

# 항암치료를 위한 겸형적혈구의 응용

최세운\*

\*금오공과대학교 메디컬IT융합공학과

Application of sickle red blood cells for targeted cancer therapy

Se-woon Choe\*

\*Department of Medical IT Convergence Engineering, Kumoh National Institute of Technology

E-mail : sewoon@kumoh.ac.kr

## 요 약

현재 암 환자들을 대상으로 하는 항암치료법은 나노입자, 폴리머 중합체, 지질, 리포솜 등을 치료 전달체로 이용하여 항암치료를 진행하는 방법들이 주로 활발하게 사용되고 있다. 이러한 전달체는 항암 치료제를 직접 암세포로 정확하게 표적 운반하는 정확성, 정확하게 운반한 후 선택적으로 항암 치료제를 방출해야하는 유출제어, 다른 일반 세포들을 약물로부터 안전하게 보호하는 기능 등을 동시에 가지고 있어야 하지만, 대부분 생산과정에서 많은 유해한 화학약품을 사용하며 이로 인한 독성을 유발하는 많은 사례가 빈번하게 발생하고 있다. 따라서 본 논문에서는 겸형 적혈구를 응용한 새로운 항암 전달체로서의 가능성을 타진하고 새로운 항암치료의 방법을 제시하고자 한다.

## ABSTRACT

Conventional drug carriers such as liposomes, nanoparticles, polymer micelles, polymeric conjugate and lipid microemulsion for cancer chemotherapy shield normal tissues from toxic drugs to treat cancer cells in tumors. However, inaccurate tumor targeting uncontrolled drug release from the carriers and unwanted accumulation in healthy sites can limit treatment efficacy with current conventional drug carriers with insufficient concentrations of drugs in the tumors and unexpected side effects as a result. In this research, we examined the use of sickle red blood cells as a new drug carrier with novel tumor targeting and controlled release properties. Sickle red blood cells show natural tumor preferential accumulation without any manipulation and controlled drug release is possible using a hemolysis method with photosensitizers.

## 키워드

겸형적혈구, 초분광이미징시스템, 헤모글로빈, 산소포화도, 표적치료

## 1. 서 론

암환자를 대상으로 시행되는 표적치료는 항암치료제를 체내의 원하는 부위에 정확하게 전달하여 특정 빈도, 투여 시간 및 농도 등을 제어하여 암 치료효과를 높이고 환자의 안전성을 높이는 데 목적이 있다. 표적치료의 효과를 증가시키기 위해서는 항암치료제 효능의 극대화 뿐 만 아니라 약물전달체의 환자별 최적화가 동시에 이루어져야 하는데, 이는 약물치료전달체의 주입, 이동, 용출, 표적지 흡수 등과 같은 순차적 과정이 필요하다. 따라서 항암치료제의 신약개발과 더불어 약물전달체의

개발 또한 항암치료에 중요한 요소라고 볼 수 있다. 약물전달체로는 최근 암치료제가 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 필수적인 두 가지 요소 (정확한 표적치료 및 약물유출 제어)를 만족시키며 동시에 치료효과를 높이는데 사용되지는 않으며 [2], 때로는 전달체에서 기인한 독성이 건강한 세포를 괴사시키는 부작용을 일으키기도 한다 [3]. 따라서 최근 독성이 거의 없는 생체 전달체에 대한 관심이 높아지고 있는데, 그 중 적혈구는 높은 생체 적합성과 생분해성, 그리고 낮은 면역

반응 등의 특별한 장점 때문에 다양한 응용연구가 진행되고 있다 [4]. 하지만 일반적인 적혈구는 고혈압 주변의 혈관에 형성되는 EPR (Enhanced Permeability and Retention) 현상을 이용한 수동적 표적법 (passive targeting)을 사용하여 표적지로의 전달을 유도하기 쉽지 않다는 한계가 있다. 하지만 헤모글로빈 단백질의 아미노산 서열 변이로 만들어지는 겸형적혈구(SSRBCs)는 일반 적혈구(RBCs)에 비해 비교적 경직성이 높은 세포막을 가지고 있을 뿐 아니라, 막 표면에서 BCAM/Lu, ICAM-4 등과 같은 혈관 접합 리셉터를 발현하기 때문에 고혈압 주변의 신생혈관에서 보이는 EPR 현상을 이용한 수동적 표적법에 보다 높은 효과를 보일 것으로 예상할 수 있다 [5]. 따라서 활성화된 광증감제를 겸형적혈구의 외부막에 부착시켜 자발적 세포붕괴를 유도하여 약물용출을 유도하는 새로운 방법을 세포실험을 통해 제시하고자 한다.

