



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0019837
(43) 공개일자 2017년02월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 49/0017 (2013.01)

A61B 5/0071 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0114239

(22) 출원일자 2015년08월13일

심사청구일자 2015년08월13일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

박찬

경기도 안양시 동안구 동편로 110, 301동 203호(관양동, 동편마을)

(74) 대리인

위병갑

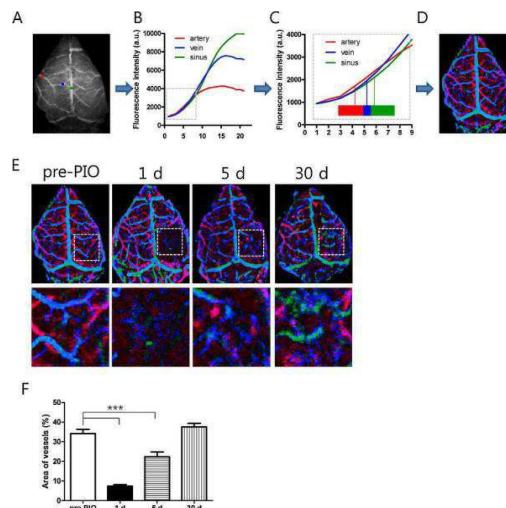
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 인도시아닌 그린을 이용하는 뇌허혈 질환의 광학 분석 방법

(57) 요약

본 발명은 뇌 허혈 질환, 가장 바람직하게는 뇌 경색 질환을 광학적으로 진단하고 분석하는 방법에 관한 것으로, 근적외선 형광염료, 특히 인도시아닌 그린을 이용하여 혈관 자체의 형태를 포함하여 뇌 경색 영역을 광학적으로 효과적으로 파악할 수 있는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61B 5/02007 (2013.01)

A61B 5/026 (2013.01)

A61K 49/0032 (2013.01)

A61K 49/0034 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

근적외선 형광염료를 포함하는, 뇌경색의 광학적 분석을 위한 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 근적외선 형광염료는

cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG, Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, 및 IRDye82로 구성된 군에서 선택되는 시아닌 계열 물질인 것을 특징으로 하는 뇌경색의 광학적 분석을 위한 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 근적외선 형광염료는 인도시아닌 그린(indocyanine green; ICG)인 것을 특징으로 하는 뇌경색의 광학적 분석을 위한 조성물.

청구항 4

다음을 포함하는, 뇌경색 부위를 광학적으로 분석하는 방법:

(i) 대상에게 근적외선 형광염료를 포함하는 뇌경색 분석용 조성물을 주입하는 단계;

(ii) 대뇌 혈류에 흐르는 상기 조성물의 흐름 또는 변화를 시간 연속적으로(시계열적으로, time-series) 촬영하는 단계; 및

(iii) 동맥, 정맥, 및 부비강을 각각 다른 색깔로 코드화하고 시간을 변수로 하여 형광의 세기를 측정하여 분석하는 단계.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 근적외선 형광염료는 인도시아닌 그린(indocyanine green; ICG)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제4항에 있어서, (i)에서,

상기 주입은 정맥주사법으로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, (ii)에서

상기 촬영은 830nm 파장 필터를 구비한 CCD 카메라로 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제4항에 있어서, (iii)에서

동맥은 빨간색으로, 정맥은 파란색으로, 부비강은 녹색으로 코드화하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

(iv) 주변 혈관은 톤 다운하고, 원하는 부위 혈관의 해상도를 높이는 단계를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

톤의 차이로 인해 혈관 형태에 대한 정보를 획득하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제4항 또는 제9항의 방법에 의해 획득되는 뇌경색 부위에 대한 정보의 제공 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 정보는 뇌경색 부위의 혈류 변화, 뇌혈관의 역학적 컬러 지도, 뇌 맥관구조 변화 및 혈관 형태로 구성되는 정보 중 1이상의 정보를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 뇌 허혈 질환, 가장 바람직하게는 뇌 경색 질환을 광학적으로 진단하고 분석하는 방법에 관한 것으로, 근적외선 형광염료, 특히 인도시아닌 그린을 이용하여 혈관 자체의 형태를 포함하여 뇌 경색 영역을 광학적으로 효과적으로 파악할 수 있는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌졸중이란, 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하출혈 등의 뇌혈관 장애 또는 허혈성 뇌질환의 총칭이다. 이들 뇌졸중의 병형 중, 최근에는 뇌경색이 상대적으로 증가하고 있다. 뇌경색 급성기의 약물 요법으로는 혈전 용해 요법, 항응고 요법, 항혈소판 요법, 뇌보호약 투여 등이 사용되고, 위독한 환자나 출혈성 뇌경색을 일으킨 환자에 대해서는 외과적 수술이 실시된다.

[0003] 뇌경색의 증상은 급성기에 가장 강하고, 그 후 서서히 개선되어 간다. 이것은, 괴사에 빠진 뇌 조직이 종창하여, 주위의 뇌 조직도 압박장애하고 있는 것에 의한다. 종창이 가라앉아 감과 함께, 주위의 조직이 기능을 회복하여 증상은 고정되어 가는 것이다. 단, 뇌허혈 부위로부터 방출되는 프리라디칼은 주위의 조직도 괴사시키는 기능이 있기 때문에 급성기를 지나가도 기능 예후의 향상으로 이어질 수 있기 때문에 계속적인 치료가 필요시되고 있다

[0004] 뇌경색의 임상 병형에는, 뇌내 소동맥이 폐색되어 발증하는 라쿠나 경색, 뇌내 대동맥이 죽종으로 폐색되어 발증하는 아테롬 혈전성 뇌경색, 심장 내의 혈전이 전자(栓子)가 되어 뇌내 동맥을 폐색하여 발증하는 심원성 뇌색전증 등이 있다. 이들 임상 병형에 따라 급성기 및 만성기의 적절한 치료법이 상이하기 때문에, 뇌경색 환자의 임상 병형을 신속하게 진단하는 방법이 요구되고 있었다

[0005] 일반적으로 뇌 경색 영역의 약 10%정도 차이에 따라 뇌 경색 질환을 앓고 있는 환자가 휠체어를 타느냐 또는 걸을 수 있느냐가 결정되는 것으로 알려져 있는바 뇌 경색 영역의 크기를 정확하게 측정하는 것은 뇌 경색 질환의 정도를 판단하는데 중요한 요소로 인식되고 있다.

[0006] 이러한 뇌졸중의 치료를 위하여 많은 약과 치료 기법이 개발되고 있는데, 상기와 같은 약이나 치료기법의 효용성은 그 약의 복용이나 치료로 인하여 뇌 경색 크기가 어느 정도 감소하는지를 기준으로 평가하기 때문에 뇌 경색 영역의 크기를 정확히 계산하는 것은 뇌졸중의 치료와 연구에 있어서 매우 중요한 부분에 해당한다

[0007] 종래에는 뇌졸중 동물 모델의 뇌 절편 이미지를 준비하여 이를 전문가가 육안으로 확인하여 수작업으로 뇌경색 영역의 경계선을 지정하면, 뇌 경색 경계선 안의 면적과 잘라낸 뇌 절편의 두께를 곱하여 뇌 경색 영역의 크기를 계산하는 방법을 사용하였다. 그러나 이와 같은 방법은 뇌 경색 영역을 결정하는 전문가의 숙련도에 따라 결

정 부위가 달라질 수 있어 균일한 결과가 나오기 어려웠으며, 정확도에 있어서 편차가 매우 크다는 단점과 함께, 뇌 절편마다 전문가가 뇌 경색 영역의 경계선을 세밀하게 수작업으로 수행해야 하였기 때문에 많은 시간이 소요되고, 번거로움이 따른다는 문제점이 있었다.

