



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0085294
(43) 공개일자 2013년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/533 (2006.01) G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01) B82B 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0006351

(22) 출원일자 2012년01월19일

심사청구일자 2012년01월19일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

임용택

대전광역시 서구 둔산동 LG한마루 106-803

노영욱

대전광역시 유성구 송강동 송강마을2단지 205-509

(74) 대리인

특허법인이룸

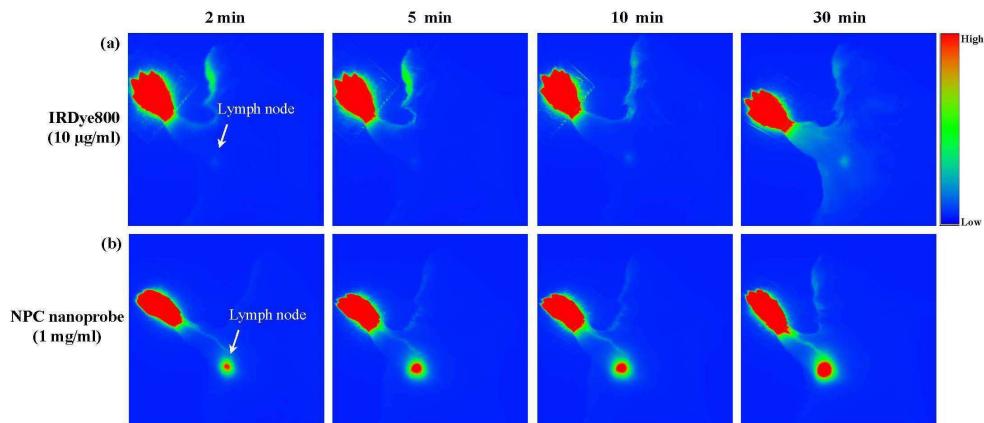
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 림프노드 탐지용 형광 고분자 나노젤 및 이를 이용한 림프노드 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 림프노드 탐지용 형광 고분자 나노젤 및 이를 이용한 림프노드 확인 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 형광 고분자 나노젤은 생체 내 주입시 센티넬 림프노드에서 비교적 장시간 머물면서 다른 림프노드로의 이동이 적은 특성이 우수하므로, 기존의 방사능 의약품을 사용하지 않고 림프노드의 위치를 실시간으로 정확하게 감지할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A-001-103-2011

부처명 교육과학기술부

연구사업명 국가연구시설장비선진화지원사업

연구과제명 림프관 연구용 근적외선 형광 표식 시약 및 장비 개발

주관기관 충남대학교

연구기간 2011.06.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하여 형광성을 측정함으로써, 형광 고분자 나노젤의 축적여부를 통해 림프노드를 확인하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 나노젤은 코어-셸 (core-shell) 구조를 갖는 고분자 나노젤로서 코어 부분이 친유성(hydrophobic) 기로 구성;되어 있고 셸 부분이 친수성 고분자로 구성;되며 표면에 형광염료가 부착된 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 고분자는 폴리아크릴산(poly(acrylic acid)), 폴리사카라이드(polysaccharide), 키토산(chitosan), 히알루론산(hyaluronic acid), 폴리아미노산(poly(amino acid)) 또는 플루란(pullulan)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 형광은 근적외선 또는 가시광선 영역의 형광염료인 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 근적외선 영역의 형광염료는 Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 780, cy5, cy5.5, cy7, 인도시아닌 그린(ICG), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750 또는 Rhodamine800로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

상기 가시광선 영역의 형광염료는 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, cy2, cy3, cy3.5, Fluorescein (FITC), NBD, Nile Red, Rhodamine B, Tetramethylrhodamine (TRITC) 또는 Texas Red로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

상기 고분자 나노젤은 크기가 10 nm 내지 70 nm 인 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤.

청구항 8

형광 고분자 나노젤을 이용한 림프노드 영상 측정방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 영상 측정은 형광 고분자 나노젤의 시험관 내(in vitro) 영상화, 생체 내(in vivo) 영상화, 생체분포(biodistribution) 추적 또는 암세포 표지(in vitro cell labelling)로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 림프노드 영상 측정방법.

