



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0110401
(43) 공개일자 2014년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/08 (2006.01) *A61K 49/04* (2006.01)
A61K 49/06 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0024657
(22) 출원일자 2013년03월07일
심사청구일자 2013년03월07일

(71) 출원인
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
안대로
경기도 파주시 동폐로 117, 301동 1202호 (동폐동, 교하벽산아파트)
김세훈
서울특별시 성북구 오페산로 90, 118동 402호 (하월곡동, 삼성래미안아파트)
(74) 대리인
박장원

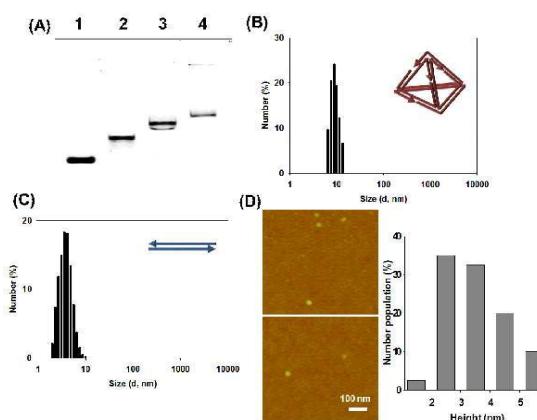
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 조영제 조성물 및 이를 이용한 바이오 영상화 방법

(57) 요약

본 발명은 조영제 조성물 및 이를 이용한 바이오 영상화 방법에 관한 것이다. 본 발명의 조영제 조성물은 생분자인 DNA 나노 구조체를 주요 성분으로 포함하기 때문에, 본질적으로 비세포독성 및 비면역성이며, 다른 유기 또는 무기 기반 조영제 조성물에서 관찰될 수 있는 안전성 문제를 야기할 가능성이 낮다. 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 우수한 세포 내 섭취 및 안정성을 나타내어 충분한 조영 증강 효과를 통해 질병의 진단을 용이하게 할 뿐만 아니라, 기존에 탐색이 어려웠던 감시럽프절까지 영상화할 수 있기 때문에, 암의 전이 여부를 용이하게 판단하고, 저침습적 치료의 임상 적용을 가능하게 한다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

DNA 나노케이지 구조체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조영제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 DNA 구조체는 사면체, 육면체, 팔면체, 십이면체, 이십면체, 육팔면체, 십이이십면체, 이중 피라미드 또는 풀로렌(fullerene) 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 DNA 구조체는 사면체 구조를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 DNA 구조체는 무기 또는 유기 염료(dye), 형광체, 동위원소, 자성체, 상자성 나노입자 또는 초상자성 나노입자로 표지된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 형광 영상화(fluorescence imaging), 광학 영상화(optical imaging), 방사선 영상화, 컴퓨터 단층(CT) 촬영 또는 MRI(magnetic resonance imaging) 영상화에 사용되기 위한 것인 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 암 또는 암 전이의 진단에 사용되기 위한 것인 조성물.

청구항 7

질병의 발병 또는 진행상황을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 제1항에 따른 조영제 조성물을 사용하여 조직을 영상화하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 조직은 감시림프절인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 질병은 암 또는 암의 전이인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 방법은 인 비보(*in vivo*)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 조영제 조성물 및 이를 이용한 바이오 영상화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

감시림프절(Sentinel lymph nodes, SLNs)은 일차 종양에서 떨어져 나온 암세포가 림프 도관을 통해 최초로 도달하는 림프절이다. 감시림프절의 상태를 평가하는 것은 암의 단계를 정확하게 결정함에 있어 매우 중요하며, 그에 따라 암의 예후 및 가장 적합한 치료법이 결정된다.¹ 현재 유방암 및 흑색종 환자의 경우, 전이를 진단하기 위하여 침습적인 감시림프절 생검(SLNB)을 수행하고 있는데, 이를 대체할 수 있는 비침습적인 방법이 요구된다. 특히, 청색 염료 및 방사능 콜로이드에 기반한 비침습적 영상화 기법이 약 20년 전에 도입된 이래로, 임상 연구에서 감시림프절(SLNs) 확인을 위한 기법으로 주로 사용되고 있다.²⁻³ 이들 기법들은 널리 사용됨에도 불구하고, 여전히 단점이 가지고 있다. 청색 염료의 경우, 그 스펙트럼의 한계로 인하여 피부 절제 없이는 감시림프절을 확인할 수 없다는 단점이 있다.⁴ 또한, 염료는 소분자이기 때문에 초기 적하점으로부터 신속하게 배출된다. 이러한 신속한 확산은, 투과성의 림프 도관들로 둘러싸인 감시림프절 내에 잘 보유되지 않는 원인이 된다. 감시림프절에 단시간 보유(ca. 15- 20 분)⁵된 후에, 염료는 제2차 결절로 넘어가게 되는데, 이는 다른 후속 결절로부터 감시림프절을 구별하는 것을 어렵게 만든다. 최근에 ICG(인도시아닌 그린), 근적외선(NIR) 염료가 이러한 청색 염료의 광학적 단점을 극복하고자 개발되었다.⁶⁻⁷ ICG 사용에 의하여 감시림프절의 육안 탐지는 개선되었지만, ICG 역시도 소분자이기 때문에 짧은 보유 시간 문제는 여전히 해결되지 않았다. 소분자 염료를 기반으로 하는 영상제작은 대조적으로, ^{99m}Tc-표지된 황 콜로이드를 포함하는, 동위원소 표지된 콜로이드의 경우 상대적으로 느린 확산속도를 가지며, 그 결과 투여 부위에 남아 있는 경향이 있다.⁸⁻⁹ 이러한 느린 확산으로 인하여, 콜로이드는 림프절에 도달할 때까지 장시간이 걸리며, 따라서 림프 맵핑을 시행하기 전날에 투여되어야 한다. 또한, 이러한 방사능 동위원소 기법은 방사능 제제에 대한 안전 규정 때문에 제한된 장소에서만 사용될 수 있다. 이러한 전통적인 염료-가이드 또는 방사능-가이드 SLN 맵핑 기법에서의 단점을 극복하기 위하여, SLN 확인에 있어, 초음파¹⁰⁻¹², 컴퓨터 단층 X선 사진 촬영(CT)¹³⁻¹⁴, 자기 공명 영상¹⁵⁻¹⁷, 광학 이미지화¹⁸⁻²², 광음향 단층 사진 촬영²³⁻²⁶ 기법 등이 연구되어 왔다. 이렇게 새롭게 연구된 기법들은 주로 나노 입자 기반 조영제 이용에 관한 것인데, 이는 나노 입자 기반 조영제가 방사성 핵종의 콜로이드와 비교하여 림프절 부위에 상대적으로 신속하게 도달하면서도, 또한 작은 염료와 비교해서는 SLN 영역에서 유지되는 시간이 길기 때문이다. 그러나, 무기 또는 고분자 나노입자는 생물학적으로 비천연의 물질로부터 유래한 것이기 때문에 인 비보에서 잠재적인 독성을 가질 수 있다.

[0003]

한편, 내재적으로 생적합성인 DNA가 자가 조립하여 사면체, 이중 피라미드, 8면체, 12면체 및 풀로렌(fullerene)-유사 구조를 포함하는 다양한 3차원(3D) 구조의 DNA 나노 케이지를 형성한다는 것이 종전에 보고된 바 있다.²⁷ 이들 중에서 특히 DNA 사면체는 4개의 DNA 가닥으로부터 간단하게 조립되어 고수율로 제조될 수 있기 때문에, 가장 실용적인 DNA 나노케이지 중 하나로 여겨지고 있다.²⁸⁻²⁹ DNA 나노케이지가 포유류 세포 중심으로 섭취된다는 최근의 보고는 나노케이지가 생의학 적용에 있어 중요한 역할을 할 수 있게 하는 기회를 열었다.³⁰ 또한, DNA 나노케이지는 뉴클레아제에 대하여 현저하게 저항성이다.³¹ 비록 종전 연구들이 DNA 나노케이지가 약물 전달 및 인 비트로 세포 수준에서의 면역 반응 자극과 같은 생명 공학 연구에 있어 전도 유망한 도구가 될 수 있음을 기술한 바 있지만,³²⁻³³ 삼차원 DNA 나노 구조의 인 비보 적용은 여전히 기초 개발 단계 수준이다. 이와 관련하여 선각자적인 연구로서, 최근에 siRNA를 포함하는 DNA 사면체가 개발되어 인 비보 시스템 중에서 효과적으로 mRNA를 조절하기 위하여 사용된 바 있다.³⁴

[0004]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문

현의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) 논문(Goodman, R. P. et al., Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* 2005, 310, 1661-1665)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명자들은 기존의 나노 입자 기반 조영제와 비교하여 세포 내부로 신속하게 도입되면서도 연장된 보유시간을 가지고, 동시에 인 비보에서 생체에 무해한 조영제 조성물의 개발을 위하여 연구 노력하였다. 그 결과 내재적으로 생적합성인 DNA의 3차원 나노구조체가, 증가된 세포 섭취 및 안정성을 구비하여 인 비보 바이오 영상화에 매우 유용하게 사용될 수 있다는 것을 밝혀냄으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 상기 DNA 3차원 나노구조체를 적용한 조영제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 조영제 조성물을 이용한 바이오 영상화 방법을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 하나의 관점은 삼차원 DNA 나노케이지 구조체 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조영제 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 내재적으로 생적합성인 DNA 가 자가 조립하여 형성하는 삼차원 DNA 나노케이지 구조는 통상의 이중사 DNA와 비교하여 뉴클레아제에 대하여 현저하게 높은 저항성을 갖는다. 본 발명자들은 DNA의 삼차원 나노구조체가 높은 생적합성 및 세포 내 안정성뿐만 아니라, 표지를 위한 유연성을 가지고 있음에 착안하여, 이를 응용한 인 비보 영상화를 설계 및 수행한 결과, 놀랍게도 삼차원 DNA 나노케이지 구조체가 선형의 DNA 이중사와 비교하여 증가된 세포 섭취 및 세포 내 안정성을 가지는바, 인 비보 바이오 영상화에 매우 적합하다는 것을 밝혀내기에 이르렀다.
- [0012] 본 발명의 조영제 조성물에 포함되는 상기 DNA 나노구조체란 통상 선형인 DNA가 자가 조립하여 형성된 3차원 케이지 형상의 구조를 갖는 것으로서, 예컨대 사면체, 육면체, 팔면체, 십이면체, 육팔면체, 십이십면체와 같은 다양한 다면체 구조, 이중 피라미드 또는 풀로렌(fullerene) 구조 등을 가질 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0013] 바람직한 구현예에서, 상기 삼차원 DNA 나노케이지 구조체는 사면체일 수 있다.
- [0014] 다양한 삼차원 DNA 나노케이지 구조체 중에서, 특히 DNA 사면체는 4개의 DNA 가닥으로부터 간단하게 조립되어 고수율로 제조될 수 있기 때문에 가장 실용적이며, 또한 DNA 사면체는 림프 배수 및 림프절 유지를 위하여 요구되는 유체역학적 직경(6 내지 10 nm)³⁵ 범위에 속하는 크기를 가지기 때문에, 특히 SLN 조영제로서 좋은 후보자이다.
- [0015] 그러나, DNA 사면체 이외의 다른 다양한 삼차원 DNA 나노케이지 구조체들도 증가된 세포 섭취 및 안정성을 가지

는 것으로서, 조영제 나노입자로서 유용하게 사용될 수 있다.