[0008] 또한 다른 방법으로, 뇌졸중 동물 모델의 뇌 절편 이미지를 준비하고, 뇌 절편 이미지상 정상 영역과 뇌 경색 영역의 녹색 가시광선의 흡수율이 다르다는 점을 이용하여 뇌 경색 영역을 결정하여 뇌 경색 영역의 면적과 뇌 절편의 두께를 곱하여 뇌 경색 영역의 크기를 계산하는 방법을 사용하였다. 그러나 이와 같은 방법도 녹색 가시광선의 흡수율에 따라 뇌 경색 영역을 구분 지을 수 있는 일정 기준치보다 밝거나 어둡게 나타난 뇌 절편 이미지에서는 뇌 경색 영역을 제대로 탐지하지 못하며, 정확도의 개선을 위해서 부가적인 장비가 필요하다는 문제점이 있었다.

[0009] 즉, 기존에는 대뇌 경색 부위를 분석하기 위하여 MRI, CT 등을 이용하였으나, 이는 고가의 비용이 소모되고 실험자들이 접근성이 떨어져 활용도가 매우 낮은 단점이 있다.

[0010] 이에 본 발명자들은 종래 혈류 속도 측정에 치중하였던 방법에서 더 나아가, 근적외선 형광물질인 인도시아닌 그린을 동물모델에 주입하고 이를 연속적으로 촬영하여 비교함으로써, 대뇌 혈관의 혈류변화, 뇌경색 부위의 범위 등을 두개골의 손상 없이 저비용으로 분석할 수 있는 광학적 방법을 고안하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 미국 특허출원공개 2010/0081136호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 허혈성 뇌질환, 특히 뇌경색 질환에 대한 진단 및 분석을 위해, 근적외선 형광염료를 이용함으로써, 종래 MRI, CT 등에 의한 고비용 및 혈류 변화 파라미터에 제한되어 있던 문제점을 해결할 수 있는, 새로운 광학적 방법의 뇌경색 부위 분석에 사용될 수 있는 조성물, 및 이를 이용하는 뇌경색 부위 분석방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또한 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법을 이용한 뇌 경색 부위에 대한 다양한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 근적외선 형광염료를 포함하는, 뇌경색의 광학적 분석을 위한 조성물을 제공한다.

[0015] 이 때, 상기 근적외선 형광염료는 cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG, Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, 및 IRDye82로 구성된 군에서 선택되는 시아닌 계열 물질인 것이 바람직하고, 인도시아닌 그린(indocyanine green; ICG)인 것이 가장 바람직하다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여, 다음을 포함하는, 뇌경색 부위를 광학적으로 분석하는 방법을 제공한다:

[0017] (i) 대상에게 근적외선 형광염료를 포함하는 뇌경색 분석용 조성물을 주입하는 단계;

[0018] (ii) 대뇌 혈류에 흐르는 상기 조성물의 흐름 또는 변화를 시간 연속적으로(시계열적으로, time-series) 촬영하는 단계; 및

[0019] (iii) 동맥, 정맥, 및 부비강을 각각 다른 색깔로 코드화하고 시간을 변수로 하여 형광의 세기를 측정하여 분석하는 단계.

- [0020] (i)에서, 상기 주입은 정맥주사법으로 수행되는 것이 바람직하다.
- [0021] (ii)에서 상기 촬영은 형광 영상을 수집할 수 있는 공지의 임의의 카메라로 수행될 수 있는데, 본 발명의 일 실시예에서는 830nm 파장 필터를 구비한 CCD 카메라로 수행하였다.
- [0022] (iii)에서 동맥은 빨간색으로, 정맥은 파란색으로, 부비강은 녹색으로 코드화하고, 시간을 변수로 하여 형광의 세기를 측정하여 분석함으로써, 뇌경색 영역에 대한 다양한 정보를 취득할 수 있다. 이러한 정보는 공지의 방법을 이용하여 계산하거나 도출할 수 있다.
- [0023] 상기 방법은 (iv) 주변 혈관은 톤 다운하고, 원하는 부위 혈관의 해상도를 높이는 단계를 추가로 더 포함하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0024] 특히, 이러한 톤(tone) 조절을 통해 뇌경색 부위의 혈관 형태 자체도 파악할 수 있게 되는 장점이 있다.
- [0025] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 취득되는 뇌경색 부위에 대한 정보의 제공 방법을 포함한다.
- [0026] 상기 정보는 본 발명의 광학적 분석 방법에 의해 취득할 수 있는 것이면 어떠한 것이든 무방하며, 예를 들어, 뇌경색 부위의 혈류 변화, 뇌혈관의 역학적 컬러 지도, 뇌 맥관구조 변화 및 혈관 형태로 구성되는 정보 중 1 이상의 정보를 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 근적외선 형광물질 인도시아닌 그린(ICG)을 기반으로 한 허혈성 뇌, 바람직하게는 뇌경색 부위를 광학적으로 분석하는 방법에 관한 것으로, 저비용 및 간단한 방법으로 시계열적 혈류의 변화뿐만 아니라 혈관의 형태까지도 파악할 수 있는 효과적인 방법인 바, 신뢰할 수 있는 뇌경색 부위의 정보를 취득할 수 있을 것이므로 그 응용범위를 확대시키는데 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 마우스 뇌에서 시계열적 ICG 이미징 및 컬러-코드화한 연뇌막 맥관구조의 이미지의 생성에 대한 관찰 결과를 나타낸 것이다[A:시계열적 ICG 이미징, B: ICG 픽셀의 역학관계 그래프, C: 각 혈관에 대한 ICG 도달 시간 차이, D:대표적 컬러 코드 이미지, E: 컬러-코드화된 연뇌막 이미지이고 박스 표시는 뇌경색 영역임, F: 뇌경색 영역에서 맥관구조의 변화]
- 도 2는 시간 경과에 따른 I_{max} 지도를 이용하여 뇌경색 영역을 가시화한 것이다[A:I_{max} 지도, 단일 톤, 하얀 화살표(노란색 영역)는 허혈 부위; B:밝은 노란색 영역; C:TTC 염색 이미지; D: 경색 영역의 표면적]
- 도 3은 PIO 후 회복 시간 경과에 따른 CBF 파라미터(BFI 및 MTT)의 비교 결과이다[A:대표적인 BFI 지도, C:대표적인 MTT 지도, B 및 D :혈류 파라미터의 평균값]