청구항 10

- i) 형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하는 단계;
- ii) 상기 고분자 나노젤의 형광을 측정하여 림프노드를 확인하는 단계;를 포함하여 이루어지는 림프노드의 맵(map)화 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 림프노드 검진용 광학영상 프로브에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 센티넬 림프노드(Sentinel Lymph Node)란 해부학적으로는 일차 암 조직으로부터 림프관을 따라 최초로 유입되는 림프절로서, 센티넬 림프노드에서 암세포를 검사하여 양성 또는 악성을 판정하면, 기타 다른 림프절로의 전이유무를 알아낼 수 있다. 이에 따라, 센티넬 림프노드에 암 세포가 전이되어 있는지 확인한다면 남아있는 다른 림프노드 상태도 예견할 수 있는 것으로 알려져 있다. 즉, 센티넬 림프노드에 암세포가 없다면 나머지 림프노드에도 암 세포가 없다고 볼 수 있기 때문에, 이러한 센티넬 림프노드를 찾아내는 방법으로, 수술시 시각적인 도움을 받기 위한 아이소질판 블루염료 (isosulfan blue dye, Lymphazurin 1%, Ben Venue Lab., Inc., USA)를 이용하는 방법과 수술 전에 테크네튬 콜로이드 알부민 (technetium-99m colloid albumin)을 환자에게 주입한 다음, 네오프로브 (Neoprobe1500, Neoprobe Corp, USA)와 방사선 핵을 탐색하는 수동형 감마 감지기 (hand-held gamma probe)를 이용하는 방법이 있는데, 이 두 가지를 병용하면 센티넬 림프노드를 찾는 효과가 우수하여 센티넬 림프노드를 찾아 다른 림프노드로의 전이를 예측하는 수술 기법이 점점 보편화 되고 있다. 흑색종이나 유방암에서와 마찬가지로 표재성 암에서도 센티넬 림프노드를 찾아 수술적으로 적용하게 되면, 불필요한 림프노드 절제를 피할 수 있다.

[0003] 일측 또는 양측 림프노드 절제술을 포함하여, 국소 광범위 절제술 또는 근치적 외음부 절제술은 외음부 암 환자에서 시행되고 있는 고식적 수술법으로, 수술 후에도 창상파괴(wound breakdown), 림프부종, 림프종 등의 후유증으로 인해 수술환자들이 고통 받는 문제점이 있다.

[0004] 센티넬 림프노드를 찾아서 센티넬 림프노드의 동결생검(frozen biopsy)을 통해 다른 림프노드로의 전이 유무를 예측하고, 결과가 양성(benign)일 경우 센티넬 림프노드 절제만으로 수술을 종결하는 방법은 외음부 암의 수술에 있어 매우 진보적인 방법이다.

[0005] 그러나, 기존에 사용되고 있는 방사선 의약품을 이용한 림프노드 감지법은 많은 문제점을 안고 있다. 방사선 의약품으로 표지된 림프노드의 병리학적 검사시, 검사자 및 검사실의 오염문제, 병리학적 검사를 마친 샘플의 처리문제 등이 가장 심각한 문제로 대두되고 있다. 또한, 무엇보다도 환자에게 방사선에 의한 노출을 최소화할 수 있도록 핵의학적 방법이 아닌 다른 분자영상 방법을 이용하여 림프노드를 감지하는 방법의 개발이 절실한 상황이다.

[0006] 그러나 아직까지 형광염료가 부착된 생체친화적 코어-셸(core-shell) 형태의 고분자 나노젤을 이용하여 림프노드를 감지하는 방법에 대해서는 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 생체에 독성을 미치지 않으면서도 효과적으로 림프노드 검진용 광학영상 프로브를 연구한 결과, 생체에 독성을 미치지 않는 고분자를 이용하여 나노젤을 만들고 표면에 형광염료를 부착한 형광 고분자 나노젤이 생체 주입 후 빠르게 림프노드에 도달하며, 다음 림프노드로의 이동이 느릴 뿐 아니라 형광 강도도 세다는 사실을 최초로 규명하였고 상기 형광 고분자 나노젤을 림프노드 검진용 광학영상 프로브로 사용할 수 있다

는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하여 형광성을 측정함으로써, 형광 고분자 나노젤의 축적여부를 통해 림프노드를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 형광 고분자 나노젤을 이용한 림프노드 영상 측정방법을 제공하는 것이다.

