

약물전달 시스템 개발을 위한 여기된 광감응제의 응용

최세운*

*동명대학교 의용공학과

Therapeutic efficacy of the photoactivated sickle cells as novel drug delivery vehicle

Se-woon Choe*

*Biomedical Engineering, Tongmyong University

E-mail : sewoon@tu.ac.kr

요 약

말기 암환자를 위해 시행되는 화학적 항암치료는 다양한 합성 운반체를 이용한 표적치료를 통해 그 효과와 안정성을 증가시킨다. 항암치료의 약물 운반체로 쓰이기 위해 다음과 같은 독특한 두 가지 특성을 만족시켜야 하는데, 이것은 약물유출의 사용자 중심 제어기능과 표적 고형암으로의 높은 전달성이다. 하지만 현재 임상에서 사용되는 합성 운반체는 다양한 부작용을 유발하여 항암치료의 효과를 억제하고 환자들의 신체적 정신적 고통을 증가시키고 있다. 따라서 본 논문에서는 생착성과 생분해능력을 가지고 있는 겸형적혈구에 활성화된 광감응제를 부착하고 형광물질을 주입하여, 자연적 용혈을 이용한 유출제어기능과 겸형적혈구의 표적기능을 일반 형광물질 주입결과와 비교하여 실험을 진행하였다. 이를 위하여 유전적으로 변이된 전임상 모델에서 생성된 겸형적혈구를 암세포가 자라는 설치류에 주입한 후, 일정 시간 간격으로 유출정도를 초분광이미징 시스템을 이용하여 모니터링 하였고, 그 결과 약물전달 운반체로서의 겸형적혈구의 역할 및 합성 운반체의 대체 가능성을 보이고자 한다.

ABSTRACT

Sickle cells possess a unique combination of traits that may enable their use as models for novel synthetic tumor targeting controlled release drug carriers with the ability to treat disseminated tumors in advanced metastatic disease. In this study, we assess the ability of light-activated release sickle cells to enhance tumor delivery of the fluorescent dye calcein by delayed photolysis controlled release compared to free systemic administration of calcein. Sickle cells from mouse models of the disease were shown to preferentially accumulate in tumors compared to adjacent tissue, in 4T1 tumors in mice on a time scale about 12 hours. Sickle cells photosensitized with protoporphyrin IX achieved delayed release of 50% of contents 8-16 hours after photoactivation, which was deemed useful for in vivo delivery of cargo to tumors given the tumor accumulation time of the sickle cells. Sickle cells may be useful as a model for new synthetic drug carrier particles with delayed photolysis controlled release properties.

키워드

혈액, 암, 운반체, 항암치료, 광감응제

1. 서 론

항암 치료효과를 높이고 환자에 대한 부작용을 최대한 낮추기 위하여 치료제는 체내의 표적지에 정확하게 전달되어야 하고 투약의 빈도, 시간 및

농도 등이 환자의 개인에 맞게 최적화 되어야 한다. 치료제의 표적치료 효과를 증가시키기 위해서는 치료효과의 극대화 및 약물전달체의 환자별 최적화가 동시에 이루어져야 하는데, 이중 약물전달체의 최적화는 약물치료전달체의 주입, 이동,

용출, 표적지 흡수 등과 같은 순차적 과정으로 구성되어 있다. 약물전달체로는 최근 입자를 이용한 비경구적 방식이 활발하게 개발되고 있는데, 특히 항암치료제가 암세포를 치료할 때 일반조직에 독성을 전달함으로써 발생할 수 있는 부작용을 감소시켜 표적치료의 효과 증대시키기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다 [1]. 하지만 이러한 모든 전달체가 항암치료에 있어서 정확한 표적치료 및 약물용출 제어가 가능한 동시에 치료효과를 높이는 데 사용되지는 않으며 [2,3] 때로는 전달체로부터 발생한 독성이 건강한 세포를 괴사시키는 부작용을 일으키기도 한다 [4]. 따라서 최근 독성이 거의 없는 생체재료 기반의 전달체에 대한 관심이 높아지고 있는데, 그 중 적혈구는 높은 생체 적합성과 생체내 분해성, 그리고 낮은 면역반응 등의 특별한 장점 때문에 다양한 응용연구가 진행되고 있다 [5]. 하지만 일반적인 적혈구는 고혈압 주변의 혈관에 형성되는 EPR (Enhanced Permeability and Retention) 현상을 이용한 수동적 표적법 (passive targeting)을 사용하여 표적치료의 전달을 유도하기 쉽지 않다는 한계가 있다.

따라서 본 논문에서는 표적치료에 사용되는 합성 전달체의 부작용을 감소시키는 동시에 수동적 표적법의 정확도를 높여 치료효과의 극대화를 유도하기 위해 낮은 면역반응과 높은 생분해능을 가진 겸형적혈구를 생체전달체로 사용하고자 한다. 또한 활성화된 광증감제를 겸형적혈구의 외부막에 부착시켜 자발적 세포막 붕괴를 유도하고, 환자 맞춤형 치료효과의 증가를 위해 전달체로부터의 약물 용출을 제어하는 새로운 방법을 전임상 실험을 통해 제시 하고자한다 [7].

