



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0059657
(43) 공개일자 2021년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) A61K 49/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0093 (2013.01)
A61K 49/0054 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0152168
(22) 출원일자 2020년11월13일
심사청구일자 2020년11월13일
(30) 우선권주장
1020190146814 2019년11월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
유경화
서울특별시 서초구 바우피로7길 51 대림아파트
106동 1201호
박용범
서울특별시 서초구 명달로11길 29-3, 502호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
파도특허법인(유한), 이재영

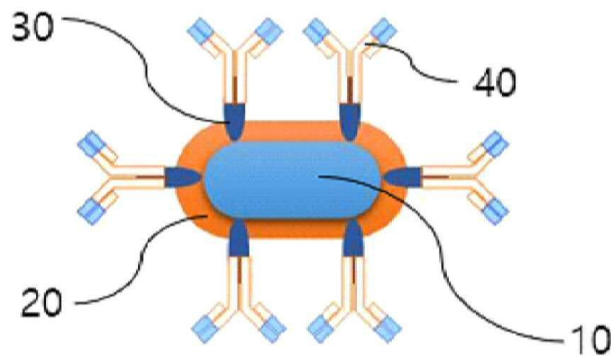
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 류마티스 관절염의 조기 진단을 위한 광학 영상용 조영제 조성물

(57) 요약

본 발명은 류마티스 관절염의 조기 진단을 위한 광학 영상용 조영제 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 금 나노입자; 및 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 형성된 폴리에틸렌글리콜 (polyethyleneglycol, PEG) 코팅층을 포함하고, 상기 금 나노입자 상에 위치하는 복수 개의 단백질 G(protein G) 및 상기 단백질 G에 연결된 항체를 더 포함하거나, 상기 폴리에틸렌글리콜 코팅층에 연결되는 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 더 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/0056 (2013.01)

A61K 49/225 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

(72) 발명자

이선미

서울특별시 강서구 강서로 266 우장산아이파크 11
4동 402호

문진희

경기도 군포시 번영로 580, 신환아파트 101동 209
호

윤태준

서울특별시 서대문구 이화여대8길 62, 101동 1203
호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465016149

과제번호 HI14C1324

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성사업

연구과제명 자가면역질환 POCT 진단기술 및 관절염 광학영상 나노입자 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

금 나노입자; 및 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 형성된 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG) 코팅층을 포함하고,

상기 금 나노입자 상에 위치하는 복수 개의 단백질 G(protein G) 및 상기 단백질 G에 연결된 항체를 더 포함하거나, 상기 폴리에틸렌글리콜 코팅층에 연결되는 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 더 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 금 나노입자는 구형(nanosphere), 셸 형태(nanoshell), 또는 막대형(nanorod)인, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 금 나노입자의 직경은 3 nm 내지 50 nm인, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

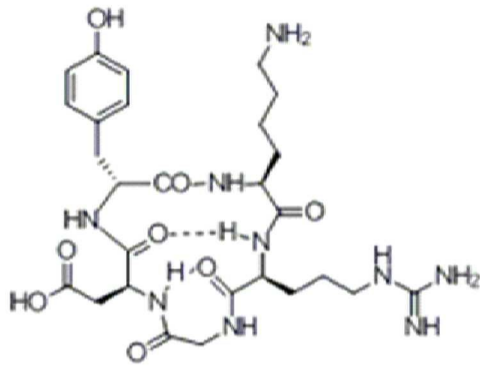
상기 항체는 TNF-알파(TNF-alpha), 과립구 큰포식세포 집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF), $\alpha\beta 3$ 인테그린($\alpha\beta 3$ integrins), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 기질 금속함유 단백질분해효소(matrix metalloproteinase; MMP), 셀렉틴(selectin), 야누스 키나제 1(Janus kinase 1; Jak1), 야누스 키나제 2(Janus kinase 2; Jak2), 야누스 키나제 3(Janus kinase 3; Jak3), 티로신 키나제 2(tyrosine kinase 2; Tyk2), 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK), 포스포이노시티드 3-키나제(Phosphoinositide 3-kinase; PI3K), 인터루킨-1(interleukin 1; IL-1), 인터루킨-6(interleukin 6; IL-6), 인터루킨-17(interleukin 17; IL-17), 인터루킨-12 p40(interleukin 12 p40; IL-12p40), 인터루킨-23 p19(interleukin 23 p19; IL-23p19), 인터루킨-22(interleukin 22; IL-22), 세포독성 T 림프구 관련 항원 4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4; CTLA-4), CD20, 혈관세포 부착분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1), S100 단백질 패밀리(S100 proteins), AXL 수용체 단백질 티로신 키나제(AXL receptor protein tyrosine kinase), 대식세포 집락자극인자(큰포식세포 집락자극인자, macrophage colony stimulating factor; M-CSF), 세포예정사 리간드(programmed cell death ligand 2; PDCD1LG2), TNF 수용체 2(tumor necrosis factor receptor 2), TNF 수용체 슈퍼패밀리1B(tumor necrosis factor receptor superfamily 1B; TNFRSF1B), 히알루론산결합단백질 2(hyaluronan-binding protein 2), 세마포린 4A(semaphorin 4A; SEMA4D) 또는 과골세포 자극인자 1(osteoclast stimulating factor 1)에 특이적으로 결합하는 항체인, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩티드는 하기 화학식 1로 표시되는 구조의 사이클릭 RGD(cyclic-Arginine-Glycine-Aspartic acid)인, 관절염 진단용 조영제 조성물:

[화학식 1]



청구항 6

제1항에 있어서,

상기 관절염은 류마티스 관절염, 미분화성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 척추관절염, 강직척추염, 반응관절염, 건선관절염, 장질환과 연관된 관절염, 골관절염, 통풍, 가성통풍, 전신홍반루푸스, 전신경화증, 쇼그렌증후군, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 성인형스틸씨병, 세균관절염, 결핵관절염, 바이러스 관절염, 라임 병, 골관절염, 섬유근통, 재발성 류마티즘, 재발다발연골염, 사르코이드증, 류마티스다발근통, 급성관절통증, 윤활낭염 및 힘줄염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 광학 영상화(optical imaging) 또는 광음향 영상화(optoacoustic imaging)용인, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 경구 투여되거나, 정맥 내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두개강내(intracranial) 주입되는, 관절염 진단용 조영제 조성물.

청구항 9

금 나노입자를 준비하는 단계; 및 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계;를 포함하고,

상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계에 앞서 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시키는 단계 및 상기 단백질 G에 항체를 연결시키는 단계를 더 포함하거나, 상기 폴리에틸렌글리콜을 코팅하는 단계에 후속적으로 상기 폴리에틸렌글리콜에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결하는 단계를 더 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 금 나노입자는 구형(nanosphere), 쉘 형태(nanoshell), 또는 막대형(nanorod)인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 금 나노입자의 직경은 3 nm 내지 50 nm인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 12

제9항에 있어서,

상기 금 나노입자를 준비하는 단계는,

(1) 세틸트리암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide; CTAB)와 염화 금산(Chloroauric acid, HAuCl_4)을 혼합하여 얻어진 혼합물에 소듐 보로하이드라이드(Sodium borohydride, NaBH_4)를 첨가하여 금 씨드(seed) 용액을 제조하는 단계;

(2) 세틸트리암모늄 브로마이드(CTAB), 질산은(Silver nitrate, AgNO_3) 및 염화 금산(HAuCl_4)을 혼합하여 얻어진 혼합물에 아스코르브산(ascorbic acid)을 첨가하는 단계; 및

(3) 상기 (1) 단계에서 얻어진 금 씨드 용액과 상기 (2) 단계에서 얻어진 혼합물을 혼합하여 금 나노입자를 형성하는 단계를 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 (2) 단계 시 아스코르브산을 첨가하기에 앞서, 상기 세틸트리암모늄 브로마이드(CTAB), 질산은(AgNO_3) 및 염화 금산(HAuCl_4)을 혼합한 뒤 교반하는 단계를 추가로 수행하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 14

제9항에 있어서,

상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계는,

상기 금 나노입자와 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 혼합하는 단계; 및

20 내지 40 °C의 온도 하에서 6 시간 내지 48 시간 동안 교반하는 단계를 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 15

제9항에 있어서,

상기 단백질 G(protein G)을 위치시키는 단계는,

상기 금 나노입자와 단백질 G(protein G)를 0 °C 초과 10 °C 이하의 온도 하에서 2 시간 내지 48 시간 동안 혼합하는 단계를 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 16

제9항에 있어서,

상기 항체는 TNF-알파(TNF- α), 과립구 큰포식세포 집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF), $\alpha\text{v}\beta 3$ 인테그린($\alpha\text{v}\beta 3$ integrins), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 기질 금속함유 단백질분해효소(matrix metalloproteinase; MMP), 셀렉틴(selectin), 야누스 키나제 1(Janus kinase 1; Jak1), 야누스 키나제 2(Janus kinase 2; Jak2), 야누스 키나제 3(Janus kinase 3; Jak3), 티로신 키나제 2(tyrosine kinase 2; Tyk2), 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK), 포스포이노시티드 3-키나제(Phosphoinositide 3-kinase; PI3K), 인터루킨-1(interleukin 1; IL-1), 인터루킨-6(interleukin 6; IL-6), 인터루킨-17(interleukin 17; IL-17), 인터루킨-12 p40(interleukin 12 p40; IL-12p40), 인터루킨-23 p19(interleukin 23 p19; IL-23p19), 인터루킨-22(interleukin 22; IL-22), 세포독성 T 림프구 관련 항원 4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4; CTLA-4), CD20, 혈관세포 부착분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1), S100 단백질 패밀리(S100 proteins), AXL 수용체 단백질 티로신 키나제(AXL receptor protein tyrosine kinase), 대식세포 집락자극인자(큰포식세포 집락자극인자,

macrophage colony stimulating factor; M-CSF), 세포예정사 리간드(programmed cell death ligand 2; PDCD1LG2), TNF 수용체 2(tumor necrosis factor receptor 2), TNF 수용체 슈퍼패밀리1B(tumor necrosis factor receptor superfamily 1B; TNFRSF1B), 히알루론산결합단백질 2(hyaluronan-binding protein 2), 세마포린 4A(semaphorin 4A; SEMA4D) 또는 과골세포 자극인자 1(osteoclast stimulating factor 1)에 특이적으로 결합하는 항체인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 17

제9항에 있어서,

상기 항체를 연결시키는 단계는,

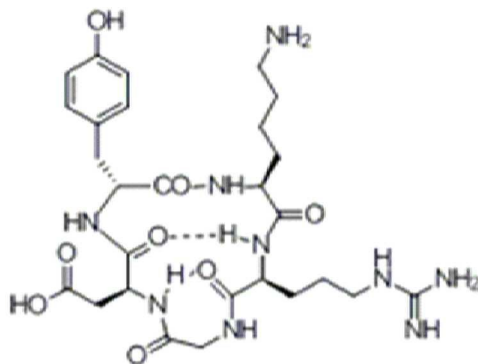
상기 복수 개의 단백질 G가 위치한 금 나노입자를 항체와 0 °C 초과 10 °C 이하의 온도 하에서 2 시간 내지 48 시간 동안 혼합하는 단계를 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 18

제9항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩티드는 하기 화학식 1로 표시되는 구조의 사이클릭 RGD(cyclic-Arginine-Glycine-Aspartic acid)인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법:

[화학식 1]



청구항 19

제9항에 있어서,

상기 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결하는 단계는,

상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 코팅된 금 나노입자와 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 혼합하는 단계를 포함하고,

상기 혼합 시 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카보다이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 및 N-하이드록시숙시이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 중 적어도 하나를 추가하며 수행되는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 20

제9항에 있어서,

상기 관절염은 류마티스 관절염, 미분화성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 척추관절염, 강직척추염, 반응관절염, 건선관절염, 장질환과 연관된 관절염, 골관절염, 통풍, 가성통풍, 진신흡반루푸스, 진신허화증, 쇼그렌증후군, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 성인형스틸씨병, 세균관절염, 결핵관절염, 바이러스 관절염, 라임병, 골관절염, 섬유근통, 재발성 류마티즘, 재발다발연골염, 사르코이드증, 류마티스다발근통, 급성관절통증, 윤활낭염 및 힘줄염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

청구항 21

제9항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 광학 영상화(optical imaging) 또는 광음향 영상화(optoacoustic imaging)용인, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 류마티스 관절염의 조기 진단을 위한 광학 영상용 조영제 조성물 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 류마티스 관절염(rheumatoid arthritis)은 성인에서 가장 흔하게 발병하는 염증성 관절염으로, 그 원인이 아직 완전히 알려지지 않았으나, 자가면역 기전으로 인한 염증 반응으로 이해되고 있다. 류마티스 관절염의 병변은 관절강을 안쪽으로 둘러싸고 있는 활막의 염증(synovitis)이다. 활막 내에서 염증이 시작되면 더 많은 염증세포가 활막에 침윤되고, 활막 세포들이 증식하며, 신생혈관이 생성되는 과정을 통해 활막 조직은 더욱 증식되고 활성화된다. 병이 진행됨에 따라 염증반응의 결과로 활막 조직 주위의 관절 연골이 손상되고 골괴괴가 나타나 결국 관절의 변형이 일어나며 장애가 생기게 된다.