[0010] 이에 더하여 본 발명의 또 다른 목적은 형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하는 단계 및 상기 고분자 나노젤의 형광을 측정하여 림프노드를 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 림프노드의 맵(map)화 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하여 형광성을 측정함으로써, 형광 고분자 나노젤의 축적여부를 통해 림프노드를 확인하는 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예로, 상기 고분자 나노젤은 코어-셸(core-shell) 구조를 갖는 고분자 나노젤로서 코어 부분이 친유성(hydrophobic)기로 구성되어 있고 셸 부분이 친수성 고분자로 구성되며 표면에 형광염료가 부착된 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 고분자는 폴리아크릴산(poly(acrylic acid)), 폴리사카라이드(polysaccharide), 키토산(chitosan), 히알루론산(hyaluronic acid), 폴리아미노산(poly(amino acid)) 또는 풀루란(pullulan)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 형광은 근적외선 또는 가시광선 영역의 형광염료인 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 근적외선 영역의 형광염료는 Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 780, cy5, cy5.5, cy7, 인도시아닌 그린(ICG), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750 또는 Rhodamine800로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 가시광선 영역의 형광염료는 Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, cy2, cy3, cy3.5, Fluorescein (FITC), NBD, Nile Red, Rhodamine B, Tetramethylrhodamine (TRITC) 또는 Texas Red로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 고분자 나노젤은 크기가 10 nm 내지 70 nm 인 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한 본 발명은 형광 고분자 나노젤을 이용한 림프노드 영상 측정방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 구현예로, 상기 영상 측정은 형광 고분자 나노젤의 시험관 내(in vitro) 영상화, 생체 내(in vivo) 영상화, 생체분포(biodistribution) 추적 또는 암세포 표지(in vitro cell labelling)로 이루어진 군중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 이에 더하여, 본 발명은 형광 고분자 나노젤을 검체 내 투입하는 단계 및 상기 고분자 나노젤의 형광을 측정하여 림프노드를 확인하는 단계를 포함하여 이루어지는 림프노드의 맵(map)화 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 형광 고분자 나노젤은 생체 내 주입시 센티넬 림프노드에서 비교적 장시간 머물면서 다른 림프노드로의 이동이 적은 특성이 우수하므로, 기존의 방사능 의약품을 사용하지 않고 림프노드의 위치를 실시간으로 정확하게 감지할 수 있는 효과가 있다.

[0023] 또한, 본 발명의 형광 고분자 나노젤은 근적외선 형광염료가 부착되어 있어 가시광선 형광 염료에 비해 피부투과도가 우수하며, 피하 깊은 곳에 위치한 림프관과 림프노드 분자 영상이미지를 획득할 수 있어서 수술과정 중 림프노드의 맵화와 생검에 대한 가이드(guiding)에 적용할 수 있는 장점을 가지고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 형광 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브의 (a)근적외선 형광 영상과 (b)형광 스펙트럼을 나타낸 것이다.
- 도 2는 실온에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 형광 고분자 나노젤과 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 형광염료의 광안정성을 (a)형광영상과 (b)그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 (a)0.5 μg 의 형광염료와 (b)50 μg 의 형광 고분자 나노젤을 마우스에 주사하고 근적외선 광학영상 장비를 통해 얻은 생체 내 센티넬 림프노드 근적외선 광학 영상이다.
- 도 4는 1.25 μg 의 형광염료와 50 μg 의 형광 고분자 나노젤을 마우스에 주사하고 2 ~ 48 시간 경과 후 적출한 림프노드로부터 얻은 생체 밖(ex vivo) 센티넬 림프노드 근적외선 광학영상이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 형광 고분자 나노젤을 검체 내에 투입하고 형광성을 측정함으로써, 형광 고분자 나노젤의 축적여부를 통해 림프노드를 확인하는 방법을 제공함에 그 특징이 있으며, 보다 구체적으로는 코어-셸(core-shell) 구조를 갖는 고분자 나노젤의 코어(core) 부분은 친유성(hydrophobic) 이고, 셸(shell) 부분은 친수성인 생체친화적 고분자의 표면에 형광염료가 부착된 것을 특징으로 하는 형광 고분자 나노젤을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0026] 본 발명자들은 기존에 알려진 림프노드 검진용 광학영상 프로브의 문제점인 방사선 오염, 실리카의 독성문제를 방지할 수 있는 새로운 림프노드 검진용 광학영상 프로브의 개발을 위해 연구하던 중 생체친화적 재료로 제조한 고분자 나노젤에 형광염료를 부착하여, 효과적으로 림프노드를 감지할 수 있는 림프노드 검진용 광학영상 프로브를 제조하고, 이를 분자영상용 프로브로 사용하였을 때 림프노드를 보다 쉽고 정확하게 감지하는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0027] 근적외선 형광영상염료는 근적외선 영역에서 형광을 내는 특성 때문에 다양한 분야에 활용이 되고 있으나 물질 자체의 광안정성이 낮고, 그 크기가 작아 더 많은 분야로의 활용에는 제한을 받고 있다.
- [0028] 본 발명자들은 이러한 형광영상염료를 림프노드 감지에 사용하여, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 제조함으로써, 형광염료의 광학 특성은 그대로 유지하고 형광염료의 낮은 광안정성을 획기적으로 향상시키는 방법 개발하였다.
- [0029] 먼저, 본 발명의 일실시예를 통해 생체친화성 고분자 소재를 이용하여 제조한 고분자 나노젤에 형광염료를 부착함으로써, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 제조하고 형광 감도를 측정한 결과, 0.5 mg/ml 농도에서 가장 형광 강도가 높으며 농도가 감소함에 따라 형광 강도 역시 감소하는 것으로 나타났고, 0.5 mg/ml 이상에서는 농도가 증가함에 따라 형광 감도는 감소하는 것으로 나타났다. 또한, 형광염료를 대조군으로 하여 본 발명의 형광염료가 부착된 고분자 나노젤 광학영상 프로브의 광학 특성을 광학 히스토그램을 통해 알아본 결과 차이가 없는 것으로 나타났다(도 1 참조).
- [0030] 이에 더하여, 대조군인 형광염료는 실온에서 1시간이 경과한 후 형광 강도가 급격하게 감소하는 것으로 나타났으나, 본 발명의 형광염료가 부착된 고분자 나노젤 광학영상 프로브는 1시간이 경과한 후에도 형광강도가 거의 일정하게 유지되는 것으로 나타났다(도 2 참조).
- [0031] 상기 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 형광 고분자 나노젤이 시간이 경과한 후에도 형광 강도가 일정함을 확인하고, 형광 고분자 나노젤을 생체 내에 투입하여 림프노드의 영상을 측정해 보았다.
- [0032] 형광염료를 림프노드 감지에 사용할 때, 형광염료 분자의 크기가 너무 작으면 생체 내에 주입되었을 때 형광염료가 센티넬 림프노드에 오래 머물러 있지 않고 주변의 다른 림프노드로 이동해 버리는 문제점이 있는데, 이러한 문제점은 실제 수술과정에 적용했을 때 암 조직 주위의 어느 림프노드가 센티넬 림프노드인지를 구분하기 어렵게 만드는 단점이 있다.
- [0033] 본 발명자들은 이러한 문제점을 해결하기 위해 크기가 큰 생체친화성 고분자 소재에 형광염료를 부착하여 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 구성하였다.
- [0034] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 본 발명의 형광염료(0.5 μg)가 부착된 고분자 나노젤 50 μg 을 마우스의 피부에 주입하였을 때, 2분이 지난 후부터 센티넬 림프노드에서 강한 형광신호가 감지되기 시작하였고 30분이 경과한 후에도 센티넬 림프노드에서 방출되는 형광강도가 매우 강하다는 것을 확인하였으며, 이에 반해, 대조군으