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 이하와 같다.
- [0030] "허혈"은 사람 환자 또는 동물에서, 치료되지 않는 경우, 허혈성 손상을 초래하는 조직 또는 표적 기관으로의 불충분한 혈액 공급 상태를 나타낸다. 예를 들면, 대뇌 또는 "뇌 허혈"은 산소 공급이 뇌 조직의 요구를 충족시키지 않도록 하는 뇌로의 혈액 감소를 나타낸다. 뇌 "경색"은 허혈 또는 혈류의 중단이 세포사를 초래할 만큼 길게 지속될 경우 초래될 수 있는 죽은 뇌 조직을 나타낸다. 본 발명에서 가장 바람직한 허혈성 뇌 질환은 뇌경색이다.
- [0031] "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명의 목적상, 진단은 뇌경색에 대한 정보를 확인하는 것이다.
- [0032] "형광 염료" 또는 "염료"라는 용어는 적절한 파장의 복사 에너지에 의하여 여기될 때, 가시 또는 근적외선 파장 범위에서 빛을 발산함으로써 형광을 발하는 작은 분자 또는 단백질 또는 다른 중합체 또는 마크로 분자를 의미한다.
- [0033] "대상" 또는 "환자"는 인간, 소, 개, 기니아 피그, 토끼, 닭, 곤충 등을 포함하여 치료가 요구되는 임의의 단일 개체를 의미한다. 또한, 임의의 질병 임상 소견을 보이지 않는 임상 연구 시험에 참여한 임의의 대상 또는 역학

연구에 참여한 대상 또는 대조군으로 사용된 대상이 대상에 포함된다.

- [0034] "조직 또는 세포 샘플"은 대상 또는 환자의 조직으로부터 얻은 유사한 세포의 집합체를 의미한다. 조직 또는 세포 샘플의 공급원은 신선한, 동결된 및/또는 보존된 장기 또는 조직 샘플 또는 생검 또는 흡인물로부터의 고형 조직; 혈액 또는 임의의 혈액 구성분; 대상의 임신 또는 발생의 임의의 시점의 세포일 수 있다.
- [0035] "표지" 또는 "라벨"은 직접 또는 간접적으로 시약, 예를 들어 핵산 프로브 또는 항체에 컨쥬게이팅 되거나 융합되고 컨쥬게이팅 되거나 융합된 시약의 검출을 용이하게 하는 화합물 또는 조성물을 의미한다. 표지는 그 자체가 검출될 수 있거나 (예를 들어, 방사성 동위원소 표지 또는 형광 표지), 효소 표지의 경우에, 검출가능한 기질 화합물 또는 조성물의 화학적 변형을 촉매 할 수 있다.
- [0036] "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 저해제 화합물의 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수해동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수해 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.
- [0037] "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 늘이는 것을 의미할 수도 있다. 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화(Palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이(time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.
- [0038] "약"이라는 것은 참조 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이에 대해 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1% 정도로 변하는 양, 수준, 값, 수, 빈도, 퍼센트, 치수, 크기, 양, 중량 또는 길이를 의미한다.
- [0039] 본 명세서를 통해, 문맥에서 달리 필요하지 않으면, "포함하다" 및 "포함하는"이란 말은 제시된 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군을 포함하나, 임의의 다른 단계 또는 원소, 또는 단계 또는 원소들의 군이 배제되지는 않음을 내포하는 것으로 이해하여야 한다.
- [0040] 이하, 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.
- [0041] 본 발명은 뇌 허혈 질환, 특히 바람직하게는 뇌경색(cortical infarcts)을 진단 및 분석하는 방법과 이의 이용에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서 "뇌경색"이란, 뇌동맥이 혈전 또는 색전에 의해 폐색되어 허혈 상태가 되고, 뇌 조직이 괴사 및 장해되는 질환이고, 뇌내 소동맥이 폐색되어 발증하는 라쿠나 경색, 뇌내 대동맥이 죽종으로 폐색되어 발증하는 아테롬 혈전성 뇌경색, 심장 내의 혈전이 전자가 되어 뇌내 동맥을 폐색하여 발증하는 심원성 뇌색전증, 상행 대동맥으로부터 대동맥궁부에 생긴 죽상 경화반으로부터 전자가 해리되어 뇌내 동맥을 폐색하여 발증하는 색전증인 대동맥 원성 뇌색전증, 주간 동맥에 생긴 플라크가 천통지의 입구부를 폐색함으로써 생긴 천통지 영역의 경색인 「Branch atheromatous disease」(이하, 「BAD」라고 하는 경우가 있다), 뇌혈관의 내막이 손상되고 혈액이 동맥벽 내에 침입하여 뇌혈관을 폐색하는 동맥 해리의 모두를 포함한다. 또, 뇌경색이라도 급성기, 아급성기, 회복기(만성기) 등의 모두를 포함한다.
- [0043] "피검 동물"은, 뇌경색을 일으킬 가능성이 있는 동물이면 어떠한 것이어도 되고, 구체적으로는, 인간, 원숭이,

또는 래트 등의 설치류 등을 들 수 있다. 본 발명의 뇌경색의 검사 방법은, 이 중, 뇌경색의 의심이 있는 인간, 또는 뇌경색 발증 후의 인간 등에 있어서 특히 바람직하게 실시된다.

[0044] 본 발명의 방법은 광학적 분자영상 방법을 이용하는 것을 주요한 특징으로 한다.

[0045] 분자영상(molecular imaging)은 동물이나 인간의 생체 내에서 일어나는 분자/세포 수준의 현상(molecular/cellular events)을 감지하고 영상화하는 기술이다. 관찰하고자 하는 분자, 유전자, 단백질, 세포 현상 및 번역화학적 정보를 실시간으로, 비침습적으로, 그리고 반복해서 얻어낼 수 있는 장점이 있다.

[0046] 근래에 빛을 이용하여 생체 내의 정보를 얻기 위한 영상화 기법이 그 유용성을 인정받아 분자영상 분야에서 많은 관심을 받고 있다.

[0047] 광학영상이란, 일반적으로 자외선, 가시광선, 적외선 영역의 빛을 이용하는 것을 말한다. 영상을 얻기 위해 형광탐침 혹은 바이오 발광탐침을 사용하며, 이러한 물질을 체내에 주입하고 외부에서 빛을 조사하면 빛을 흡수한 형광물질은 들뜬(excitation)상태가 되고, 긴 파장의 빛을 방출(emission)한다. 이 때 방출되는 특정 파장의 빛을 탐지하여 영상화하기 위해서는 광학영상장비에 적절한 필터 및 CCD(Charged Coupled Device) 카메라가 부착되어 있어야 한다. 광학적 영상기술은 다른 진단기술에 비해 저렴하며, 이온화 방사선의 영향을 받지 않는 영역의 빛을 사용하기 때문에 공간 분해능이 좋다

[0048] 본 발명에서는 이러한 광학적 분자영상 기술을 이용하기 위해 형광염료(색소)를 이용한다. 특히, 근적외선 형광염료를 사용한다.

[0049] "형광염료(색소)"란, 일정 파장의 빛을 흡수하여 여기상태를 형성한 후, 빛의 침투거리가 최대가 되고, 수분에 의한 오류신호를 최소화 할 수 있는 형광을 발생하는 유기화합물을 의미하는데, 바람직하게는 700nm 내지 3000nm, 바람직하게는 750nm 내지 900nm의 근적외선 파장의 형광을 발생하는 유기화합물인 근적외선 형광염료가 될 수 있다.