[0003] 류마티스 관절염에서 이러한 관절의 손상은 비가역적이며 70~80%의 환자에서 발병 초기에 발생하는 것으로 알려져 있다. 류마티스 관절염 환자에서 흔히 관찰되는 기능적 장애 및 골밀도의 감소 역시 류마티스 관절염의 발병 초기에 가장 많이 발생하고 이들의 발생은 관절 손상의 정도와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로, 류마티스 관절염을 초기에 진단하여 적극적으로 치료하는 것이 필요하다.

[0004] 류마티스 관절염을 진단 평가하기 위한 영상 방법에는 X 선 검사, 초음파, CT, MRI, 전신골스캔과 PET 등이 있다. X 선 검사와 초음파는 비교적 저렴한 비용의 검사 방법이지만, 현 시점의 관절염 활성 정도를 평가하기에는 제한점이 있다. CT는 구조적 손상(structural damage)을 확인하는 좋은 검사 방법이나, 관절염 활성 정도를 반영하지 못하고 방사선 노출의 위험성이 있으며, 조영제에 의한 과민반응이나 신장 기능 저하의 위험성이 있다. MRI는 관절염 활성 정도를 평가하는데 좋은 영상 검사법이지만 검사 비용이 비싸고 검사 시간이 오래 걸린다는 단점이 있다. 전신골 스캔은 관절의 염증 정도를 반영하는 검사이지만 관절염의 정량적 평가는 어렵다. PET 검사는 관절의 염증 정도를 어느 정도 정량화 할 수 있지만 방사성 동위원소에 의한 위험성이 있고 검사 비용이 매우 높은 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 일 목적은 류마티스 관절염의 조기 진단을 가능하게 하는 광학 영상용 조영제 조성물을 제공하고자 한다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 류마티스 관절염의 조기 진단을 가능하게 하는 광학 영상용 조영제 조성물의 제조 방법을 제공하고자 한다.

[0007] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

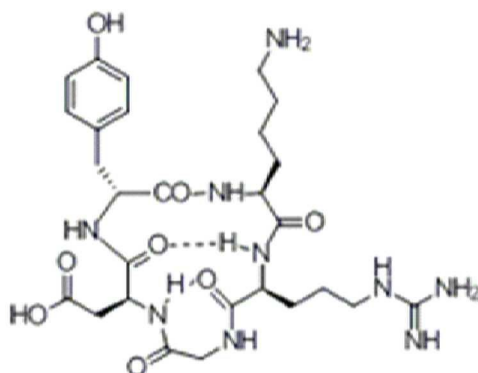
[0008] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 금 나노입자; 및 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 형성된 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG) 코팅층을 포함하고,

[0009] 상기 금 나노입자 상에 위치하는 복수 개의 단백질 G(protein G) 및 상기 단백질 G에 연결된 항체를 더 포함하거나, 상기 폴리에틸렌글리콜 코팅층에 연결되는 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 더 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물에 관한 것이다.

[0010] 본 발명에서 상기 금 나노입자는 구형(nanosphere), 셸 형태(nanoshell), 또는 막대형(nanorod)을 가질 수 있으나, 바람직하게는 막대형일 수 있다.

- [0011] 본 발명에서 상기 금 나노입자의 직경은 3 nm 내지 50 nm, 바람직하게는 10 내지 40 nm의 직경을 가지는 것일 수 있다.
- [0012] 본 발명에서 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)은 HS-(CH₂CH₂)₁₇₅-COOH 또는 분자량이 1,000 내지 50,000인 HS-폴리(에틸렌 글리콜)-CH₃HS-poly(ethylene glycol)-CH₃일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 상기 항체는 관절염의 진단을 위한 타겟 항원에 특이적인 항체로, 예를 들면, TNF-알파(TNF- α), 과립구 큰포식세포 집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF), $\alpha\beta 3$ 인테그린($\alpha\beta 3$ integrins), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 기질 금속함유 단백질분해효소(matrix metalloproteinase; MMP), 셀렉틴(selectin), 야누스 키나제 1(Janus kinase 1; Jak1), 야누스 키나제 2(Janus kinase 2; Jak2), 야누스 키나제 3(Janus kinase 3; Jak3), 티로신 키나제 2(tyrosine kinase 2; Tyk2), 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK), 포스포이노시티드 3-키나제(Phosphoinositide 3-kinase; PI3K), 인터루킨-1(interleukin 1; IL-1), 인터루킨-6(interleukin 6; IL-6), 인터루킨-17(interleukin 17; IL-17), 인터루킨-12 p40(interleukin 12 p40; IL-12p40), 인터루킨-23 p19(interleukin 23 p19; IL-23p19), 인터루킨-22(interleukin 22; IL-22), 세포독성 T 림프구 관련 항원 4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4; CTLA-4), CD20, 혈관세포 부착분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1), S100 단백질 패밀리(S100 proteins), AXL 수용체 단백질 티로신 키나제(AXL receptor protein tyrosine kinase), 대식세포 집락자극인자(큰포식세포 집락자극인자, macrophage colony stimulating factor; M-CSF), 세포예정사 리간드(programmed cell death ligand 2; PDCD1LG2), TNF 수용체 2(tumor necrosis factor receptor 2), TNF 수용체 슈퍼패밀리1B(tumor necrosis factor receptor superfamily 1B; TNFRSF1B), 히알루론산결합단백질 2(hyaluronan-binding protein 2), 세마포린 4A(semaphorin 4A; SEMA4D) 또는 과골세포 자극인자 1(osteoclast stimulating factor 1)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 바람직하게는 TNF-알파(TNF- α) 또는 인터루킨-6(IL-6)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.
- [0014] 본 발명에 상기 "항체"는 항원과 특이적으로 결합하여 항원-항체 반응을 일으키는 물질을 가리킨다. 본 발명의 목적상, 항체는 상기 바이오마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다. 본 발명의 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 상기 항체는 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 용이하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 다클론 항체는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 과정을 포함하는 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다. 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물로부터 제조될 수 있다. 또한, 단클론 항체는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마 방법(hybridoma method; Kohler 및 Milstein (1976) European Journal of Immunology 6:511-519 참조), 또는 파지 항체 라이브러리 기술(Clackson et al, Nature, 352:624-628, 1991; Marks et al, J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991 참조)을 이용하여 제조될 수 있다. 상기 방법으로 제조된 항체는 겔 전기영동, 투석, 염 침전, 이온교환 크로마토그래피, 친화성 크로마토그래피 등의 방법을 이용하여 분리, 정제될 수 있다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전장의 경쇄 및 2개의 전장의 중쇄를 갖는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란, 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.
- [0015] 본 발명에서 상기 서열번호 1로 표시되는 펩티드는 하기 화학식 1로 표시되는 구조의 사이클릭 RGD(cyclic-Arginine-Glycine-Aspartic acid)일 수 있다:

[0016] [화학식 1]



[0017]

- [0018] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 구조를 도시한 것으로, 금 나노입자(10), 바람직하게는 금 나노막대(gold nanorod) 상에 복수 개의 단백질 G(30)가 위치하며, 상기 금 나노막대를 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG) 코팅층(20)이 형성되고, 상기 단백질 G에는 항체(40)가 연결된 구조를 이룰 수 있다.
- [0019] 도 2는 본 발명의 다른 실시예에 따른 조영제의 구조를 도시한 것으로, 금 나노입자(10), 바람직하게는 금 나노막대(gold nanorod) 상에 폴리에틸렌글리콜(PEG) 코팅층(20)이 형성되고, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG) 코팅층에서 열번호 1로 표시되는 펩타이드(50)가, 바람직하게는 공유 결합으로 연결된 구조를 이룰 수 있다.
- [0020] 본 발명의 조영제 조성물은 단순히 관절에 통증이 있는 관절통과 구분하여 관절염의 진단을 위해 사용할 수 있고, 특히 관절염의 조기 진단을 위해 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 관절염은 류마티스 관절염, 미분화성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 척추관절염, 강직척추염, 반응관절염, 건선관절염, 장질환과 연관된 관절염, 골관절염, 통풍, 가성통풍, 전신홍반루푸스, 전신경화증, 쇼그렌증후군, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 성인형스틸씨병, 세균관절염, 결핵관절염, 바이러스 관절염, 라임병, 골관절염, 섬유근통, 재발성 류마티즘, 재발다발연골염, 사르코이드증, 류마티스다발근통, 급성관절통증, 윤헄남염 및 힘줄염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 바람직하게는 류마티스 관절염일 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 상기 조영제 조성물은 광학 영상화(optical imaging) 또는 광음향 영상화(optoacoustic imaging) 용으로 사용될 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 상기 "조영제"란 생체 내에서 완전 (즉, 원상태) 포유동물 신체의 관심있는 부위의 광학 영상화에 적합한 화합물을 의미한다. 바람직하게는, 포유동물은 인간이다. 영상화는 침투성 (예를 들어 수술 중 또는 내시경) 또는 비-침투성일 수도 있다. 생검 (예를 들어, 내시경 장치에서 생검 채널을 통해) 또는 종양 절제 (예를 들어, 종양 가장자리 확인을 통하여 수술중 절차 동안에)를 수월하게 하기 위하여 영상화가 임의로 사용될 수도 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 "광학 영상화(optical imaging)"란, 녹색 내지 근 적외선 영역의 광 (파장 500-1200 nm)과의 상호작용을 기초로 하여, 질병의 검출, 단계결정 또는 진단, 질병 발생의 모니터링조사, 또는 질병 치료의 모니터링 조사를 위해 영상을 형성하는 어떠한 방법을 의미한다. 광학 영상화는, 어떠한 기구도 사용하지 않는 직접적인 가시화 및 다양한 스코프, 카테터 및 광학 영상화 장치, 예를 들어, 단층촬영 표시를 위한 컴퓨터-보조 하드웨어와 같은 기구의 사용을 포함한 모든 방법을 더욱 포함한다. 형식 및 측정 기술은 이에 한정되지 않지만 발광 영상화; 내시경; 형광 내시경; 광학적 간섭성 단층촬영; 투과 영상화; 시간차 투과 영상화; 공초점 영상화; 비선형 현미경; 광음향 영상화; 음향-광학 영상화; 분광법; 반사 분광법; 간섭법; 결맞춤 간섭법; 확산 광학 단층촬영법 및 형광 매개 확산 광학 단층촬영법 (연속 파, 시간 도메인 및 주파수 도메인 시스템), 및 광산란, 흡수, 편광, 발광, 형광 수명, 양자 수율 및 소광의 측정을 포함한다. 이러한 기술의 추가의 세부사항은 문헌 ([Tuan Vo-Dinh (편집자): "Biomedical Photonics Handbook" (2003), CRC Press LCC]; [Mycek & Pogue (편집자): "Handbook of Biomedical Fluorescence" (2003), Marcel Dekker, Inc.]; [Splinter & Hopper: "An Introduction to Biomedical Optics" (2007), CRC Press LCC])에 의해 제공된다.
- [0024] 본 발명에서 상기 광학 영상화를 위해 사용되는 녹색 내지 근-적외선 영역의 광의 파장은 500 내지 1200 nm, 바람직하게는 550 내지 1000 nm, 가장 바람직하게는 600 내지 900 nm일 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 "광음향 영상화(optoacoustic imaging)"는 광음향 효과에 기반한 생물 의학의 이미징 모달리티(biomedical imaging modality)에 해당한다. 광음향 영상화 시 비전리 레이저 펄스는 생물학적 조직으로 전달된다. 전달된 에너지의 일부는 흡수되어 열로 전환되고, 일시적으로 열탄성 팽창을 일으켜 MHz와 같은 광대역 초음파 방출을 일으킨다. 발생된 초음파 파장은 초음파 변환기에 의해 탐지되고 분석되어 이미지를 생성한다. 광학 흡수는 물리적 특성과 밀접하게 관련되어 있다. 따라서 초음파 방출의 크기, 즉 광음향 신호는 국소적 에너지 축적에 비례하며, 물리적으로 특징의 광학 흡수 조영을 나타낸다. 타겟 부위의 2D 또는 3D 이미지를 형성할 수 있다.
- [0026] 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, 수막강내 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.

