

활성산소 감응성 고분자를 이용한 치료 진단 나노제제

Reactive Oxygen Species-Responsive Polymer Nanoconstructs for Theranostic Applications

노정연¹ · 정은경² · 이동원^{1,2} | Joungyoun Noh¹ · Eunkyeong Jung² · Dongwon Lee^{1,2}

¹Department of Polymer · Nano Science and Technology, Chonbuk National University, 567, Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea

²Department of BIN Convergence Technology, Chonbuk National University, 567, Baekje-daero, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeollabuk-do 54896, Korea
E-mail: dlee@jbnu.ac.kr

1. 서론

고분자는 금속 및 세라믹에 비해 화학적 구조가 다양하고, 구조변화가 용이하며, 생분해성과 생체적합성이 우수하다는 특성이 있어 생체재료로서 많은 장점을 가진다. 또한, 용제에 쉽게 용해되고 녹는점이 낮아 가공성이 뛰어나기 뿐만 아니라 화학구조의 변형을 통해 분해속도 및 물리화학적 성질을 조절할 수 있어 의학·바이오 분야에 널리 이용되는 소재이다. 최근 급속도로 발전하는 나노기술과 고분자과학이 접목되어 나노입자, 나노섬유, 마이셀 등 다양한 형태의 나노구조물에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 의약학적 분야에서의 활용을 위하여 영상조영제 및 약물의 전달체로 개발되고 있다. 특히, 고분자 기반 약물전달체는 기존에 사용되는 치료제의 단점으로 거론되는 낮은 용해성을 극복할 수 있고, 질병부위에 특이적으로 약물을 전달할 수 있어 부작용을 최소화하는 동시에 약물의 치료효율을 극대화할 수 있다.¹⁻³

최근에는 약물의 방출속도를 조절하여 치료효율을 향상시키거나 MRI 등 영상진단에서 영상신호를 증가시키기 위한 목적으로 병변의 특이적 환경에 감응하는 생체고분자의 연구개발에 많은 관심이 모아지고 있다. 대표적인 병변의 특이적 환경으로는 낮은 pH, 활성산소종(reactive oxygen species), 효소 등이 있으며 특히, 산화 스트레스 환경에 민감하게 반응할 수 있는 생체고분자소재 개발과 연구가 국내외에서 활발히 진행되고 있다. 산화 스트레스를 유도하는 활성산소종은 체내의 생리학적 환경에 비해 병리학적 환경에서 적게는 수십 배, 많게는 수백 배까지 높은 농도로 존재하기 때문에 치료와 영상을 위한 바이오 마커로 다양하게 활용될 수 있는 잠재력이 있다. 따라서, 높은 농도의 활성산소종에 반응하는 생체고분자 소재는 각종 염증성 질환 및 암을 표적

Author



노정연

2012 전북대학교 신소재공학부 (학사)
2014 전북대학교 고분자나노공학과 (석사)
2015-현재 전북대학교 고분자나노공학과 (박사과정)



정은경

2015 전북대학교 고분자나노공학과 (학사)
2017 전북대학교 BIN융합공학과 (석사)
2017-현재 전북대학교 BIN융합공학과 (박사과정)



이동원

1997 영남대학교 섬유공학과 (학사)
1999 영남대학교 섬유공학과 (석사)
2004 University of Florida, 재료공학과 (박사)
2008-현재 전북대학교 고분자나노공학과 교수

하여 치료 및 영상화가 가능한 치료진단(theranostic) 제제로 활용이 가능하다.⁴⁶

살아있는 유기체에 존재하는 활성산소종은 세포 내에서 발생하는 생화학 반응의 부산물로 세포의 성장과 분화뿐만 아니라 신호전달 경로에 있어 중요한 역할을 한다. 대표적인 활성산소종에는 과산화수소(H_2O_2), 슈퍼옥사이드(O_2^-), 하이드록실라디칼($\cdot OH$) 및 산화질소(NO) 등이 있으며, GSH (glutathione), citrulline, vitamin E, superoxide dis-mutase (SOD) 및 catalase 등과 같은 항산화제 및 효소 등이 활성산소종의 농도를 조절한다. 여러 종류의 활성산소종에서 과산화수소는 반응성이 낮고 화학적으로 안정하여 생체 내의 다른 활성산소종에 비해 높은 농도로 존재하며, 세포의 성장, 증식, 분화 및 이동을 조절하는 필수 분비 단백질(mitogen-activated protein kinase, nuclear factor κB)에 영향을 끼친다.⁷ 특히, 과산화수소의 과도한 생성은 산화스트레스를 유도하고, 세포의 산화-환원(redox) 반응의 불균형을 초래하기 때문에 세포의 항상성을 파괴시켜 체내 조직 및 기관에 손상을 야기하고 이로 인해 수많은 병리적 장애를 일으킨다. 따라서 과산화수소는 인간의 노화와 질병의 원인이 되며, 특히, 급성 및 만성 염증질환, 죽상동맥경화증, 신경퇴행성장애 및 허혈성 뇌졸중 등을 포함하는 염증성 질병의 대표적 원인이 된다.⁸⁻¹¹

활성산소종이 과도하게 생성된 세포와 조직의 미세환경은 산화 스트레스 환경에서 약물 및 조영제를 방출하도록 설계된 고분자 나노제제를 통해 치료제 및 진단제의 전달에 이용될 수 있다. 이러한 고분자 나노제제는 1) 약물의 용용범위를 넓히고, 2) 약물의 효율을 증가시키며, 3) 질병부위에서만 약효를 나타낼 수 있으므로 투여량을 감소시켜 부작용을 줄

일 수 있으며, 4) 질병 부위의 영상화 및 치료경과를 모니터링 할 수 있다는 장점이 있다. 수용성이 낮은 저분자 약물뿐만 아니라 단백질 또는 펩타이드의 전달을 위하여 다양한 생체적합성 및 생분해성 고분자 나노입자가 개발되고 있다. 또한, 형광제제를 물리화학적으로 결합하거나 나노입자 내에 담지하여 실시간으로 생체 내 표적생물분자의 행동을 관찰할 수 있다.