로 0.5 μg 의 형광염료를 단독으로 피부에 주입한 결과, 시간이 경과함에 따라 센티넬 림프노드 방향으로 형광염료가 이동하는 경향은 파악되었으나, 30분이 경과한 후에는 형광염료가 센티넬 림프노드에 머물러 있지 않고, 다른 림프노드로 이동하기 때문에 센티넬 림프노드에서의 형광강도가 매우 약해지는 것으로 나타났다(도 3 참조).

[0035] 또한, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 마우스 피부에 주입한 다음 센티넬 림프노드에서 머무르는 시간을 확인 한 결과, 대조군으로 1.25 μg 의 형광염료를 단독으로 피부에 주입하였을 때는 1 ~ 2 시간 경과 후에 센티넬 림프노드에 형광염료가 이동하였으나 24시간이 경과한 후에는 형광염료가 센티넬 림프노드에 머물러 있지 않고 다른 림프노드로 이동하여 센티넬 림프노드에서의 형광강도가 매우 약하게 나타났지만, 본 발명의 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브 50 μg 을 피부에 주입하였을 때는 1 ~ 2분이 지났을 때 센티넬 림프노드에서 강한 형광신호가 감지되고, 24시간이 경과한 후에도 다른 림프노드로 이동하지 않고 센티넬 림프노드에 머물러 있기 때문에 센티넬 림프노드에서 방출되는 형광강도가 매우 강한 것으로 나타났다(도 4 참조).

[0036] 따라서 상기 결과를 통해 본 발명자들은 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 이용하여 센티넬 림프노드를 감지하는 방법을 사용할 경우, 본 발명의 광학영상 프로브가 다른 림프노드로 이동하지 않고 센티넬 림프노드 오래 머물러 있으면서 센티넬 림프노드 감지 효과를 높인다는 사실을 알 수 있었다.

[0037] 그러므로 본 발명은 형광 고분자 나노젤을 이용하여 림프노드 영상을 측정하는 방법을 제공할 수 있다.

[0038] 또한, 상기 영상 측정은 당업계에 공지된 여러 가지 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, 이에 한정되지는 않으나 시험관 내(*in vitro*) 영상화, 생체 내(*in vivo*) 영상화, 생체분포(biodistribution) 추적 또는 암세포 표지(*in vitro* cell labelling)가 포함된다.

