



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0056492
(43) 공개일자 2016년05월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/18 (2006.01) A61K 49/08 (2006.01)

A61K 49/10 (2006.01) A61K 49/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0156410

(22) 출원일자 2014년11월11일

심사청구일자 2014년11월11일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

한국과학기술원

대전광역시 유성구 대학로 291(구성동)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

김진원

서울 서초구 신반포로 45, 60동 306호 (반포동, 반포아파트)

박경순

강원도 춘천시 효자2동 강원대학길 1 강원대학교 내 집현관 306호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 13 항

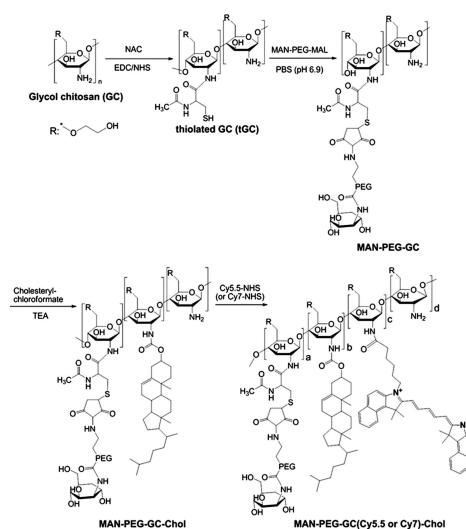
(54) 발명의 명칭 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조영제 조성물

(57) 요약

본 발명은 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체는 동맥경화반에 존재하는 염증 내 대식세포를 표적하여 인지하는 것이 가능하다. 또한 상기 키토산 나노입자 복합체에는 상기 대식세포를 표적하는 것뿐 만이 아니라, 동맥경화반에 존재하는 염증의 정도를 평가해 내는 것이 가능하다. 그러므로 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 조영제로 활용하게 되면, 동맥경화 여부의 진단이 가능할 뿐만 아니라, 동맥경화에 의한 협착 이전 단계에서도 염증의 정도를 통해 동맥경화의 진행 양상을 진단하는 것이 가능해져, 동맥경화에 따른 각종 합병증도 조기에 진단 또는 예방하는 것이 가능하게 된다.

대표도 - 도1



(71) 출원인

한국기초과학지원연구원

대전광역시 유성구 과학로 169-148 (어은동)

한양대학교 산학협력단

서울특별시 성동구 왕십리로 222(행당동, 한양대학교내)

(72) 발명자

오왕열

대전광역시 유성구 대학로 291 (구성동, 한국과학기술원)

유홍기

서울특별시 성동구 행당로 79, 108동 102호 (행당동, 행당동대림아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R1209883

부처명 미래부연구재단

연구관리전문기관 의료원산학협력팀

연구사업명 중견연구자지원_핵심연구(공동)

연구과제명 혈관내 광단층-조직분광-나노분자영상 완전 통합기법 개발을 통한 관상동맥내 파열 고위험 동맥경화반 영상검출 생체내 검증

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

친수성인 키토산의 아민기에;
소수성의 콜레스테릴 유도체가 결합하여 자기조립체를 형성하며; 및
상기 자기조립체에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체;
가 결합하여 형성된 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 친수성인 키토산은 키토산, 메틸글라이콜 키토산(Methylglycol chitosan), 키토산 올리고당 및 글라이콜 키토산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 친수성인 키토산은 글라이콜 키토산인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 소수성의 콜레스테릴 유도체는 콜레스테릴 에스터, 콜레스테릴 클로로포르메이트 및 콜레스테릴 벤조에이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 표적 리간드는 만노스아민 또는 만노스포스페이트인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 근적외선 형광체는
Cy 계열인 Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5이거나;
또는 Rhodamine 계열인 TAMRA, Texas Red, Rhodamine이거나;

또는 Alexa 계열이거나;

또는 BODIPY 계열이거나; 및

또는 ROX 계열이거나;

또는 이들 각각의 형광유도체인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체.

청구항 7

1) 친수성인 키토산의 아민기에 소수성의 콜레스테릴 유도체를 결합시킨 후, 상기 결합체가 나노입자로 자기조립하는 단계; 및

2) 상기 자기조립한 나노입자에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체를 결합시키는 단계;

를 포함하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 친수성인 키토산은 키토산, 메틸글라이콜 키토산(Methylglycol chitosan), 키토산 올리고당 및 글라이콜 키토산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 친수성인 키토산은 글라이콜 키토산인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 소수성의 콜레스테릴 유도체는 콜레스테릴 에스터, 콜레스테릴 클로로포르메이트 및 콜레스테릴 벤조에이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 표적 리간드는 만노스아민 또는 만노스포스페이트인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 근적외선 형광체는

Cy 계열인 Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 또는 Cy7.5이거나;

Rhodamine 계열인 TAMRA, Texas Red, Rhodamine이거나;

Alexa 계열이거나;

BODIPY 계열이거나; 및

ROX 계열이거나;

또는 이들 각각의 형광유도체인 것을 특징으로 하는 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법.

청구항 13

제1항에 따른 키토산 나노입자 복합체를 포함하는 동맥경화 진단용 조영제 조성물로서,

상기 키토산 나노입자 복합체는 만노스 수용체를 선택적으로 인지하여 동맥경화를 진단하는 동맥경화 진단용 조영제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 동맥경화는 혈관의 가장 안쪽 막(내피)에 콜레스테롤 침착이 일어나고 혈과 내피세포의 증식이 일어나 혈관이 좁아지거나 막히게 되어(협착) 그 혈관이 말초로의 혈류 장애를 일으키는 질환이다. 이러한 동맥경화는 단순히 동맥 협착을 유발하는 질환이 아니라, 서서히 진행되는 만성 염증 질환으로서 염증이 진행된 동맥경화반이 과열하게 되면 심근경색, 협심증, 뇌졸중 등 치명적인 합병증을 수반하게 된다. 이러한 합병증들은 협착이 심해진 경우에만 발생하는 것은 아니며, 비교적 협착이 심하지 않은 경우에도 발생한다. 즉, 동맥경화를 단순히 동맥의 협착이 발생한 경우로 한정하게 된다면, 동맥경화로 인해 발생하는 합병증은 진단이 어렵고 어떠한 대응도 용이하지 않게 된다. 그러므로 동맥경화를 진단하는데 있어서는 협착의 정도뿐 만 아니라, 염증이 진행된 동맥경화반의 염증 정도까지 상세하게 평가되어야만 동맥경화에 의한 합병증을 진단하고 대처하는 것이 가능하게 된다. 하지만, 현재 동맥경화를 진단하는 방법들은 동맥경화에 의한 협착의 정도만을 평가할 뿐, 염증의 정도를 평가하지는 못하기 때문에 동맥경화반의 진단 및 합병증의 발생 가능성 등을 적절히 진단하기 어렵다는 문제점이 있다.