- [0016] 본 발명의 조영제 조성물에 있어서, 상기 DNA 구조체는 무기 또는 유기 염료(dye), 형광체, 동위원소, 자성체, 상자성 나노입자 또는 초상자성 나노입자로 표지된 것일 수 있다.
- [0017] 상기 무기 또는 유기 염료는 기존의 염료를 포함하여 형광 또는 광학 영상, 컴퓨터 단층(CT) 촬영과 같은 방사선 영상화, 초음파 또는 MRI와 같은 비방사선 영상화에 있어서 영상의 대조도를 증가시키기 위하여 사용되는 것으로서, 예컨대 디아트리조에이트(Diatrizoate), 메트리조에이트(Metrizoate), 이옥사글레이트(Ioxaglate), 이오파미돌(Iopamidol), 이오헥솔(Iohexol), 이옥실란(Ioxilan), 이오프로미드(Iopromide), 이오디산올(Iodixanol), 바륨 설페이트와 같은 바륨계 염료, 가스트로그라핀(Gastrografin)[®] 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 상기 형광 표지자로는, 예컨대 인도시아닌, NIR(근적외선) 염료, 플루오레신(Fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), Cy3, Cy5(Pharmacia), 발색단, 화학발광단, 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제) 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 삼차원 DNA 나노케이지 구조체는 방사성 동위 원소로 표지될 수도 있는데, 사용 가능한 방사성 동위 원소의 예는 ¹⁰C, ¹¹C, ¹³O, ¹⁴O, ¹⁵O, ¹²N, ¹³N, ¹⁵F, ¹⁷F, ¹⁸F, ³²Cl, ³³Cl, ³⁴Cl, ⁴³Sc, ⁴⁴Sc, ⁴⁵Ti, ⁵¹Mn, ⁵²Mn, ⁵²Fe, ⁵³Fe, ⁵⁵Co, ⁵⁶Co, ⁵⁸Co, ⁶¹Cu, ⁶²Cu, ⁶²Zn, ⁶³Zn, ⁶⁴Cu, ⁶⁵Zn, ⁶⁶Ga, ⁶⁶Ge, ⁶⁷Ge, ⁶⁸Ga, ⁶⁹Ge, ⁶⁹As, ⁷⁰As, ⁷⁰Se, ⁷¹Se, ⁷²As, ⁷³Se, ⁷⁴Kr, ⁷⁴Br, ⁷⁵Br, ⁷⁶Br, ⁷⁷Br, ⁷⁷Kr, ⁷⁸Br, ⁷⁸Rb, ⁷⁹Rb, ⁷⁹Kr, ⁸¹Rb, ⁸²Rb, ⁸⁴Rb, ⁸⁴Zr, ⁸⁵Y, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁸⁷Zr, ⁸⁸Y, ⁸⁹Zr, ⁹²Tc, ⁹³Tc, ⁹⁴Tc, ⁹⁵Tc, ⁹⁵Ru, ⁹⁵Rh, ⁹⁶Rh, ⁹⁷Rh, ⁹⁸Rh, ⁹⁹Rh, ¹⁰⁰Rh, ¹⁰¹Ag, ¹⁰²Ag, ¹⁰²Rh, ¹⁰³Ag, ¹⁰⁴Ag, ¹⁰⁵Ag, ¹⁰⁶Ag, ¹⁰⁸In, ¹⁰⁹In, ¹¹⁰In, ¹¹⁵Sb, ¹¹⁶Sb, ¹¹⁷Sb, ¹¹⁵Te, ¹¹⁶Te, ¹¹⁷Te, ¹¹⁷I, ¹¹⁸I, ¹¹⁸Xe, ¹¹⁹Xe, ¹¹⁹I, ¹¹⁹Te, ¹²⁰I, ¹²⁰Xe, ¹²¹Xe, ¹²¹I, ¹²²I, ¹²³Xe, ¹²⁴I, ¹²⁶I, ¹²⁸I, ¹³¹I, ¹²⁹La, ¹³⁰La, ¹³¹La, ¹³²La, ¹³³La, ¹³⁵La, ¹³⁶La, ¹⁴⁰Sm, ¹⁴¹Sm, ¹⁴²Sm, ¹⁴⁴Gd, ¹⁴⁵Gd, ¹⁴⁵Eu, ¹⁴⁶Gd, ¹⁴⁶Eu, ¹⁴⁷Eu, ¹⁴⁷Gd, ¹⁴⁸Eu, ¹⁵⁰Eu, ¹⁹⁰Eu, ¹⁹¹Au, ¹⁹²Au, ¹⁹³Au, ¹⁹³Tl, ¹⁹⁴Tl, ¹⁹⁴Au, ¹⁹⁵Tl, ¹⁹⁶Tl, ¹⁹⁷Tl, ¹⁹⁸Tl, ²⁰⁰Tl, ²⁰⁰Bi, ²⁰²Bi, ²⁰³Bi, ²⁰⁵Bi, ²⁰⁶Bi, 또는 이들의 유도체를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 삼차원 DNA 나노케이지 구조체는 자성체, 상자성 나노입자 또는 초상자성 나노입자로 표지될 수도 있는데, 이 경우 특히 MRI를 이용한 영상화에 있어 유용하게 활용될 수 있다.
- [0021] 상자성 나노입자란 스판-격자 이완을 일으킬 수 있는 물질로서, 예컨대 Magnevist(Schering, Germany), Gd-DTPA(Gd-diethylene triamine pentaacetic acid)와 같은 Gd 칼레이트 화합물, Gd₂O₃(C. Riviere et al. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 5076.), MnO(T. Hyeon et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007, 46, 5397.) 등의 물질을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 초상자성 나노입자란 외부에서 자기장을 주었을 때 자화되고, 유도 자기장을 발생시켜 주변 물분자의 수소 핵스핀의 스판-스핀 과정에 영향을 주며, 자기공명영상 신호를 증폭시키어, 통상 물과 비교하여 어두운 조영 효과(dark or negative contrast effect)를 나타내는 물질로서, 예컨대 산화철 성분을 포함하는 Feridex, Resovist, Combidex, MEIO(magnetism engineered iron oxide) 등을 사용할 수 있으나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기와 같이, 삼차원 DNA 나노케이지 구조체가 어떠한 성분으로 표지되는지에 따라, 본 발명의 조영제 조성물을 형광 영상화(Fluorescence imaging), 광학 영상화(optical imaging), 방사선 영상화, 컴퓨터 단층(CT) 촬영 또는 MRI용으로 적절하게 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 조영제 조성물은 상술한 삼차원 DNA 나노케이지 구조체와 함께 약제학적으로 혼용되는 담체를 포함하는데, 상기 약제학적으로 혼용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐파리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 혼용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어

있다.

[0025] 본 발명의 조영제 조성물은 비경구 또는 경구 방식으로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수방강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조영제 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 조직을 영상화하여 그로부터 질병을 진단하는 데 유용하게 사용할 수 있는데, 특히 암 또는 암 전이의 진단에 바람직하게 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 다른 관점은 질병의 발병 또는 진행상황을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 상술한 조영제 조성물을 사용하여 조직을 영상화하는 방법을 제공하는 것이다.

[0028] 본 발명의 조영제 조성물은 증가된 세포 내 섭취 및 우수한 세포 내 안정성을 가지는 생적합성 삼차원 DNA 나노 케이지 구조체를 포함하기 때문에, 생체 조직을 영상화하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0029] 바람직한 구현예에서, 상기 영상화하고자 하는 조직은 감시림프절일 수 있는데, 감시림프절은 투과성의 림프 도관들로 둘러싸여 물질의 배출이 신속한 관계로 기존의 조영제로는 탐색이 어려웠다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 조영제 조성물은 감시림프절 중의 세포 속으로 섭취 및 유지되어, 증가된 감시림프절 내 보유시간을 나타내므로, 빠른 정맥 역류로 인하여 탐색이 곤란하였던 감시림프절까지도 우수하게 국소화하는 특징을 갖는다.

[0030] 상술한 바와 같이 본 발명의 방법은 감시림프절까지 영상화할 수 있는 방법으로서, 암 또는 암의 전이의 진단을 위하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 인 비보에서 수행될 수 있다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 조영제 조성물은 생분자인 DNA 나노 구조체를 주요 성분으로 포함한 것으로서, 본질적으로 비세포독성 및 비면역성이며, 다른 유기 또는 무기 기반 조영제 조성물에서 관찰될 수 있는 안전성 문제를 야기할 가능성이 낮다. 또한, 본 발명의 조영제 조성물은 우수한 세포 내 섭취 및 안정성을 나타내어 충분한 조영 증강 효과를 통해 질병의 진단을 용이하게 할 뿐만 아니라, 기존에 탐색이 어려웠던 감시림프절까지 영상화할 수 있기 때문에, 암의 전이 여부를 용이하게 판단하고, 저침습적 치료의 임상 적용을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

[0032] **도 1.** Td의 특성 확인. (A) 사면체 조립을 확인하기 위한 천연 PAGE. 레인 1: Cy5-S4; 레인 2: Cy5-S4 및 S3; 레인 3: Cy5-S4, S3 및 S2; 레인 4: Cy5-S4, S3, S2 및 S1. Td(B) 및 Ds(C)의 유체역학적 크기를 측정하기 위한 DLS 데이터. (D) Td의 AFM 이미지 및 AFM 이미지 중에서의 Td 입자의 고도 분포.

도 2. 10% 마우스 혈청 중에서 선형의 DNA 이중사(Cy5-Ds) 및 DNA 사면체 안정성의 겔 전기영동 분석.

도 3. DNA 프로브를 사용한 SLN 영상화. Cy5-Td (A) 또는 Cy5-Ds (B)를 주입한 직후(상단) 및 2시간 후(하단)의 마우스 영상. (C) Cy5-Td(백색점) 및 Cy5-Ds(흑색점) 주입 후 SLN 영역에서의 시간 의존적인 Cy5 발광의 강도 변화.

도 4. Cy5-Td을 주입한 마우스의 광학 단층 X선 사진 영상. Cy5의 발광에 의하여 왼쪽 겨드랑이에 있는 SLN가 특히 눈에 띈다.