[0039] 한편, 림프노드의 감지에 나노크기의 물질을 사용할 경우, 그 크기가 5 nm 이하면 나노입자가 혈액내로 빠지게 되고, 100 nm 이상이면 생체 내 투여 부위에서 림프관을 따라 림프절로 이동하는 속도가 현저하게 느려져, 수술 시에 바로 적용할 수 없는 문제가 있기 때문에, 본 발명의 고분자 나노젤은 바람직하게는, 10nm 내지 70 nm인 것으로 제조할 수 있다.

[0040] 광학 영상 염료는 가시광선 및 근적외선 파장영역에서 형광특성을 나타내는 형광염료로써, 특히 빛에 대한 피부 침투도가 최대가 되는 근적외선 영역에서 형광특성을 나타내는 근적외선 광학염료를 이용한 영상프로브는 신호 대 잡음비(S/N)가 높아 신호를 감지하기 용이하다. 본 발명에서 사용할 수 있는 광학 영상 염료는 당업계에 공지된 근적외선 또는 가시광선 영역의 형광염료를 사용할 수 있으며, 바람직하게는, 근적외선 형광염료일 수 있다.

[0041] 상기 근적외선 형광염료로 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 780, cy5, cy5.5, cy7, 인도시아닌 그린(ICG), Cypate, ITCC, NIR820, NIR2, IRDye680, IRDye700, IRDye800, DiD, DiR, Cresy Violet, Nile Blue, Oxazine 750, Rhodamine800 또는 기타 시아닌 계열, Oxaines 계열, Rhodamines 계열 염료를 사용할 수 있다. 가시광선 형광 염료로는 이에 한정되지는 않으나, 바람직하게는, Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, cy2, cy3, cy3.5, Fluorescein isothio-cyanate (FITC), NBD, Nile Red, Rhodamine B, Tetramethylrhodamine (TRITC) 또는 Texas Red가 있다.

[0042] 나아가 본 발명에 따른 형광 고분자 나노젤의 고분자는 생체 친화성 고분자로써 합성 고분자 및 생체 유래 고분자를 포함하며, 이에 한정되지는 않으나 바람직하게는 폴리아크릴산(poly(acrylic acid)), 폴리사카라이드(polysaccharide), 키토산(chitosan), 히알루론산(hyaluronic acid), 폴리아미노산(poly(amino acid)) 또는 폴루란(pullulan)을 사용할 수 있다.

[0043] 본 발명의 다른 측면으로, 본 발명은 형광 고분자 나노젤의 약제학적 유효량을 개체에 투여하여 림프노드를 검진하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 개체란 림프노드의 검진을 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다. 또한, 본 발명에서 약제학적 유효량은 개체의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음은 당업자에게 명백하다.

[0044] 본 발명에 따른 형광 고분자 나노젤의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태 및 투여경로에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0045] 본 발명의 형광 고분자 나노젤은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육 또는 피하로 투여될 수 있다.

[0046] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0047] 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브의 제조

[0048] 본 발명자들은 형광염료가 부착된 생체친화성 고분자 나노젤을 제조하기 위하여 다음과 같은 방법으로 진행하였다. 플루란(pullulan)은 Wako Chemical사에서 구입하였고, 형광염료로는 NHS ester 반응기를 가지고 있어서 아민기를 함유하는 고분자에 결합하는 특성이 있는 IRDye800CW를 Licor사에서 구입하여 사용하였다.

[0049] 플루란 나노젤은 플루란과 콜레스테롤의 결합체에 아민화 과정을 거쳐서 제조하였는데, 플루란 콜레스테롤 결합체를 제조하기 위하여 플루란의 하이드록시그룹과 아민-콜레스테롤 [Cholesterol-2,2'-(Ethylene dioxy) bis(ethylamine) conjugate]의 아민그룹 간에 반응을 유도하였다.

[0050] 우선, 아민-콜레스테롤을 제조하기 위하여 2,2'-(Ethylene dioxy) bis(ethylamine) 37 g(250 mmol)을 무수 톨루엔 250 ml에 녹인 다음 소량의 무수톨루엔에 cholesteryl chloro formate를 2.25 g(5 mmol) 녹인 것을 10분에 걸쳐서 서서히 첨가하였다. 이 때, 반응기는 0℃로 유지하였고, 이후 상온에서 16시간동안 반응을 지속하였다. 반응이 완료된 후에는 무수황산 마그네슘으로 물을 제거하고, 증발 농축기로 건조한 다음 건조물을 회수하여 dichloromethane 20 ml와 메탄올 20 ml의 혼합용액에 녹이고 여과하였다. 이에 따라 중탄산염들이 제거되었고, 이를 건조하여 흰색의 파우더를 얻었다.