본 특집에서는 현재까지 개발된 과산화수소 감응성 치료 진단제제들에 대해 기술하고자 한다. 또한 본 연구진이 개발한 산화 스트레스가 높은 병리적 장애를 해결하고 질병 부위를 모니터링할 수 있는 다양한 치료진단 고분자 나노소재의 높은 잠재력과 활용 가능성에 대해 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 활성산소 감응성 저분자 진단 제제

2.1.1 H_2DCFDA (Dichlorodihydrofluorescein Diacetate)

H_2DCFDA 는 세포막을 쉽게 통과할 수 있기 때문에 세포 배양 모델에서 활성산소 센서로 유용하게 사용되고 있는 형광제제이다(그림 1). 이 형광제제는 세포의 esterase에 의해 분해된 후 활성산소에 의해 산화되면서 형광을 띠는 Dichlorofluorescein (DCF)를 생성한다. H_2DCFDA 는 세포 내의 활성산소 생성에 대한 실시간 연구를 가능하게 하여 현재 가장 널리 이용되는 활성산소 형광영상제제 중의 하나이다.¹²⁻¹³ 그러나, 파장이 짧아서(~530 nm) 조직 투과도가 낮아 생체 내 영상이 불가능하고, 세포 내 특정 부위까지 정밀하게 표적하여 확인할 수 없으며, 활성산소가 없는 환경에서도 자동 산화되어 background 형광을 나타낸다. 또한 여러 종류의 활성산소종과 광범위하게 반응하므로 특정 활성산소를 감지하지 못한다는 한계점을 가지고 있다.¹⁴

2.1.2 앰플렉스 레드(Amplex Red)

Amplex Red는 세포의 과산화수소의 농도를 확인하고 정량화하기 위해 사용되는 형광제제이다. Amplex Red는 과산화수소와 반응하면 산화되어 높은 형광성을 나타내는 resorufin으로 변한다.¹⁵ 특히, H_2DCFDA 와 다르게 과산화수소에 특이적으로 반응하며, 낮은 농도의 과산화수소를 검출하는데 유용하게 사용될 수 있다. 그러나, 세포막을 통과할 수 없기 때문에 정확한 세포 내 과산화수소 농도는 측정할 수 없으며, 세포의 GSH 및 pyridine dinucleotides의 산화 과정에 영향을 받는다.¹⁶

2.1.3 Peroxy Caged Luciferin-1 (PCL-1)

2010년, 미국의 University of California, Berkeley의 Christopher J. Chang 교수 연구팀이 생체 내의 과산화수소

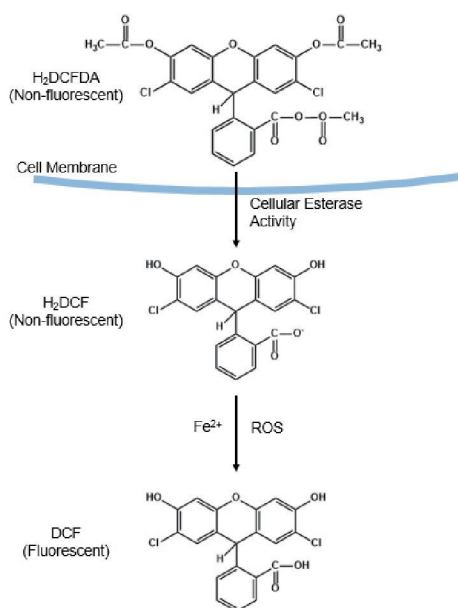


그림 1. 활성산소에 의한 형광화합물 DCF 형성.

와 선택적으로 반응하여 실시간으로 영상이 가능한 과산화수소 감응성 저분자 진단제제인 Peroxy Caged Luciferin-1 (PCL-1)을 개발하였다(그림 2).⁶ PCL-1은 boronic acid가 포함된 firefly luciferin 분자로 과산화수소와 선택적으로 반응하여 firefly luciferin을 방출하며, luciferase의 촉매작용에 의해 형광을 나타낸다. 과산화수소에 대한 PCL-1의 감응성 및 선택성은 H_2DCFDA 나 Amplex Red와 다르게 살아있는 동물에서도 과산화수소에 의한 생리학적 변화를 실시간으로 영상하여 활성산소 감응성 진단소재의 임상 활용 가능성에 대한 높은 잠재력을 증명하였다.

2.2 활성산소 감응성 고분자 치료진단 제제

2.2.1 Peroxalate 고분자 나노 진단제제

2007년, Georgia 공과대학의 Niren Murthy 교수 연구팀이 개발한 polyoxalate 고분자 나노입자는 최초의 생체 내 과산화수소 영상이 가능한 형광 영상제제이다.⁸ 이 나노입자는 peroxalate chemiluminescence(POCL)의 원리에 의해 과산화수소의 영상이 가능하도록 고안되었다. 물에 대한 안정성이 취약한 peroxalate의 문제점을 해결하기 위하여 peroxalate ester기가 주사슬에 함유된 polyoxalate 고분자와 rubrene, perylene 및 pentacene 등 형광제제를 단일유