도 5. (A) 투여 2시간 후에 찍은 인 비보 형광 영상. (B) Cy5-Ds-주입한 마우스(상단) 및 Cy5-Td-주입한 마우스(하단)로부터 유래한 분리된 기관의 엑스 비보 NIR 형광 영상. 표시된 장기들은 왼쪽부터 순서대로 간, 폐, 비장, 신장, 심장, 종양, 왼쪽 겨드랑이 SLNs 및 오른쪽 겨드랑이 SLNs이다. (C) SLNs에서의 Cy5(적색) 및 자동형 광(녹색)이 혼합되지 않은 발광 프로파일. (D) Cy5-Ds-주입된 마우스(상단) 및 Cy5-Td-주입된 마우스(하단)로부터 유래한 분리된 장기의 비혼합된 형광 이미지로서, 특히 왼쪽 겨드랑이 SLN로부터의 Cy5 발광을 보여준다.

도 6. Cy-Td(A) 및 Cy-Ds(B)의 조직학적 위치의 형광 분석. 좌측 패널 중 사각형 영역을 확대한 것을 우측 패널에 나타내었다. 밝은 필드 영상을 상단에, 그에 대응하는 형광 영상을 하단에 각각 나타내었다. 핵은 DAPI로 염색되어 녹색을 띤다.

도 7. SLN 조직의 조직학적 영상 중에서의 강도 비교. 사진 중에 포함된 숫자는 카메라로 읽은 카운트 수준을 나타내면서, Cy5의 평균 형광 신호를 표시한다.

도 8. DNA 프로브의 세포 섭취. (A) Td 및 Ds의 세포 내 섭취를 보여주고 있는 RAW264.7 세포의 형광 현미경 영상. (B) 미처리 대조군(흑색)과 비교하여 나타낸, Td(녹색) 및 Ds(적색) 처리된 세포의 유세포 분석 프로파일. (C) Ds와 비교하여 Td의 증가된 세포 섭취를 보여주는 정량적 데이터.

도 9. RAW264.7 세포에 대한 Ds 및 Td의 세포 독성

도 10. Td (10a) 및 Ds (10b)의 안정성을 시험하기 위한 세포 내 FRET. 공여자(Cy3)에 대한 여기 및 발광 필터를 사용하여 얻은 영상을 맨 윗줄에 나타내었다. 수용자(Cy5)에 대한 필터를 사용하여 얻은 영상을 맨 아래 줄에 나타내었다. 공여자에 대한 여기 필터 및 수용자에 대한 발광 필터를 사용하여 얻은 FRET 영상을 중간 줄에 나타내었다.

도 11. 세포 내 FRET. DNA 프로브로 처리한 후 0 시간(11a), 2 시간(11b), 4 시간(11c), 6 시간(11d), 8 시간(11e) 및 24 시간(11f) 동안 RAW264.7 세포를 배양하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명 하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0034]

실시예

[0035]

<실험방법>

[0036]

DNA 사면체(Td) 및 선형의 이중사 DNA(Ds)의 제조.

[0037]

모든 DNA 올리고뉴클레오타이드는 바이오니어(대한민국, 대전)로부터 구입하였다. S1, S2, S3 및 Cy5-S4(또는 FAM-S4)를 혼합하여 Td를 조립하였다. TM 완충액(10 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl₂, pH=8.0) 중에 4개의 DNA 서열(각 서열 250 nM)을 혼합하였다. PCR 기계(Applied Biosystems, USA)를 사용하여, 상기 혼합물을 95°C까지 가열하여 변성시키고, 4°C까지 냉각하여 어닐링되도록 하였다. Ds는 Td 조립에 사용한 것과 동일한 방법으로, Cy5-S4 및 그의 상보적 가닥(c-S4)으로부터 제조하였다.

[0038]

DNA 사면체 및 선형의 이중사 DNA를 구성하기 위하여 사용한 올리고뉴클레오타이드 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

[0039]

[표 1]

S1	5'-CCAGGCAGTTGAGACGAACATTCTAAGTCTGAAATTATCACCCG CCATAGTAGACGTATCA
Cy3-S1	5'-Cy3-CCAGGCAGTTGAGACGAACATTCTAAGTCTGAAATT TCACCCG CCATAGTAGACGTATCA
S2	5'-CTTGCTACACGATTCAAGACTTAGGAATGTCGACATGCGAGGGTCC AATACCGACGATTACAG
S3	5'-GGTGATAAAACGTGTAGCAAGCTGTAATCGACGGGAAGAGCATGC CCATCCACTACTATGGCG
S4	5'-CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTACGAGGATGGCATG CTCTTCCCGACGGTATTGGAC
Cy5-S4	5'-Cy5-CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTACGAGGATGGCATG CTCTTCCCGACGGTATTGGAC
FAM-S4	5'-fluorescein-CCTCGCATGACTCAACTGCCTGGTACGAGGATG GGCATGCTCTTCCCGACGGTATTGGAC
c-S4	5'-GTCCAATACCGTCGGGAAGAGCATGCCATCCTCGTATCACCAGG CAGTTGAGTCATGCGAGG

[0040]

[0041]

겔 전기영동. DNA 사면체의 형성을 확인하기 위하여, 100 V 조건 하, 4°C의 완충액 중에서 40분 동안, 비변성 폴리아크릴아미드 겔(6%)에서 전기영동을 수행하였다. 전기 영동 후에 형광스캐너(Typhoon 9400, GE healthcare, USA)를 사용하여 이미지를 시각화하였다.

[0042]

동적 광산란 측정. 문헌³⁸에 기재된 방법에 따라, 제타사이저(Malvern, UK) 중에서 Td의 유체역학적 크기(hydrodynamic size)를 측정하였다.

[0043]

뉴클레아제에 대한 저항성 측정. 안정성 시험을 위하여, DNA 용액(90 μL, 900 nM)에 10% 마우스 혈청(10 μL, Sigma Aldrich, USA)을 첨가하고, 혼합물을 37°C에서 배양하였다. 각각의 시점에, 98% 탈이온화 포름아마이드, 10 mM EDTA, 브로모페놀 블루 및 자일렌시아놀 0.5 mg/ml로 구성된 정지 용액을 첨가하여 반응을 정지시키고, 변성 12% PAGE (7 M 우레아) 상에서 분석을 수행하였다. 손상되지 않은 DNA 구조의 양은 형광 스캐너(Typhoon9400, GE Healthcare, USA) 상에서 Cy5-S4를 시각화하여 측정하였다.

[0044]

인 비보 영상화에 의한 SLN 맵핑. 동물 실험은 한국 과학기술원 동물 보호 및 사용 위원회의 승인을 받았으며, 모든 마우스는 위원회의 규정에 따라 처리하였다. 인 비보 영상화 및 질병 모델 제작을 위하여, 0.5% 펜토바르비탈 나트륨(0.01 mL/g)을 복막 내 주입하여 마우스를 마취시켰다. BALB/c 누드 마우스(5주령, 웅성, Orient Bio Inc., Korea)를 이용하여 동물 질병 모델을 제작하였다. 마우스의 대퇴부에 SCC7 세포(배양 배지 중에 혼탁 시킨 1.0×10^6 개의 세포)를 피하 접종하여 종양을 생성시켰다. Cy5-Ds 및 Cy5-Td를 왼쪽 발바닥 피하 내에 주입

하였다. 고감도 영상 시스템(IVIS-스펙트럼, Perkin-Elmer, USA) 중에서 수행되는 CCD 카메라를 사용하여 SLN 맵핑의 실시간 형광을 기록하였다.

[0045] 엑스 비보 영상화 및 조직학적 분석. 인 비보 영상 연구 후에, 인 비보 영상화에서 사용된 것과 동일한 획득세트를 구비한 IVIS-스펙트럼 영상 시스템을 사용하여, 절제된 기관, 림프절 및 몸통의 다른 부위에 대한 엑스 비보 근적외선 형광 영상을 얻었다. 광학적 및 형광 조직학적 관찰을 위해, 현미경(Leica DMI3000 B, 독일; 및 누안스 멀티스펙트럼 영상 시스템, Perkin Elmer, USA)을 사용하여 OCT-함침된 림프절의 DAPI(4',6'-디아민-2-페닐인돌)-염색된 단편(20 μ m, CM1900 microtome, Leica, 독일)을 관찰하였다.

[0046] RAW264.7 세포 속으로 Td 감염. 열로 불활성화한 10% 우태아 혈청, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지(Gibco, USA)가 들어있는 유리바닥 35 mm 페트리 접시에 RAW264.7 세포를 넣었다. 2.5×10^4 개 세포를 각각의 접시에 접종하고, 5% CO_2 를 포함하는 37° C의 습한 대기 환경 중에서 상기 접시를 밤새 배양하였다. 각각의 세포 시료로부터 성장 배지를 제거하고, PBS(Gibco, USA)를 사용하여 세포를 2회 세척하였다. 혈청 및 항생제가 없는 신선한 배지(250 μ L) 중에 있는 Td 또는 Ds(250 nM)를 사용하여 각각의 감염 혼합물을 준비하고, 이를 세포 시료에 첨가하고, 5% CO_2 를 포함하는 37° C의 습한 대기 중에서 6시간 동안 배양하였다.

[0047] RAW264.7 세포 속에 있는 Td의 현미경 영상화. 현미경 시험 및 유세포 분석을 위하여, FAM-S4 가닥을 사용하여 형광 표지된 Td를 제작하였다. Hoechst 34580(3 μ g/mL, Invitrogen, USA)을 사용하여 핵을 염색하고, PBS(200 μ L)로 세포를 2회 세척하였다. 그 다음 세포 배양 배지(200 μ L)를 첨가하였다. 형광 현미경(DeltaVision, Applied Precision, USA)으로 살아있는 세포를 영상화하였다. 플루오레신 및 Hoechst 34580를 위하여 사용된 여기/발광 필터는 각각 480-500/509-547 nm와 340-380/432-482 nm이었다.

[0048] 유세포 분석. RAW264.7 세포를 10^5 세포/mL의 밀도로 24-웰 플레이트에 접종하고, 24시간 동안 배양한 다음, PBS로 2회 세척하였다. 감염 실험에서 채택한 방법과 동일한 방법을 사용하여 플루오레신 표지된 DNA 문자와 함께 배양 및 수득하고, PBS로 3회 세척하였다. 그 다음 트립신 보충물(TrypLE™, Gibco, USA) 0.2 mL를 각각의 시료에 첨가하고, 37° C에서 5분간 배양하였다. 그 다음 각각의 시료에 배지 1 mL를 첨가하고, 얻어진 세포 혼탁액을 원뿔형 투브(Falcon™ tubes, BD Biosciences, USA)로 이전한 후, 2500 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고, 세포 펠렛을 PBS 1 mL에 재현탁시켰다. 유세포 분석기(FC500, Beckman coulter, USA)를 사용하여 세포의 플루오레신 강도를 측정하였다. 적어도 1,000개 세포의 시료를 3회 분석하였다.