- [0028] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 금 나노입자를 준비하는 단계; 및 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계;를 포함하고,
- [0029] 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계에 앞서 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시키는 단계 및 상기 단백질 G에 항체를 연결시키는 단계를 더 포함하거나, 상기 폴리에틸렌글리콜을 코팅하는 단계에 후속적으로 상기 폴리에틸렌글리콜에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결하는 단계를 더 포함하는, 관절염 진단용 조영제 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0030] 금 나노입자를 준비하는 단계
- [0031] 본 발명에서 상기 금 나노입자는 구형(nanosphere), 셸 형태(nanoshell), 또는 막대형(nanorod)을 가질 수 있으나, 바람직하게는 막대형일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 금 나노입자의 직경은 3 nm 내지 50 nm, 바람직하게는 10 내지 40 nm의 직경을 가지는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 금 나노입자를 제조하기 위해서는, (1) 세틸트리암모늄 브로마이드(cetyltrimethylammonium bromide; CTAB)와 염화 금산(Chloroauric acid, HAuCl₄)을 혼합하여 얻어진 혼합물에 소듐 보로하이드라이드(Sodium borohydride, NaBH₄)를 첨가하여 금 씨드(seed) 용액을 제조하는 단계;
- [0034] (2) 세틸트리암모늄 브로마이드(CTAB), 질산은(Silver nitrate, AgNO₃) 및 염화 금산(HAuCl₄)을 혼합하여 얻어진 혼합물에 아스코르브산(ascorbic acid)을 첨가하는 단계; 및
- [0035] (3) 상기 (1) 단계에서 얻어진 금 씨드 용액과 상기 (2) 단계에서 얻어진 혼합물을 혼합하여 금 나노입자를 형성하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 상기 (1) 단계 후 20 내지 30 °C에서 30 분 내지 6 시간, 바람직하게는 1 시간 내지 3 시간 동안 유지시키는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 (2) 단계 시 아스코르브산을 첨가하기에 앞서, 상기 세틸트리암모늄 브로마이드(CTAB), 질산은(AgNO₃) 및 염화 금산(HAuCl₄)을 혼합한 뒤 교반하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명에서 상기 (2) 단계 후 20 내지 40 °C의 온도 하에서 100 내지 200 rpm의 교반 속도로 교반하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서는 상기 (3) 단계 후 10,000 내지 30,000 rpm, 바람직하게는 10,000 내지 20,000 rpm의 조건 하에서 10 분 내지 2 시간, 바람직하게는 20 분 내지 40 분 동안 원심 분리하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0040] 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계
- [0041] 본 발명에서는 상기와 같이 금 나노입자가 준비되면 그 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 금 나노입자의 표면에 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하기 위해서는, 상기 금 나노입자와 폴리에틸렌글리콜(PEG)로, HS-(CH₂CH₂)₁₇₅-COOH 또는 분자량이 1,000 내지 50,000인 HS-폴리(에틸렌 글리콜)-CH₃(HS-poly(ethylene glycol)-CH₃)과 혼합하는 단계를 수행할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 금 나노입자에 항체를 연결시키는 경우, 상기 폴리에틸렌글리콜은 분자량이 1,000 내지 50,000인 HS-폴리(에틸렌 글리콜)-CH₃(HS-poly(ethylene glycol)-CH₃)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 본 발명에서 상기 금 나노입자에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결시키는 경우, 상기 폴리에틸렌글리콜은 HS-(CH₂CH₂)₁₇₅-COOH일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 본 발명에서는 상기 혼합하는 단계에 후속적으로 20 내지 40 °C의 온도 하에서 6 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 12 시간 내지 24 시간 동안 교반하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.
- [0046] 본 발명에서는 상기 교반하는 단계에 후속적으로 5,000 내지 20,000 rpm, 바람직하게는 5,000 내지 15,000 rpm의 조건 하에서 10 분 내지 2 시간, 바람직하게는 20 분 내지 40 분 동안 원심 분리하는 단계를 추가로 수행할

수 있다.

[0047] 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시키는 단계

[0048] 다만, 본 발명에서는 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅하기에 앞서, 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시키는 단계를 수행할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시키기 위해서는, 상기 금 나노입자와 단백질 G(protein G)를 혼합하는 단계를 수행할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 상기 혼합은 0 °C 초과 10 °C 이하, 바람직하게는 1 °C 내지 5 °C의 온도 하에서 2 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 6 시간 내지 24 시간 동안 수행될 수 있다.

[0051] 본 발명에서는 상기 단백질 G를 위치시키는 단계 후 10,000 내지 30,000 rpm, 바람직하게는 10,000 내지 20,000 rpm의 조건 하에서 1 분 내지 1 시간, 바람직하게는 5 분 내지 30 분 동안 원심 분리하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0052] 항체를 연결시키는 단계

[0053] 본 발명에서 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G를 위치시킨 뒤에는, 상기 단백질 G에 항체를 연결시키는 단계를 수행할 수 있다.

[0054] 본 발명에서 상기 항체는 관절염의 진단을 위한 타겟 항원에 특이적인 항체로, 예를 들면, TNF-알파(TNF- α), 과립구 큰포식세포 집락 자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor; GM-CSF), $\alpha\text{v}\beta 3$ 인테그린($\alpha\text{v}\beta 3$ integrins), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 기질 금속함유 단백질분해효소(matrix metalloproteinase; MMP), 셀렉틴(selectin), 야누스 키나제 1(Janus kinase 1; Jak1), 야누스 키나제 2(Janus kinase 2; Jak2), 야누스 키나제 3(Janus kinase 3; Jak3), 티로신 키나제 2(tyrosine kinase 2; Tyk2), 브루톤 티로신 키나제(Bruton's tyrosine kinase; BTK), 포스포이노시티드 3-키나제(Phosphoinositide 3-kinase; PI3K), 인터루킨-1(interleukin 1; IL-1), 인터루킨-6(interleukin 6; IL-6), 인터루킨-17(interleukin 17; IL-17), 인터루킨-12 p40(interleukin 12 p40; IL-12p40), 인터루킨-23 p19(interleukin 23 p19; IL-23p19), 인터루킨-22(interleukin 22; IL-22), 세포독성 T 림프구 관련 항원 4(Cytotoxic T Lymphocyte associated Antigen 4; CTLA-4), CD20, 혈관세포 부착분자-1(vascular cell adhesion molecule-1; VCAM-1), S100 단백질 패밀리카(S100 proteins), AXL 수용체 단백질 티로신 키나제(AXL receptor protein tyrosine kinase), 대식세포 집락자극인자(큰포식세포 집락자극인자, macrophage colony stimulating factor; M-CSF), 세포예정사 리간드(programmed cell death ligand 2; PDCD1LG2), TNF 수용체 2(tumor necrosis factor receptor 2), TNF 수용체 슈퍼패밀리1B(tumor necrosis factor receptor superfamily 1B; TNFRSF1B), 히알루론산결합단백질 2(hyaluronan-binding protein 2), 세마포린 4A(semaphorin 4A; SEMA4D) 또는 과골세포 자극인자 1(osteoclast stimulating factor 1)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있고, 바람직하게는 TNF-알파(TNF- α) 또는 인터루킨-6(IL-6)에 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다.

[0055] 본 발명에서 상기 단백질 G에 상기 항체를 연결하기 위해서는, 상기과 같이 표면에 복수 개의 단백질 G가 위치한 금 나노입자를 항체와 혼합하는 단계를 수행할 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 혼합은 0 °C 초과 10 °C 이하, 바람직하게는 1 °C 내지 5 °C의 온도 하에서 2 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 6 시간 내지 24 시간 동안 수행될 수 있다.

[0057] 본 발명에서는 상기 항체를 연결시키는 단계 후 10,000 내지 30,000 rpm, 바람직하게는 10,000 내지 20,000 rpm의 조건 하에서 1 분 내지 1 시간, 바람직하게는 5 분 내지 30 분 동안 원심 분리하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

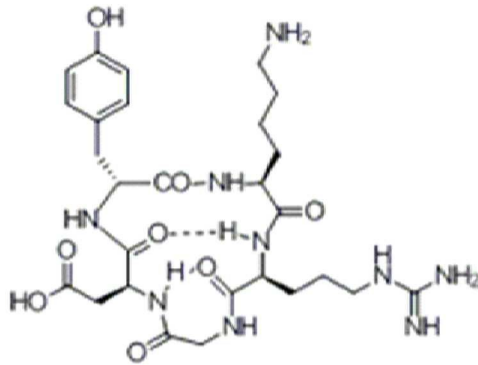
[0058] 본 발명에서는 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G를 위치시킨 뒤, 상기 단백질 G에 항체를 연결한 후 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅함으로써 금 나노입자와 항체 사이 결합 효율을 현저히 높일 수 있고 그에 따라 체내 안정성과 관절염의 진단의 효율을 높임으로써 광학 영상화용으로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 관절염의 조기 진단 또한 가능하도록 한다.

[0059] 펩타이드를 연결하는 단계

[0060] 본 발명에서는 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅한 후 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결하는 단계를 수행할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 서열번호 1로 표시되는 펩티드는 하기 화학식 1로 표시되는 구조의 사이클릭 RGD(cyclic-Arginine-Glycine-Aspartic acid)일 수 있다:

[0062] [화학식 1]



[0063]

[0064] 본 발명에서 상기 연결은 공유 결합일 수 있다.

[0065] 본 발명에서 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 연결하기 위해서는, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 코팅된 금 나노입자와 서열번호 1로 표시되는 펩타이드를 혼합하는 단계를 수행할 수 있다.

[0066] 본 발명에서 상기 혼합 시 1-에틸-3-(3-디메틸 아미노프로필) 카보디이미드(1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, EDC) 및 N-하이드록시숙신이미드(N-hydroxysuccinimide, NHS) 중 적어도 하나를 추가하며 수행될 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명에서는 상기 혼합하는 단계에 후속적으로 20 내지 40 °C의 온도 하에서 6 시간 내지 48 시간, 바람직하게는 12 시간 내지 24 시간 동안 교반하는 단계를 추가로 수행할 수 있다.

[0068] 조영제 조성물

[0069] 본 발명에서 상기의 방법으로 제조된 조영제 조성물은 관절염의 진단을 위해 사용할 수 있고, 특히 관절염의 조기 진단을 위해 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 관절염은 류마티스 관절염, 미분화성 관절염, 소아기 특발성 관절염, 척추관절염, 강직척추염, 반응관절염, 건선관절염, 장질환과 연관된 관절염, 골관절염, 통풍, 가성통풍, 전신홍반루푸스, 전신경화증, 쇼그렌증후군, 다발성근염, 피부근염, 혈관염, 성인형스틸씨병, 세균관절염, 결핵관절염, 바이러스 관절염, 라임병, 골관절염, 섬유근통, 재발성 류마티즘, 재발다발연골염, 사르코이드증, 류마티스다발근통, 급성관절통증, 윤활낭염 및 힘줄염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있으나, 바람직하게는 류마티스 관절염일 수 있다.

[0070] 본 발명에서 상기 조영제 조성물은 광학 영상화(optical imaging) 또는 광음향 영상화(optoacoustic imaging) 용으로 사용될 수 있다.

[0071] 본 발명에서 상기 광학 영상화를 위해 사용되는 녹색 내지 근-적외선 영역의 광의 파장은 500 내지 1200 nm, 바람직하게는 550 내지 1000 nm, 가장 바람직하게는 600 내지 900 nm일 수 있다.

[0072] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 제조 공정을 나타낸 것으로, 금 나노입자를 준비하고, 상기 금 나노입자 상에 복수 개의 단백질 G(protein G)을 위치시킨 뒤 이에 항체를 연결시킨 후 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅함으로써, 관절염 진단을 위한 조영제 조성물을 제조할 수 있다.

[0073] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 제조 공정을 나타낸 것으로, 금 나노입자를 준비하고, 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 코팅한 뒤, 상기 폴리에틸렌글리콜(PEG)에 서열번호 1로 표시되는 펩타이드인 사이클릭 RGD(cyclic RGD)를 공유 결합시킴으로써 관절염 진단을 위한 조영제 조성물을 제조할 수 있다.