[0051] 이어서 플루란 1 g과 아민-콜레스테롤 0.086g을 DMSO에 혼합하고, 여기에 1,1'-Carbonyldiimidazole 1.134g을 첨가하여 반응시킨 다음 플루란-콜레스테롤 결합체를 얻었다. 다음으로 DMSO 50 ml에 플루란-콜레스테롤의 결합체와 1,1'-Carbonyldiimidazole 38 mg을 혼합하여 24시간 반응을 실시함으로써 아민화 반응을 유도하였다. 이렇게 제조된 아민기를 함유하는 플루란 나노젤 복합체 2 mg와 IRDye800CW NHS ester 0.1 mg을 3차 증류수 1 ml에 2시간동안 반응시킨 뒤 PD10 컬럼을 이용하여 반응하지 않은 형광염료를 제거함으로써, 형광염료가 부착된 플루란 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브 (10 µg 형광염료/1 mg 프로브)를 제조하였다.

[0052] 제작된 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브 용액을 2, 1, 0.5, 0.25 및 0.125 mg/ml 농도로 0.2 ml 튜브에 0.2 ml씩 각각 분주한 다음, 도 1에 나타낸바와 같이, 데이터 획득 및 분석을 위해 자체 제작한 근적외선 광학영상 측정 장치(home made NIR optical imaging system)를 이용하여 영상을 촬영하였으며, 형광 분광계(Fluorescence Spectrophotometer; FluoroMate FS-2)를 이용하여 근적외선 형광 스펙트럼을 측정하였다.

[0053] 상기 자체 제작한 근적외선 영상 측정 장치는 500mW 화이버 형태의 레이저로 구성된 광원(light source), 방출 필터(emission filter), 마크로 줌이 장착된 렌즈 시스템, 근적외선 검출기(NIR CCD detector)로 구성되며, 자체 제작한 근적외선 광학영상 측정 장치에서 형광의 세기는 슈도 컬러(pseudo color)로 나타나고, 붉은 형광을 나타낼수록 형광강도가 세다는 것을 의미한다. 모든 근적외선 형광 영상은 760 nm 레이저와 835/55 nm (810~860 nm 여기과장 측정) 필터 세트를 이용하여 측정하였다.

[0054] 이에 더하여, 시간의 흐름에 따른 형광강도를 측정한 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, 형광염료 단독 시료(1µg/ml)는 시간 경과에 따라 1 시간 내에 급격하게 형광 강도가 감소한 반면, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브 시료(100 µg/ml)는 1시간이 지나도 형광강도가 거의 일정하게 유지된다.

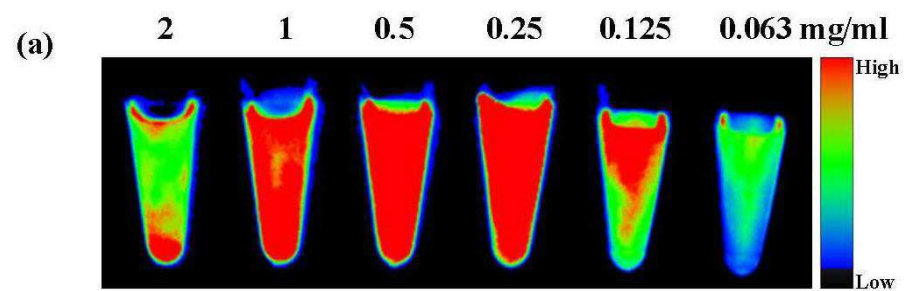
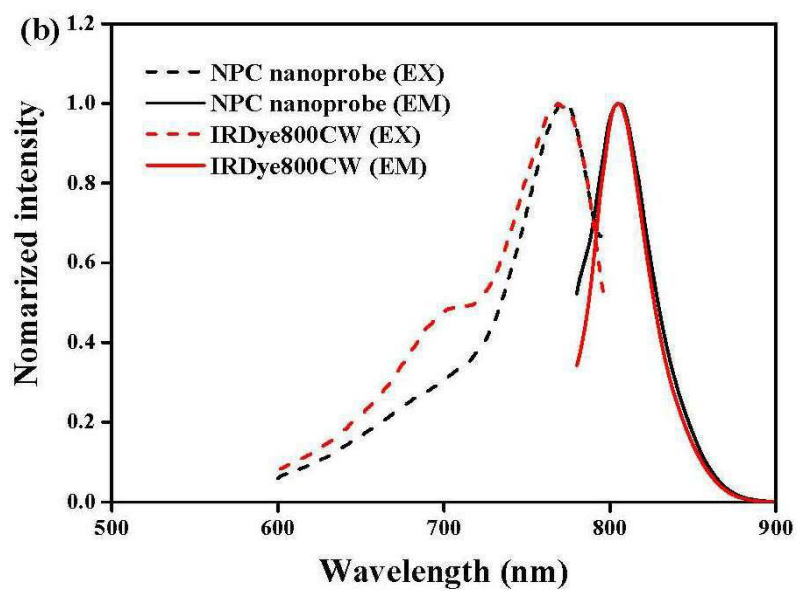
실시예 2