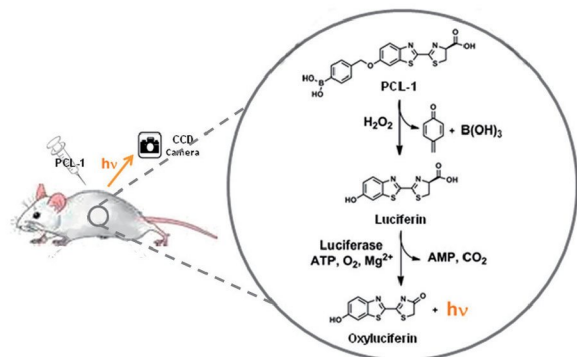


그림 2. 과산화수소 감응성 진단소재 PCL-1 구조 및 발광 원리.⁶

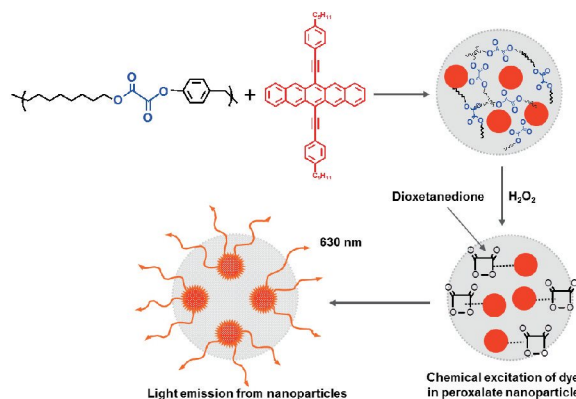


그림 3. Peroxalate 고분자기반 과산화수소 영상 나노제제의 구조와 발광원리.⁹

화법으로 담지하여 직경이 약 500 nm인 polyoxalate 나노입자가 제조되었다. 이 진단제제는 3 단계의 과정을 통해 과산화수소를 영상화할 수 있다(그림 3). 첫째, 나노입자를 형성하는 polyoxalate 주사슬의 peroxalate ester기가 과산화수소와 반응하여 dioxetanedione 중간체가 생성된다. 둘째, 안정성이 낮고 에너지가 높은 dioxetanedione 이 즉시 CO_2 로 분해되면서 에너지를 방출한다. 마지막으로, 나노입자에 담지된 형광물질이 방출되는 에너지에 의해 여기되면서 빛을 발산한다. 특히, polyoxalate 나노제제는 250 nM의 낮은 농도의 과산화수소를 감지할 수 정도로 고민감도를 가지고, hydroxyl radical과 superoxide 등과 같은 다른 활성산소종에는 반응하지 않아 과산화수소에 대한 선택성을 가진다.

Polyoxalate 나노입자에서 생성되는 dioxetanedione 중간체가 근적외선 영역을 포함하는 높은 파장의 영상화가 가능한 다양한 형광물질을 화학적으로 발광시킬 수 있기 때문에 1 cm 이상의 깊은 조직에서 발생하는 염증 질환의 진단을 위한 진단제제로서의 높은 잠재력이 입증되었다(그림 4).

2.2.2 항염증 Polyoxalate 나노 치료 진단제제

본 연구진은 과산화수소와의 우수한 선택적 반응성을 가지는 polyoxalate를 의약적으로 더욱 응용하기 위하여 peroxalate ester기와 함께 바닐릴 알코올(vanillyl alcohol)이 첨가된 polyoxalate 공중합체 PVAX를 합성하였다.^{10,17} 바닐릴 알코올은 천마와 토마토 등에 다량 함유되어 있는 물질로서 항산화, 항염증 및 세포사멸 억제효과를 발휘하는 생리활성 물질이지만, 혈중 반감기가 짧고 생체이용률이 낮은 단점이 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 생분해성을 가지고 과산화수소와의 특이적 반응성이 뛰어난 peroxalate ester기를 활용하여 바닐릴 알코올의 고분자 전구약물의 개념으로 PVAX를 개발하였다. 아래 그림과 같이 바닐릴 알코올을 과산화수소에 의해 가수분해가 촉진되는 peroxalate ester기를

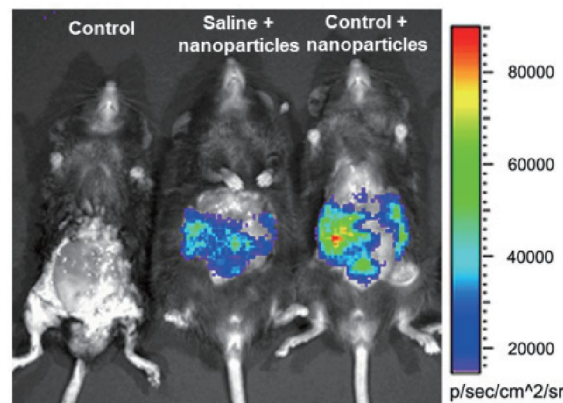


그림 4. LPS 유발 염증 반응을 통해 과산화수소를 유도한 마우스 복강 형광 영상. LPS를 마우스의 복강 내로 주사한 다음 4 시간 후에 peroxalate 나노제제를 복강 내 주사함.⁹

함유하는 PVAX 고분자의 주사슬에 포함시켰고 이를 약 500 nm의 직경을 갖는 나노입자로 제형화하였다(그림 5a-c). PVAX 나노입자는 과산화수소를 효과적으로 제거할 수 있고 활성화된 대식세포의 활성산소종의 생성을 억제하는 우수한 항산화 효과를 발휘하였다.

PVAX 나노입자의 우수한 물리화학적 성질과 안전성을 바탕으로 마우스 허혈/재관류 손상 모델을 이용하여 과산화수소 영상가능성을 평가하였다. 허혈/재관류 손상은 허혈성 조직에 재관류가 일어날 때 과산화수소가 다량 생성되고, 이로 인해 세포가 손상되는 것으로 관상동맥질환 및 뇌졸중을 포함하는 각종 질병들과 관련되어 있다. POCL의 원리를 적용하기 위해 rubrene이 담지된 PVAX 나노입자(PVAX/Rb)를 제조하였다. 1시간의 허혈 후 재관류된 왼쪽다리는 재관류가 일어나지 않은 오른쪽 다리에 비해 더 높은 형광 세기를 나타냈으며, 2분 이상 형광신호가 지속되었다(그림 6a,b). PVAX 나노제제가 과산화수소에 특이적으로 반응하는지 확인하기 위해 미리 과산화수소 분해효소인 catalase를 처리한 뒤 PVAX/Rb 나노입자를 주입한 결과, catalase가 처리된 허혈/재관류 손상 부위에서는 형광발현이 관찰되지 않았다. 이 결과를 바탕으로 PVAX 나노입자가 과산화수소의 농도가 높은 질환에 특이적으로 반응한다는 것을 알 수 있었다(그림