[0049] 세포 생존 분석. MTT 분석법으로 Td의 세포독성을 측정하였다. 구체적으로, 배지(100 μ L)와 함께 8.0×10^3 개 RAW264.7 세포를 96-웰 플레이트에 접종하고, ~80% 컨플루언시가 될 때까지 밤새 배양하였다. 그 다음, 세포를 혈청 및 항생제를 포함하지 않는 신선한 배지와 함께, 선형의 이중사 DNA 또는 DNA 사면체의 존재 하에서 37°C의 CO_2 챔버에서 6시간 동안 배양하였다. 그 다음 배지를 포함하는 시료를 제거하고, PBS로 세포를 3회 세척하였다. 신선한 세포 배양 배지와 함께 세포를 CO_2 챔버 중에서 48시간 동안 배양하였다. 그 다음 각각의 세포에 티아졸릴 블루 테트라졸리움 브로마이드(MTT, TACS, Germany) 용액(10 μ L)을 첨가하고, 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. 디메틸 살포사이드(DMSO, Sigma-Aldrich, USA) 200 μ L로 세포를 용출시켰다. 상온에서 밤새 배양한 후에, 마이크로플레이트 리더(SpectraMax Plus™, Molecular Devices, USA)를 사용하여 580 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0050] FRET(Fluorescence resonance energy transfer) 분석. 10% 열 불활성화 우태아 혈청, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신을 포함하는 DMEM 배지(Gibco, USA)와 함께 RAW264.7 세포를 유리바닥 35 mm 페트리 접시 중에 두었다.

2.5×10^4 개 세포를 각각의 접시에 접종한 후, 5% CO₂를 포함하는 37° C의 습한 대기 중에서 밤새 배양하였다. 각각의 세포 시료로부터 성장 배지를 제거하고, PBS(Gibco, USA)로 세포를 2회 세척하였다. Cy3-S1, S2, S3 및 Cy5-S4를 혼합하여 Cy3-Td-Cy5를 제작하였다. Cy3-Ds-Cy5는 Cy3-c-S4 및 Cy5-S4를 혼합하여 준비하였다. Td 및 Ds를 위한 단일 표지된 대조군 프로브는 Cy3-S1, S2, S3 및 S4 (또는 S1, S2, S3 및 Cy5-S4) 및 S4 및 Cy3-S1 (또는 S1 및 Cy5-S4) 각각을 혼합하여 준비하였다. PCR 기계를 사용하여, 95°C까지 가열하여 혼합물을 변성시키고, 4°C까지 냉각하여 어닐링을 수행하였다. 감염은 섭취 실험에서 채택한 것과 동일한 방법을 사용하여 수행하였다. DNA 시료의 최종 농도는 100 nM이었다. 그 다음 세포를 PBS로 2회 세척하고, 37° C에서 신선한 세포 배지 (200 μL)와 함께 배양하고, 형광 현미경(Delta Vision)을 사용하여 다른 시점(0, 2, 4, 6, 8 및 24 시간)에서 영상화하였다. Cy3 및 Cy5에 대하여 사용한 여기/발광 필터는, 각각 542-570/594-630 및 630-650/665-705 nm이었다. FRET 분석을 위하여, Cy3/Cy3(제공자/제공자), Cy3/Cy5(제공자/수용자) 및 Cy5/Cy5(수용자/수용자)와 같은 다른 여기/발광 필터를 사용하여 신호를 기록하고, ImageJ로 분석하였다

[0051] <실험결과>

[0052] DNA 사면체를 조립하고, 사면체 구조(Td)의 구성을 비변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 상에서 분석한 결과, PAGE 분석에서 DNA 사면체 조립의 전형적인 현상인 DNA의 사슬형 첨가에 의한 지연 증가가 관찰되었다(도 1A). 크기 측정을 위하여 DNA 사면체에 대한 DLS(dynamic light scattering)를 측정하고, 이를 선형의 이중선 DNA (Ds)와 비교하였다. DNA 사면체 및 DNA 이중선의 크기는 각각 8.89 (± 0.22) nm 및 4.19 (± 0.39) nm으로 나타났다(도 1B 및 1C). 추가 특성화를 위하여 AFM를 더 측정하였으며, AFM 이미지에서 관찰된 DNA 사면체의 크기는 건조 상태에서 3 내지 5 nm 이었다(도 1D).

[0053] DNA 나노구조의 혈청 안정성을 측정하기 위하여 Cy5-표지된 Td(Cy5-Td)의 뉴클레아제 저항성을 10 % 마우스 혈청 용액 중에서 시험한 결과, 사면체 구조의 경우 그 70 % 이상이 상기 혈청 용액에 7 시간 노출된 뒤에도 유지된 반면, 선형 이중 DNA(Cy5-Ds)의 경우는 3 시간 후에 완전히 분해되는 것으로 관찰되었다(도 2). Td의 이러한 장시간 혈청 안정성은 SLN 영상화를 위해 바람직한 특성인데, 왜냐하면 SLN을 시각화한 후 SLN생검에 대략 30분이 소요되기 때문이다.³⁶

[0054] DNA 사면 구조체의 특성화 및 혈청에서의 안정성 분석 이후에, Cy5-표지된 DNA 구조체(Cy5-Td)를 종양을 가진 마우스의 앞발에 피하 주입하여 SLNs 영상화를 시도하였다. 앞발의 SLNs가 일반적으로 겨드랑이 영역에 위치하기 때문에, SLNs를 지정하기 위하여, 겨드랑이 영역의 피부를 통한 형광 신호를 관찰하였다. 도 3은 DNA 프로브 주입 후의 마우스의 형광 영상을 나타낸다. 영상화 프로브로서 Cy5-Td를 사용함으로써, 겨드랑이 SLNs가 성공적으로 탐지되었다(도 3A). 반면에, 선형 DNA 프로브인 Cy5-Ds는 SLNs에서 무시할 정도의 형광 신호를 나타낼 뿐이었고, SLNs의 공간 정보를 제공하는데 실패하였다(도 3B). Cy5-Td가 특이적으로 SLNs 중에서 관찰된 것과는 대조적으로, Cy5-Ds는 안면과 같이 의도하지 않은 영역에서 관찰되었다. 프로브에 의한 SLN 영상화에 관한 동적 정보를 얻기 위하여 각각의 프로브의 립프절에서의 형광 강도를 정량화하였다(도 3C). 형광 강도는 Cy5-Td의 주입 2시간 후에 최대 수준에 도달하였다. 그 다음 8시간 동안에는 강도가 배경 수준으로 천천히 감소하였다. 사면체 구조와 달리, 선형의 DNA는 측정 동안에 배경 신호와 거의 구별할 수 없을 정도의 강도 수준만을 제공하였다. 이러한 결과는 DNA 사면체가 SLN 영상화에 사용될 수 있으며, DNA 물질이 상기 적용에 활용되기 위해서는 나노입자-유사 구조가 필수적임을 시사한다. 겨드랑이 SLNs 중의 Cy5-Td의 위치변경은 도 4에서 보여지는 바와 같이 프로브 주입된 마우스의 단층 X선 사진 촬영 영상을 통해 추가적으로 나타내었다.

[0055] 살아있는 동물 중에서 Cy5-Td에 의한 특이적인 SLN 영상화를 관찰한 다음, 주입 2시간 후 희생된 마우스 중에서 형광 DNA 사면체의 생분포를 관찰하였다(도 5A). Cy5 표지된 DNA 사면체로부터 유래한 형광은 Cy5-Td 프로브가 주로 SLNs 중에 축적되었고, 신장, 간 및 비장에 소량으로 축적되었음을 나타내었다(도 5B 상단). 반면에, 선형 DNA 프로브인 Cy5-Ds는 SLNs 중에 상대적으로 적은 양이 축적되었고, 프로브를 포함하는 다른 기관과 유사한 양으로 축적되는 것으로 확인되었다(도 5B 하단). 다른 조직과 SLNs 사이의 발광 스펙트럼의 차이는 SLNs 중에서 관찰되는 뚜렷한 형광 강도가 Cy5 표지된 DNA 사면체로부터 유래한 것임을 나타내며, 이는 조직의 자가 형광으로부터 유래하는 비특이적 영상화의 가능성을 배척하는 것이다(도 5C 및 5D).

[0056] Cy5-Td에 의한 효과적인 SLNs 영상화를 관찰한 후에, 분절을 조직학적 분석하여 SLNs 조직 중의 DNA 구조체의 분포를 조사하였다. 냉동 섹션 중의 Cy5의 형광 강도는 Cy5-Td의 대부분이 동양구조(sinuroid) 영역에 있는 세포에 의하여 섭취되었음을 나타내었는데, 이는 형광 발광에 의해 확인될 수 있다(도 6A). 반면에, Cy5-Ds는 산

만하고 흐린 염색 영역을 나타내면서, 세포 중에 거의 축적되지 않은 것으로 확인되었다(도 6B). Cy5-Td-처리된 조직의 상대적인 강도는, 대조군 배경 수준으로 낮은 강도를 보인 Cy5-Ds-처리된 조직의 것과 비교하여 대략 5배 더 높은 것으로 나타났다(도 7).

[0057] 인 비보 SLN 영상화 동안에 관찰된 DNA 구조체의 세포 섭취를 추가적으로 시험하기 위하여, RAW264.7 마우스 조직구 전구 세포 중에서 DNA 구조체 세포 섭취에 관한 인 비트로 연구를 수행하였다. 조직구 세포는 림프절 중에서 발견되는 다양한 세포 형태 중의 하나이기 때문에³⁷, 인 비트로 세포 연구를 위한 모델 시스템으로서 RAW264.7을 선택하였다. 플루오레신으로 표지된 DNA 사면체를 RAW264.7 세포와 함께 6시간 배양한 경우, 현미경 검사시 세포질이 형광을 나타내었는데, 이는 Td가 성공적으로 세포 중으로 전달되었음을 나타내는 것이다(도 8A). 그러나, Ds의 전달은 Td와 같이 효과적이지 못하였다. 세포 속으로의 DNA 구조체 섭취를 정량적으로 분석하기 위하여, 유세포 분석법으로 전달 효율을 분석하였다(도 8B 및 8C). Ds와 비교하여 상대적으로 증가된 Td의 전달이 관찰되었는데, 이는 현미경 검사 영상과 일치하는 것이었다.

[0058] 한편, DNA 사면체의 세포 독성 관점에 있어서, Td는 세포 생존 능력에 영향을 미치지 않았는데, 이는 DNA 나노 구조체가 세포 독성이 없음을 나타내는 것이다(도 9).