[0055] 센티넬 림프노드의 생체 내 영상화

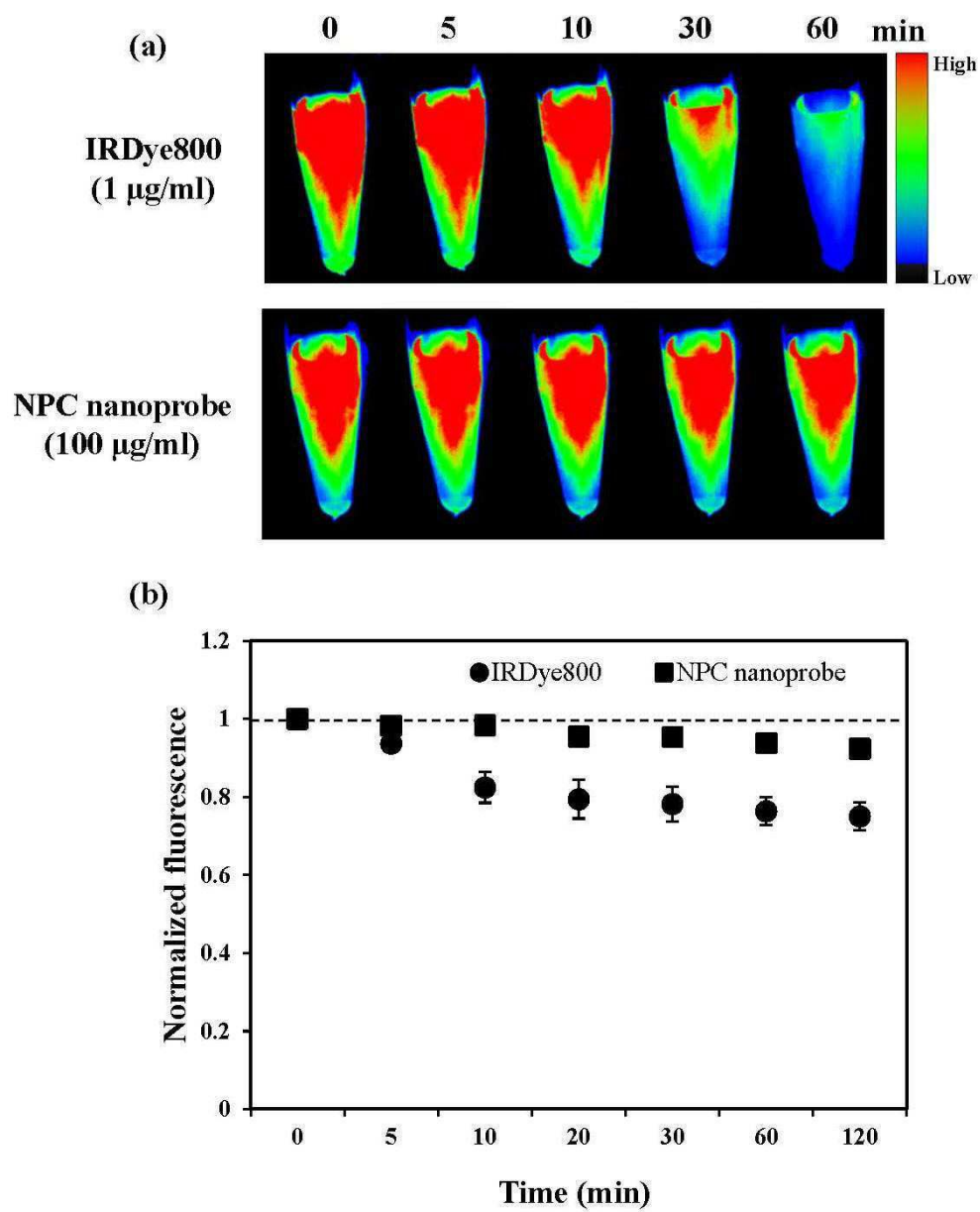
- [0056] 상기 <실시예 1>에서 제조한 형광염료가 부착된 고분자 나노젤의 생체 내(*in vivo*)에서의 특성을 알아보기 위하여, 동물실험을 수행하였다. 동물실험에는 특정 병원균이 없는 6주령의 암컷 BALB/c 마우스를 사용하였으며, 모든 동물실험은 충남대학교 공동동물실험센터에서 승인을 받아 수행하였다.
- [0057] 먼저, 체중(g) 당 0.01 ml의 2.5% 아버틴(*avertin*; 2,2,2 - tribromoethanol - tert - amyl alcohol, Sigma) 용액을 마우스의 복강에 주입하여 마우스를 마취시키고, 50 μ l의 형광염료 IRDye800CW (10 μ g/ml)가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브 용액(1 mg/ml)을 마우스 왼쪽 앞발바닥에 각각 주입(*footpad*, *subcutaneous injection*)한 다음 2, 5, 10 및 30 분 후에 센티넬 림프노드의 형광 강도를 측정하였으며, 대조군으로는 50 μ l의 형광염료 IRDye800CW (10 μ g/ml)를 단독으로 처리한 마우스를 사용하였다.
- [0058] 데이터의 획득 및 분석은 상기 <실시예1>에 기재한 자체 제작 근적외선 광학영상 측정 장치 (*home made NIR optical imaging system*)를 이용하였다.
- [0059] 형광 강도의 측정 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브의 경우, 30분이 경과한 후에도 센티넬 림프노드에서 방출되는 형광강도가 매우 강한 반면, 형광염료만 피부에 주입한 대조군의 경우 센티넬 림프노드에서의 형광강도가 매우 약하다는 것을 알 수 있다.
- [0060] 시간이 경과함에 따라 대조군의 형광염료는 센티넬 림프노드에 머물러 있지 않고, 다른 림프노드로 이동하는 것으로 나타났다.
- [0061] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브를 피부에 주입하였을 경우, 48시간이 경과한 후에도 다른 림프노드로 이동하지 않고 센티넬 림프노드에 머물러 있으며, 센티넬 림프노드에서 방출되는 형광강도가 매우 강하다는 것을 확인할 수 있는 반면, 대조군에서는 형광염료를 주입하고 시간이 지남에 따라 형광강도가 약해지다가 24시간이 경과한 후에는 형광염료가 센티넬 림프노드에 머물러 있지 않고 다른 림프노드로 이동하며, 센티넬 림프노드에서의 형광강도도 매우 약한 것을 확인할 수 있다.
- [0062] 상기 결과는 본 발명의 형광염료가 부착된 고분자 나노젤을 함유하는 광학영상 프로브가 센티넬 림프노드에서 강한 형광강도를 보이며, 오랜 시간 센티넬 림프노드에 머문다는 것을 의미한다.
- [0063] 이상의 설명은 본 발명의 기술 사상을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로서, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 수정, 변경 및 치환이 가능할 것이다. 따라서, 본 발명에 개시된 실시예 및 첨부된 도면들은 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예 및 첨부된 도면에 의하여 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 보호 범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