## II. 연구방법

### 2.1 초분광 이미징 시스템

초분광 이미징 시스템은 기존 Zeiss AxioImager microscope 플랫폼으로 사용하며 설치류의 배면에 설치된 윈도우챔버를 영상화하기 위해 100W 텅스텐 할로겐 램프를 광원으로 사용한다. 초분광 영상을 얻기 위해 해상도 1388×1024 픽셀의 12비트 유동범위를 갖고 -20° C까지 냉각이 가능한 CCD (Charge Coupled Device) 카메라를 이용하게 되며, 보다 고해상도의 영상 혹은 빠른 적혈구의 이동과 같이 초당 많은 프레임을 요구하는 영상획득을 위해서는 -50° C까지 냉각이 가능한 EMCCD (Electron Multiplying Charge Coupled Device)카메라를 사용하기도 한다. 전임상 모델의 모세혈관부터 대동맥에 이르는 다양한 크기 혈관의 분석을 위해 2.5×, 5×, 10× 와 20× 등의 다양한 렌즈를 사용하고, 선택가능한 파장대의 초분광 영상을 획득하기 위해 C-mounted LCTF를 CCD 카메라의 전단에서 이용하게 되면 400nm~720nm 대역의 10nm의 밴드 폭을 갖는 영상의 획득이 가능하게 된다.

### 2.2 전임상 마우스 모델

배면 내 이미지 획득을 위하여 윈도우챔버를 마우스모델에 다음과 같은 절차에 따라 설치한다. 타이타늄 소재의 지름 12mm의 윈도우챔버 및 기타 수술도구들을 고압/고온으로 살균한 후 케타민 (100mg/kg)과 자일리진 (10mg/kg) 용액을 마우스모델의 무게에 따라 혼합 제조한 후 복막 내에 주입한다. 약 10분 정도 후 마우스모델의 마취상태를 확인하고 저체온 방지를 위해 37° C의 온도에 맞춰진 패드로 이동한 후 윈도우챔버를 설치하기 위하여 배면의 한쪽 면을 윈도우챔버의 지름만큼 (1.2cm) 완벽하게 제거한다. 마우스모델의 종류 및 실험의 목적에 따라 1ml의 4T1 mammary carcinoma cells (1×10<sup>8</sup>cells/ml)을 윈도우 챔버의 중앙에 주입한다. 적용을 마친 윈도우챔버 상단에 유리로 된 커버슬립 (#2,

지름 12mm)을 덮고 타이타늄 링을 이용하여 고정한다. 윈도우챔버의 설치가 끝나고 마취에서 회복된 후 마우스모델은 24시간 물과 사료를 자유롭게 접촉할 수 있는 시설로 옮겨져 12시간동안 암명의 조명이 제어되는 환경 내에서 관리하게 된다.

### 2.3 Preswelling method를 이용한 겸형적혈구 담지

겸형적혈구를 Sickle Cell Disease 환자 혹은 유전적으로 조작된 동물모델 (Berkeley Knock-in mouse: B6;129 -Hbatm1 (HBA) TowHbbtm2 (HBG1, HBB\*)Tow/Hbbtm3 (HBG1 ,HBB)Tow/J) 에서 수집한다. 적혈구를 선별해 내기위해 4° C로 냉각된 1ml의 혈액과 같은 온도의 10ml의 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, w/o phenol red, w/ 0.1mM Ca<sup>2+</sup>, w/ 0.5mM Mg<sup>2+</sup>) 용액을 섞어 4° C를 유지하며 원심분리를 진행한다. 원심 분리 후 적혈구를 제외한 나머지 상단의 용액을 제거하고 다시 10ml의 DPBS를 첨가하여 상단의 용액이 투명해질 때 까지 2~3회 반복한다. 향후 실험을 위해 200ul씩 따로 냉장 보관한다.

### 2.4 용혈된 형광물질 측정

항암치료제 (Cisplatin)의 담지유무와 유출된 약물 치료제의 양은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 측정한다. 겸형적혈구의 세포막은 기존의 적혈구처럼 변형이 쉽지 않기 때문에 일반 적혈구에 약물을 담지하기 위한 hypotonic preswelling method를 기본으로 하되, 실험을 통해 얻어진 다음과 같은 겸형적혈구만을 위한 최적화된 방법을 사용하기로 한다. 담지방법은 기존의 방법과는 다르게 약 200ul로 분리된 겸형적혈구 용액을 삼투농도 0.67을 갖는 1.2ml의 저장성 (hypotonic) DPBS에 추가하여 상온에서 약 5분정도 vortex를 이용해 골고루 섞은 후 4° C에서 원심분리를 시행하고 적혈구를 제외한 나머지 용액을 제거한다. 이 과정을 적혈구를 제외한 나머지 상단의 용액이 투명해질 때까지 2~3회 반복한다.