[0075] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체에게 본 발명의 관절염 진단용 조영제 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 관절염 진단 방법에 관한 것이다.

[0076] 본 발명에서 상기 "목적하는 개체"란 관절염이 발병하였거나 발병 여부가 불확실한 개체로, 관절염이 발병 가능

성이 높은 개체를 의미한다. 여기서, 상기 개체는 인간을 포함하는 포유 동물로, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 본 발명에서 상기 조영제 조성물의 투여 시 비경구 또는 경구 방식으로 수행될 수 있다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다.

[0078] 또한, 본 발명에서 상기 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.

[0079] 본 발명에서 상기 투여하는 단계에 후속적으로 광학 영상(optical imaging) 또는 광음향 영상(optoacoustic imaging)을 촬영하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 상기 광학 영상화를 위해 사용되는 녹색 내지 근-적외선 영역의 광의 파장은 500 내지 1200 nm, 바람직하게는 550 내지 1000 nm, 가장 바람직하게는 600 내지 900 nm일 수 있다.

[0082] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 목적하는 개체에게 본 발명의 관절염 진단용 조영제 조성물을 투여하는 단계; 및

[0083] 상기 개체의 목적하는 부위의 영상을 촬영하는 단계를 포함하는, 영상 획득 방법에 관한 것이다.

[0084] 본 발명에서 상기 "목적하는 부위"란 관절염이 발병하였거나 발병 여부가 의심되는 신체 부위로, 예를 들면, 신체의 각 관절 부위일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 본 발명에서 상기 영상은 광학 영상(optical imaging) 또는 광음향 영상(optoacoustic imaging)일 수 있다.

[0086] 본 발명의 영상 획득 방법에서 상기 목적하는 개체의 정의, 조영제 조성물의 투여 방식 또는 투여량 및 광학 영상화를 위해 사용되는 광의 파장은 상기 진단 방법에 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위해 이하 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0087] 본 발명에서 제공하는 조영제 조성물은 광학 영상화(optical imaging) 또는 광음향 영상화(optoacoustic imaging)에 적용이 가능하며, 상기 조영제 조성물을 사용하는 경우 류마티스 관절염 등 관절염의 조기 진단을 가능하도록 한다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 구조를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 제조 공정을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 조영제의 제조 공정을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 실시예 1에서 제조한 금 나노막대 조영제를 FESEM(Field Emission Scanning Electron Microscopy)로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 실험예 1에서, 본 발명의 실시예 1에서 제작된 금 나노막대 조영제에 대한 흡수 스펙트럼을 UV-Vis/NIR 분광계를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 실험예 3에서 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가를 위한 실험 계획도를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 실험예 3에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 실험예 4에서 본 발명의 실시예 1 및 2와, 비교예 1에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가를 위한 실험 계획도를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 실험예 4에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 실험예 4에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상의 촬영 후 NIR 흡수 강도를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 실험예 4에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 2의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 실험예 4에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 2의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상의 촬영 후 NIR 흡수 강도를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 실험예 4에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 2와, 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상의 촬영 후, 각 조영제 조성물에 있어 관절염 유발율에 따른 NIR 흡수 강도를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 실험예 5에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 실험예 6에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여하고 30분 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 18은 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 2의 조영제 조성물을 투여하고 30분 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 19는 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여하고 6시간 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 2의 조영제 조성물을 투여하고 6시간 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여하고 24시간 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 2의 조영제 조성물을 투여하고 24시간 경과 후 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영한 사진을 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 실험예 7에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 2의 조영제 조성물을 투여하여 광음향 영상을 촬영한 뒤 각 조영제 조성물에 있어 관절염 유발율에 따른 평균 픽셀 강도를 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 실험예 8에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 면역조직화학염색을 통해 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 VCAM-1의 발현을 확인한 사진을 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 실험예 9에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 관절염 중증도에 따른 혈청 내 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현을 ELISA 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 26은 본 발명의 실험예 10에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 폐, 심장, 콩팥, 비장 및 간에 있어서 조직의 g 당 주입량의 퍼센티지를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

도 27은 본 발명의 실험예 10에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 주요 장기를 헤마톡실린 & 에오신(H&E) 염색을 실시한 후 광학현미경으로 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 28은 본 발명의 실험예 12에서 류마티스 관절염 마우스 모델에 실시예 1 및 비교예 1의 조영제 조성물을 투여한 뒤 마우스의 체중 변화를 측정한 그래프를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0091] 실시예

[0093] [준비예 1] 금 나노입자의 제조

[0094] 5 ml의 CTAB (0.2 M)에 5 ml의 HAuCl_4 (1 μl)을 넣어준 후 차가운 60 μl NaBrH_4 를 넣어주고 2분 동안 교반하여 금 씨드(gold seed) 용액을 제조하였다. 금 씨드 용액을 실온에 3 시간 이상 보관한 후 사용하였다. 5 ml의 CTAB (0.2 M)에 30 μl 의 AgNO_3 (0.01M), 5 ml의 HAuCl_4 (1 μl)를 넣어준 후 교반하였다. 반응 용액에 55 μl 아스코르브산(ascorbic acid) (0.1M)을 넣어주자 노란색의 반응 용액이 무색으로 변하였다. 반응 용액을 1시간 동안 교반 배양(shaking incubation) (150 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$) 한 뒤 앞서 제조한 12 μl 의 금 씨드 용액을 가한 후, 24 시간 교반 배양 (150 rpm, 30 $^{\circ}\text{C}$)하여 금을 성장시켜 무색 용액이 적갈색(reddish-brown)으로 변화는 것을 관찰할 수 있었다. 이렇게 합성된 금 나노막대(gold nanorods; GNR) 반응 용액을 2번 원심 분리 (15,000 rpm, 30분)하여 과량의 CTAB을 제거한 후, 초순수(DI water)에 재분산시켰다.

[0096] [실시예 1] 류마티스 관절염 조기 진단용 표적성 항체 리간드(anti-TNF- α antibody)가 결합된 금 나노입자의 제조

[0097] 도 3에 나타난 방법으로 금 나노입자의 표면에 복수 개의 단백질 G를 위치시키고, 상기 단백질 G에 항체를 연결시키며, 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 PEG가 코팅된 조영제를 제조하였다. 구체적으로, 상기 준비예 1에서 합성된 금 나노막대 수용액을 단백질 G 수용액과 12시간 동안, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후, 3번 원심 분리 (15,000 rpm, 10분)를 시행하여 미반응 단백질 G를 제거하였다. 이후, Remicade 수용액과 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 반응시킨 후, 3번 원심 분리 (15,000 rpm, 10분)를 시행하여 미반응 Remicade를 제거하였다. 금 나노막대의 체내 안전성을 위하여 분자량 5,000의 HS-poly(ethylene glycol)- CH_3 수용액과 실온에서 24시간 동안 반응시킨 후, 15,000 rpm 원심분리를 통하여 미반응한 PEG를 제거하고, 초순수(DI water)에 재 분산시켰다. 이렇게 수득된 금 나노막대를 FESEM(Field Emission Scanning Electron Microscopy)로 관찰한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 금 나노막대의 직경 크기는 대략 30 nm인 것을 확인할 수 있었다.

[0099] [실시예 2] 류마티스 관절염 조기 진단용 표적성 항체 리간드(anti-IL-6 antibody)가 결합된 금 나노입자의 제조

[0100] 도 3에 나타난 방법으로 금 나노입자의 표면에 복수 개의 단백질 G를 위치시키고, 상기 단백질 G에 항체를 연결시키며, 상기 금 나노입자의 표면을 감싸도록 PEG가 코팅된 조영제를 제조하였다. 구체적으로, 상기 준비예 1에서 합성된 금 나노막대 수용액을 단백질 G 수용액과 12시간 동안, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후, 3번 원심 분리 (15,000 rpm, 10분)를 시행하여 미반응 단백질 G를 제거하였다. 이후, 토실리주맙(Tocilizumab) 수용액과 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 12시간 동안 반응시킨 후, 3번 원심 분리 (15,000 rpm, 10분)를 시행하여 미반응 토실리주맙을 제거하였다. 금 나노막대의 체내 안전성을 위하여 분자량 5,000의 HS-poly(ethylene glycol)- CH_3 수용액과 실온에서 24시간 동안 반응시킨 후, 15,000 rpm 원심분리를 통하여 미반응한 PEG를 제거하고, 초순수(DI water)에 재 분산시켰다.

[0102] [실시예 3] 류마티스 관절염 조기 진단용 표적성 단백질 리간드(RGD)가 결합된 금 나노입자의 제조

[0103] 도 4에 나타낸 방법으로 RGD가 PEG를 통해 금 나노입자의 표면에 연결된 조영제를 제조하였다. 구체적으로, 상기 준비예 1에서 합성된 금 나노막대(50 mmol)의 금 박막 위에 기능성 PEG (HS-(CH₂CH₂)₁₇₅-COOH, 10 mmol)와 24 시간 동안 실온에서 교반시킨 후, 미반응 기능성 PEG는 10,000 rpm 원심분리를 통해 제거하였다. 그 후, 기능성 PEG와 동물의 EDC(1-ethyl-3(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide, 10 mmol) 및 NHS(N-hydroxysuccinimide, 10 mmol)를 이용하여 기능성 PEG와 동물의 RGD(서열번호 1의 펩타이드)(10 mmol)를 실온에서 24 시간 동안 교반 반응시켜 RGD가 PEG에 공유 결합된 금 나노막대를 제조하였다. 도면에 도시하지는 않았지만, 이렇게 하여 수득한 금 나노막대에서 말레이미드 (maleimide)의 ¹H-NMR 피크가 6.7 ppm에서 관찰되었는 바, RGD가 금 나노막대 위의 PEG와 공유 결합된 것임을 알 수 있었다.

[0105] [비교예 1]

[0106] 본 발명의 금 나노입자 조영제의 효과를 비교하기 위하여, 금 나노입자의 표면에 PEG만 코팅된 조영제를 비교예 1로 제작하였다. 구체적으로는, 상기 준비예 1에서 합성된 금 나노막대(50 mmol)의 금 박막 위에 기능성 PEG (HS-(CH₂CH₂)₁₇₅-COOH, 10 mmol)와 24시간 동안 실온에서 교반시킨 후, 미반응 기능성 PEG는 10,000 rpm 원심분리를 통해 제거하였다.

[0108] [실험예 1] 본 발명에 따른 조영제의 흡수 스펙트럼 분석

[0109] 상기 실시예 1에서 제작된 금 나노막대 조영제에 대한 흡수 스펙트럼을 UV-Vis/NIR 분광계를 이용하여 분석하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0110] 그 결과, 도 6에서 보는 바와 같이 본 발명의 실시예 1 및 2의 금 나노입자의 흡수 피크는 NIR 영역에 위치하며, 대략 800 nm인 것을 확인할 수 있었다.

[0112] [실험예 2] 본 발명에 따른 조영제의 흡수 스펙트럼 분석

[0113] 상기 준비예 1, 실시예 1 내지 3, 그리고 비교예 1에서 제작된 금 나노막대 조영제에 대하여 동적광산란 (Dynamic Light Scattering)(DLS, Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments Lt)을 통해 제타-전위(Zeta-potential)를 측정하였다. 또한, 실시예 3에서 제작된 금 나노막대를 증류수에 용해시킨 뒤 고압 액체 크로마토 그래피(high-pressure liquid chromatography; HPLC)를 이용하여 상기 금 나노막대에 포함된 RGD 함량을 평가하였다. Bio-Rad 단백질 어췌이 시약(Bio-Rad laboratories, Inc.)을 이용하여 Bradford 방법에 의해 실시예 1 및 2에서 제작된 금 나노막대에 포함된 항-TNF- α 항체(Remicade) 및 항-IL-6 항체(Tocilizumab)의 함량을 평가하였다. 단, 소 혈청 알부민을 표준 시료로 사용하였다. 각 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	제타-전위 (mV)	RGD 로딩 함량(wt%)	항-TNF- α 로딩 함량 (wt%)
준비예 1(GNR)	18.5 \pm 1.25		-
비교예 1(PEG-GNRs)	0.108 \pm 0.042		-
실시예 1(anti-TNF- α -GNRs)	2.33 \pm 1.12		6.2
실시예 2(anti-IL-6-GNRs)	3.42 \pm 0.98		5.9
실시예 3(RGD-GNRs)	-23.5 \pm 1.31	3.5	

[0117] [실험예 3] 본 발명에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가(1)

[0118] 도 7은 본 발명에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가를 위한 실험 계획도를 나타낸 것으로, 2차 면역을 통해 류마티스 관절염 동물 모델을 제작한 뒤, 본 발명에 따른 조영제를 투여한 후 류마티스 관절염

조직 조영 효과를 평가하였다. 구체적 실험 방법은 다음과 같다:

1. 류마티스 관절염 마우스 모델의 준비

자가면역질환 중 하나인 류마티스 관절염 동물 모델은 DBA1/J 마우스에 Type II 콜라겐에 0.01 mol/L의 아세트산과 완전 프로인트 항원 보강제(complete Freund's adjuvant)를 혼합한 후 100 μ g을 마우스 꼬리 근육에 피하 주사하고 14일 후 동량을 주입하여 관절염을 유도하였다. 류마티스 관절염 마우스의 증상으로는 붓어짐, 부풀기 등이 있는데, 관절염 징후를 Mann-Whitney U test의 기준에 따라 발병율(incidence, %)을 결정하고, 각 마우스의 네 발을 육안으로 관찰하여 부풀어 오른 정도를 하기 표 2의 기준에 따라 류마티스 관절염 유발 정도(arthritic score)를 부여하였다. 동물 당 부여된 스코어(score)의 최소값은 0이고, 최대값은 16이 되도록 하였다.