[0050] 상기 근적외선 형광염료로부터 발생하는 근적외선 파장의 형광은 형광 카메라, 형광 센싱 프로브(PCT/KR2011/009271) 등의 장비를 이용하여 사진형태로 촬영하거나 실시간 모니터링할 수 있다.

[0051] <조성물>

[0052] 그러므로, 본 발명은 일 관점에서 근적외선 형광염료, 가장 바람직하게는 인도시아닌 그린을 포함하는 허혈성 뇌질환, 바람직하게는 뇌경색 분석용 조성물을 제공한다.

[0053] 근적외선 형광 염료는 이에 제한되지 않으나 Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 780, cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, 인도시아닌 그린(ICG), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750 및 Rhodamine800, Texas Red 및 이들의 혼합물 또는 복합체로 이루어지는 군에서 선택되는 것일 수 있다.

[0054] 바람직하게는 본 발명의 근적외선 형광염료는 양친성을 띠는 근적외선 형광염료로서, 이에 한정되지 않으나 시아닌 계열인 cy3.5, cy5, cy5.5, cy7, ICG, Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye78, IRDye80, IRDye82 와 Oxazine 계열의 Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamines 계열의 Rhodamine800, Texas Red, 및 이들의 혼합물 또는 복합체로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 더욱 바람직하게는 인도시아닌 그린(indocyanine green; ICG)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인도시아닌 그린(ICG)을 이용하였다.

[0055] 상기 인도시아닌 그린(ICG)은 생체 영상화를 위한 물질로서, FDA에서 이미 승인받은 긴 파장대를 가지는 안전한 화학물질로, 인체에 주입된 후 한 시간 정도 지나면 분해되어 없어지거나 대소변으로 배출되는 특성이 있어 인체에 사용 가능한 형광염료로 임상적 적용에 유리하다.

[0056] ICG는 730~770nm의 근적외선을 받아서 더 긴 파장인 800~850nm의 근적외선 영역 형광을 내므로, 이를 CCD 카메라, 레이저 스캐닝(Laser scanning) 및 현미경용 디텍터(Detector) 중 적어도 하나의 기구로 측정하는 방법으로 이용할 수 있다.

- [0057] 본 발명의 조성물은 이에 제한되지는 않지만, 액체, 현탁액, 페이스트, 분말, 농축액, 적절한 농도로 혼합하기 위한 과립화 분말 또는 고체 형태를 포함한 여러 가지 형태를 가질 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물은 주사제, 경피 투여용 제제, 삽관용 제제, 경구용 제제, 직장투여용 제제의 형태로 제조될 수 있으며, 바람직하게 주사제 일 수 있다.
- [0058] 조성물의 투여는 여러가지 투여 형태가 가능하며, 경구 투여 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 조성물은 단일 용량으로 투여되거나, 다중 용량으로 분할하여 투여될 수 있다.
- [0059] "비경구적 투여"는 개체에서 조직의 물리적인 틈(breach)으로 특징지어지는 임의의 경로로의 투여 및 조직 내 틈을 통한 조성물의 투여를 포함한다. 따라서, 비경구적 투여는 주사, 외과적 절개를 통한 조성물의 적용, 조직-투과적 비-외과적 상처를 통한 조성물의 적용 등에 의한 조성물의 투여를 포함하지만, 이들에 제한되는 것은 아니다. 특히, 비경구적 투여는 내시경 점막하 주입, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내를 포함하지만 이들에 제한되는 것은 아니라고 해석된다. 바람직하게 상기 투여는 정맥 내 투여일 수 있다.
- [0060] 조성물이 의료 활동 이전 또는 도중에, 개체에게 투여되는 활성 성분(근적외선 형광물질)의 총량은 이에 제한되지 않으나 0.01ml 내지 100ml 범위일 수 있다. 바람직하게 0.1ml 내지 80ml 일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1ml 내지 60ml일 수 있다. 상기 투여되는 조영제(활성성분)의 총량은 당해 분야의 기술자라면 개체(또는 환자)의 연령, 체적, 건강상태 등을 고려하여 적정하게 정할 수 있을 것이다
- [0061] 상기 투여 횟수 및 투여 용량은 당해 분야의 기술자라면 제반 사항들을 충분히 고려하여 정할 수 있을 것이다. 바람직하게 본 발명의 조성물은 1회 투여 일 수 있다.
- [0062] 근적외선 형광염료를 포함하는 조성물은, 염료가 영상 진단될 영역으로 이동하고 영상 진단 시 이러한 영역에 존재할 정도로 영상 진단되기 전 충분한 시간 투여될 수 있다. 일 예로, 예를 들면 염료가 영상 진단 부위로 이동할 필요가 있는 거리에 기초하여, 어떤 과정에서는, 조성물이 영상 진단 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8시간 미만 또는 그 이하로 투여될 수 있다. 한 구체예에서, 조성물은 영상 진단 전 1, 2, 또는 3 시간 이내로 투여된다.
- [0063] 본 발명의 조성물은, 허혈성 뇌 부위, 바람직하게는 뇌 경색 부위를 관찰할 수 있는데 필요한 시간 동안 유효하도록 당업자가 조절할 수 있을 것이고, 예를 들어, 생체 내 유효 시간이 24 내지 72시간일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 조성물은 추가적으로 안정화제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0065] 상기 안정화제는 임의의 유체, 반-유체 또는 고체를 포함하는, 물질의 점도를 변경시키는 임의의 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서 적합하게 사용되는 안정화제로는, 제한되지는 않지만, 셀룰로오스, 젤라틴, 천연 하이드로콜로이드, 벤토나이트, 로커스트 빈 검 또는 영상 공정을 용이하게 하도록 물질의 점도를 적절히 변경시키는 임의의 화합물이 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물 내 사용에 적합한 천연 하이드로콜로이드는, 제한되지는 않으나, 카라기난, 알긴산염, 한천, 아가로오스, 푸셀란(fucellan) 및 크산탄 검과 같은 천연 해초 추출물; 구아 검, 로커스트빈 검, 타라검, 타마린드 검 및 프실리움(psillium) 검과 같은 천연 시드(seed) 검; 아카시아, 트라가칸트, 카라야 및 가티(ghatti) 검과 같은 천연 식물 삼출물; 저-메톡실 펙틴 및 고-메톡실 펙틴과 같은 천연 과일 추출물; 벤토나이트 및 비검과 같이, CT 및 MR 영상법의 성능을 향상시키도록 점도를 변경시키고 신호/노이즈 비를 낮추기 위한 천연 및 정제 클레이를 포함한다. 이에 한정되지 않지만 조성물 중 약 0.001 중량% 내지 약 70 중량%의 안정화제를 포함할 수 있고, 바람직하게 약 0.05 중량% 내지 약 25 중량%의 안정화제, 더욱 바람직하게 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량%의 안정화제를 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 조성물은 신체로부터 해부학상 부분 내로의 유체의 전달을 촉진시키고, 신체에 의한 해부학상 부분 내 유체의 재흡수를 적어도 실질적으로 억제하는 삼투제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0067] 상기 삼투제는 이에 제한되는 것은 아니지만 당계 (sugar based) 화합물을 포함한다. 상기 당계 화합물은 이에 제한되는 것은 아니지만, 수크로오스, 글루코오스, 프럭토오스(fructose), 만니톨, 만노오스, 갈락토오스, 알도헥소오스(alдохexose), 알트로오스(altrose), 탈로오스(talose), 소르비톨, 크실리톨, 락토오스, 비이온성 시드