II. 연구 방법

전임상을 목적으로 하며 특히 혈관질환 및 변화 분석을 목적으로 하는 초분광 이미징 시스템은 기존 Zeiss AxioImager microscope의 플랫폼을 사용하며 설치류의 배면에 설치된 윈도우 챔버를 영상화 하기 위해 100W 텅스텐 할로젠 램프를 광원으로 사용한다. 초분광 영상을 얻기 위해 해상도 1388×1024픽셀의 12비트 유동범위를 갖고 -20도로 냉각이 가능한 CCD (Charge Coupled Device) 카메라를 이용하게 되며, 보다 고해상도의 영상 혹은 빠른 적혈구의 이동과 같이 초당 많은 프레임을 요구하는 영상획득을 위해서는 -50도까지 냉각이 가능한 EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device) 카메라를 이용하기도 한다. 전임상의 모세혈관부터 대동맥에 이르는 다양한 혈관 분석을 위해 C-mounted LCTF (Liquid Crystal Tunable Filter)를 CCD 카메라의 전면부에 부착하여 이용하게 되면 400nm~720nm대역의 5nm 밴드 폭을 갖는 영상획득이 가능하다.

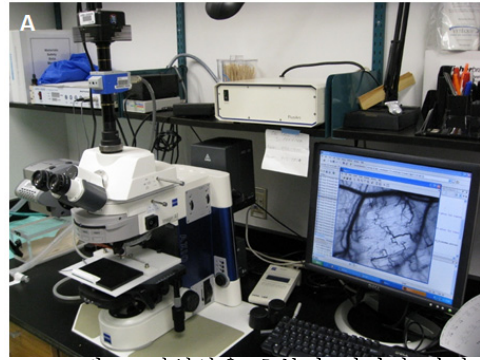


그림 1. 전임상용 초분광 이미징 장비

초분광 이미지 영상획득을 위해 LabView 프로그램을 이용하며 CCD카메라 및 LCTF의 제어가 가능하게 되고, 이를 통해 사용자가 선택된 파장에서의 사용자의 요구에 맞는 노출시간 동안 특정한 이득이 반영되어 자동적으로 획득된 초분광 이미지의 저장이 가능하다. 정동맥 내의 산소변화량을 위해서는 자동화된 시스템을 이용하여 헤모글로빈포화도를 만들어 내기위한 특정 파장의 초분광 이미지를 저장해야하는데, 이는 LCTF를 이용하여 총 16장의 500nm~575nm 파장대역의 이미지를 5nm의 간격으로 획득이 가능하며 연결된 컴퓨터로 저장이 가능하다.

배면내의 이미지 획득을 위해 타이타늄 재질의 윈도우 챔버를 마우스 모델에 기존의 방법과 같이 설치하고 암세포 (4T1; mammary carcinoma cell)을 윈도우 챔버 내에 주입한 후, 정기적인 시간동안 이미지를 획득하기 위하여 아이소플루레인 (isoflurane) 1%~5%를 이용한 호흡기 마취를 통해 총 16장의 500nm~575nm 파장대역의 이미지를 5nm 간격으로 획득 한다 [2]. 파장별 영상은 약 10초 내외로 획득이 가능하며 이러한 영상은 Matlab을 이용하여 헤모글로빈 산소포화도 지도를 만드는데 사용된다.

헤모글로빈의 산소포화 이미지를 얻기 위해서는 혈액의 유동이 없는 무혈관 지역의 백그라운드에서 얻어진 수치를 기준으로 무산소 및 유산소포화도 값을 측정할 수 있다. 또한, 헤모글로빈의 광 흡수치는 식(1)과 선형 최소자승 회귀분석 (Linear Least-Square Regression)을 이용하여 유도할 수 있다.

$$A_{\lambda} = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \epsilon_{\lambda}^{HbO_2} [HbO_2] L + \epsilon_{\lambda}^{Hb-R} [Hb-R] L + SL \quad (1)$$