표 2

단계	유발 정도
0	부풀기 없음, 정상적인 상태
1	경미한 부풀기
2	중간 이하의 부종
3	두드러진 부종
4	심각한 부종

2. 본 발명에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직의 광학적 영상 효과 평가상기 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 금 나노입자 200 μ g을 식염수에 분산시켜 얻어진 금 나노입자 용액 100 μ l을 상기 1.의 류마티스 관절염 마우스에 정맥 주사 후, 24시간 후에 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상(GE Health Care, eXplore Optix, Pre-clinical Optical Imaging System)을 얻었고 그 결과는 도 8에 나타내었다.

도 8에서 염증이 일어나지 않은, 즉 류마티스 관절염이 발현되지 않은 음성 대조군 그룹에서는 금 나노입자의 흡수가 거의 일어나지 않아 붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도를 보여주었다. 하지만 염증이 일어난 류마티스 관절염이 발현된 그룹에는 금 나노입자의 흡수가 증가하여 파란색과 보라색으로 변하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 조영제로 비교예 1의 조영제에 비하여 실시예 1의 조영제를 사용한 경우, 스코어 0의 류마티스 관절염 초기 단계에서도 파란색과 보라색으로 변하여 조기 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[실험예 4] 본 발명에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가(2)

도 9는 본 발명에 따른 조영제의 류마티스 관절염 조직 조영 효과 평가를 위한 실험 계획도를 나타낸 것으로, 2차 면역을 통해 다양한 정도의 류마티스 관절염 동물 모델을 제작한 뒤, 본 발명에 따른 조영제를 투여한 후 류마티스 관절염 조직 조영 효과를 평가하였다. 구체적 실험 방법은 다음과 같다:

1. 류마티스 관절염 마우스 모델의 준비

상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 0 부터 4까지 다양한 정도의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비하였다.

2. 류마티스 관절염 정도에 본 발명의 조영제의 조영 효과 평가

실시예 1 및 2, 및 비교예 1에서 제조한 금 나노입자 200 μ g이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μ l을 준비하였다. 상기 1.에서 준비한 5 단계의 류마티스 관절염 마우스 모델에 상기 금 나노입자 용액 100 μ l을 정맥 주사한 후, 24시간 후에 류마티스 관절염 조직의 근적외선 흡수 영상을 얻었다. 실시예 1 및 비교예 1의 조영제를 사용하여 얻은 영상 사진은 도 10에 나타내었고, 류마티스 관절염의 정도(스코어) 별 실시예 1 및 비교예 1의 조영제에 따른 NIR 흡수 강도를 측정하여 그 결과는 도 11에 나타내었다. 또한, 실시예 2의 조영제를 사용하여 얻은 영상 사진은 도 12에, 류마티스 관절염의 정도에 따른 NIR 흡수 강도를 측정한 그래프는 도 13에 나타내었다. 한편, 실시예 1 및 2와, 비교예 1의 조영제 별 류마티스 관절염의 정도에 따른 NIR 흡수 강도를 비교한 그래프를 도 14에 나타내었다.

도 10 내지 14에서 보는 바와 같이, 류마티스 관절염의 스코어가 증가함에 따라 금 나노입자의 흡수가 증가하여

붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도가 파란색과 보라색의 강한 흡수 강도로 변함을 확인할 수 있었다. 특히 조영제로 비교예 1의 조영제를 사용한 경우 스코어 2 이상의 경우에서도 여전히 붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도를 보이는 반면, 실시예 1 또는 2의 조영제를 사용한 경우, 동일한 정도의 류마티스 관절염에서 흡수 강도가 파란색과 보라색으로 변한 것을 볼 수 있고, 특히 스코어 0 내지 1 정도에서도 류마티스 관절염의 조기 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 실시예 1의 조영제를 사용한 경우가 가장 효과적으로 조기 진단이 가능함을 알 수 있었는데, 이는 조기 류마티스 관절염에 타겟팅하는 항체가 폴리에틸렌글리콜에 결합하는 것보다 단백질 G(protein G)에 더 효과적으로 결합한 결과에 기인한 것임을 알 수 있다.

[0134] [실험예 5] 본 발명에 따른 조영제를 이용한 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상(1)

[0135] 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 5의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1에서 제조한 금 나노입자 100 μg 이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μl 을 정맥 주사한 후, 24시간 경과한 뒤에 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영하여 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0136] 도 15에서 보는 바와 같이, 류마티스 관절염 유발하지 않은 음성 대조군과 비교하여 류마티스 관절염 유도 모델에서는 붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도가 증가하여 상기 실시예 1의 조영제가 류마티스 염증 부위에 많이 존재함을 확인할 수 있었다.

[0138] [실험예 6] 본 발명에 따른 조영제를 이용한 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상(2)

[0139] 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 1 및 2의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1에서 제조한 금 나노입자 100 μg 이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μl 을 정맥 주사한 후, 24시간 경과한 뒤에 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영하여 그 결과를 도 16에 나타내었다.

[0140] 도 16에서 보는 바와 같이, 류마티스 관절염 부위에서 상기 실시예 1의 조영제가 많이 존재하여 붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도가 증가하였고, 관절염 정도가 심할수록, 즉 스코어가 높을수록 상기 실시예 1의 조영제가 더욱 많이 존재하여 더욱 붉은색과 노란색 계통의 흡수 강도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0142] [실험예 7] 본 발명에 따른 조영제를 이용한 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상(3)

[0143] 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 각 발의 관절염 중증도 스코어가 0, 1 및 2에 해당하는 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1 및 2에서 제조한 금 나노입자 100 μg 이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μl 을 정맥 주사한 후, 0.5, 6, 24시간 경과한 뒤에 류마티스 관절염 조직의 광음향 영상을 촬영하여 염증 비표적성 및 표적성 항체에 따른 영상 정량 결과를 도 17에 나타내었다. 촬영 조건으로는 680nm, 730nm, 760nm, 800nm, 850nm, 900nm의 6가지 파장으로 촬영을 하였고 파장당 10 프레임을 촬영하여 그 결과는 도 17 내지 22에 나타내었다. 또한, 광음향 영상을 얻은 뒤 동일한 면적의 ROI를 설정하여 정량값을 분석하였으며 정량값들의 평균을 도 23에 나타내었다.

[0144] 그 결과, 도 17 내지 23에서 보는 바와 같이 관절염 중증도가 증가할수록, 음성 대조군에 비하여 실시예 1 및 2의 금 나노입자를 주입한 경우 광음향 이미징 정량값이 모두 증가하였다. 또한, 실시예 1 및 2의 금 나노입자 모두, 특히는 항-IL-6 항체가 결합된 실시예 2의 금 나노입자를 주입하는 경우 스코어 0 수준의 초기 류마티스 관절염 또한 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었고, 금 나노입자의 주입 후 30분 안에도 진단이 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[0146] [실험예 8] 본 발명에 따른 조영제를 이용한 류마티스 관절염 조직 내 염증성 사이토카인의 발현 확인

[0147] 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 0 내지 4의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1에서 제조한 금 나노입자 200 μg 이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μl 을 정맥 주사한 후, 관절염 중증도에 따른 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 VCAM-1의 발현을 확인하였다. 이를 위해 동물의 관절 조직을 포르말린으로 고정한 후, 4%의 포름산(formic acid)에서 탈석회화 과정을 거쳐 파라핀에 고정하였다. 조직을 4 μm 절편한 후, 면역조직화학염색을 시행하여 그 결과를 도 24의 (a)에 나타내었고, 비교를 위해 조영제를 사용하지 않은

결과를 (b)에 나타내었다.

[0148] 도 24에서 보는 바와 같이, 류마티스 관절염의 중증도가 증가할수록 염증이 일어난 관절 부위에서 TNF- α 와 VCAM-1의 발현이 모두 증가하였으며, 특히 실시예 1의 조영제가 주입된 모든 관절염 마우스의 관절에서 같은 결과를 확인하였다.

[0150] [실험예 9] 본 발명에 따른 조영제를 이용한 류마티스 관절염 마우스의 혈청 내 염증성 사이토카인의 발현 확인

[0151] 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 0 내지 4의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 금 나노입자 200 μg 이 식염수에 분산된 금 나노입자 용액 100 μl 을 정맥 주사한 후, 관절염 중증도에 따른 혈청 내 염증성 사이토카인인 TNF- α 의 발현을 ELISA 통해 분석하여 그 결과를 도 25에 나타내었다.

[0152] 도 25에서 보는 바와 같이, 육안으로는 염증이 관찰되지 않는 관절염 스코어가 0일 때, 류마티스 관절염 마우스의 혈청 내에서 TNF- α 의 발현이 가장 높았으며, 관절염의 스코어가 증가할수록 혈청 내 TNF- α 의 발현은 감소하였는데, 비교예 1의 조영제에 비하여 실시예 1의 조영제를 사용한 경우 모든 스코어에서 혈청 내 TNF- α 의 발현 수준이 더욱 낮은 것을 확인할 수 있었다.

[0154] [실험예 10] 본 발명에 따른 조영제의 조직 독성 평가

[0155] 조영제의 반복 투여에 따른 독성을 평가하기 위하여, 상기 실험예 3의 1.과 동일한 방법으로 스코어 4의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 금 나노입자를 4 mg/ml 농도로 100 μl 씩 7회 투여한 후, 1일 경과한 뒤 모든 실험 동물의 유안부검 소견을 관찰 기록하고, 주요 장기로 폐, 심장, 콩팥, 비장 및 간에 있어서 조직의 g 당 주입량의 퍼센티지를 측정하여 그 결과를 도 26에 나타내었고, 각 조직 별 절대 중량을 측정하여 그 결과는 하기 표 3에 나타내었다. 단, 하기 표 3에서 각 값은 평균 \pm 표준 편차로 나타내었다. 또한, 주요 장기의 일부 조직을 10% 중성 포르말린에 18시간 이상 고정시킨 다음, 탈수를 거쳐 파라핀 포매 후 4 μm 의 절편을 제작하고, 헤마톡실린 & 에오신(hematoxylin & eosin, H&E) 염색을 실시한 뒤, 광학현미경으로 관찰한 결과를 도 27에 나타내었다.

[0156] 도 26 및 표 3에서 보는 바와 같이, 정상 마우스에 비하여 류마티스 관절염 마우스 모델에서 조직 내 조영제의 축적량 및 조직의 절대량의 증가가 관찰되었으나, 비교예 1의 조영제 대비 실시예 1의 조영제에서 유의적 증가는 관찰되지 않았으며, 그로 인해 독성이 유발되는 것 또한 확인하지 못하였다.

[0157] 도 27에서 보는 바와 같이, 정상 마우스 대조군을 포함한 모든 실험군에 걸쳐 금 나노입자의 조영제 투여와 관련된 조직병리학적 변화가 관찰되지 않았다.