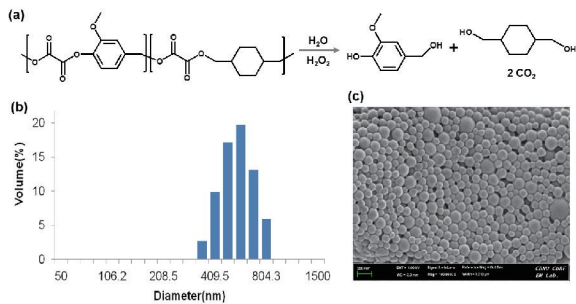


그림 5. PVAX 고분자 나노 진단제제의 구조 및 과산화수소 억제 효과: (a) PVAX 고분자 나노제제 개략도, (b,c) PVAX 고분자 나노제제의 형태 및 크기.¹¹

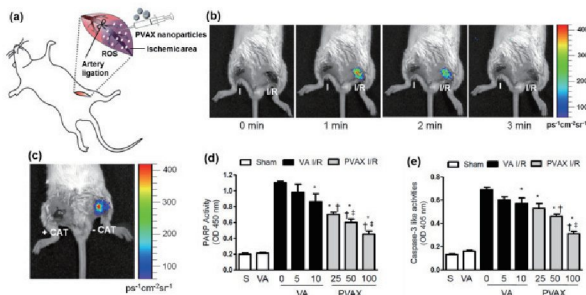


그림 6. 마우스 I/R 모델을 이용한 PVAX의 바이오이미징 및 세포사멸 억제 효과: (a) 마우스 뒷다리 허혈/재관류 개략도, (b) PVAX/Rb 나노입자를 이용한 허혈/재관류 손상의 형광영상, (c) Catalase 유무에 따른 형광영상, (d) 세포사멸 유도 효소 PARP-1의 활성화 억제 능력, (e) 세포사멸 유도 효소 caspase-3 활성화 억제 능력.¹¹

6c). 또한, PVAX 나노입자는 허혈/재관류 손상에서 항염증 효과와 함께 세포사멸에 관여하는 대표적 효소인 polyADP ribose polymerase-1(PARP-1)과 caspase-3의 활성을 억제하는 우수한 세포사멸 억제효과를 발휘하였다(그림 6d,e).

2.2.3 항염증 Polyoxalate 나노입자를 이용한 초음파 영상

기존 실험 결과를 바탕으로, 본 연구진은 PVAX 고분자 나노입자가 과산화수소와 반응하면서 CO₂를 발생시킨다는 점에 착안하여, 초음파 영상에 활용하는 연구를 진행하였다.¹⁸ 초음파 영상은 임상에서 보편적으로 사용되는 진단 방법 중 하나이며 실시간 영상, 높은 공간 해상도, 낮은 비용 및 환자 접근 용이성 등 다른 영상기법과 비교되는 장점을 가진다. 기존의 초음파 조영제는 체내에서 기화되는 perfluorocarbon이 단백질이나 지질에 담지된 마이크로 버블로 제조된다. 그러나, 가스로 채워진 마이크로 버블은 지속성과 안정성이 부족하여 영상화할 수 있는 부위가 국한된다는 단점이 지적되어, 생리적 환경에서 긴 반감기를 가지고 지속적인 초음파 영상이 가능한 조영제의 필요성이 높아지고 있다. 최근에는 carbonate 작용기를 이용해 CO₂ 기포를 지속적으로 생성할 수 있는 기포생성입자가 활발히 개발되며, 이를 통해 초음파 영상의 지속성을 높이기 위한 노력이 많아지고 있다. 본 연구진은 이러한 점에서 과산화수소에 특이적으로 반응하고 CO₂를 발생하는 PVAX의 특성을 이용할 수 있을 것이라 예상하여, 초음파 영상과 관련된 연구를 진행하였다. 우선, PVAX 나노입자가 과산화수소에 의해 CO₂를 생성하는지 확인하기 위해 직경이 약 500 nm 이하인 PVAX 나노입자를 제조한 후(그림 7a,b) 과산화수소 조건에서 가스 크로마토그래피를 이용해 CO₂ 농도를 확인한 결과, 과산화수소 환경에서 CO₂의 농도가 증가하였으며, 40분 이상 CO₂가 지속적으로 생성되는 것을 확인하였다(그림 7c).

더욱 정확한 CO₂ 생성 효과를 확인하기 위하여, 광학 현미경으로 과산화수소 조건 하에서 직경이 10 mm인 PVAX 입자의 기포발생 여부를 시각적으로 확인해 본 결과, PVAX 나노입자는 과산화수소에 의해 CO₂ 기포를 빠르게 발생하였으

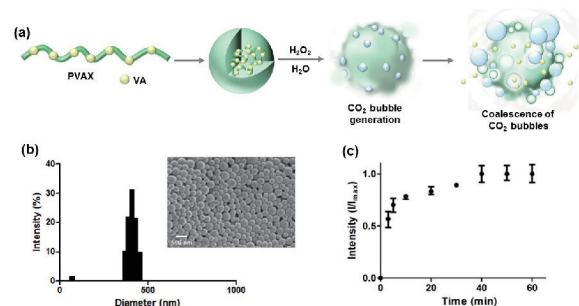


그림 7. 초음파 조영제로 사용가능한 PVAX 나노입자: (a) 과산화수소에 의해 분해되는 PVAX 나노입자의 개략도, (b) PVAX 나노입자의 분포 및 크기, (c) 과산화수소 조건 하에서 PVAX 나노입자의 CO₂ 발생.¹⁸

며, 30분 이상 기포 발생이 유지되었다(그림 8a).