[0059] 또한, 세포 중에서의 사면 구조체의 안정성을 연구하기 위하여, 이중 표지된 Cy3-Td-Cy5의 FRET(형광 공명 에너지 전달) 효율을 관찰하였다. Cy3-Td-Cy5로 처리된 세포 상의 제공자(donor)에 대한 여기광을 조사한 다음, 발광 프로파일을 취득하였다. 580 nm에서 감소되는 제공자 강도에 대한 670 nm에서 증가되는 수용자 강도의 비율로서 FRET 신호를 관찰하였다(도 10 및 도 11). 단일 표지된 Cy3-Td 및 Cy5-Td으로 처리된 세포의 강도를 배경 대조군으로 사용하였다. 형광 세포 영상화를 위하여 DNA 프로브 농도를 증가시켜 사용하였다(100 nM). 도 10a는 다른 시점에서의 Td의 세포 내 FRET 이미지를 나타낸다. 비록 시간의존적인 감소가, Cy3 및 Cy5 강도에서뿐만 아니라, FRET 효율에서도 관찰되었지만, FRET-기반 신호는 Td로 처리한 세포 중에서, 심지어 8시간 후에도 여전히 관찰되었는데, 이는 Td가 세포 내에서 상당한 안정성을 가짐을 보여준다. 이는 종전 결과³¹⁻³²와도 일치하는 것이다. 반면에, 선형의 Cy3-Ds-Cy5로부터 유래한 FRET 신호는 빠르게 감소하여 4시간 후에 배경 수준에 근접하였는데(도 10b), 이는 인 비트로 혈청 안정성 평가의 경향과 잘 상응하는 것이다(도 11). 이러한 결과는 DNA 사면체에 의한 성공적인 SLN 영상화가 선형 이중사와 비교하여 DNA 사면체가 갖는 SLNs 조직구 세포 속으로의 증가된 세포 섭취 및 증가된 세포내 안정성에서 기인하는 것임을 제시한다.

<결 론>

[0060] 상기 실시예에 있어서, 본 발명자들은 DNA 구조체상의 Cy5 표지의 형광에 기반한 효과적인 SLN 영상화를 위한 나노 크기의 DNA 사면체를 활용하였다. 염료로 표지된 DNA 나노 구조체에 의한 SLNs의 시각화는 인 비보 모델 시스템 중에서 성공적으로 기술되었다. 선형의 DNA 프로브와 비교하여 DNA 사면체는 SLNs 중에 효과적으로 위치하였고, 마디에서 증가된 보유 시간을 나타내었다. 이와 같은 DNA 사면체의 SLN 맵핑을 위한 장점들은 DNA 구조체의 증가된 세포 섭취에서 기인하는 것이었다.

[0061] [0062] 또한, 본원발명자들은 마우스 조직구 전구 세포를 사용한 인 비트로 FRET 분석을 수행하여, DNA 사면체의 세포 섭취 효율 및 증가된 세포 내 안정성을 평가하였다. 사면체는 뉴클레아제에 대하여 현저하게 저항성인데, 이는 DNA 사면체를 인 비보 영상 기법에 있어 더욱 매력적인 도구로 만든다.

[0063] 사면체뿐만 아니라, 사면체를 포함하는 다른 다양한 삼차원 나노케이지 구조체들 또한 선형의 이중사 DNA와 비교하여 증가된 세포 섭취 및 세포 내 안정성을 나타내므로, SLN 맵핑에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0064] DNA 구조체는 대사적인 뉴클레오타이드로 분해될 수 있는 내재적인 생분자로 구성된 것이기 때문에, 이는 실질적으로 비-세포독성이고, 비-면역성이며, 임상 영역에 적용되었을 때 다른 유기 또는 무기 나노입자 기반 영상화 시스템에서 관찰될 수 있는 안전성 문제를 야기할 가능성이 낮다. 게다가 형광 표지뿐만 아니라, 다른 영상화 양식들을 위한 화학 모이어티도 구조체의 DNA 가닥에 쉽게, 그리고 장소 특이적으로 결합할 수 있다. 그러므로, 인 비보 영상화에 있어서의 성공적인 수행, 높은 생적합성 및 맞춤 변형을 위한 무궁한 잠재력을 구비한 단순한 제조법과 함께, DNA 삼차원 나노케이지 구조체는 인간 임상 모델에서도 또한 조영제로서 유용할 것으로 기대된다.

<참고 문헌>

- [0065] **<참고 문헌>**
- [0066] 1. Torabi, M.; Aquino, S. L.; Harisinghani, M. G. Current Concepts in Lymph Node Imaging. *J. Nuc. Medi.* **2004**, *45*, 1509-1518.
- [0067] 2. Krag, D. N.; Weaver, D. L.; Alex, J. C.; Fairbank, J. T. Surgical Resection and Radiolocalization of the Sentinel Lymph Node in Breast Cancer Using a Gamma Probe. *Surg. Oncol.* **1993**, *2*, 335-339.
- [0068] 3. Giuliano, A. E.; Kirgan, D. M.; Guenther, J. M.; Morton, D. L. Lymphatic Mapping and Sentinel Lymphadenectomy for Breast Cancer. *Ann. Surg.* **1994**, *220*, 391-398.
- [0069] 4. Abe, H.; Mori, T.; Umeda, T.; Tanaka, M.; Kawai, Y.; Shimizu, T.; Cho, H.; Kubota, Y.; Kurumi, Y.; Tani, T. Indocyanine Green Fluorescence Imaging System for Sentinel Lymph Node Biopsies in Early Breast Cancer Patients. *Surg. Today* **2011**, *41*, 197-202.
- [0070] 5. Sato, K. Current Technical Overviews of Sentinel Lymph Node Biopsy for Breast Cancer. *Breast Cancer* **2007**, *14*, 354-361.
- [0071] 6. Kitai, T.; Inomoto, T.; Miwa, M.; Shikayama, T. Fluorescence Navigation with Indocyanine Green for Detecting Sentinel Lymph Nodes in Breast Cancer. *Breast Cancer* **2005**, *12*, 211-215.
- [0072] 7. Tagaya, N.; Yamazaki, R.; Nakagawa, A.; Abe, A.; Hamada, K.; Keiichi Kubota, K.; Oyama, T. Intraoperative Identification of Sentinel Lymph Nodes by Near-Infrared Fluorescence Imaging in Patients with Breast Cancer. *Am. J. Surg.* **2008**, *195*, 850-853.
- [0073] 8. Tsopelas, C. Particle Size Analysis of (99m)Tc-Labeled and Unlabeled Antimony Trisulfide and Rhenium Sulfide Colloids Intended for Lymphoscintigraphic Application. *J. NucI. Med.* **2001**, *42*, 460-466.
- [0074] 9. Wilhelm, A. J.; Mijnhout, G. S.; Franssen, E. J. Radiopharmaceuticals in Sentinel Lymph Node Detection - An Overview. *Eur. J. NucI. Med.* **1999**, *26*, S36-S42.
- [0075] 10. Vassallo, P.; Edel, G.; Roos, N.; Naguib, A.; Peters, P. E. In-Vitro High-Resolution Ultrasonography of Benign and Malignant Lymph Nodes : A Sonographic-Pathologic Correlation. *Invest Radiol.* **1993**, *28*, 698-705.
- [0076] 11. Yang, W. T.; Goldberg, B. B. Microbubble Contrast-Enhanced Ultrasound for Sentinel Lymph Node Detection: Ready for Prime Time? *Am. J. Roentgenol.* **2011**, *196*, 249-250.
- [0077] 12. Krishnamurthy, S.; Sneige, N.; Bedi, D. G.; Edieken, B. S.; Fornage, B. D.; Kuerer, H. M.; Singletary, S. E.; Hunt, K. K. Role of Ultrasound-Guided Fine-Needle Aspiration of Indeterminate and Suspicious Axillary Lymph Nodes in the Initial Staging of Breast Carcinoma. *Cancer* **2002**, *95*, 982-988.
- [0078] 13. Kim, J.; Lee, J.; Chang, E.; Kim, S.; Suh, K.; Sul, J.; Song, I.; Kim, Y.; Lee, C. Selective Sentinel Node Plus Additional Non-Sentinel Node Biopsy Based on an FDG-PET/CT Scan in Early Breast Cancer Patients: Single Institutional Experience. *World J. Surg.* **2009**, *33*, 943-949.
- [0079] 14. Oh, M. H.; Lee, N. H.; Kim, H. S.; Park, S. P.; Piao, Y.; Lee, J. S.; Jun, S. W.; Moon, W. K.; Choi, S. H.; Hyeon, T. H. Large-Scale Synthesis of Bioinert Tantalum Oxide Nanoparticles for X-ray Computed Tomography Imaging and Bimodal Image-Guided Sentinel Lymph Node Mapping. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5508-5515.
- [0080] 15. Joshi, T.; Pankhurst, Q.; Hattersley, S.; Brazdeikis, A.; Hall-Craggs, M.; De Vita, E.; Bainbridge, A.; Sainsbury, R.; Sharma, A.; Douek, M. Magnetic Nanoparticles for Detecting Sentinel Lymph Nodes. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2007**, 1135.
- [0081] 16. Song, K. H.; Kim, C.; Cobley, C. M.; Xia, Y.; Wang, L. V. Near-Infrared Gold Nanocages as a New Class of Tracers for Photoacoustic Sentinel Lymph Node Mapping on a Rat Model. *Nano Lett.* **2009**, *9*, 183-188.