표 3

구분	비교예 1(mg)		실시예 1(mg)		DBA/1J
	음성 대조군	CIA	음성 대조군	CIA	
폐	0.254 \pm 0.057	0.311 \pm 0.093	0.230 \pm 0.014	0.299 \pm 0.085	0.192 \pm 0.072
심장	0.158 \pm 0.014	0.154 \pm 0.013	0.154 \pm 0.013	0.179 \pm 0.090	0.145 \pm 0.061
신장	0.583 \pm 0.056	0.635 \pm 0.044	0.562 \pm 0.070	0.665 \pm 0.027	0.687 \pm 0.274
비장	0.117 \pm 0.034	0.153 \pm 0.048	0.102 \pm 0.016	0.157 \pm 0.029	0.072 \pm 0.005
간	1.657 \pm 0.135	1.873 \pm 0.184	1.667 \pm 0.235	1.747 \pm 0.232	1.520 \pm 0.467

[0161] [실험예 11] 본 발명에 따른 조영제의 혈액 독성 평가

[0162] 상기 실험예 10에서 실험이 종료된 후, 마우스를 CO₂ 마취 하에 경추탈골법으로 희생시키고 개복하여 혈액을 대퇴정맥으로부터 23 G의 주사기를 이용하여 채취하였다. 채취한 혈액을 3000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 혈청을 분리한 뒤, 금 나노입자를 주입한 정상 마우스와 류마티스 관절염 마우스 모델에서 적혈구, 백혈구, 헤

모글로빈, 적혈구 용적, 평균 적혈구 용적, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 헤모글로빈 농도를 측정하여 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 단, 하기 표 4에서 각 값은 평균±표준 편차로 나타내었다.

[0163] 표 4에서 보는 바와 같이, 실시예 1의 금 나노로드 조영제를 주입한 정상 마우스와 류마티스 관절염 마우스 모델 모두에서 적혈구, 백혈구, 헤모글로빈, 적혈구 용적, 평균 적혈구 용적, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 헤모글로빈 농도는 유의한 차이가 없었다.

표 4

구분	비교예 1		실시예 1		DBA/1J
	음성 대조군	CIA	음성 대조군	CIA	
WBC (K/ μ l)	6.13 (± 1.58)	4.51 (± 0.95)	5.48 (± 2.72)	5.71 (± 0.55)	3.41 (± 0.81)
RBC(M/ μ l)	12.63(± 0.61)	12.28 (± 0.44)	11.81 (± 2.82)	12.52 (± 0.53)	11.04 (± 0.62)
Hb(g/dL)	14.53(± 0.71)	13.14 (± 0.55)	13.25 (± 3.15)	13.23 (± 0.58)	14.68 (± 0.89)
PLT(K/ μ l)	909.00(± 71.33)	1144.00 (± 82.86)	480.50 (± 228.5)	1014.00 (± 70.00)	1107.4 (± 72.65)
HCT(%)	52.70(± 2.80)	52.70 (± 2.80)	49.05 (± 11.15)	47.17 (± 1.78)	44.78 (± 2.15)
MCV(fL)	41.70(± 0.20)	41.70 (± 0.20)	41.70 (± 0.50)	37.67 (± 0.31)	40.57 (± 0.41)
MCH(pg)	11.47(± 0.11)	10.73 (± 0.16)	11.20 (± 0.00)	10.57 (± 0.04)	13.30 (± 0.13)
MCHC(g/dL)	27.57(± 0.22)	27.83 (± 0.39)	26.90 (± 0.30)	28.03 (± 0.24)	32.77 (± 0.46)
WBC: 백혈구; RBC: 적혈구; Hb: 헤모글로빈; PLT: 혈소판; HCT: 헤마토크릿(Hematocrit); MCV: 평균 적혈구 용적; MCH: 평균 적혈구 혈색소량; MCHC: 평균 적혈구 혈색소 농도					

[0167] [실험예 12] 본 발명에 따른 조영제에 의한 체중 변화 평가

[0168] 상기 실험예 10과 동일한 방법으로 스코어 5의 류마티스 관절염 마우스 모델을 준비한 뒤, 실시예 1 및 비교예 1에서 제조한 금 나노막대를 4 mg/ml 농도로 100 μ l씩 매일 7회 투여한 후, 마우스의 체중 변화를 측정하여 그 결과를 도 28에 나타내었다.

[0169] 도 28에서 보는 바와 같이, 실시예 1의 조영제를 투여한 정상 마우스와 류마티스 관절염 마우스에서 유의한 체중 변화는 관찰되지 않았다.