이를 바탕으로 다양한 농도의 과산화수소를 이용하여 아가로스 팬텀 테스트를 진행해 본 결과, PVAX 나노입자는 과산화수소 농도의존적으로 높은 초음파 신호강도와 신호 지속성을 나타냈으며, 임상에서 가장 널리 사용되는 초음파 조영제이나 신호의 지속성이 짧은 SonoVue와 달리 30분 이상 긴 초음파 신호를 나타내어 PVAX 나노입자가 높은 농도의 과산화수소와 관련된 병리학적 환경에서 효율적인 초음파 영상이 가능하다는 것을 알 수 있었다(그림 8b).

PVAX 나노입자가 생체 내 환경에서도 초음파 조영제로 활용가능한지 확인하기 위하여, 뒷다리 삼두근에 타박상을 입힌 쥐를 이용하였다. 먼저 Amplex Red를 이용하여 손상된 근육의 과산화수소 농도를 정상 근육과 비교한 결과, 근육이 손상되고 난 뒤, 두 배 이상으로 과산화수소의 농도가 증가하는 것을 확인하였다(그림 9a).

다음으로 PVAX 나노입자를 주입하여, 손상된 근육에서 특이적으로 초음파 신호를 나타내는지 확인해 보았다. 그 결과, PVAX 나노입자는 환경 비특이적 조영제인 SonoVue와 달리 과산화수소와 반응하여 CO_2 기포를 발생시켜 초음파 신호를 나타내기 때문에 근육손상이 일어난 부위에서만 높은 초음파 신호를 나타냈다(그림 9b). 뿐만 아니라 기존 조영제가 가지는 3분 이내의 짧은 신호 지속 시간과 다르게 PVAX 나노입자는 7시간 까지도 초음파 신호를 생성하여 생리환경에서 지속적인 초음파 영상이 가능하다는 것을 알 수 있었다(그림 9c). 따라서, PVAX 나노입자는 과산화수소가 고농도로

존재하는 허혈/재관류 손상 및 근육손상 질환에 특이적으로 POCL에 의한 형광발현 및 CO_2 기포생성을 통해 초음파 신호를 나타내는 고분자 나노 치료진단제제로서의 높은 잠재력과 활용 가능성을 가질 것으로 예상할 수 있다.

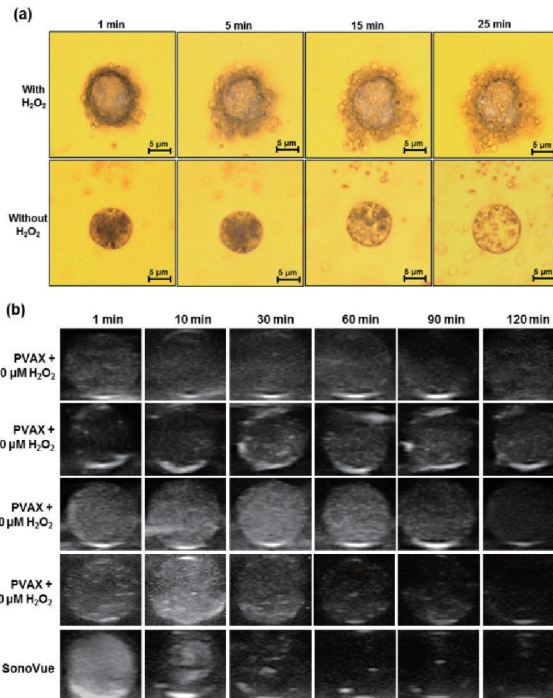


그림 8. 시간에 따른 초음파 신호 발생 특성: (a) 과산화수소에 환경에서 PVAX 입자의 CO_2 생성. (b) 과산화수소 환경에서 아가로스겔 팬텀테스트를 통한 PVAX 나노제제의 초음파 영상.¹⁸

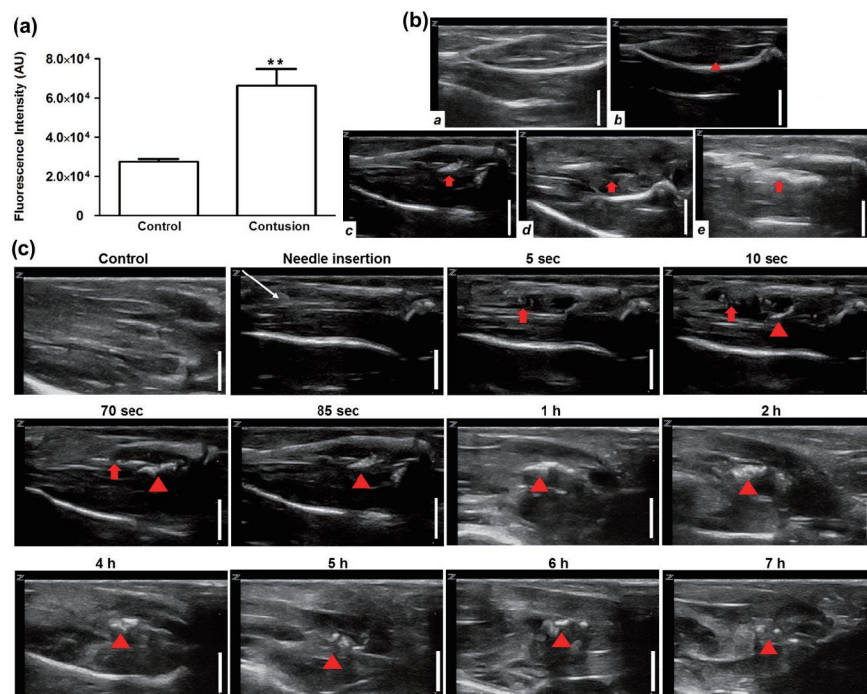


그림 9. 손상근육의 초음파 영상: (a) 손상 전후의 삼두근 과산화수소 농도 측정, (b) 다양한 초음파 조영제를 사용한 손상 근육의 초음파 영상(a: 근육손상 없음, b: 근육손상만, c: 근육손상 + PVAX 나노제제, d: 근육손상 + PLGA 나노제제, e: 근육손상 + SonoVue), (c) 시간에 따른 손상근육의 초음파 영상.¹⁸