폴리사카라이드, 하나의 갈락토오스 단위에 의해 각각의 만노오스에서 브랜칭으로 그루핑하는 직쇄 만난(mannan), 베타-D-man, 알파-D-gal, D-glcA, D-gal A, L-gul, 베타-D-man, 알파-Dgal(4:1), D-글루쿠론산, D-갈락투론산, 및 L-글루쿠론산을 포함하는 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 폴리사카라이드를 포함한다. 본 발명의 조영제 조성물은 약 0.005 중량% 내지 약 20 중량%의 삼투제를 포함할 수 있고, 바람직하게는 약 1 중량% 내지 약 5 중량%의 삼투제를 포함할 수 있다.

[0068] 본 명세서에 제공된 조성물의 기재가 주로 인간 투여에 적절한 조성물에 대한 것이지만, 당업자는 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에 투여되기에 적합하다는 것을 이해할 것이다. 상기 조성물을 다양한 동물에 투여하기에 적합하도록 하기 위하여 인간 투여에 적합한 조성물의 변형이 잘 이해되고, 통상적으로 숙달된 수의 약리학자는, 만약 있다면 단순히 통상적인 실험으로 이러한 변형을 디자인하고 실행할 수 있다. 조성물의 투여가 계획되는 개체는, 비록 이에 제한되지는 않지만, 인간 및 비-인간 영장류 및 다른 포유동물을 포함한다.

[0069] <분석 방법>

[0070] 본 발명은 다른 관점에서, 근적외선 형광 조성물을 이용하여 허혈성 뇌질환, 바람직하게는 뇌경색을 광학적으로 분석 및 진단하는 방법에 관한 것이다.

[0071] 일 구체예로서, 다음을 포함하는 단계로 대뇌 경색부위를 분석하는 방법을 수행할 수 있다:

[0072] (i) 대상에게 근적외선 형광염료를 포함하는 뇌경색 분석용 조성물을 주입하는 단계;

[0073] (ii) 대뇌 혈류에 흐르는 상기 형광 조성물의 흐름 또는 변화를 시간 연속적으로(시계열적으로, time-series) 촬영하는 단계; 및

[0074] (iii) 동맥, 정맥, 및 부비강을 각각 다른 색깔로 코드화하고 시간을 변수로 하여 형광의 세기를 측정하여 분석하는 단계.

[0075] (i) 단계에서, 상기 근적외선 형광염료는 앞서 설명한 바와 같다. 가장 바람직하게는 인도시아닌 그린을 사용한다.

[0076] 대상에게 조성물을 주입하는 것은 당업자들이 적절한 방법으로 수행할 수 있음은 자명할 것이고, 예를 들어 정맥 주사를 이용하여 주입한다.

[0077] (ii) 단계에서, 시계열적으로, 즉 시간 연속적으로 형광 신호를 취득한다. 이 때, 공지의 임의의 영상장치를 선택하여 이용할 수 있을 것이다. 본 발명의 일 실시예에서는 830-nm 파장 필터를 구비한 CCD 카메라를 이용하였다.

[0078] (iii) 단계에서, 상기 (ii)에서 취득한 형광신호에 대한 이미징 및 동맥, 정맥, 부비강을 각각 다른 색깔로 코딩하고 시간을 변수로 하여 형광 최고 세기, 혈류의 변화, 맥관 구조 등을 분석하여 뇌경색 부위와 관련된 여러 정보를 얻는다. 형광 이미지 프로세싱 및 코딩은 상용화된 소프트웨어를 이용할 수 있다.

[0079] 본 발명은 다른 구체예로서, 뇌경색 영역에서의 뇌 혈관의 역학적 컬러 지도를 제작하는 방법 및 이의 이용을 제공할 수 있다.

[0080] 본 발명의 일 실시예에서는 동맥(빨강), 정맥(파랑) 및 부비강(녹색)에 대해 코드화하여 컬러 지도를 제작하였고, 대뇌 피질에서의 혈류, BFI, NTT 등의 다양한 정보를 취득하였다.

[0081] 취득한 형광신호를 이용하여 컬러 코딩, 혈류 분석, BFI, NTT 등의 정보를 계산하거나 취득하는 방법은 당업계에 이미 공지되어 있는 임의의 방법을 이용할 수 있을 것이다.

[0082] 예를 들어, 일부 픽셀(pixel)의 평균값, 중간값, 최저값 및 최고값을 분석하고, 촬영된 형광 영상을 이용하여 혈류동역학 영상을 생성할 수 있고, 형광 영상을 Gray형식의 색상모델을 이용하여 영상처리를 할 수 있으며, Gray형식의 색상모델을 RGB형식의 색상모델로 변환할 수 있으며, 평균 경과 시간(mean transit time), 타임 투 피크(time-to-peak), 혈액 관류 비율(blood perfusion rate), ICG 주입 후 일정 시간 이후의 동역학 감소 패턴을 수치화한 값, 특정 픽셀에서 추출한 동역학 영상 중에서 가장 세기가 센 형광 세기 및 혈류 지표(blood flow

index) 등 다양한 방법을 이용할 수 있다.

[0083] 본 발명의 방법은, 바람직하게는 다음 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.

[0084] (iv) 주변 혈관은 톤 다운하고, 원하는 부위 혈관의 해상도를 높이는 단계

[0085] 이 때, 이러한 톤(tone) 조절을 통해 혈관의 형태 자체도 파악할 수 있게 되는 장점이 있다.

[0086] 본 발명의 상기 방법은 종래 혈류 속도 측정에 치중하였던 방법이 아닌, 근적외선 형광물질인 인도시아닌 그린을 이용하여 시계열적으로 분석함으로써 효과적으로 뇌경색 부위에 대한 정보를 취득할 수 있는 새로운 광학적 방법이다.

[0087] 상기 본 발명의 방법은 생체 염색(vital staining), 근적외선 형광 영상(NIR imaging) 및 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography)을 동시에 할 수 있다.

[0088] 생체 염색(vital staining)은 살아있는 세포나 조직을 색소(dye)를 사용하여 염색하는 것으로, 본 발명의 조성물은 생체 염색을 위한 생염료(Vital dye)로 근적외선 형광염료, 바람직하게는 인도시아닌 그린을 사용한다.

[0089] 본 발명의 조성물은 근적외선 형광 다이(near infra-red fluorescent dye)를 포함하고 있어, 근적외선 파장영역에서 형광 특성을 나타낸다. 따라서 본 발명의 조성물은 당해 분야의 기술자에게 공지된 근적외선 형광 영상(NIR imaging)방법으로 사용될 수 있으며, 이에 제한되지 않으나 예를 들어 근적외선 광학영상 측정 장치(NIR optical imaging system)를 이용하여 영상을 촬영하고, 형광 분광계(Fluorescence Spectrophotometer)를 이용하여 근적외선 형광 스펙트럼을 측정할 수 있다.