부호의 설명

[0170] 10: 금 나노입자

20: 폴리에틸렌글리콜

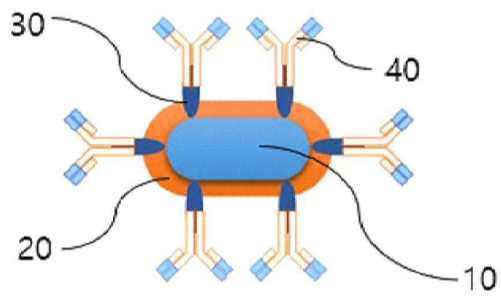
30: 단백질 G

40: 항체

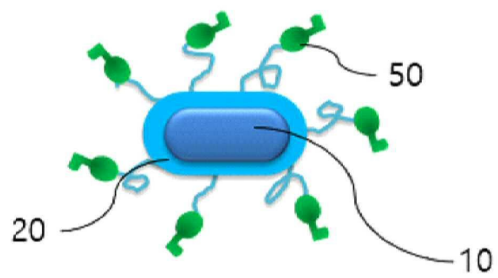
50: 펩티드

도면

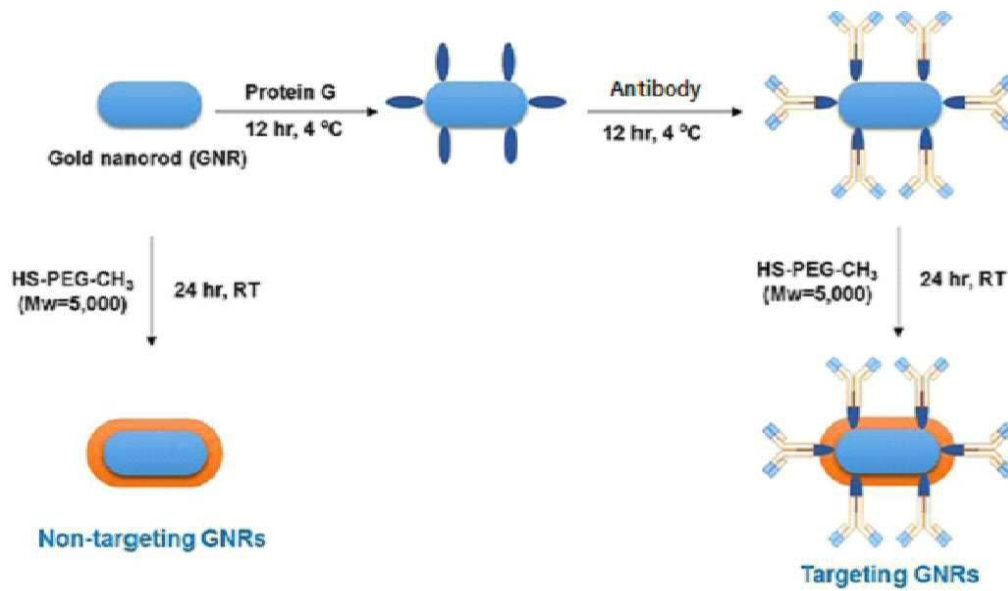
도면1



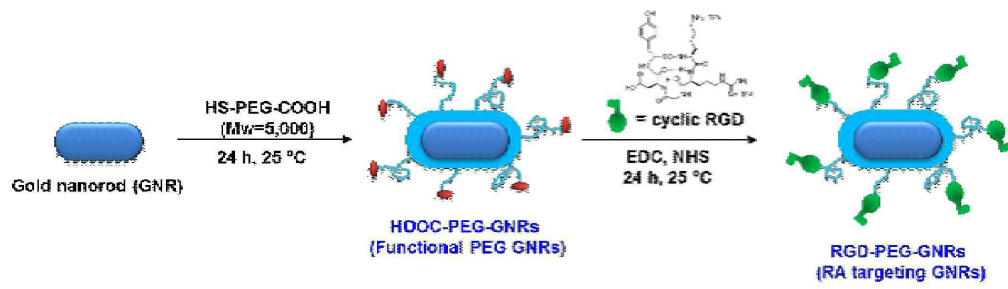
도면2



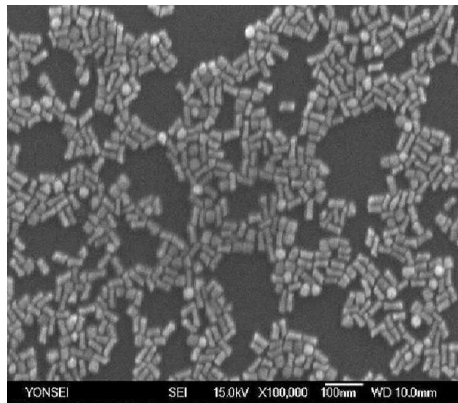
도면3



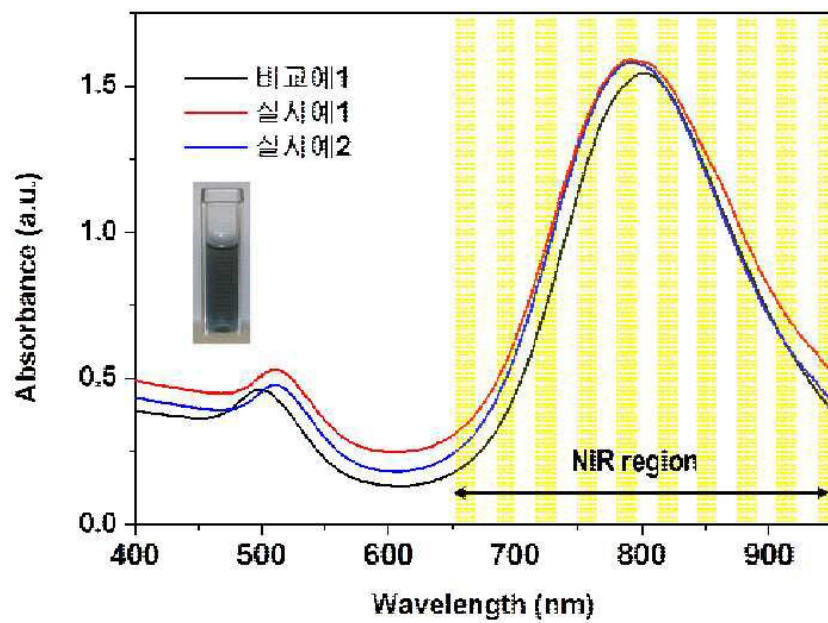
도면4



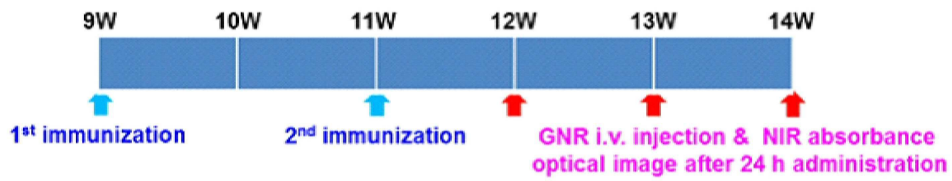
도면5



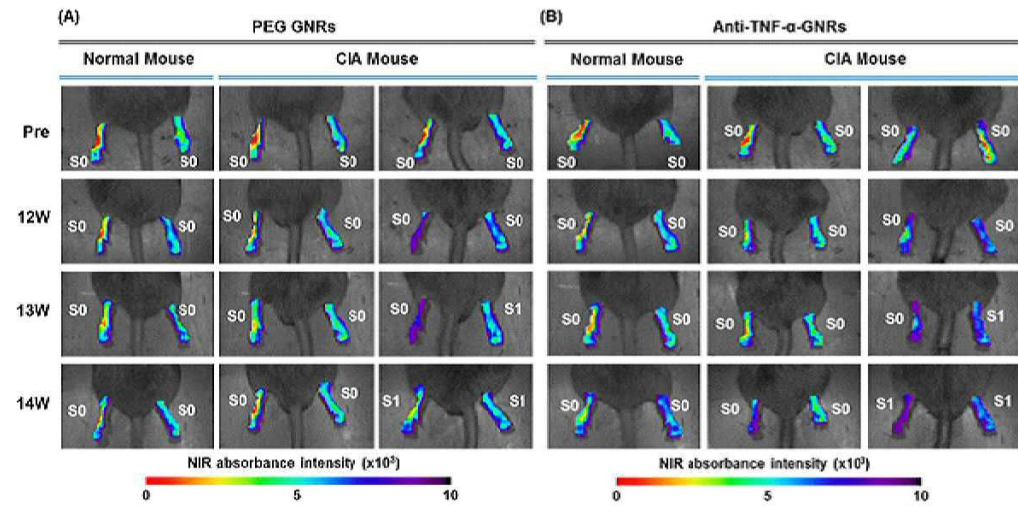
도면6



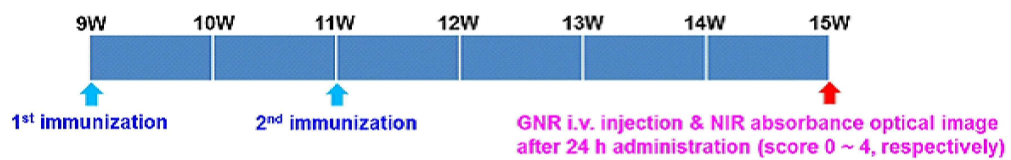
도면7



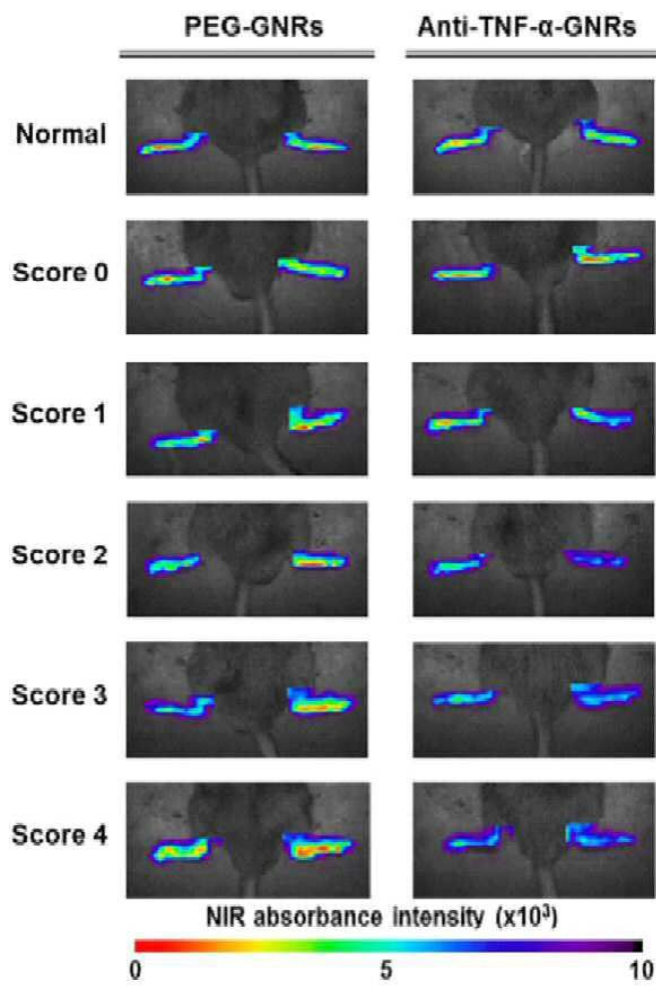
도면8



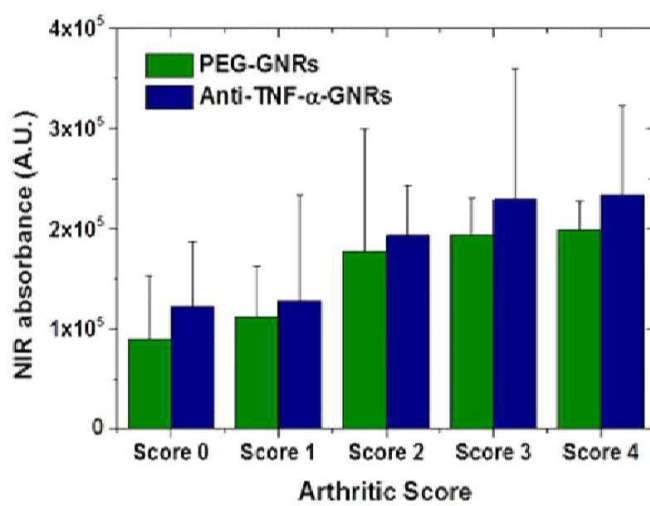
도면9



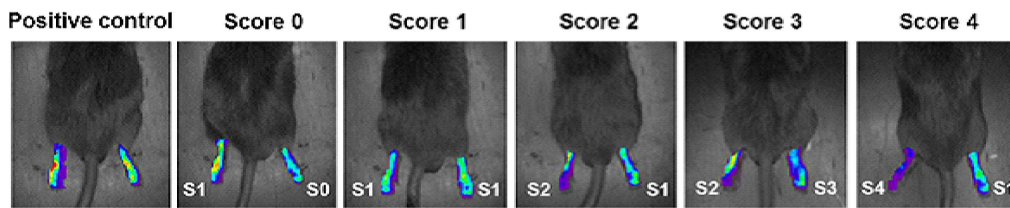
도면10



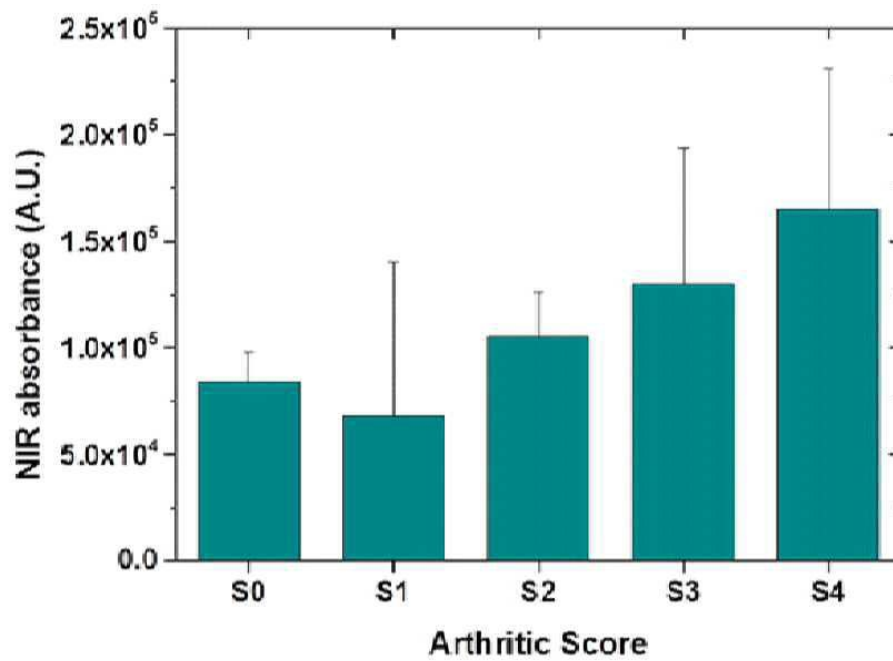
도면11



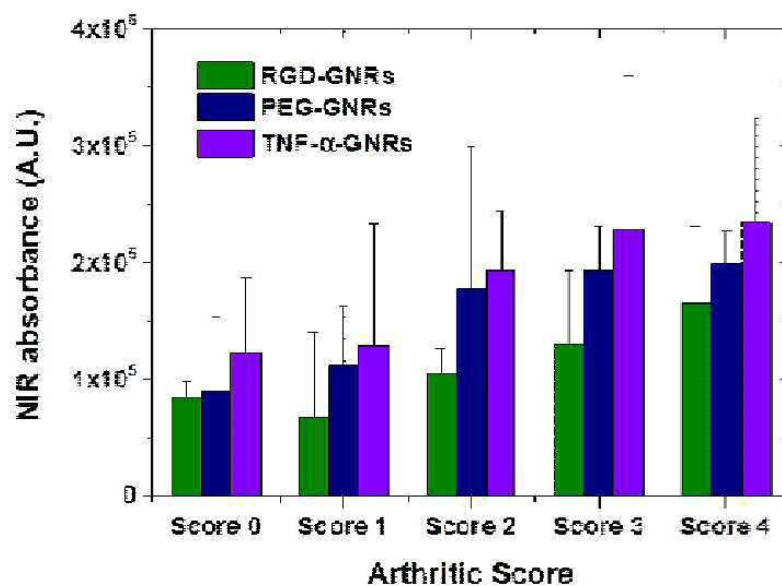
도면12



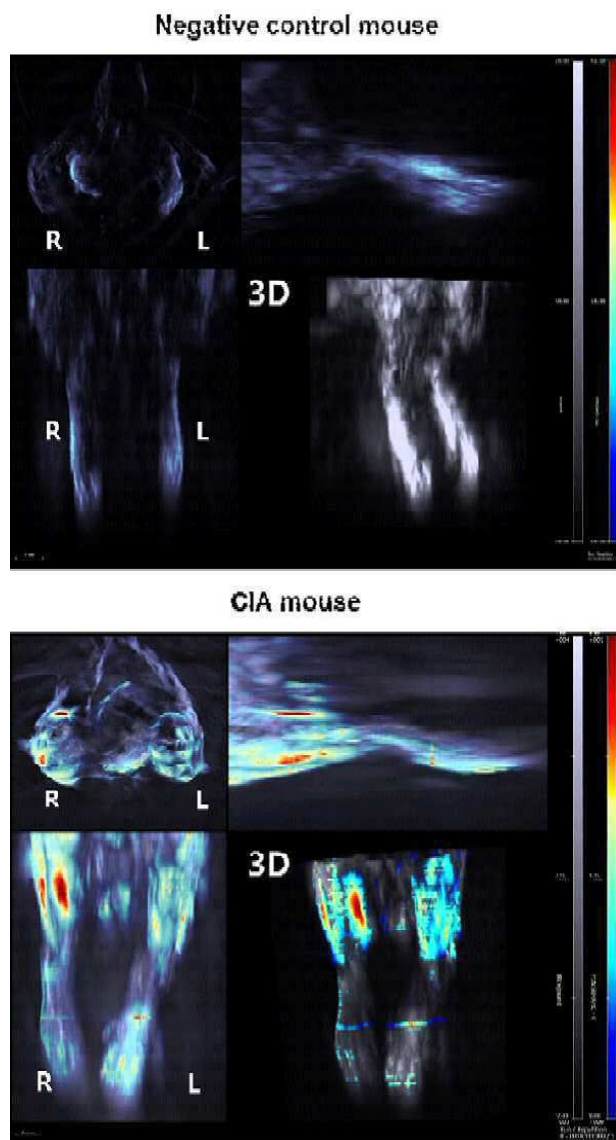
도면13



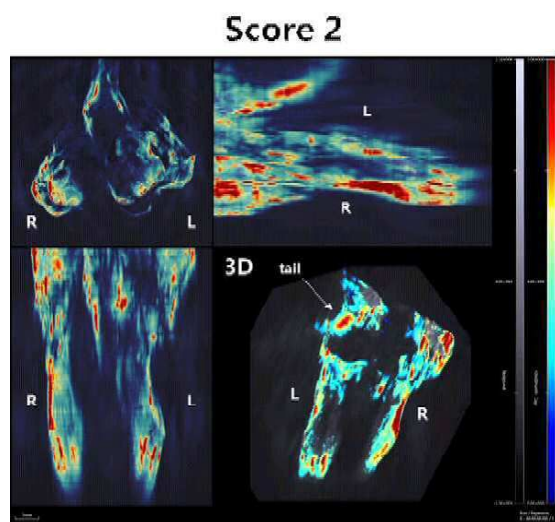
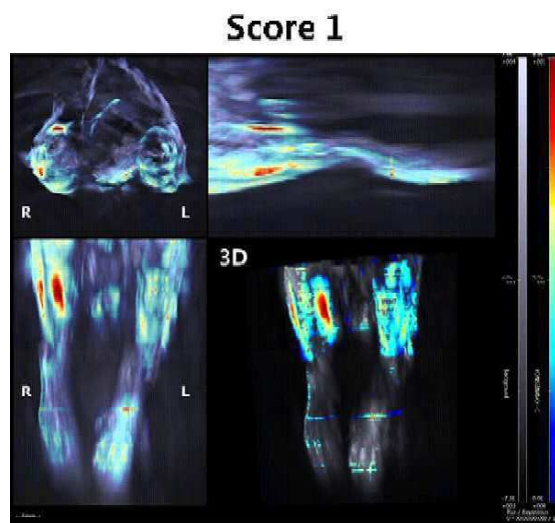
도면14