[0003] 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 자기 공명 영상 (Magnetic Resonance Imaging: MRI), 양전자 방출 단층 촬영 (Position Emission Tomography: PET), 컴퓨터 단층 촬영 (Computed Tomography: CT)와 같은 영상 기법을 이용하여 고 위험 동맥경화반을 조기에 진단하는 연구들이 진행되고 있으나, 이러한 영상 기법들은 관상동맥과 같은 작은 혈관의 병변을 진단하기에는 해상도가 떨어지며, 심장 박동에 의한 동잡음(Motion artifact)을 극복하기 쉽지 않다. 또한, 최근에는 근적외선 광장을 이용한 광학 분자 영상 기법을 활용하고 있기는 하나, 이러한 방법은 주변 조직에 의한 산란이나 흡수가 적어 자가 형광을 이용한 조영제로서만 활용이 가능하고, 특정 세포 등을 표적하여 인지가 가능한 약물 전달제로서는 이용할 수 없어 특정 질병에 대한 진단이나 치료의 목적으로는 활용할 수 없다는 문제점이 있다.

[0004] 본 발명과 관련된 선행기술문헌으로는 대한민국 등록특허 제10-1286347호(특허문헌 1)가 있으며, 상기 특허문헌 1은 텍스트란 설페이트를 포함하는 블록공중합체로 도포된 산화철 복합 나노입자를 포함하는 동맥경화 진단용 조영제에 관한 것이다. 하지만, 상기 특허문헌 1에서도 염증 정도까지 평가하는 것이 가능한 동맥경화 진단용 조영제 조성물에 관하여는 어떠한 개시 또는 암시조차 되어있지 않은 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 등록특허 제10-1286347호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상술한 문제점을 해결하기 위해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 동맥경화반에 존재하는 염증을 발생시키는 대식세포를 표적으로 인지하는 것이 가능한 나노입자 복합체를 개발하고, 이를 포함한 조영제를 개발하여 초기 동맥경화에 의한 염증 정도까지를 효과적으로 진단하는 것을 목적으로 한다. 또한 이렇게 진단된 염증의 정도를 가지고 동맥경화에 의해 유발되는 각종 합병증 등을 진단 또는 예방하고자 하는 것이 본 발명의 목적이다.

과제의 해결 수단

[0007] 위와 같은 과제를 해결하기 위한 본 발명의 한 특징에 따른 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체는

[0008] 친수성인 키토산의 아민기에;

[0009] 소수성의 콜레스테릴 유도체가 결합하여 자기조립체를 형성하며; 및

[0010] 상기 자기조립체에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체;

[0011] 가 결합하여 형성된 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법은

[0013] 1) 친수성인 키토산의 아민기에 소수성의 콜레스테릴 유도체를 결합시킨 후, 상기 결합체가 나노입자로 자기조립하는 단계; 및

[0014] 2) 상기 자기조립한 나노입자에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체를 결합시키는 단계;

[0015] 를 포함한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 동맥경화 진단용 조영제 조성물은

[0017] 본 발명에 따른 상기 키토산 나노입자 복합체를 포함하는 동맥경화 진단용 조영제 조성물로서,

[0018] 상기 키토산 나노입자 복합체는 만노스 수용체를 선택적으로 인지하여 동맥경화를 진단한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체는 동맥경화반에 존재하는 염증 내 대식세포를 표적하여 인지하는 것이 가능하다. 또한 상기 키토산 나노입자 복합체에는 상기 대식세포를 표적하는 것뿐 만이 아니라, 동맥경화반에 존재하는 염증의 정도를 평가해 내는 것이 가능하다. 그러므로 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 조영제로 활용하게 되면, 동맥경화 여부의 진단이 가능할 뿐만 아니라, 동맥경화에 의한 협착 이전 단계에서도 염증의 정도를 통해 동맥경화의 진행 양상을 진단하는 것이 가능해져, 동맥경화에 따른 각종 합병증도 조

기에 진단 또는 예방하는 것이 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 제조과정 및 분자식을 도시한 그림이다.
- 도 2는 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 모식도이다.
- 도 3은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 형태 및 크기를 나타내는 사진이다.
- 도 4는 반응 시간에 따라 대식세포에서 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 섭취가 높아짐을 보여주는 사진이다.
- 도 5는 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 농도가 높아질수록 대식세포에서 이의 섭취가 높아짐을 보여주는 사진이다.
- 도 6은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체가 표적 리간드에 따라 대식세포에서 섭취량이 달라짐을 보여주는 사진이다.
- 도 7은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 농도에 따른 대식세포 생존율을 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 투여에 따른 조직 손상 여부를 보여주는 사진이다.
- 도 9는 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 동맥경화반 영상을 촬영한 사진이다.
- 도 10은 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 분포와 대식세포의 분포가 일치함을 보여주는 사진이다.
- 도 11은 광간섭 단층 영상기(Optical Coherence Tomography: OCT)와 근적외선형광(Near-Infrared Fluorescence: NIRF)을 융합한 신영상기를 이용하고, 하기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 혈관 내 동맥경화반을 광학 분자 영상화하는 모식도이다.
- 도 12는 생체 내 OCT-NIRF 융합 영상 단면이다.
- 도 13은 Cy7으로 표지된 만노스 수용체 표적 키토산 나노입자 복합체를 투여 받은 토끼에서 얻은 대동맥과 장골 동맥에서 얻은 생체의 형광 반사 영상이다.
- 도 14는 복부 대동맥 조직 단편의 조직으로 형광 현미경 영상(FM)에서 붉은색으로 보이는 Cy7 신호가 RAM-11으로 염색된 대식세포의 분포와 일치하여 Cy7으로 표지된 만노스 수용체 표적 키토산 나노입자 복합체가 대식세포에 결합하였음을 보여주는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이에 본 발명자들은 동맥경화반에 존재하는 염증의 정도까지 판별하는 것이 가능하여 동맥경화에 따른 각종 합병증까지도 조기에 진단 또는 예방하는 것이 가능한 키토산 나노입자 복합체를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조영제 조성물을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 구체적으로 본 발명에 따른 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체는
- [0023] 친수성인 키토산의 아민기에;
- [0024] 소수성의 콜레스테릴 유도체가 결합하여 자기조립체를 형성하며; 및
- [0025] 상기 자기조립체에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체;
- [0026] 가 결합하여 형성된 것이다.
- [0027] 이렇게 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체는 양친성 고분자 물질로서, 상기 양친성 고분자는 친수성 고분자 물질에 소수성 물질이 결합된 형태이다. 이러한 양친성 특징으로 인하여 본 발명의 키토산 나노입자 복합체는 나노 크기의 자기조립체 (Self-assembly)를 구성하며 소수성인 내부에 약물의 탑재가 가능하며, 봉입된 약제를 동맥경화반에 직접 고농도로 전달하는 것이 가능하다. 또한 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체는 동맥

경화반에 도달하기 전에 분해되거나 활성이 저하되는 것을 방지하고, 혈중 체류시간을 연장하는 것이 가능하다. 또한 만노스 수용체를 표적하는 표적 리간드가 부착된 것이다. 마지막으로 영상화를 위하여 근적외선 형광체가 부착된 것이다. 이러한 구성을 가진 키토산 나노입자 복합체는 수계에서 안정한 구조를 가졌으며, 상기 키토산 나노입자 복합체의 크기는 바람직하게는 50~100nm의 크기를 가지며, 구형을 형성하는 것이다.