III. 실험 및 결과 분석

외부의 자극 없이 24시간 물과 사료를 자유롭게 접촉할 수 있는 환경에서 키워진 마우스 모델은 윈도우챔버가 설치 약 7일 후, 지름 5~7mm

사이즈의 압 조직을 갖게 된다. 윈도우챔버가 설치된 Day1과 암세포가 적정부피로 자란 Day7의 헤모글로빈 산소포화도 지도 및 신생혈관의 비교를 위해 초분광 시스템을 이용하여 grayscale의 윈도우챔버 내 혈관지도와 헤모글로빈 산소포화도 지도를 생성하였다. Day7 암세포의 주변에는 기존의 존재하던 모세혈관 이외에 산소포화도가 높거나 낮은 동정맥의 성질을 가지고 있는 신생혈관들이 암세포의 성장과 함께 변화하고 있음을 확인할 수 있었고, 암세포의 크기 역시 brightfield 이미지를 통해 측정이 가능하였다. 또한 광증감제 혹은 형광물질이 부착된 겸형적혈구 1ml (8×10^8 cells)를 마우스 모델의 꼬리정맥을 통해 주입하여 약 6시간 간격으로 윈도우챔버 내 일반혈관과 암세포 주변의 혈관 내 적체된 겸형적혈구를 형광현미경으로 확인한 결과, 그림 2과 같이 암세포 주변의 혈관 내에 적체된 겸형적혈구는 일반혈관에 적체된 겸형적혈구 보다 약 3-5배 많은 양이 관찰 되었다. 이는 겸형적혈구가 고형압 주변의 신생혈관에서 보이는 EPR 현상을 이용한 수동적 표적법에 보다 높은 효과를 보일 수 있다는 가설을 뒷받침 하는 명확한 증거가 된다.

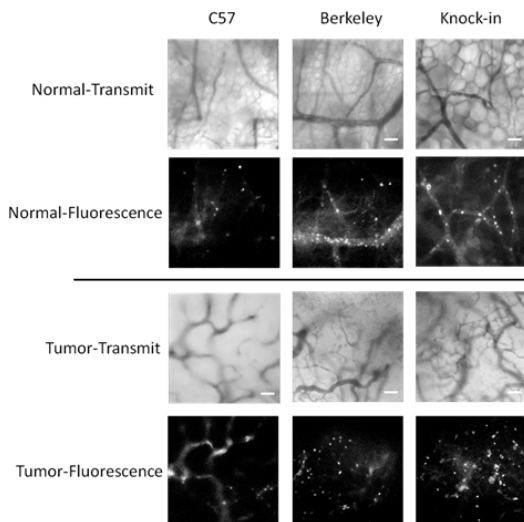


그림 2. 일반 혈관과 암세포 주변의 혈관 내 적체된 일반 적혈구 및 겸형적혈구의 비교

IV. 결 론

본 연구에서는 일반혈관과 암세포 주변의 혈관 내의 광감응제가 여기된 겸형적혈구와 일반 적혈구의 적체현상을 초분광 이미징 시스템을 이용하여 비교하였다. 초분광 이미징 시스템을 이용하면 이러한 적체현상 뿐만 아니라 여러 가지의 성인 질병 (암, 동정맥 기형증 등)의 병적 특성을 갖는 혈관의 특성 및 질병의 메카니즘 분석이 가능할

것으로 보이며 관련 생체 정보의 실시간 분석결과와 제공이 가능하다. 이러한 일련의 가능성은 병적특성을 고려한 치료법의 효과를 검증할 수 있는 새로운 표준기법의 제시의 가능성을 보이며 관련 치료 및 진단기기 제조 산업으로 응용범위가 다양할 것으로 기대한다. 또한 바이오 소재 및 바이오센서와 인공장기 등 생체재료 생분해성 및 생착성의 정량적 진단을 적은 수의 전임상 동물 모델을 이용하여 보다 저렴한 비용으로 가능할 것으로 보이고, 기존 영상장비의 융합운용으로 새로운 복합의료영상 진단 및 치료장비로의 개발을 위해 추가적 연구가 필요하다.

참고문헌

- [1] Y. Malam, M. Loizidou, A. M. Seifalian, "Liposome and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer," *Trends in Pharmacological Science*, vol. 30, pp592-599, 2009
- [2] L. H. Reddy, "Drug delivery to tumours: recent strategies," *J. Pharm. Pharmacol.* 57 (2005) 1231-1242.
- [3] V. Lorusso, L. Manzione, N. Silvestris, Role of liposomal anthracyclines in breast cancer, *Ann. Oncol.* 18 (Suppl 6) (2007) vi70-vi73.
- [4] R. I. Pakunlu, Y. Wang, M. Saad, J. J. Khandare, V. Starovoytov, T. Minko, "In vitro and in vivo intracellular liposomal delivery of antisense oligonucleotides and anticancer drug," *Journal of Controlled Release*, Vol. 114, Issue 2, pp. 153-162, August 2006.
- [5] Y. Godfrin, F. Horand, R. Franco, E. Dufour, E. Kosenko, B. Bax, A. Banz, O. Skorokhod, J. Lanao, V. Vitvitsky, E. Sinauridze, V. Bourgeaux, K. C. Gunter, "International Seminar on the Red Blood Cells as Vehicles for Drugs" *Expert Opnion on Biological Therapy*, Vol. 12, No. 1, pp. 127-133, January 2012.
- [6] M. J. Telen, Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules, *Transfus. Med. Rev.* 19 (2005) 32-44.
- [7] T. L. Andresen, S. S. Jensen, K. Jørgensen, Advanced strategies in liposomal cancer therapy: Problems and prospects of active and tumor specific drug release, *Prog. Lipid Res.* 44 (2005) 68-97.