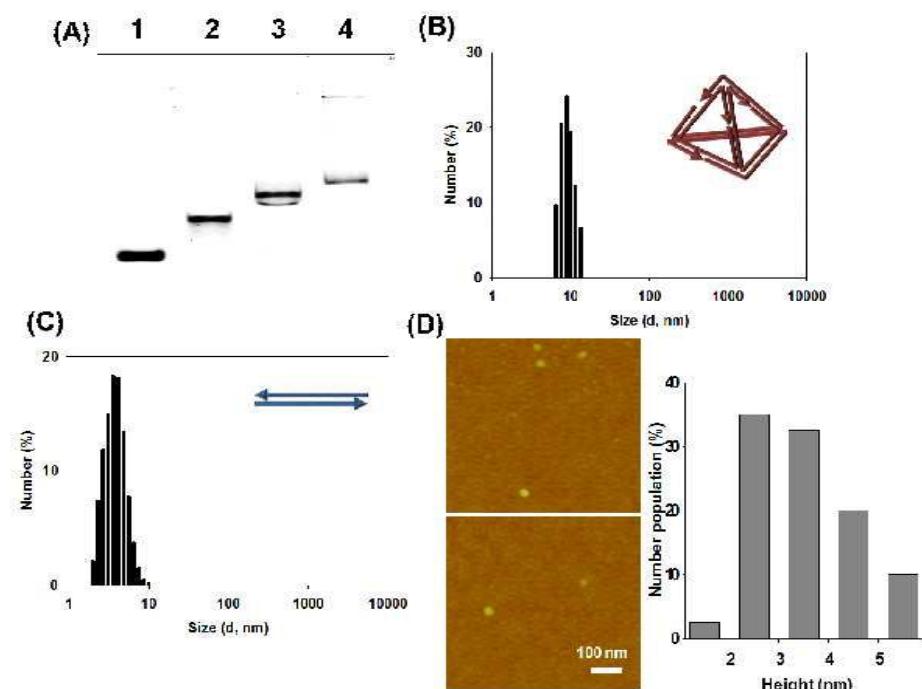
- [0082] 17. Surguladze, B.; Zhorzoliani, R.; Tsikitishvili, T. Novel Method of Sentinel Lymph Node Detection in Malignant Tumors Using Preparation 'Unimag'. *Breast Cancer Res.* **2007**, *9* (Suppl 1), 15.
- [0083] 18. Kim, S. H.; Lim, C. K.; Na, J. H.; Lee, Y. D.; Kim, K. M.; Choi, K. W.; Leary, J. F.; Kwon, I. C. Conjugated Polymer Nanoparticles for Biomedical In Vivo Imaging. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 1617-1619
- [0084] 19. Noh, Y. W.; Kong, S. H.; Choi, D. Y.; Park, H. S.; Yang, H. K.; Lee, H. J.; Kim, H. C.; Kang, K. W.; Sung, M. H.; Lim, Y. T. Near-Infrared Emitting Polymer Nanogels for Efficient Sentinel Lymph Node Mapping. *ACS Nano* **2012**, *6*, 7820-7831.
- [0085] 20. Kosaka, N.; Mitsunaga, M.; Bhattacharyya, S.; Miller, S. C.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Self-Illuminating In Vivo Lymphatic Imaging Using a Bioluminescence Resonance Energy Transfer Quantum Dot Nano-Particle. *Contrast Media Mol. Imaging* **2011**, *6*, 55-59.
- [0086] 21. Cong, L.; Takeda, M.; Hamanaka, Y.; Gonda, K.; Watanabe, M.; Kumasaka, M.; Kobayashi, Y.; Kobayashi, M.; Ohuchi, N. Uniform Silica Coated Fluorescent Nanoparticles Synthetic Method, Improved Light Stability and Application to Visualize Lymph Network Tracer. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e13167.
- [0087] 22. Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Kosaka, N.; Choyke, P. L.; Urano, Y. Multicolor Imaging of Lymphatic Function with Two Nanomaterials: Quantum Dot-Labeled Cancer Cells and Dendrimer-Based Optical Agents. *Nanomedicine (Lond.)* **2009**, *4*, 411-419.
- [0088] 23. Song, K. H.; Stein, E. W.; Margenthaler, J. A.; Wang, L. H. V. Noninvasive Photoacoustic Identification of Sentinel Lymph Nodes Containing Methylene Blue In Vivo in a Rat Model. *J. Biomed. Opt.* **2008**, *13*, 054033.
- [0089] 24. Kim, J. W.; Galanzha, E. I.; Shashkov, E. V.; Moon, H. M.; Zharov, V. P. Golden Carbon Nanotubes as Multimodal Photoacoustic and Photothermal High-Contrast Molecular Agents. *Nat. Nanotechnol.* **2009**, *4*, 688-694.
- [0090] 25. Akers, W. J.; Kim, C.; Berezin, M.; Guo, K.; Fuhrhop, R.; Lanza, G. M.; Fischer, G. M.; Daltrozzo, E.; Zumbusch, A.; Cai, X.; Wang, L. V.; Achilefu, S. Noninvasive Photoacoustic and Fluorescence Sentinel Lymph Node Identification Using Dye-Loaded Perfluorocarbon Nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *5*, 173-182.
- [0091] 26. Pan, D.; Cai, X.; Yalaz, C.; Senpan, A.; Omanakuttan, K.; Wickline, S. A.; Wang, L. V.; Lanza, G. M. Photoacoustic Sentinel Lymph Node Imaging with Self-Assembled Copper Neodecanoate Nanoparticles. *ACS Nano* **2012**, *6*, 1260-1267.
- [0092] 27. Chhabra, R.; Sharma, J.; Liu, Y.; Rinker, S.; Yan, H. DNA Self-Assembly for Nanomedicine. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62*, 617-625.
- [0093] 28. Goodman, R. P.; Schaap, A. T.; Tardin, C. F.; Erben, C. M.; Berry, R. M.; Schmidt, C. F.; Turberfield, A. J. Rapid Chiral Assembly of Rigid DNA Building Blocks for Molecular Nanofabrication. *Science* **2005**, *310*, 1661-1665.
- [0094] 29. Goodman, R. P.; Berry, R. M.; Turberfield, A. J. The Single-Step Synthesis of a DNA Tetrahedron. *Chem. Commun.* **2004**, 1372-1373.
- [0095] 30. Walsh, A. S.; Yin, H. F.; Erben, C. M.; Wood, M. J. A.; Turberfield, A. J. DNA Cage Delivery to Mammalian Cells. *ACS Nano* **2011**, *5*, 5427-5432.
- [0096] 31. Keum, J. W.; Bermudez, H. Enhanced Resistance of DNA Nanostructures to Enzymatic Digestion. *Chem. Commun.* **2009**, 7036-7038.
- [0097] 32. Li, J.; Pei, H.; Zhu, B.; Liang, L.; Wei, M.; He, Y.; Chen, N.; Li, D.; Huang, Q.; Fan, C. Self-Assembled Multivalent DNA Nanostructures for Noninvasive Intracellular Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8783-8789.
- [0098] 33. Chang, M.; Yang, C. S.; Huang, D. M. Aptamer-Conjugated DNA Icosahedral Nanoparticles as a

Carrier of Doxorubicin for Cancer Therapy. *ACS Nano* **2011**, *5*, 6156-6163.

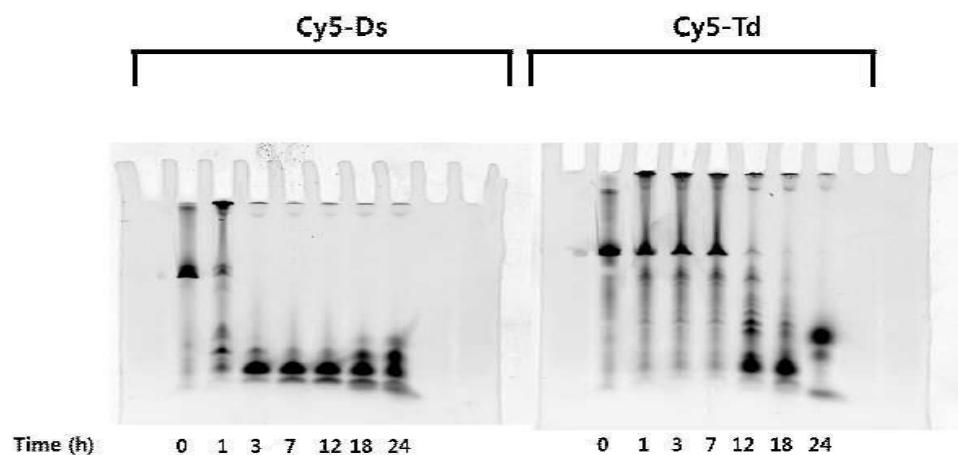
- [0099] 34. Lee, H. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Chen, Y.; Love, K. T.; Park, A. I.; Karagiannis, E. D.; Sehgal, A.; Querbes, W.; Zurenko, C. S.; Jayaraman, M.; Peng, C. G.; Charisse, K.; Borodovsky, A.; Manoharan, M.; Donahoe, J. S.; Truelove, J.; Nahrendorf, M.; Robert Langer, R.; Anderson, D. G. Molecularly Self-Assembled Nucleic Acid Nanoparticles for Targeted In Vivo SiRNA Delivery. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 389-393.
- [0100] 35. Longmire, M. R.; Ogawa, M.; Choyke, P. L.; Kobayashi, H. Biologically Optimized Nanosized Molecules and Particles: More than Just Size. *Bioconj. Chem.* **2011**, *22*, 993-1000.
- [0101] 36. Kim, M. C; Kim, H. H.; Jung, G. J.; Lee, J. H.; Choi, S. R.; Kang, D. Y.; Roh, M. S.; Jeong, J. S. Lymphatic Mapping and Sentinel Node Biopsy Using 99mTc tin Colloid in Gastric Cancer. *Ann. Surg.* **2004**, *239*, 383-387.
- [0102] 37. Cynthia, L.; Willard, M. Normal Structure, Function and Histology of Lymph Nodes. *Toxicol. Pathol.* **2006**, *34*, 409-424.
- [0103] 38. Afonin, K. A.; Grabow, W. W.; Walker, F.; Bindewald, E.; Dobrovolskaia, M.; Shapiro, B. A.; Jaeger, L. Design and Self-Assembly of SiRNA-Functionalized RNA Nanoparticles for Use in Automated Nanomedicine. *Nat. Protocols* **2011**, *6*, 2022-2034.