[0090] 컴퓨터 단층 촬영(computed tomography; CT)은 전산화 단층 촬영이라고도 불리우며, 인체의 목적 부위를 여러 방향에서 조사하여 투과한 X-선을 검출기로 수집하고, 그 부위에 대한 X-선의 흡수차이를 컴퓨터가 수학적 기법을 이용하여 재구성하는 촬영기법을 말한다. 즉, 몸 주위로 카메라가 360° 회전하며 여러 다른 각도에서 찍은 수많은 2차원 X-선 사진을 컴퓨터 프로그래밍으로 재조합하여 3차원 영상으로 만드는 영상기법이다

[0091] 그러므로, 본 발명은 다른 관점에서, 상기 조성물 및 방법을 수행하는데 필요한 장치를 포함한다.

[0092] 일반적으로, 적절한 장치는 발산된 염료 형광을 잡을 수 있는 카메라와 형광 염료를 여기할 수 있는 광원을 가진다.

[0093] 카메라는 영상을 포커싱하는 수단을 포함할 수 있다. 어떤 구체예는 영상을 포커싱하는 수동 수단을 포함한다. 다른 구체예는 영상을 포커싱하는 자동화 수단을 포함한다. 카메라는 영상 부분의 확대를 허용하는 렌즈 시스템을 추가로 포함할 수 있다.

[0094] 어떤 구체예에서, 카메라는 디지털 컨버터에 아날로그로, 그 다음 컴퓨터에서 구동되는 프로세싱 소프트웨어와 영상 캡처를 통하여, 캡처된 영상을 중계한다. 영상은 하드 드라이브, 광학 디스크, 자기 테이프와 같은 임의의 적절한 매체에 저장될 수 있다. 카메라는 또한 영상이 실시간으로 디스플레이되고, 녹화되어 추후에 다시 재생될 수 있도록 텔레비전/VCR 시스템에 직접 영상을 전달할 수 있다.

[0095] <용도>

[0096] 한편, 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 조성물 및 방법을 이용하는 다양한 용도를 포함한다. 특히, 본 발명은 뇌경색 부위를 간단하고 저비용으로 효과적으로 분석함으로써 다양한 정보를 취득하는 방법으로 유용할 것이다.

[0097] 일 구체예는 뇌경색 부위에 대한 다양한 정보를 제공한다..

[0098] 앞서 설명한 바와 같이, 정보는 뇌경색 부위의 혈류 변화, 뇌혈관의 역학적 컬러 지도, 뇌 맥관구조 변화 및 혈

관 형태 동일 수 있다.

- [0099] 일 구체예는 개체의 하나 이상의 뇌경색 부위를 영상 진단하기 위한 방법을 제공한다. 영상은 수술중에 얻어질 수 있다. 따라서, 수술이 실시될 영역 또는 근처 부위가 외과적으로 노출될 수 있다.
- [0100] 일 구체예에서, 뇌 혈관 지도 제작을 위한 하나의 용도는 수술 중에 있다. 이 기술이 환자의 내부 구조의 실시간 작동 영상을 얻기 위하여 의사에 의하여 일반적으로 사용되는 영상 진단 기술, 형광 투시법에 사용되는 염료-태그 신경에 사용될 수 있다는 것이 고려된다.
- [0101] 일 구체예에서, 또한 본 발명은 형광 영상을 관찰함으로써 수술팀은 영상 중 뇌경색의 존재 또는 부재를 결정할 수 있다.
- [0102] "형광 영상을 관찰하는 것"은 영상을 관찰하는 다른 방법을 포함하여 정지 영상(인쇄된 것이거나 화면상의 것이든) 또는 비디오 모니터로 실시간 검토하는 것을 지칭할 수 있다.
- [0103] 종종 뇌경색 부위는 통상적인 외과 분야 조명으로 가시광을 사용하여 크기, 형태, 및 전체 위치로 확인될 수 있다. 외과 수술팀은, 또한 형광 영상을 관찰하여 하나 이상의 특정 뇌경색 부위의 위치를 결정할 수 있다. 따라서, 외과 수술팀은 이들이 수술 과정을 어떻게 수행하는지를 결정하기 위하여 하나 이상의 뇌경색의 위치 또는 존재/부재에 대한 정보를 사용할 수 있다. 예를 들면, 상기 방법들의 사용을 통하여 얻어지는 정보에 기초하여 외과 수술 팀은 개체의 한 점에서 절개를 하도록 결정할 수 있고, 이들은 그 영역으로부터 인지된 뇌경색의 존재에 기초하여 다른 부위를 부주의하게 잘라내거나 외과적으로 접촉하는 일이 적을 것이다.
- [0104] 일 구체예에서, 다수의 영상들을 얻는 것을 고려할 수 있다. 뇌경색 부위를 부주의하게 잘라내는 것과 같이 손상시키지 않았다는 것을 판단하기 위하여, 다수의 영상들이 서로 비교될 수 있다.
- [0105] 다른 구체예에서, 본 발명은 또한 뇌 경색 영역의 변화를 측정하는 단계를 포함하는 뇌 경색 영역 변화 예측에 의한 뇌 경색 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0106] 상기와 같은 뇌 경색 치료 물질의 스크리닝에 있어서 뇌 혈류 변화 및 혈관 변화의 측정 값을 결합하여 보다 정확한 신경 보호 약물의 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0107] <실시예>

- [0108] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0109] 재료 및 방법

[0110] 1. 동물 준비

- [0111] 8주령 수컷 C57BL/6 마우스(이미징을 위해 n = 8, 트리페닐 테트라졸리움 클로라이드 염색을 위해 n = 12)를 대한 바이오링크(경기도, 한국)로부터 수득하였다. 모든 동물들은 실험기간 동안 12-h 빛/어둠 사이클 상에서 유지시켰다. 모든 적용 절차를 ARRIVE 가이드라인(<http://www.nc3rs.org.uk/ARRIVE>)에 따라 수행하였고 경희 대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받았다.

[0112] 2. 인도시아닌 그린 이미징

- [0113] 동물들을 졸레틸(Zoletil) (30 mg/kg; Virbac Korea, 서울, 한국) 및 럼폰(Rompun)(10 mg/kg; Bayer Korea, 서울, 한국)의 복강 내 주사로 마취시켰다. 동물 온도는 항온동물용 담요(Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA)를 이용하여 수술 동안 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 절개를 수행하여 전체 두개골을 노출시키고, 마우스를 830-nm 파장 필터를 구비한 CCD 카메라 하에 두었다.
- [0114] ICG (0.001 mg/g wt)를 꼬리 정맥에 주입하고 머리 부분을 760-nm 파장 빛으로 비추었다. 시계열의 형광 신호를

2분 동안 매 160ms로 획득하였다 최초의 30-40 프레임을 이용하여 뇌관(cerebral vessels)의 컬러 지도를 생성하였고, 반면 최초 100 프레임을 이용하여 혈류(blood flow) 지도를 생성하고 상용 소프트웨어(Viewworks Co.,Ltd., Anyang, Republic of Korea)를 이용하여 대뇌 피질에서의 혈류를 계산하였다[Kalchenko et al. (2014) 및 Ku & Choi (2012)].