[0028] 한편, 상기 친수성인 키토산은 고분자로서 키토산, 메틸글라이콜 키토산 (Methylglycol chitosan), 키토산 올리고당 및 글라이콜 키토산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 글라이콜 키토산인 것이 바람직하다. 상기 친수성의 키토산이 글라이콜 키토산인 경우에는 고분자 사슬에 양전하를 많이 함유하고 있어 조직에 흡수되는 축적 효율이 높으며, 글라이콜 키토산의 아민기는 소수성 물질 및 근적외선 형광체를 이용한 화학적 개질을 유도할 수 있어 바람직하다.

[0029] 또한 상기 소수성의 콜레스테릴 유도체는 콜레스테릴 에스터 (cholesteryl ester), 콜레스테릴 클로로포르메이트(cholesteryl chloroformate) 및 콜레스테릴 벤조에이트(cholesteryl benzoate)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 콜레스테릴 클로로포르메이트인 것이 바람직하다.

[0030] 한편, 상기 친수성인 키토산의 아민기에 소수성의 콜레스테릴 유도체가 결합하여 형성된 자기조립(Self-assembly)체인 양친성의 키토산 나노입자는 수성과 친수성의 균형을 통해 나노 자기조립체를 형성시킬 수 있고, 동맥경화반의 조직에 선택적으로 축적될 수 있다. 또한, 고분자 나노입자 복합체에 근적외선 투시가 가능한 근적외선 형광체의 화학적 개질이 용이해야 하며, 생체내 조직에서 강한 근적외선 형광을 나타낼 수 있다.

[0031] 또한 상기 표적 리간드는 만노스 수용체를 선택적으로 인지하여 표지하는 것이 가능한 것이라면 특별한 제한이 있는 것은 아니지만, 대식세포의 만노스 수용체에 선택성이 뛰어난 만노스아민 또는 만노스포스페이트인 것이 바람직하다.

[0032] 또한 상기 근적외선 형광체는 먼저 Cy 계열인 Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5이거나, 또는 Rhodamine 계열인 TAMRA, Texas Red, Rhodamine이거나, 또는 Alexa 계열이거나, 또는 BODIPY 계열이거나, 또는 ROX(ROXTM, 실시간 PCR 기기 등에서 쓰이는 형광물질) 계열이거나 또는 이들 각각의 형광유도체인 것이 바람직하다.

[0033] 이러한 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체는 동맥경화시 염증을 유발하는 대식세포의 만노스 수용체를 효과적으로 표지하는 것이 가능하다. 그러므로 이를 포함하여 조영제 조성물로 활용하는 경우에는 동맥경화의 조기 진단 및 합병증 진단 및 예방 등에 효과적으로 활용하는 것이 가능하다.

[0034] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체의 제조방법은

[0035] 1) 친수성인 키토산의 아민기에 소수성의 콜레스테릴 유도체를 결합시킨 후, 상기 결합체가 나노입자로 자기조립하는 단계; 및

[0036] 2) 상기 자기조립한 나노입자에 만노스 수용체를 선택적으로 인지하는 표적 리간드 및 근적외선 형광체를 결합시키는 단계;

[0037] 를 포함한다.

[0038] 한편, 상기 친수성인 키토산은 고분자로서 키토산, 메틸글라이콜 키토산 (Methylglycol chitosan), 키토산 올리고당 및 글라이콜 키토산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 글라이콜 키토산인 것이 바람직하다.

[0039] 또한 상기 소수성의 콜레스테릴 유도체는 콜레스테릴 에스터, 콜레스테릴 클로로포르메이트 및 콜레스테릴 벤조에이트로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하다.

[0040] 또한 상기 표적 리간드는 만노스아민 또는 만노스포스페이트인 것이 바람직하다.

[0041] 또한 상기 근적외선 형광체는 먼저 Cy 계열인 Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7, Cy7.5이거나, 또는 Rhodamine 계열인 TAMRA, Texas Red, Rhodamine이거나, 또는 Alexa 계열이거나, 또는 BODIPY 계열이거나, 또는 ROX 계열이거나 또는 이들 각각의 형광유도체인 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명의 또 다른 특징에 따른 동맥경화 진단용 조영제 조성물은 본 발명에 따른 키토산 나노입자 복합체를 포

함한다.

[0043] 한편, 상기 키토산 나노입자 복합체는 만노스 수용체를 선택적으로 인지하여 동맥경화를 진단하게 된다.

[0044] 이러한 본 발명에 따른 조영제 조성물은 동맥경화반의 염증 정도를 효과적으로 평가하는 것을 가능하게 하는 조영제 조성물이며, 이를 통해 동맥경화 여부를 조기 진단하는 것이 가능하게 되고, 동맥경화에 의해 유발되는 각종 합병증 또한 조기에 진단하고 예방하는 것을 가능하게 한다.

[0045] 이하 본 발명을 바람직한 실시예를 참고로 하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0046] **실시예: 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자와 근적외선 형광체의 복합체의 제조**

[0047] 생체 적합성/생분해성 특징을 가지는 친수성 글라이콜 키토산(glycol chitosan)을 기본으로 하여 그 아민 그룹에 소수성인 콜레스테릴 클로로포메이트(cholesteryl chloroformate)를 화학적으로 결합하여 양친성 키토산을 제조하고, 이를 이용하여 자기 조립 (Self-aggregate)방법으로 나노입자를 제조하였다. 또한 표적하는 동맥경화반에 도달하기 전에 분해되거나 활성이 저하되는 것을 방지하고, 혈중 체류시간을 연장하도록 폐길화(PEGylation)을 시행하였으며, 표적 리간드로써 만노스아민(mannosamine)을 부착하여 만노스 수용체를 표적하였다. 마지막으로 영상화를 위하여 근적외선 형광체인 Cy5.5 또는 Cy7를 부착하여 최종 동맥경화 진단용 키토산 나노입자 복합체를 제조하였다.