도면

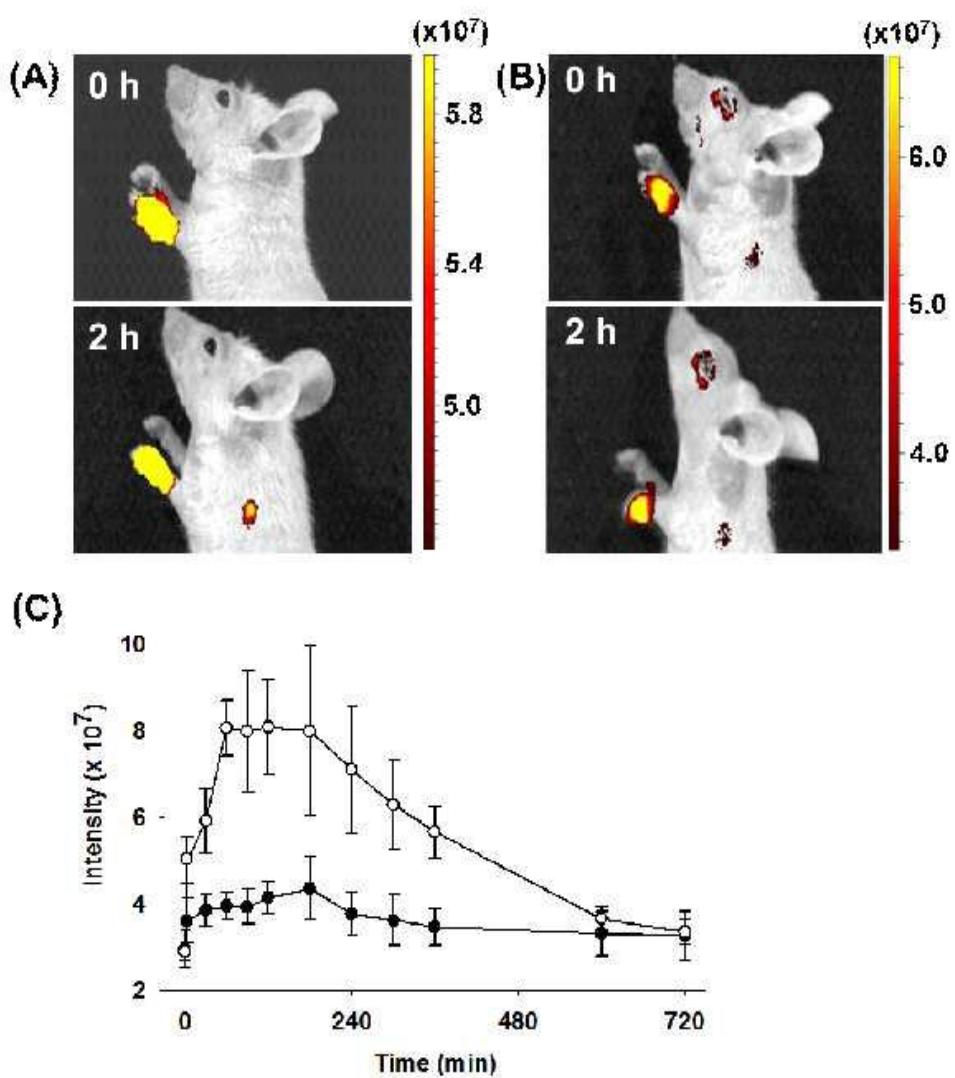
도면1



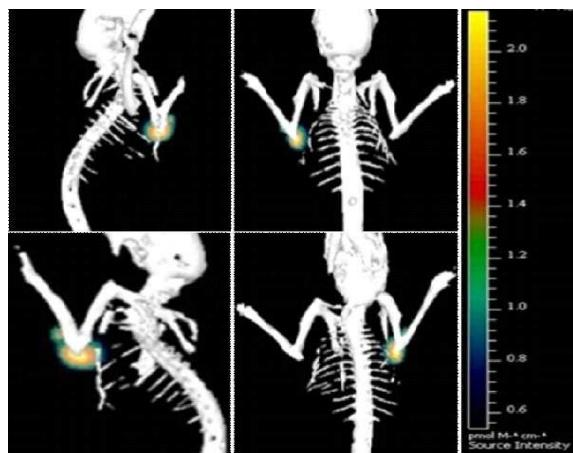
도면2



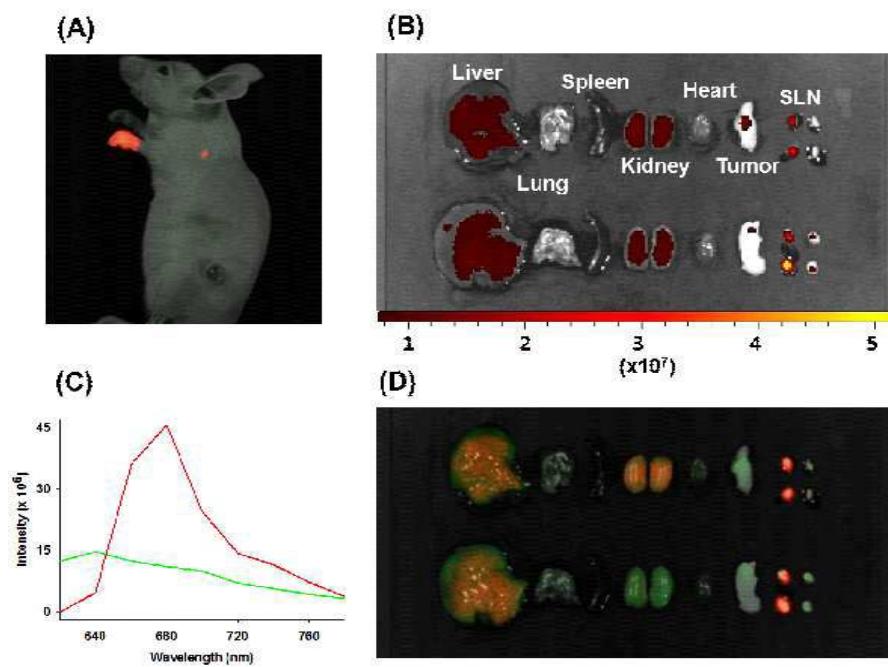
도면3



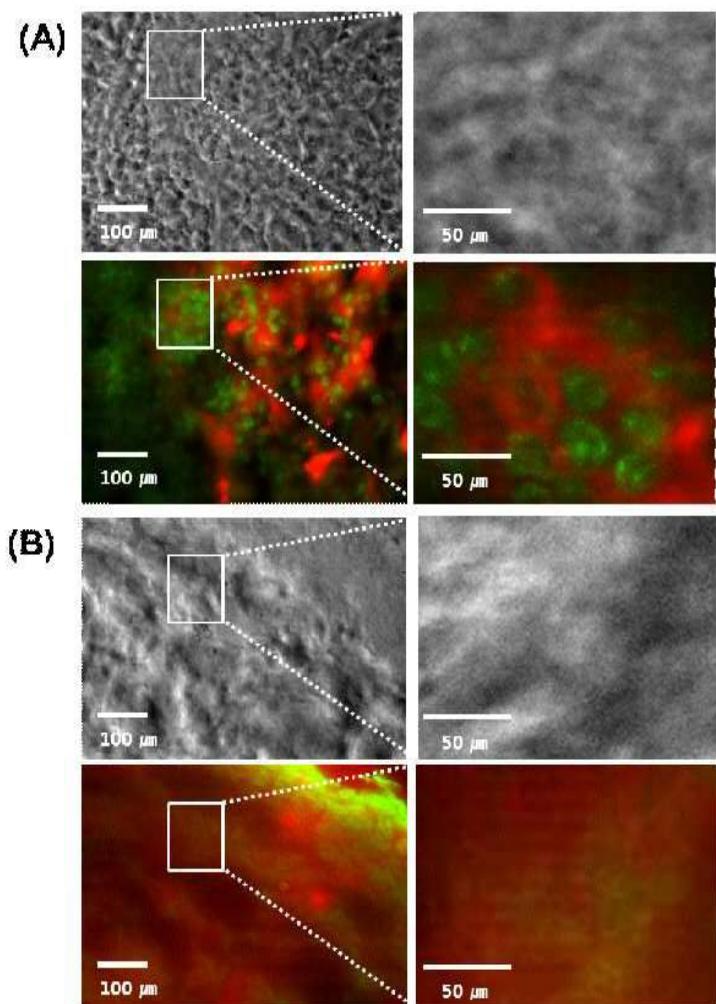
도면4



도면5



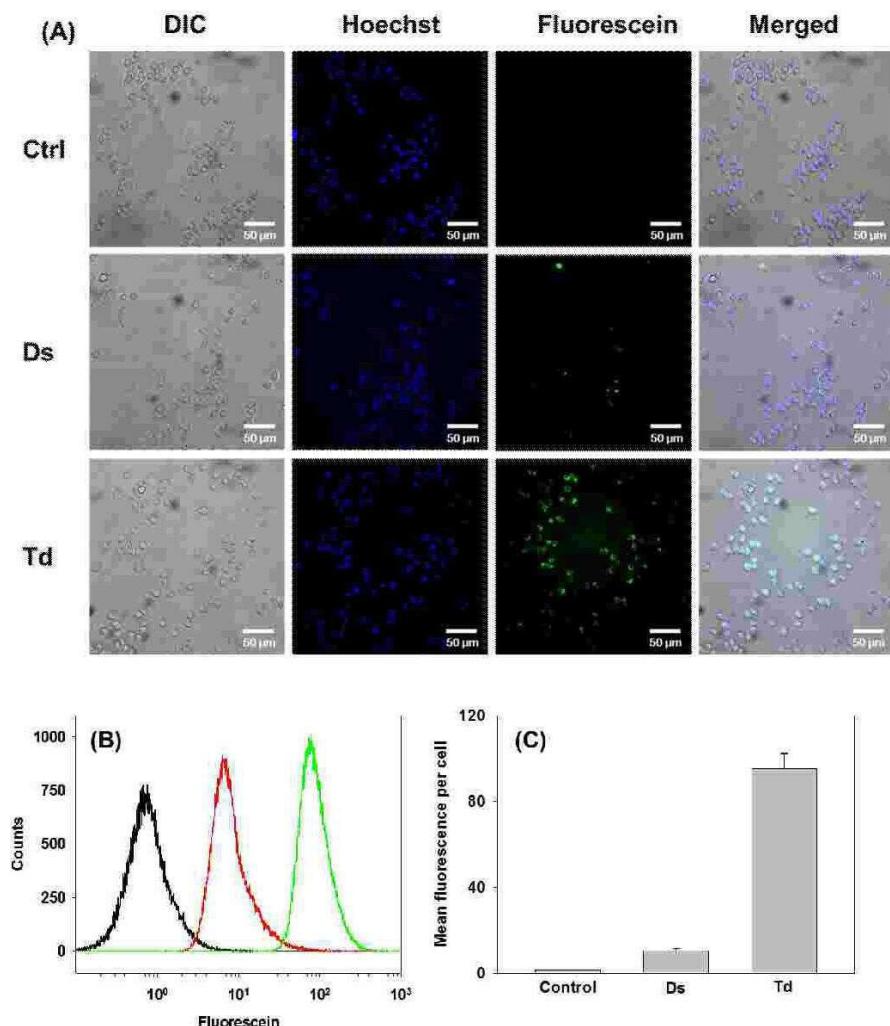
도면6



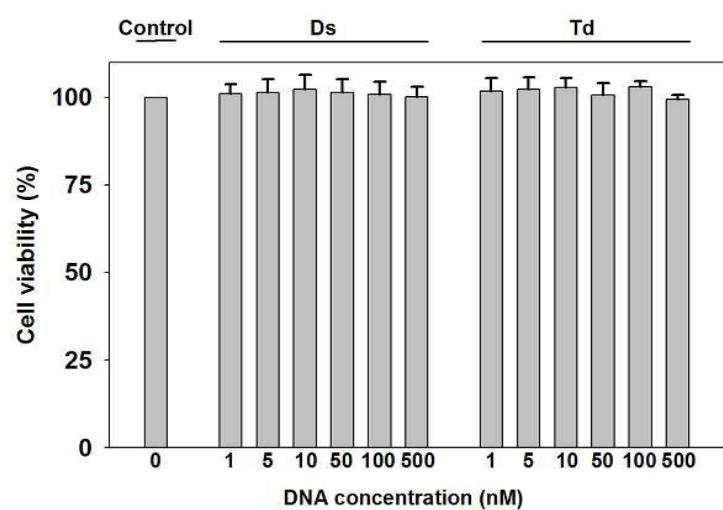
도면7



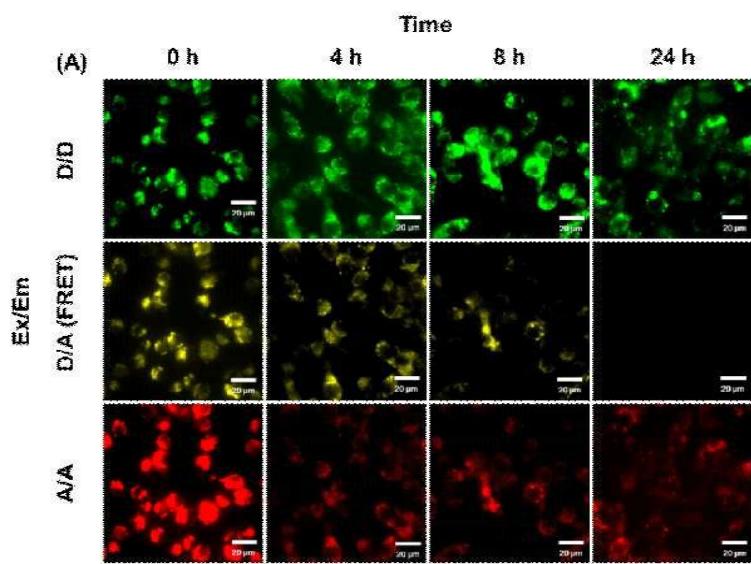