2.2.4 과산화수소 감응성 혈전표적 영상 및 항혈전 고분자 나노제제

최근 나노 초(nanosecond)의 펄스 형태로 가해지는 레이저와 조직 내의 광 흡수 물질 사이의 상호작용으로 생성된 광대역 음향 파동에 의해 생체 내 영상이 가능한 광음향 영상에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.¹⁹⁻²⁰ 광음향 영상은 신호검출이 초음파 영상과 동일하게 이루어지기 때문에 선택적으로 빛을 가하면 높은 해상도와 깊은 생체 내 조직의 영상화가 가능하다. 광음향 영상은 열팽창을 통해 광대역 음향을 유도하여 이를 영상으로 구현하는 기술이다. 기존에 사용되는 광음향 영상조영제로는 gold nanorod 및 탄소 나노튜브 등이 있다.²¹⁻²² 특히, 최근에는 마이크로 버블을 발생시켜 초음파 조영제로 사용하는 perfluorocarbon이 광음향 조영제인 gold nanorod와 함께 사용될 경우, 마이크로 버블이 광음향 조영제의 열팽창을 증가시켜 광음향 영상의 신호를 향상시킬 수 있음이 입증되었다.²³ 그러나, 이를 위해 사용되는 마이크로 버블은 기포의 안정성이 낮고, 신호의 지속성이 낮으며 레이저를 조사하는 정확한 시간을 제어하기 힘들다는 한계점을 가진다.

이러한 한계점들을 극복하기 위해 본 연구진은 초음파 및 광음향 영상조영제로 T-FBM 고분자 나노 치료진단제제를 개발했다.²⁴ T-FBM 나노입자는 생체적합성이 뛰어난 maltodextrin에 과산화수소와 반응하여 마이크로 버블을 생성할 수 있는 borylbenzyl carbonate와 광음향 영상을 위해 열팽창을 할 수 있는 IR780이 화학적으로 결합된 fluorescent boronated maltodextrin(FBM)과 혈전표적 지질-펩타이드(DSPE-GPRPP)를

를 이용하여 제조되었다. 특히, borylbenzyl carbonate의 aryl boronate는 과산화수소에 의해 빠르게 산화되면서 결합이 끊어지고 전자의 이동에 의해 carbonate 결합이 파괴되면서 지속적으로 CO₂를 생성한다. 이 CO₂는 기포의 형태로 나노 입자에 형성되고 초음파 신호를 증진시킬 뿐만 아니라, IR780의 열팽창 효율을 증가시켜 정확하고 지속적인 초음파/광음향 영상을 가능하게 한다. 또한, 과산화수소에 의해 aryl boronate가 분해되면서 생성되는 QM(quinone methide)은 물과 빠르게 반응하여 HBA(hydroxyl benzyl alcohol)를 생성한다. boronate ester의 산화에 의해 혈전 등 염증성 질환에서 고농도로 존재하는 과산화수소가 제거되고, 이 때 생성되는 HBA는 항산화 및 항염증 효능을 가지고 있어 허혈성 심장 손상과 같은 병리학적 질환을 완화시키는 역할을 할 수 있다. 이러한 T-FBM의 치료 진단 효능을 확인하기 위하여 FeCl₃로 유도된 마우스 경동맥 혈전모델을 이용하였다(그림 10).

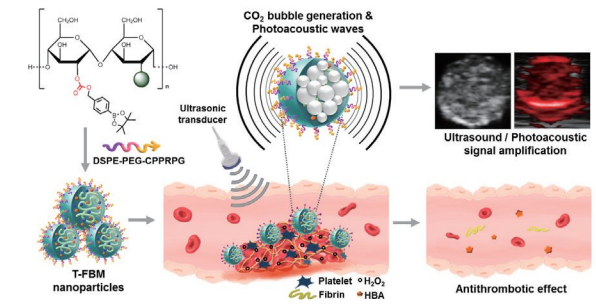


그림 10. 혈전 특이적 T-FBM 나노제제 개략도. T-FBM 나노제제는 피브리노이 풍부한 혈전을 표적하고, 과산화수소에 의해 광음향 신호를 증폭시키며, 혈전 치료의 역할을 함.²⁴

