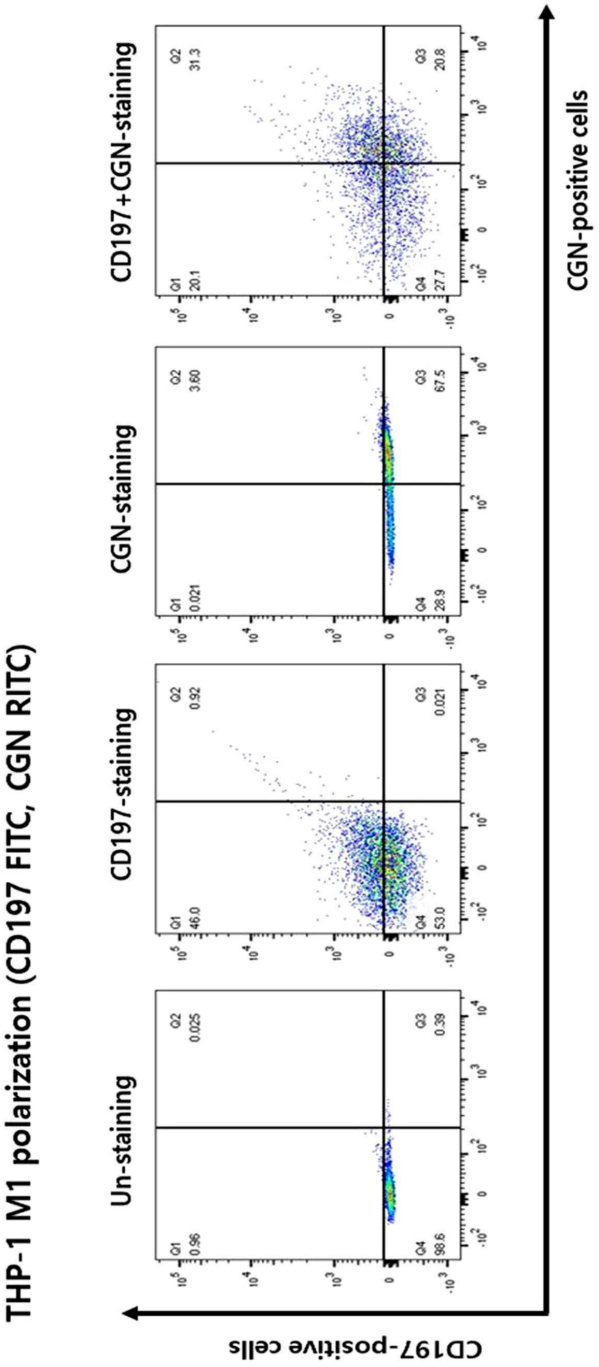
도면11


Blocking Effect of TLR4 antibody on binding CGN-RITC to 264.7 RAW Macrophages
Added 1umg/L Lipopolysaccharide
Control
TLR-4 blocking Ab 0.5 ug/200 ul
1.0 ug/200 ul
2.0 ug/200 ul
No Lipopolysaccharide
Control
TLR-4 blocking Ab 0.5 ug/200 ul
1.0 ug/200 ul
2.0 ug/200 ul

도면12


RITC
CGN
LPS stimulation
CD80
Raw264.7 macrophage
염증성 대식세포 (M1 type macrophage)
의 확인 및 임상적 진단에 응용

도면13


THP-1 M1 polarization (CD197 FITC, CGN RITC)
Un-staining
CD197-staining
CGN-staining
CD197+CGN-staining
CD197-positive cells
CGN-positive cells