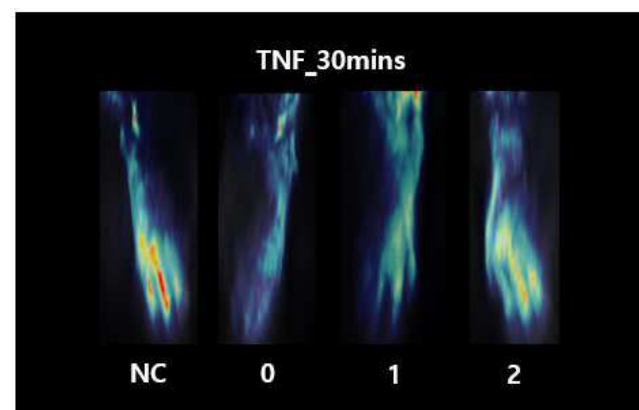
도면15



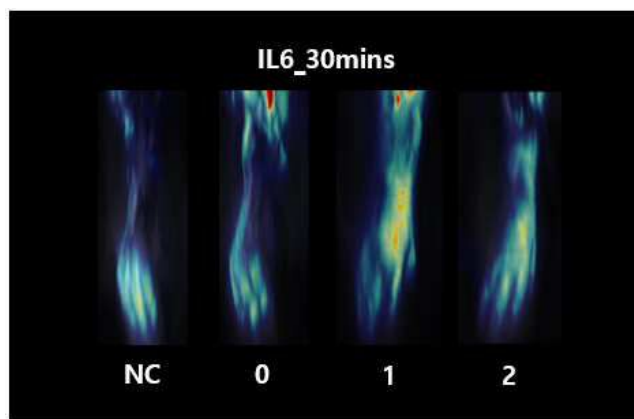
도면16



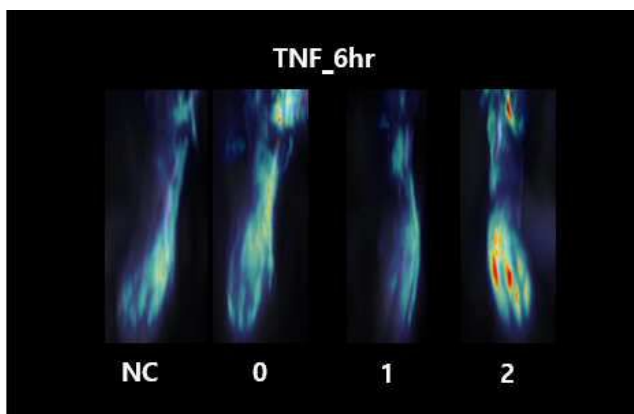
도면17



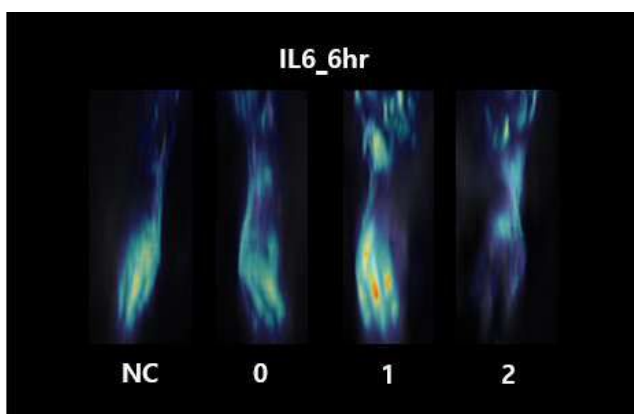
도면18



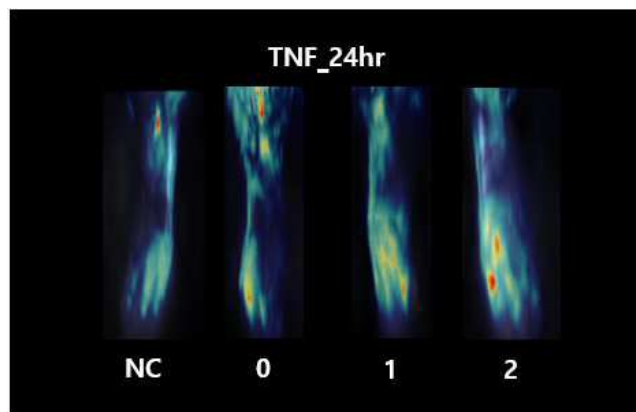
도면19



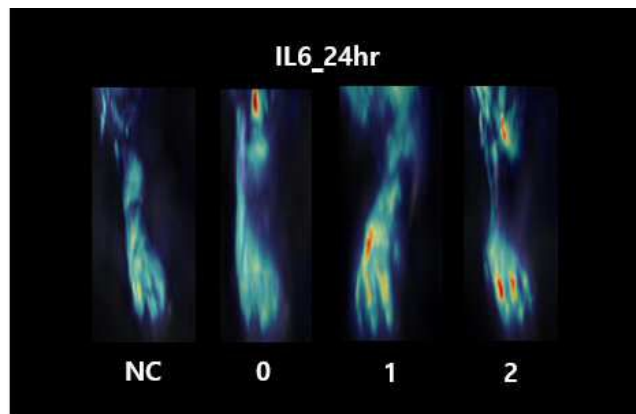
도면20



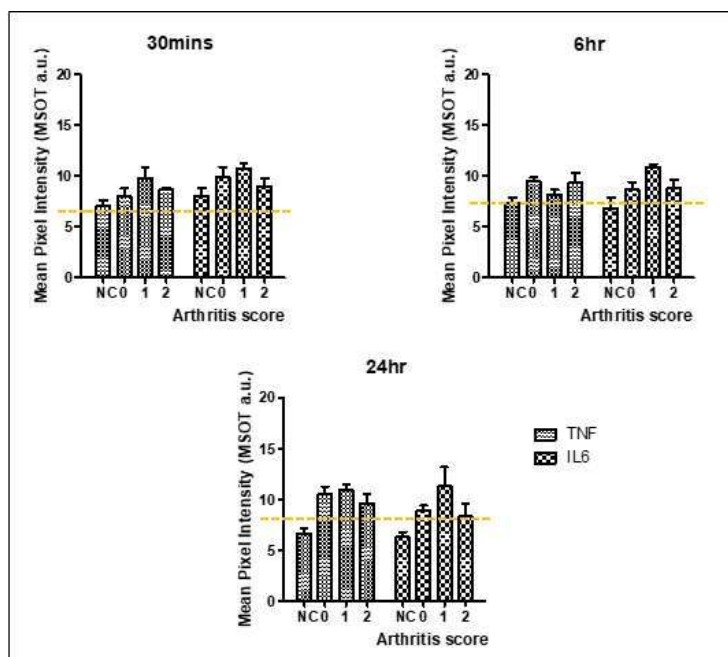
도면21



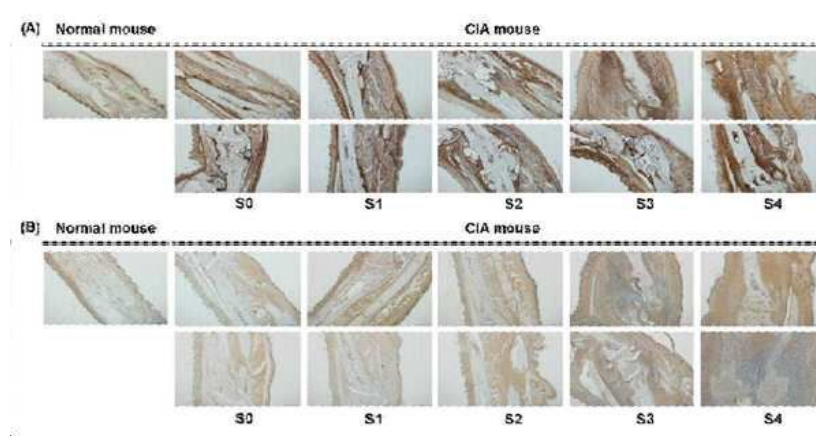
도면22



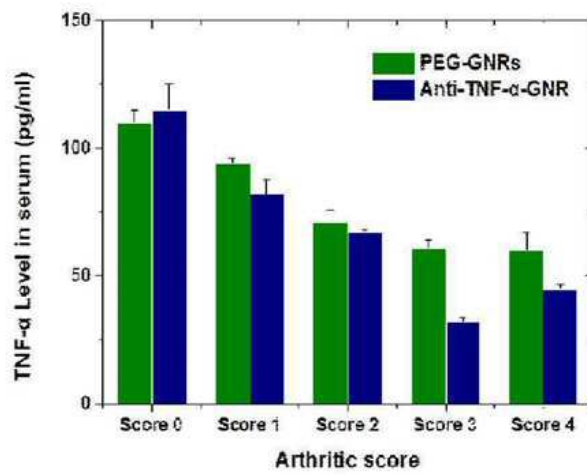
도면23



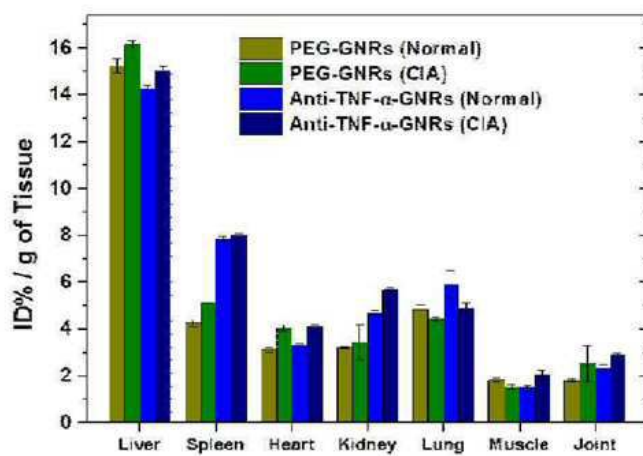
도면24



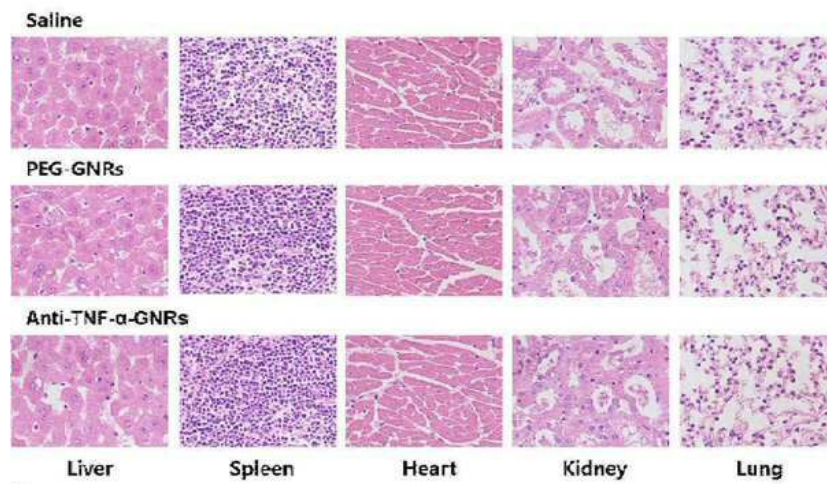
도면25



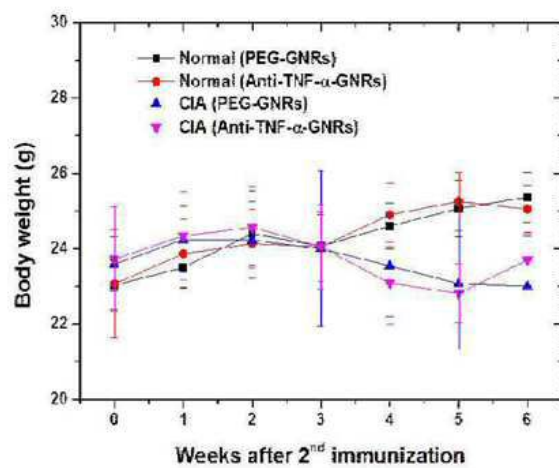
도면26



도면27



도면28



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Yonsei University
- <120> Contrast agent for optical imaging for early diagnosing
rheumatoid arthritis
- <130> PDPB192194k01
- <150> KR 10-2019-0146814
- <151> 2019-11-15
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 3
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> RGD sequence

<400> 1

Arg Gly Asp

1