[0115] 시간 강도 곡선에서 첫번째 피크의 기울기를 이용하여 BFI를 계산하였다(ICG 검출 및 ICG 최대강도(Trising) 사이에 경과된 시간에 의해 첫번째 피크(Tpeak)의 기간에서 상대적인 형광 강도를 나눔). 그리고 역학 곡선의 중력 중심으로서 MTT를 계산하였다(Gobbel et al., 1991). 각 동물에 대한 ICG 이미지들을 다음의 4 시간 포인트에서 획득하였다:post-PI0(photo thrombotic ischemic operation) 전후 시간; PI0 전 1일 (pre-PI0) 및 PI0 후 1, 5, 30 일 (post-PI0).

[0116] 3. 광화학적 허혈성 수술(Photothrombotic ischemic operation, PI0)

[0117] 마우스를 졸레틸(30 mg/kg) 및 럼폰(10 mg/kg)의 복강 내 주사로 마취시켰다. 동물 온도는 항온동물용 담요(Harvard Apparatus, Holliston, MA,USA)를 이용하여 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였다. 두개골을 피부 절개를 통해 노출시키고 두개골에 걸쳐있는 골막을 완전히 제거하였다. 조명을 위해, 3-mm 구멍을 가진 냉광 소스(cold light source)의 광섬유 번들 (Olympus LCD, 150 W)이 브레그마(bregma)에 대한 2 mm 꼬리부 및 mm 측면에서 중심이 되었다.

[0118] 로즈 벤갈(Rose Bengal)(0.1 mL/25 g body weight of a 10% solution; Sigma-Aldrich, St Louis, Mo, USA)을 꼬리 정맥 내에 주입하고, 냉광으로 3분동안 두개골을 비추었다. 이미징화 후, 두피를 봉합하고 마우스를 회복토록 하였다.

[0119] 4. 트리페닐 테트라졸리움 클로라이드 염색

[0120] 생체 염색을 위해, 뇌를 상이한 시간점들에서 제거하고(즉, PI0 전, PI0 후 1, 5, 및 30 일), 37°C 에서 10 분 동안 0.9% NaCl에서 2% 트리페닐 테트라졸리움 클로라이드(TTC)에 즉시 침지하였다. 그 후 뇌 사진을 찍고 반구의 미염색 영역을 측정하였다

[0121] 5. 통계적 분석

[0122] 모든 통계적 변수들을 Graphpad Prism 4.0 software (San Diego, CA, USA)를 이용하여 계산하였다 데이터들을 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 결과들을 ANOVA로 일원분석하고 Bon-ferronis post hoc test를 수행하였다. P-value의 차이는 0.05 이하일 때 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

[0123] 실시예 1 : 경색 영역에서 뇌혈관의 역학적 컬러 지도제작

[0124] 정맥 ICG 주사 후, 새로운 이미지를 획득하고 컴퓨터에 스트림처리하였다.

[0125] 그 결과, 새로운 형광 이미지에서, 혈관은 밝은 영역으로 나타났다(도 1). PI0 전 및 PI0 후 1일, 30일 동물로부터 획득한 이미지는 혈류 운동학을 보여주는 비디오 시퀀스로서 프레임-바이-프레임(frame-by-frame) 기록되었다.

[0126] 뇌의 실질(parenchymal)과 대조되는 혈관을 측정하기 위해, 시계열의 30-40 프레임 이미지으로부터의 이미지, 형광, 흑백 이미지를 모아서 엮기-강조하였다(도 1A).

[0127] 혈관에서 화이트 픽셀은, ICG가 지정된 강도에 도달하기 위해 걸리는 시간 상의 차이에 따라서 이미지가 동맥(빨강), 정맥(파랑) 및 부비강(녹색) (즉, 상시상 정맥동)에 대해 코드화되는 것을 명시하였다(도 1B 및 C).

[0128] 형광 이미지 프로세싱 및 코딩은 상용화된 소프트웨어 (Viewworks Co., Ltd., Anyang, Republic of Korea)를 이용하여 달성하고, 프로세싱 후 이미지가 별도로 동맥, 정맥 및 부비강을 보여주도록 하였다(도 1D).

[0129] 이처럼, 동맥(빨강), 정맥(파랑) 및 부비강(녹색)에 대해 각각 다른 색깔 코드를 부여하고 시계열적으로 관찰함으로써, 뇌혈관의 역학적 컬러 지도를 효과적으로 획득할 수 있었다.

[0130] 실시예 2 :PIO 후 경색 영역에서 연뇌막 맥관구조(pial vasculature)의 변화

[0131] 컬러-코딩된 이미지를 이용하여, PIO 후 경색 영역에서 뇌 맥관구조에서의 변화를 가시화하였다.

[0132] 그 결과, PIO 1일 후, 경색 영역에서 혈관은 ICG 이미징으로 검출되지 않았고(도 1E), 이는 혈전 thrombosis) 후 연뇌막 혈관에서 혈류가 없음을 시사한다.

[0133] PIO 5일 후, 일부 혈관들이 경색 영역에서 검출된 반면, 이상한(aberrant) 형태를 가지는 혈관이 손상 후 30일째 검출되었다. 경색 영역의 코어에서 혈관 상 변화를 정량화하기 위해, 관심 부위(region of interest, ROI)에서 역치(100 a.u.) 이상의 형광 강도를 보이는 픽셀의 퍼센테이지를 분석하였다(도 1F). 경색 영역에서 맥관 구조 영역이 PIO 손상 후 일자에 따라 증가함을 확인하였다

[0134] 실시예 3 : PIO 후 경색 영역의 변화

[0135] 무손상 두개골을 통해 경색 영역을 가시화하기 위하여, 시계열 ICG 역학을 이용하여 I_{max} 지도를 제작하였다.

[0136] 모든 뇌 혈류 변수 중, I_{max} 지도는 배측 피질성 뇌(dorsal cortical brain)의 고-해상도 이미지를 획득하였다. 배측 피질 영역에서 경색을 특정하기 위해 I_{max} 지도에 대해 단일 톤 컬러 범위(이 경우 갈색)를 선별하였다

[0137] 이를 도 2에 도시하였다.

[0138] 도 2A는 PIO 전-후에, 한 동물로부터 I_{max} 지도의 후속 이미지를 보여주는데, 경색 영역에서의 변화를 입증하고 있다.

[0139] PIO 1일 후, 경색 영역은 갈색과 경계를 이루는 밝은 노란색으로 명확하게 가시화되었고, 이러한 영역은 시간에 따라 크기가 감소하는 것으로 관찰되었다(도 2A).

[0140] ICG I_{max} 지도 이미지에서 밝은 노란색 영역을 상용 소프트웨어를 이용하여 측정하였고, 이 또한 시간에 걸쳐서 크기가 감소함이 관찰되었다(도 2B).