도면8



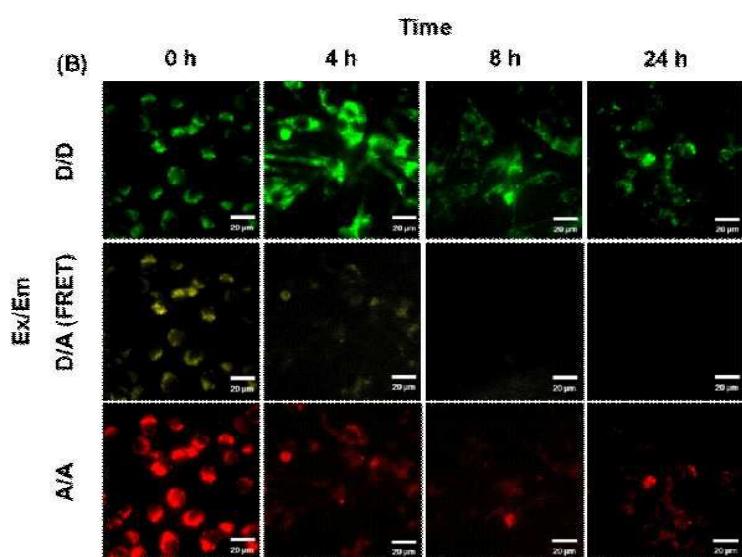
도면9



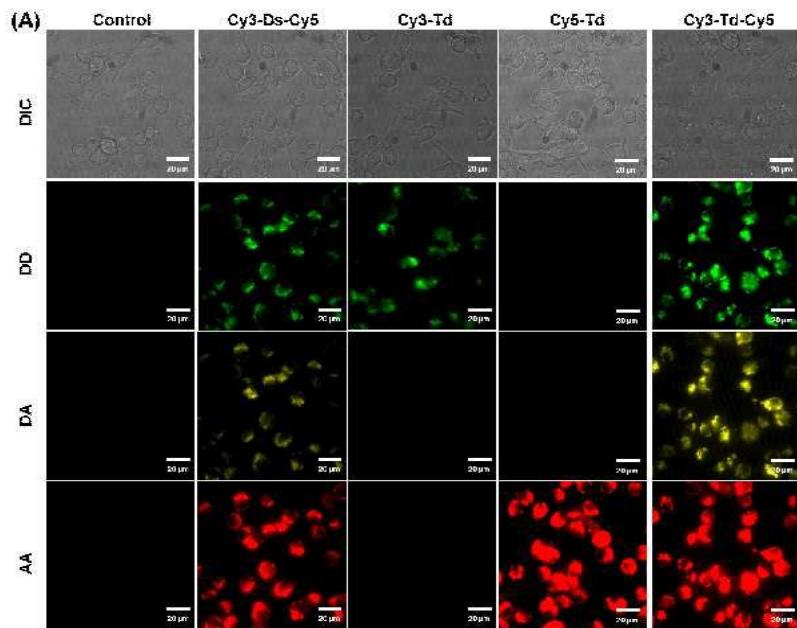
도면10a



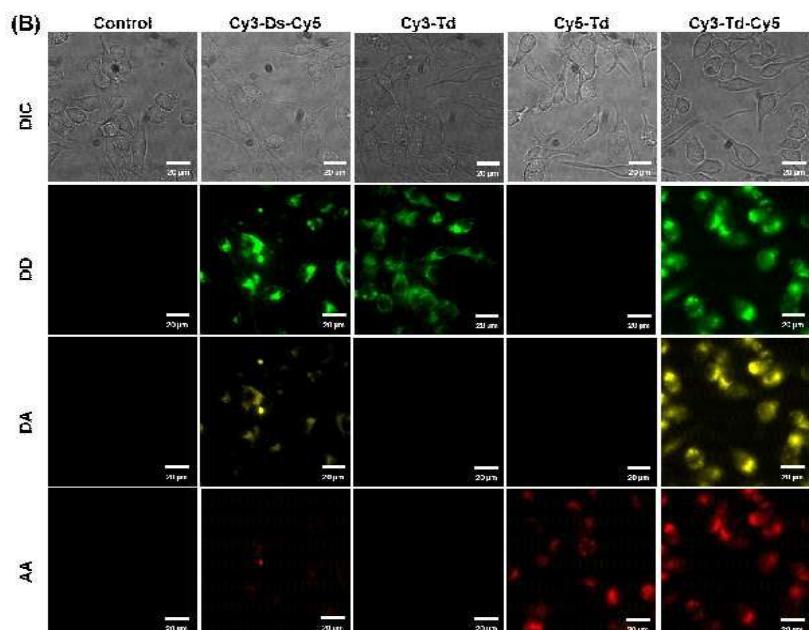
도면10b



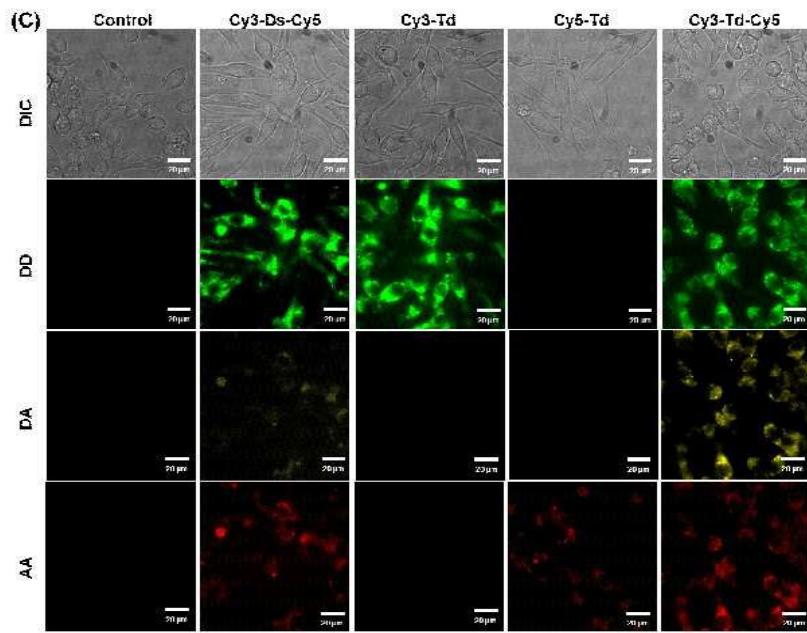
도면11a



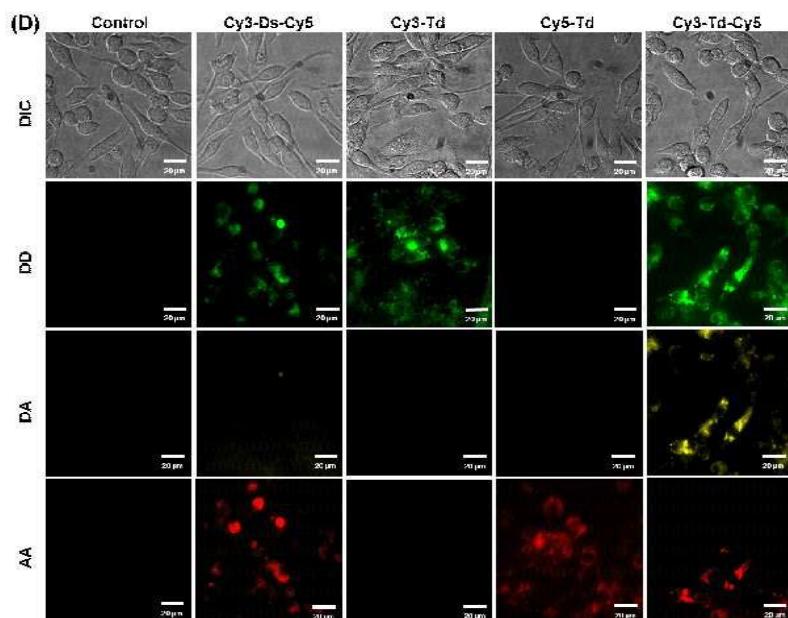
도면11b



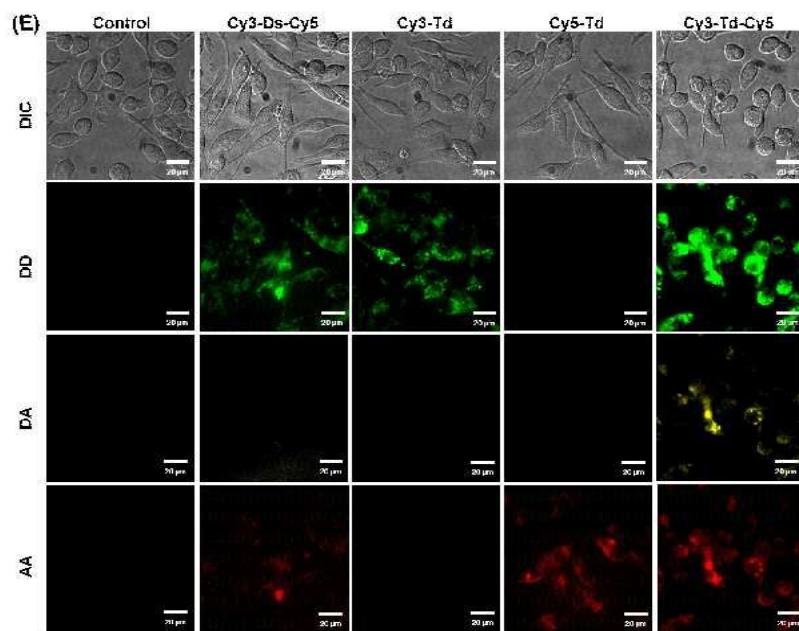
도면11c



도면11d



도면11e



도면11f