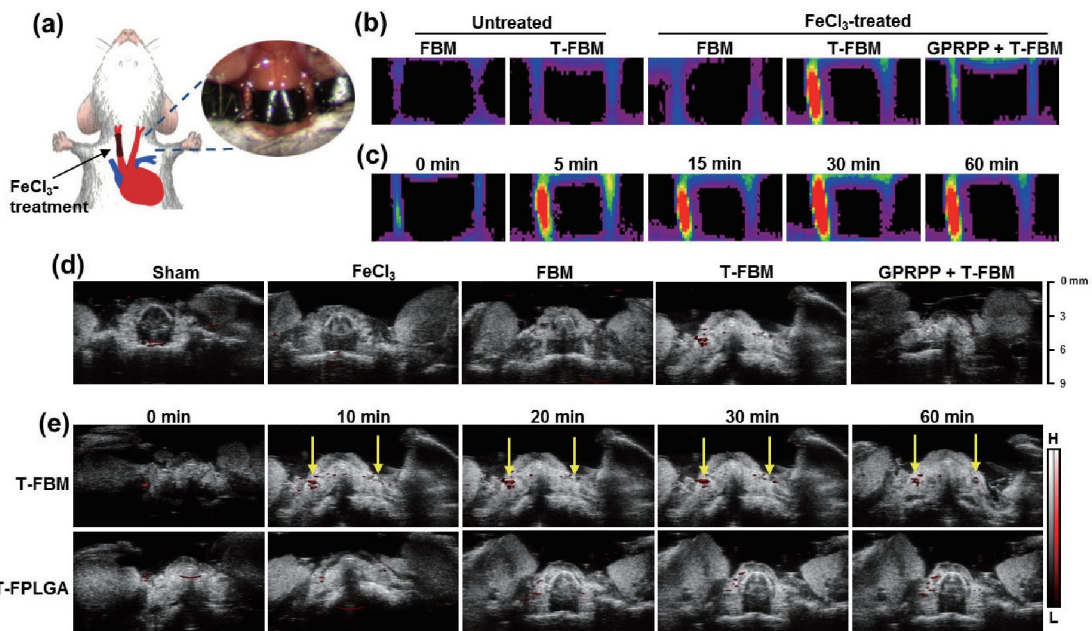


그림 11. T-FBM 나노제제의 혈전 유도 혈관 이미징. (a) 경동맥혈전을 유도한 마우스 모델 도식화. (b) T-FBM 주입 경동맥 형광 신호. (c) 시간에 따른 혈관 형광신호. (d) T-FBM 나노제제 주사 후 나타나는 광음향 이미징. (e) 혈전 유도 경동맥의 광음향 신호 세기의 변화 (화살표: 경동맥).²⁴

우선, T-FBM 나노제제의 혈전 표적능력과 혈관에 축적되는 시간을 확인하였다. 그 결과, 혈전 표적 ligand가 없는 FBM 나노입자는 혈전에 표적되지 않았으나 ligand를 표지한 T-FBM 나노입자는 혈전에 특이적으로 표적되어 형광신호를 나타냈고, 이 형광신호는 30분간 점차 증가하였으며 그 이후에는 형광신호의 세기가 일정하게 유지되었다(그림 11a-c,e). 다음으로, T-FBM 나노입자의 과산화수소 감응 능력을 확인하기 위해 Amplex Red 분석을 진행한 결과, 혈전이 유도된 군에서는 혈전이 없는 군에 비해 형광세기가 증가되었음을 알 수 있었다. 따라서 T-FBM 나노제제는 과산화수소가 다량 발생하는 혈전에서 특이적으로 반응하여, CO₂ 기포를 생성하고, 이를 통해 초음파 및 광음향 신호를 증폭시킬 수 있음을 예상할 수 있다(그림 11d). 이러한 예상을 뒷받침하기 위해 혈전이 유도된 마우스 모델에서의 광음향 신호 발생 여부를 확인하였다. T-FBM 나노입자를 혈전이 유도된 마우스에 주입한 후 15분 뒤, 손상된 경동맥에서 강한 광음향 신호를 나타냈으며, 이 신호의 세기는 30분간 점차적으로 증가하였다. 이는 본지에는 나타나지 않았으나, 마우스 실험 전에 실행한 아가로스 팬텀테스트의 결과와 일치한다.

T-FBM 나노입자가 과산화수소에 발생하는 CO₂ 기포에 의해 광음향 신호를 증폭시킨다는 점을 증명하기 위해 CO₂를 발생하지 않는 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 고분자와 IR780을 이용하여 GPRPP를 표지한 T-FPLGA를 제조하여 두 나노입자를 비교하였다. T-FPLGA 나노입자는 광음향 신호를 보였으나 T-FBM 나노제제에 비해 신호세기가 낮았고 1시간 동안 신호세기의 변화가 나타나지 않았다(그림 11e). 따라서, 이러한 실험 결과는 T-FBM 나노입자가 외부자극 없이 과산화수소와 화학적으로 반응하여 CO₂ 기포를 생성하고 이를 통해 손상된 경동맥에서 광음향 신호를 증폭시키는 혈전표적 자극감응 신호증폭 광음향 조영제임을 증명한다.

T-FBM 나노입자는 광음향 조영제의 기능과 함께 항혈전

치료제의 역할도 할 수 있는 치료진단 나노제제로 개발되었다. 따라서, 본 연구진은 T-FBM 나노입자의 혈전증에 대한 치료효과를 평가하였다. FeCl₃에 의해 혈전증이 유도된 경동맥에서 염증인자인 TNF- α 와 sCD40L의 발현 수준을 확인해본 결과, T-FBM이 두 염증인자의 발현을 효과적으로 억제하였다. 즉, T-FBM 나노입자가 강력한 항염증 및 항 혈소판 효과를 나타내어 치료제의 기능을 가진다는 것을 알 수 있다. 이를 바탕으로 경동맥의 조직학적 검사인 DHE(dihydroethidium), H&E 및 Masson's trichrome 염색을 통하여 혈전이 생성된 혈관에서 활성산소가 다량 발생하는 것과 T-FBM 나노입자가 이러한 활성산소와 혈전생성을 농도의존적으로 억제한다는 것을 확인할 수 있었다(그림 12). 이러한 결과를 바탕으로 T-FBM 나노입자가 혈전이 있는 혈관을 표적하여 강력한 항혈전 효능을 나타냄을 알 수 있다.

따라서, T-FBM 나노입자는 과산화수소의 반응을 통해 생성된 CO₂ 기포를 이용해 초음파 및 광음향 신호를 증폭하는 동시에 혈관 내 혈전 생성을 억제하는 혈전치료 기능을 가지는 최초의 혈전표적 광음향 영상진단 및 치료 나노제제로, 과산화수소와 관련된 다양한 염증 및 심혈관 질환의 진단과 치료에 적용될 수 있을 것으로 예상된다.