[0048] 한편, 이러한 키토산 나노입자 복합체의 분자식은 하기 도 1과 같고, 그 결과로 제조된 키토산 나노입자 복합체의 모식도는 하기 도 2와 같다.

[0049] **실험예**

[0050] **<실험예 1: 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노 입자의 형태적 특성>**

[0051] 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체의 광학적 특성을 관찰하기 위하여 상기 실시예에서 제조한 키토산 나노입자 복합체를 1 mg을 1 ml의 PBS에 녹인 후 0.45 마이크로 필터로 여과하여 나노입자를 형성한 후 주사 전자 현미경 (SEM)과 투과 전자 현미경으로 그 입자를 관찰하였다.

[0052] 그 결과 하기 도 3에서 보는 바와 같이 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체는 50~100 nm의 지름을 가지는 균일한 형태의 구체임을 확인할 수 있었다.

[0053] **<실험예 2: 시험관 내에서 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 대식세포 결합능 평가(FACS 분석)>**

[0054] 상기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 농도 및 반응 시간에 따른 대식 세포(RAW 264.7 세포)에 의한 키토산 나노입자 복합체의 섭취를 평가하였다. 우선 RAW264.7 세포 배지 위에 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체를 각각 200 μ g 처리하고 0 분, 10 분, 30 분, 1 시간, 그리고 2 시간 후에 근적외선 신호를 측정하였다. 그러자 하기 도 4에서 보여지는 바와 같이, 일정농도하에서 시간이 증가함에 따라 근적외선 신호가 강해졌다. 반응 시간을 일정하게 유지하되 키토산 나노입자 복합체의 농도를 0 μ g/ml, 25 μ g/ml, 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml로 증가시켰을 경우 하기 도 5에서 보여지는 것처럼 키토산 나노입자 복합체의 농도와 비례하여 근적외선 신호가 강해졌다. 이는 시간 및 농도에 비례하여 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체가 대식세포에 더 많이 결합함을 알 수 있다. 또 다른 특징으로는 대식세포에 결합된 키토산 나노입자 복합체의 신호가 세포막에서만 보여지는 것이 아니라, 세포질 내에서도 확인된다는 점이며, 이는 나노입자가 세포 내부로 효과적으로 섭취됨을 의미한다. 이러한 특징은 약물 전달체로써 사용될 경우 유용한 특징이다. 또한 만노스 수용체에 대한 특이적 결합능을 평가하기 위하여 나노입자와 RAW264.7 세포를 반응시키기 전 만노스 아민으로 미리 처리하는 차단 실험을 시행하였다. 하기 도 6에서 보여지는 바와 같이 만노스 아민으로 미리 처리하는 경우, RAW264.7 세포에 의한 나노입자의 섭취가 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0055] **<실험예 3: 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 독성 평가 실험>**

[0056] MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석은 세포의 생존도를 측정하여 바이오표지물에 의한 독성을 알아보기 위한 측정 방법이다. 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체의 세포독성(cytotoxicity)을 측정하기 위하여 Raw 264.7 대식세포(macrophage)를 대상으로 MTT 분석을 수행하였다. Raw 264.7 대식세포를 웰당 1×10^4 세포수가 되게 96-웰 플레이트에 분주한 다음 이를 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 배양 후 다양한 농도의 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체가 함유된 새로운 배지로 교체하였다. 24 시간 후 0.5 mg/ml의 MTT를 첨가한 다음 4 시간 더 배양하였다. 4 시간 배양 후 배지를 제거한 다음 세포의 생존율을 분석하였다. 하기 도 7의 결과에서 알 수 있듯이 실시예에 따른 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체의 농도가 증가함에 따라 세포 생존도 감소는 미미하여, 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 세포독성이 문제가 되지 않는 수준임을 확인할 수 있었다.

[0057] 또한 생체내에서 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 독성을 확인하기 위하여 3 마리의 쥐(CL57BL/6)에게 미 정맥을 통하여 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체를 투여하고 72 시간 동안 관찰한 뒤에 폐, 간, 비장, 콩팥과 같은 주요장기를 채취하여 조직학적 분석을 시행하였다. 3 마리의 쥐 모두 투약 후 72 시간 동안 별다른 이상 행동을 보이지 않았다. 조직학적 분석에 있어서도 하기 도 8에서 보여지듯, 폐, 간, 비장, 콩팥과 같은 주요 장기 손상의 증거가 없었다. 따라서 생체 내 환경에서도 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체가 큰 독성을 나타내지 않음을 알 수 있다.

[0058] **<실험예 4: 동맥 경화 쥐에서 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용한 생체 내 동맥경화 영상화>**

[0059] 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체의 대식세포에 대한 표적성을 이용하여, 생체 내에서 동맥경화반의 광학 분자 영상화가능성을 평가하기 위하여 동맥경화를 유발한 쥐(ApoE^{-/-})와 정상쥐(C57BL/6)에 본 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 투약하였다. 여기서 동맥경화를 유발한 ApoE^{-/-} 쥐는 2개의 군으로 나눠, 한 개 군에는 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체를 투여하였으며 (10mg/kg), 나머지 한 군에는 Cy5.5로 표지된 비표적성 키토산 나노 입자를 투여하였다(10mg/kg). 정상쥐 군에는 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자를 투여하였다(10mg/kg). 약물 투입 48시간 후 추가로 혈관 전체 영상을 얻기 위하여 형광 이소 티오 시아 네이트- 텍스트란 (fluorescein isothiocyanate-dextran: FITC-dextran, 분자량 2,000,000)을 10 mg/kg로 투약하였다. 이후 경동맥을 노출 시킨 후 생체내 형광 현미경으로 경동맥 동맥경화반을 관찰하였으며, 그 결과는 하기 도 9에서 보여지는 바와 같이 ApoE^{-/-}쥐에게 Cy5.5로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자를 투여하였을 경우 동맥경화가 있는 부분에서 Cy5.5의 강한 형광 신호가 확인되었으나, 비특이적인 키토산 나노 입자를 투여하거나, 동맥경화반이 없는 정상쥐에 투여되었을 경우에는 의미있는 형광 신호가 확인되지 않았다(하기 도 9에서는 나노 입자에 의한 Cy5.5 신호는 붉은 색으로, FITC-dextran에 의한 혈관 영상은 녹색으로 나타내었으며, 만노스 수용체 표적 키토산 나노입자 복합체를 투여받은 ApoE^{-/-} 쥐(ApoE^{-/-} mouse MMR-Cy5.5)에서만 동맥 경화반 특이적인 근적외선 신호를 획득할 수 있음을 보여줌). 이러한 동맥경화반 특이적인 형광 신호가 실제로 동맥경화반 내에 있는 대식세포에서 기인한 것임을 확인하기 위하여 동맥경화 유발 쥐에서 적출한 경동맥의 동맥경화반을 H&E 염색, MAC3 염색(대식세포 염색), SMA 염색(평활근세포 염색)을 시행하였다. 하기 도 10에서 보여지듯 조직 분석 결과 동맥경화반의 형성과 대식세포의 침윤을 확인하였으며, 형광현미경을 이용하여 키토산 나노입자 복합체의 분포와 대식세포의 분포가 일치함을 확인하여, 경동맥 동맥경화 반에서 확인한 근적외선 형광 신호가 동맥경화반 내의 대식세포에서 기인함을 확인하였다.