[0141] I_{max} 지도 이미지에 대한 실제 경색 영역을 비교하기 위해, 새로운 세트의 동물에서 PIO 전-후 각 시간점에서 TTC 염색을 수행하였다. 흥미롭게도 TTC 염색 이미지는 거의 완벽하게 I_{max} 지도 이미지와 매칭되었다(도 2C). 마지막으로, 배측 경색 영역이 PIO 후 감소하였는지를 결정하였다(도 2D).

[0142] 실시예 4 : PIO 후 경색 영역에서 뇌 혈류의 변화

[0143] 다음으로, PIO 후 경색 영역에서 뇌 혈류 변수를 조사하였다.

[0144] 그 결과, 혈액 투입 정도를 보여주는 BFI는 수술 후 1일째 경색 영역에서 눈에 띄게 감소하였지만 이후에는 회복함을 확인할 수 있었다(도 3A 및 B).

[0145] BFI에서 변화의 패턴은 맥관 구조에서 변화와 유사하였고, 이는 대뇌 피질에서 연뇌막 혈관이 BFI의 결정 요소를 가리킨다.

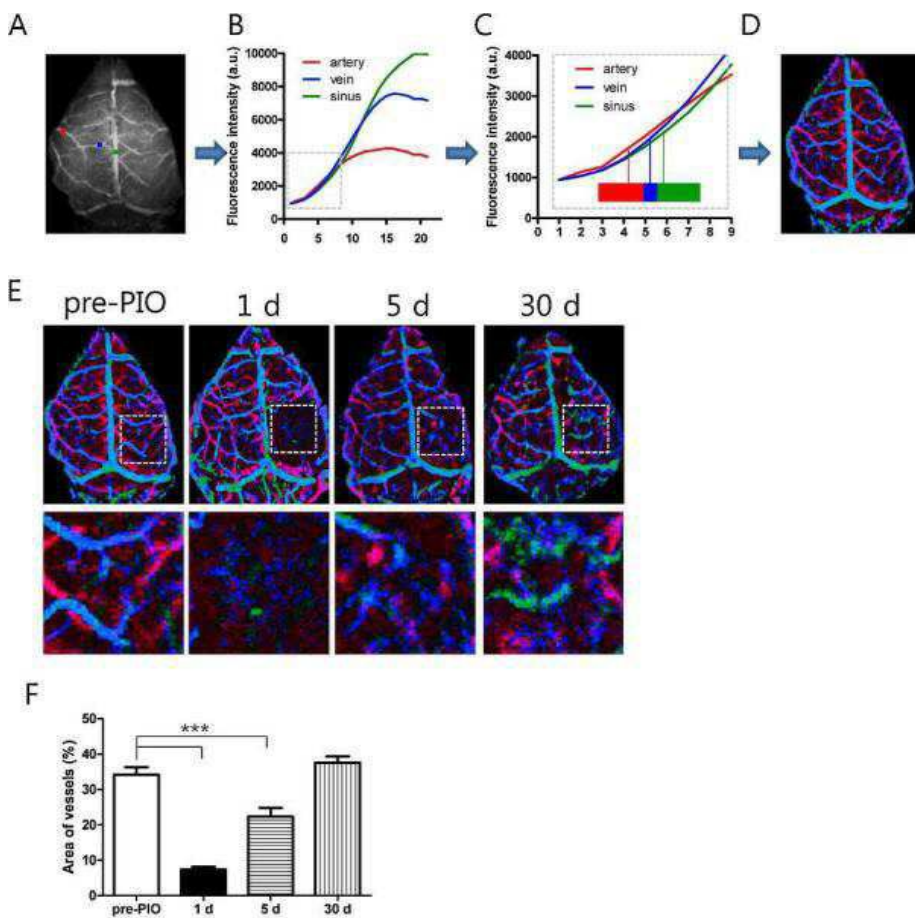
[0146] 평균 혈액 체류 시간을 의미하는 MTT는 수술 후 증가하였다.

[0147] PIO-전 맥관 구조의 연뇌막 혈관에 대해 PIO-후 1일째 경색에서 높은 MTT 영역의 매칭은 광화학적 손상 (photothrombotic injury) 후 경색 영역의 혈관에서 혈액의 유출이 현저하게 감소함을 보여주었다 (도 3C 및 D).

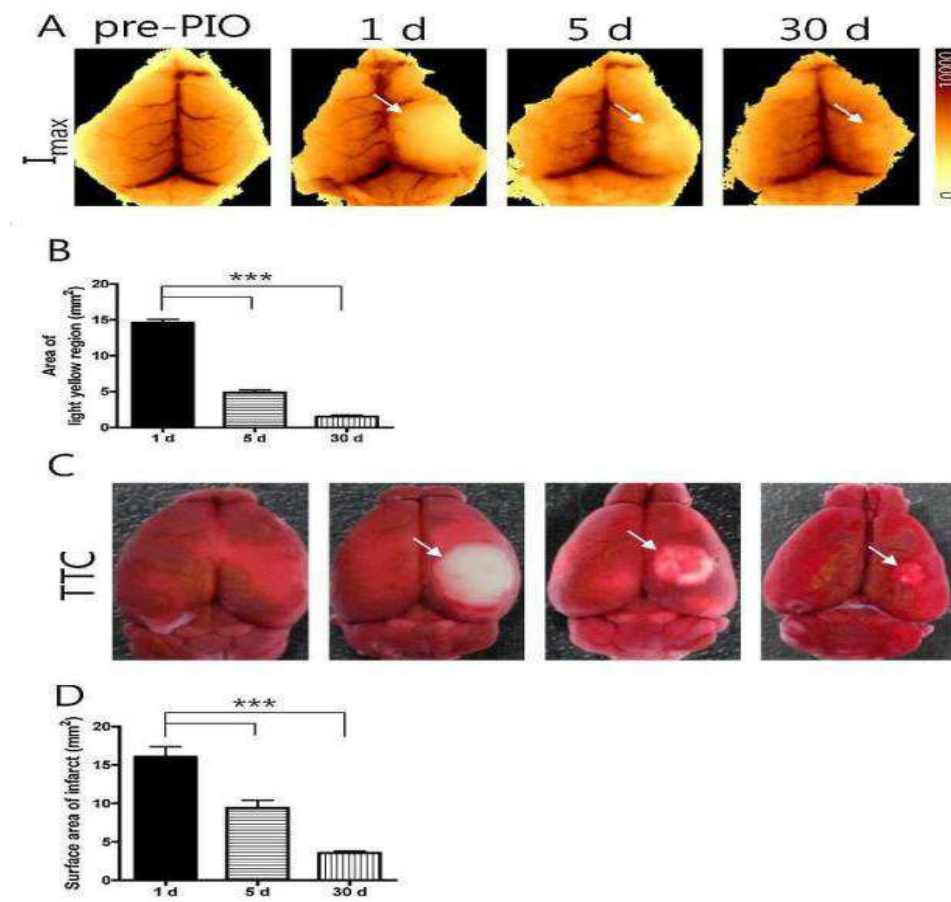
[0148] 이러한 결과들을 통해, 본 발명의 인도시아닌 그린을 이용한 광학적 분석법에 의해 대뇌 혈관의 혈류변화 및 뇌 경색 부위의 범위 등을 두개골의 손상 없이 효율적으로 분석할 수 있음을 알 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