3. 결론

생체 내 활성산소종의 중요성과 활성산소종에 감응하여 진단과 치료효과를 나타내는 다양한 저분자 및 고분자 나노제제에 대해 소개하였다. 특히, 과산화수소는 각종 염증관련 질환에서 높은 농도로 존재하므로 질병의 진단 및 치료에서 바이오마커로 활용될 수 있는 무궁한 잠재력을 가진다. 따라서, 과산화수소와 반응할 수 있는 oxalate, boronate 및 carbonate 구조를 포함하는 고분자를 나노입자로 제형화하고, 염증성 질환을 유도한 마우스 모델을 이용해 치료진단 효과를 증명

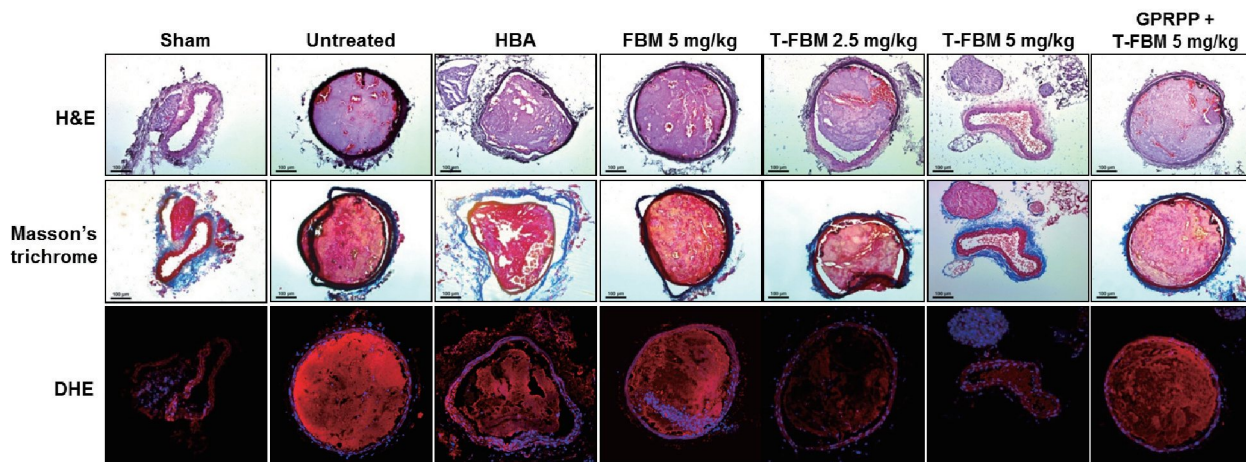


그림 12. T-FBM 나노제제의 혈전 생성 혈관의 치료 기능. H&E, Masson's trichrome 및 DHE 염색.²⁴

한 다양한 고분자 나노제제들이 개발되고 있다. 이러한 고분자 나노소재는 질병부위에서 활성화되어 약효를 나타내는 치료제의 기능과 함께 영상진단에서 조영제로 유용하게 활용될 수 있다. 따라서, 활성산소 감응성 고분자 나노제제를 통한 질병의 치료와 진단은 기존의 약물 및 조영제가 가지는 한계를 극복할 수 있는 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. S. Park, B. Kwon, W. Yang, E. Han, W. Yoo, B. M. Kwon, and D. Lee, *J. Control. Release*, **196**, 19 (2014).
2. A. L. Carbone and K. E. Uhrich, *Macromol. Rapid Commun.*, **30**, 1021 (2009).
3. W. Yang, J. Noh, H. Park, S. Gwon, B. Singh, C. Song, and D. Lee, *Biomaterials*, **154**, 48 (2018).
4. N. Soh, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 532 (2006).
5. P. Wardman, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol.)*, **19**, 397 (2007).
6. G. C. Van de Bittner, E. A. Dubikovskaya, C. R. Bertozzi, and C. J. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 21316 (2010).
7. S. G. Rhee, *Nat. Chem. Biol.*, **3**, 244 (2007).
8. D. Lee, S. Khaja, J. C. Velasquez-Castano, M. Dasari, C. Sun, J. Petros, W. R. Taylor, and N. Murthy, *Nat. Mater.*, **6**, 765 (2007).
9. D. W. Lee, V. R. Erigala, M. Dasari, J. H. Yu, R. M. Dickson, and N. Murthy, *Int. J. Nanomed.*, **3**, 471 (2008).
10. E. Ko, D. Jeong, J. Kim, S. Park, G. Khang, and D. Lee, *Biomaterials*, **35**, 3895 (2014).
11. D. Lee, S. Bae, D. Hong, H. Lim, J. H. Yoon, O. Hwang, S. Park, Q. Ke, G. Khang, and P. M. Kang, *Sci. Rep.*, **3**, (2013).
12. J. P. Crow, *Nitric Oxide*, **1**, 145 (1997).
13. M. Afri, A. A. Frimer, and Y. Cohen, *Chem. Phys. Lipids*, **131**, 123 (2004).
14. P. Bilski, A. G. Belanger, and C. F. Chignell, *Free Radic. Biol. Med.*, **33**, 938 (2002).
15. J. G. Mohanty, J. S. Jaffe, E. S. Schulman, and D. G. Raible, *J. Immuno. Methods*, **202**, 133 (1997).
16. S. Dikalov, K. K. Griendling, and D. G. Harrison, *Hypertension*, **49**, 717 (2007).
17. D. Lee, S. Bae, D. Hong, H. Lim, J. H. Yoon, O. Hwang, S. Park, Q. Ke, G. Khang, and P. M. Kang, *Sci. Rep.*, **3**, 2233 (2013).
18. G. W. Kim, C. Kang, Y. B. Oh, M. H. Ko, J. H. Seo, and D. Lee, *Theranostics*, **7**, 2463 (2017).
19. J. E. Lemaster and J. V. Jokerst, *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, **9**, (2017).
20. W. Li and X. Chen, *Nanomedicine (Lond)*, **10**, 299 (2015).
21. B. Wang, E. Yantsen, T. Larson, A. B. Karpouk, S. Sethuraman, J. L. Su, K. Sokolov, and S. Y. Emelianov, *Nano Lett.*, **9**, 2212 (2009).
22. M. Eghtedari, A. Oraevsky, J. A. Copland, N. A. Kotov, A. Conjusteau, and M. Motamedi, *Nano Lett.*, **7**, 1914 (2007).
23. K. Wilson, K. Homan, and S. Emelianov, *Nat. Commun.*, **3**, 618 (2012).
24. E. Jung, C. Kang, J. Lee, D. Yoo, D. W. Hwang, D. Kim, S. C. Park, S. K. Lim, C. Song, and D. Lee, *Acs Nano*, **12**, 392 (2018).