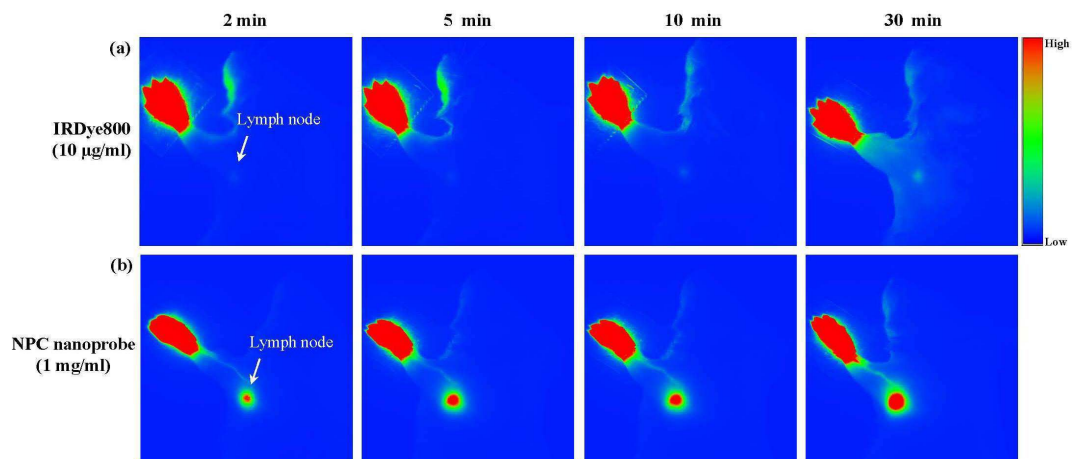
도면1



도면2



도면3



도면4