[0060] **<실험예 5: 동맥경화 토끼에서 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용한 혈관 내 동맥경화 영상화>**

[0061] 최근, 임상적으로 널리 사용되고 있는 높은 공간 해상도를 갖는 광간섭 단층 영상기(Optical Coherence Tomography: OCT) 와 새롭게 대두되고 있는 근적외선형광(Near-Infrared Fluorescence: NIRF) 기술을 융합하여 생체 내에서 시행 가능한 새로운 분자영상 기법이 소개되었다. 이러한 방법은 구조적, 형태학적 정보를 기반으로 한 영상만을 제공하는 OCT의 한계를 NIRF 기술과의 융합을 통해 극복하여 동맥경화반에 의한 협착의 정도에 대한 양적인 정보뿐 아니라, 상기 실시예에 따른 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 염증의 정도와 불안정성의 정도에 대한 질적인 정보를 같이 제공할 수 있어 더욱 더 효과적으로 죽상동맥경화반의 위험도를 평가할 수 있게 되었다. 이 시스템에 대한 모식도는 하기 도 11과 같다.

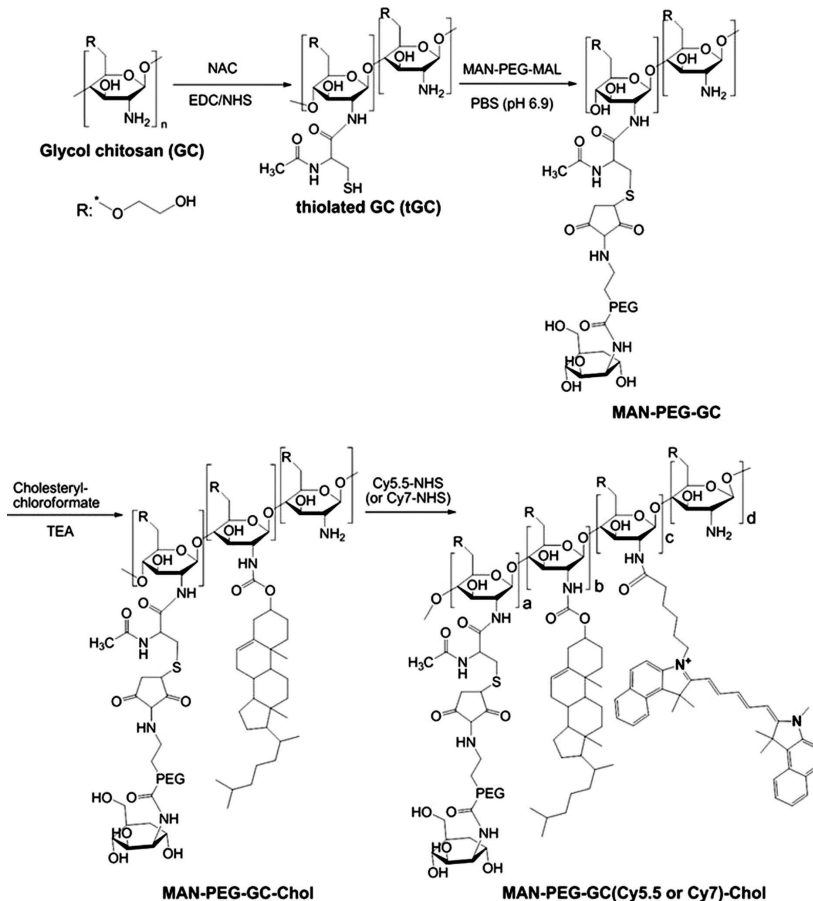
[0062] 상기 영상 기법과 Cy7으로 표지된 만노스 수용체 특이적인 키토산 나노입자 복합체를 이용하여 인간의 관상동맥 직경과 유사한 토끼의 대동맥과 장골동맥에서 동맥경화반의 광학 분자 영상화 실험을 진행하였다. 토끼의 복부 대동맥과 우측 장골 동맥 내에서 압력 손상(풍선 확장)을 통해 손상을 입히고, 이후 고지방식이를 8 주간 먹여 동맥경화를 유발시켰다. 이후 상기 나노물질을 정맥주입 하고 이틀 후에 OCT-NIRF 카테터 시스템으로 영상을 얻은 것이 하기 도 12가 되겠다. 하기 도 12는 실시간으로 생체내에서 얻은 OCT-NIRF 융합 영상의 단면이 되겠으며 흰색 화살표로 표시된 부분이 대식세포가 다량으로 포함되어 있는 죽상동맥경화반의 형태학적 구조를 보여주고 있는 부분이 되겠으며 화살표 머리로 표시되어 있는 부분이 죽상동맥경화반의 대식세포 표면에 결합한 나노형광 합성 물질이 방출하는 근적외선 신호를 받아 영상화한 부분이다.

[0063] 하기 도 13은 OCT-NIRF 융합 영상을 얻은 토끼의 복부 대동맥 및 장골 동맥의 박리를 시행하고 생체 외에서 진행한 형광반사영상이 되겠다. 양쪽 방향 화살표로 표시된 부분이 풍선 확장술을 통해 혈관 손상을 준 부위가 되겠으며 이 부위의 죽상동맥경화반에 결합되어 있는 나노형광합성 물질이 강한 신호를 방출하는 것을 알 수 있다. 점선으로 표시된 부분의 단면을 OCT-NIRF 융합 영상으로 확인한 것이 위의 하기 도 12이 되겠다. 나노형광합성 물질은 죽상동맥경화반 조직 내로의 침투가 중요한 문제가 될 수 있어 이를 확인하기 위해 복부대동맥 조직 단편을 잘라 형광 현미경으로 촬영하였고 이와 관련한 영상이 하기 도 14가 되겠다.

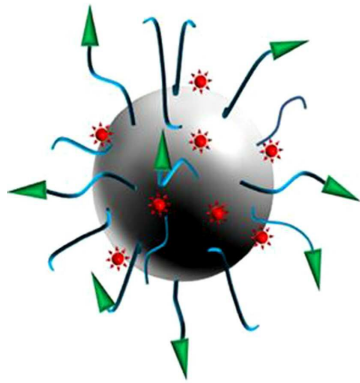
[0064] 상기에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 설명하였지만, 본 발명은 이에 한정되는 것은 아니고, 본 발명의 기술 사상 범위 내에서 여러 가지로 변형하여 실시하는 것이 가능하고, 이 또한 첨부된 특허 청구 범위에 속하는 것은 당연하다.

도면

도면1

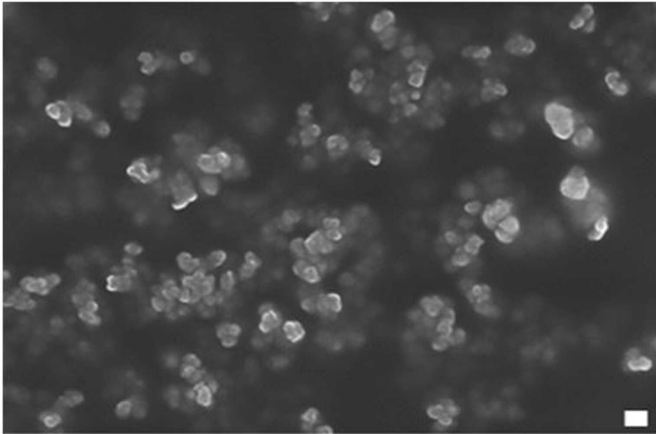


도면2

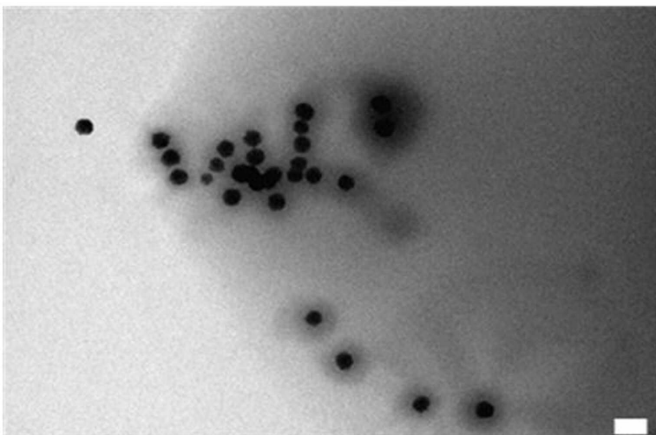


도면3

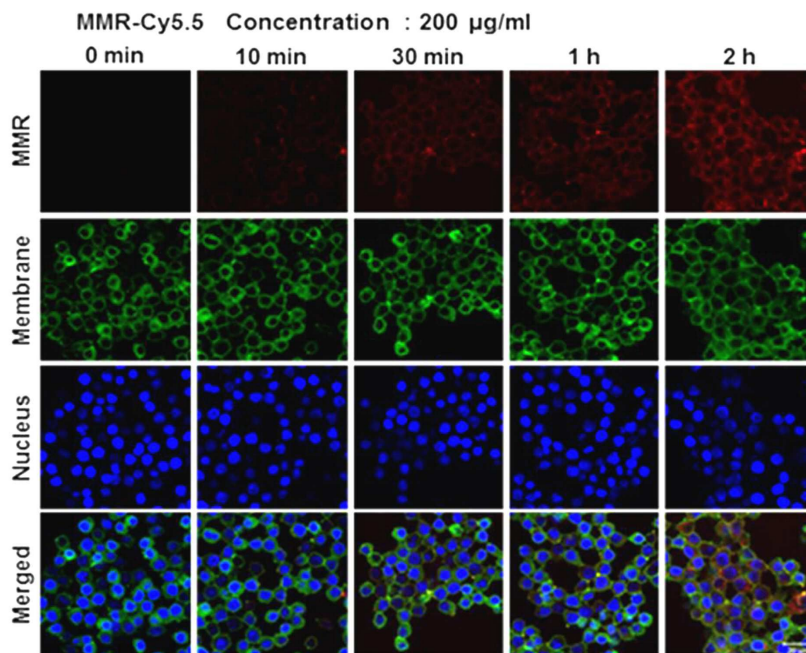
(a)



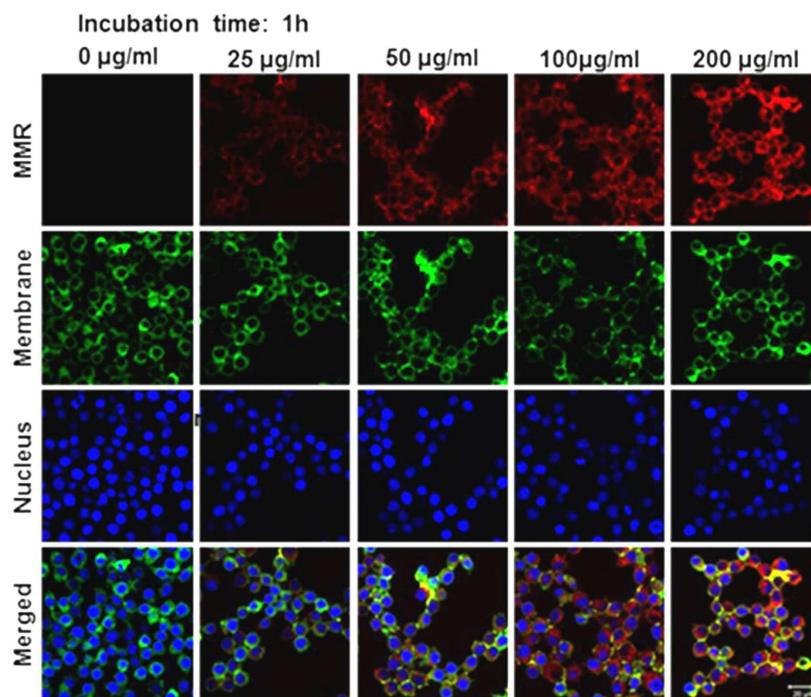
(b)



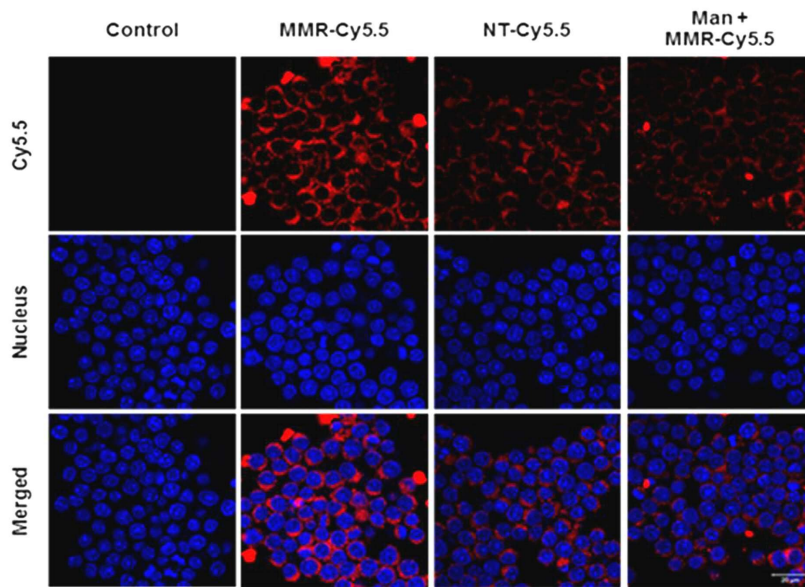
도면4



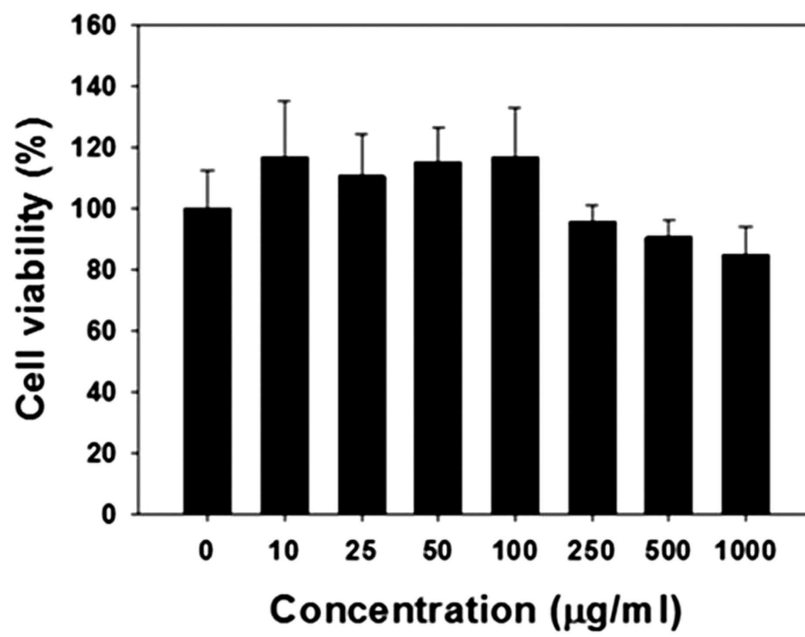
도면5



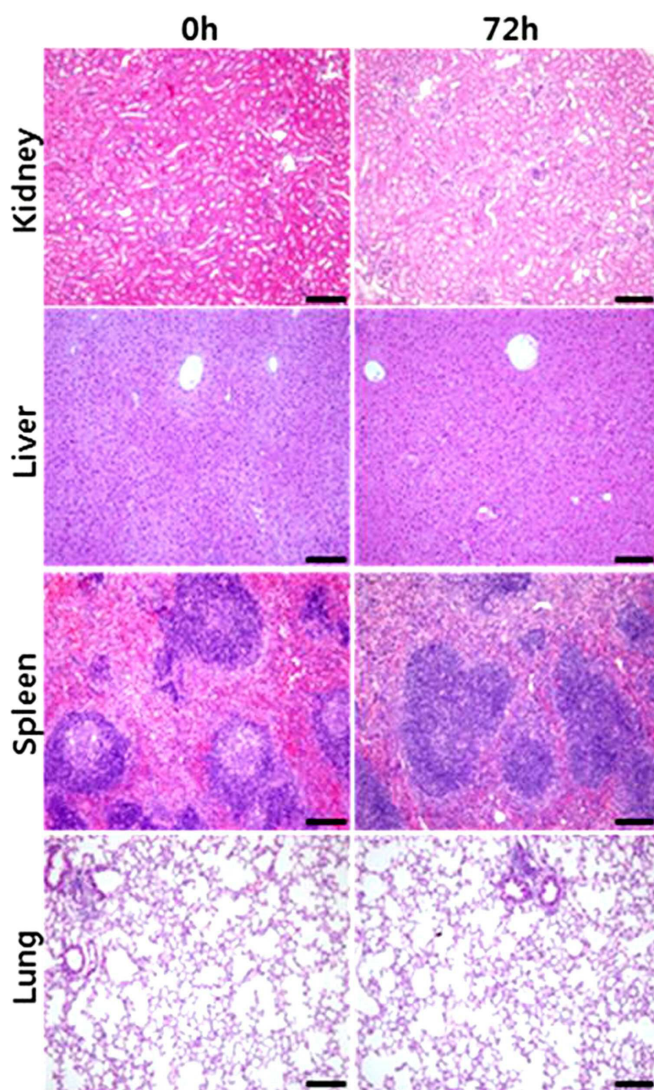
도면6



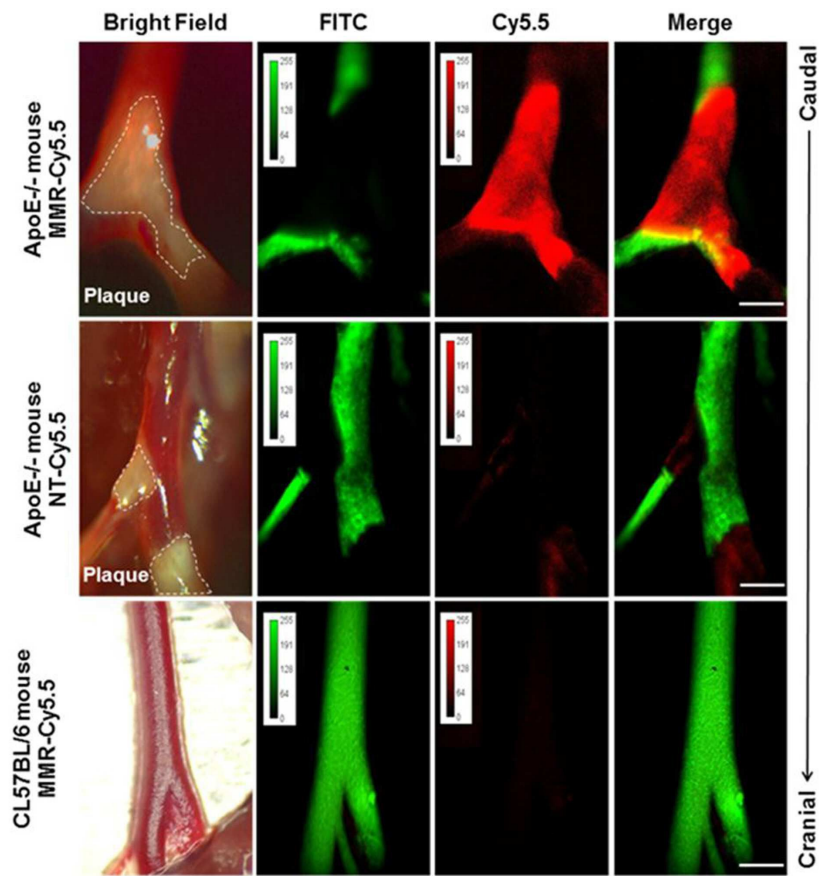
도면7



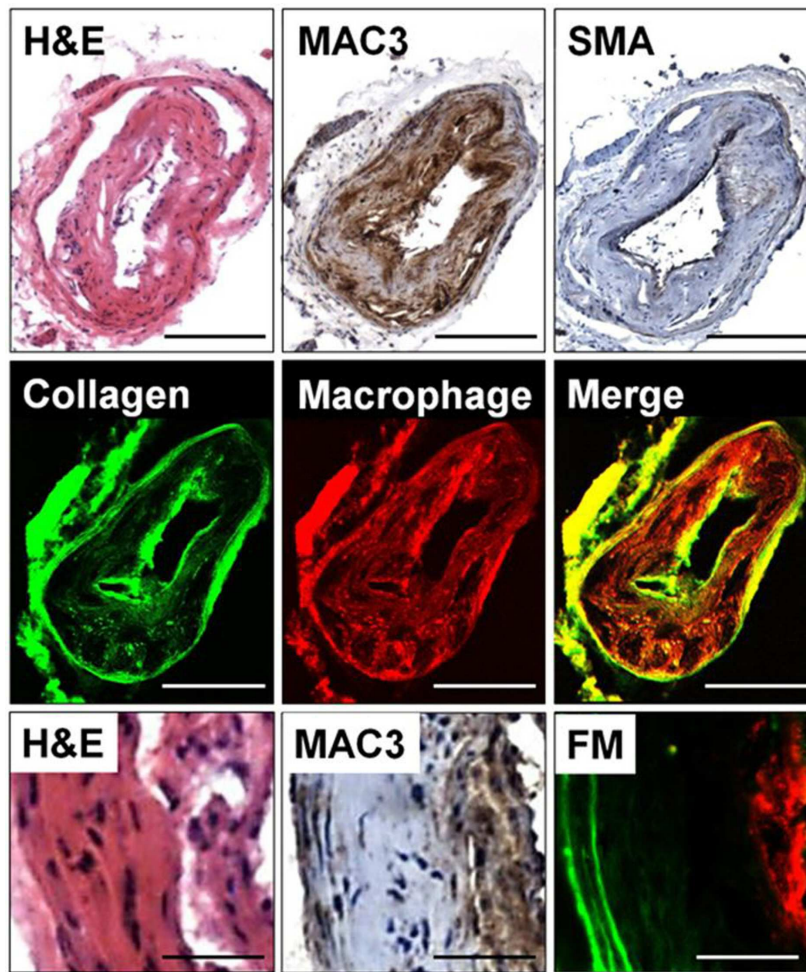
도면8



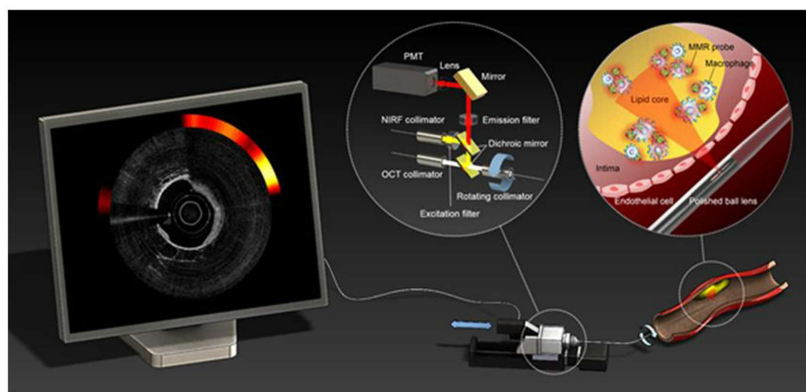
도면9



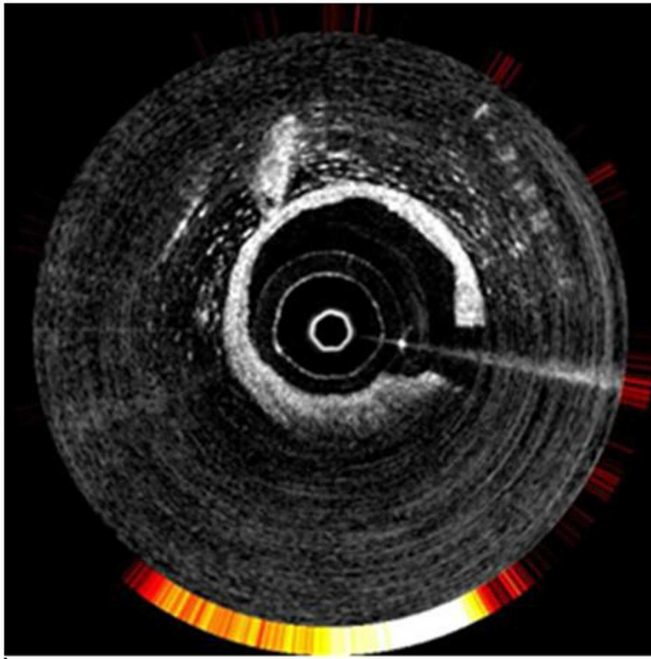
도면10



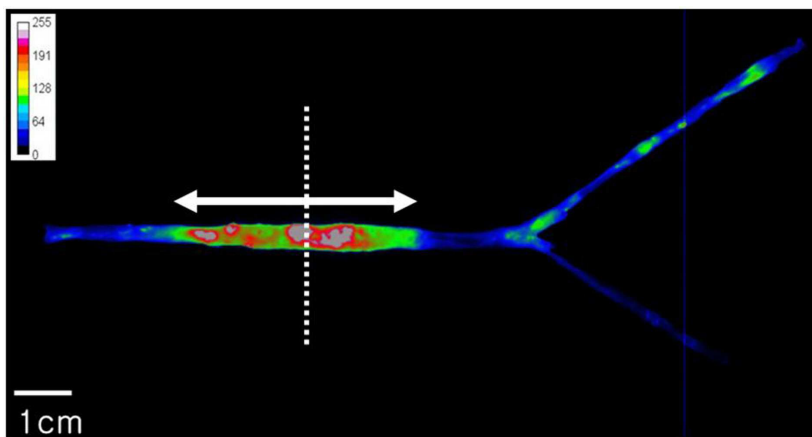
도면11



도면12



도면13



도면14