## 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 5~10mm 사이즈의 암 조직을 갖게 된다. 윈도우챔버가 설치된 Day1과 암세포가 적정부피로 자란 Day7의 헤모글로빈 산소포화도 지도 및 신생혈관의 비교를 위해 초분광 시스템을 이용하여 윈도우챔버 내 혈관지도와 헤모글로빈 산소포화도 지도를 생성하고 광증감제 혹은 형광물질이 부착된 겸형적혈구 1ml (8×10<sup>8</sup> cells)를 마우스 모델의 꼬리정맥을 통해 주입하여 약 6시간 간격으로 윈도우챔버 내 일반 혈관과 암세포 주변의 혈관 내 적체된 겸형적혈구를 형광현미경으로 확인한 결과, 그림과 같이 암세포 주변의 혈관 내에 적체된 겸형적혈구는 일반 혈관에 적체된 겸형적

혈구 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.

과를 보였으며, 향후 임상치료 목적의 새로운 약물치료 방식에 사용되기 위해서는 추가적인 전임상연구와 임상으로부터 획득된 다양한 적혈구를 응용한 추가연구가 필요하다.

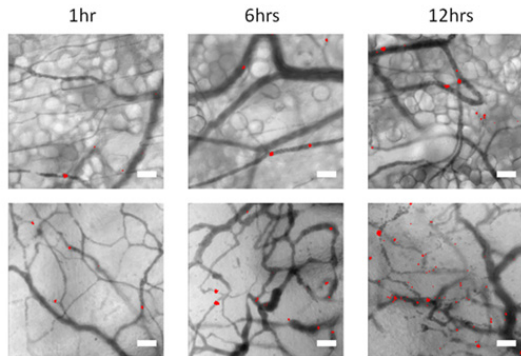


그림 1. 4T1 일반 혈관(위)과 암세포 주변의 혈관(아래)내 적체된 겸형적혈구의 비교 (붉은 색 점 : 형광물질이 부착된 겸형적혈구)

일반혈관 내에서 겸형적혈구는 일반 적혈구보다 약 34% 많은 적체현상을 보였으나, 암세포에 인접한 혈관 내에서의 겸형적혈구는 약 300~400% 가깝게 증가된 적체율을 보였다. 이는 겸형적혈구는 일반 적혈구에 비해 표적치료로서의 높은 가능성일 보이며 그 중 Berkeley 마우스 모델보다 Knock-in 마우스 모델의 겸형적혈구가 보다 높은 효과를 보인다는 것을 알 수 있었으며 이는 표 1을 통해 보여 진다.

표 1. 일반 적혈구와 겸형적혈구의 적체율 현상 분석

	[%]		
혈관종류	C-57	Berkeley	Knock-In
일반 혈관	100±12	128±13	141±7
암세포 혈관	100±9	301±17	415±34

### 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] V. Lorusso, L. Manzione, N. Silvestris, Role of liposomal anthracyclines in breast cancer, *Ann. Oncol.* 18 (Suppl 6), vi70-vi73, 2007

[3] 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, 2006.

[4] 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 Opinion on Biological Therapy*, Vol. 12, No. 1, pp. 127-133, 2012.

[5] M. J. Telen, Erythrocyte adhesion receptors: blood group antigens and related molecules, *Transfus. Med. Rev.* 19, 32-44, 2005

### IV. 결 론

본 논문에서는 겸형적혈구를 약물 운반체로 이용한 항암치료방법의 효과를 보이기 위해 일반 적혈구 및 겸형적혈구에 치료제를 담지한 모델과 운반체를 이용하지 않고 치료제를 주입한 전임상 모델들을 비교 분석 하였다. 제시된 겸형적혈구를 이용한 표적치료 방법은 여기 된 광증감제를 응용한 새로운 약물방출 제어 방식을 제안하고 추가적 물리/화학적 처리 없이 겸형적혈구의 세포막의 특성을 이용하여 표적화를 증가시킬 수 있다는 가능성을 보였다. 약물 운반체로서의 겸형적혈구는 생분해성과 생착성이 높으며 면역반응을 일으키지 않는 특성을 가지고 있어 기존의 화합물을 이용한 운반체로부터 기인하는 독성 유출과 부정확한 표적화로부터 보다 자유로울 수 있다. 운반체가 없는 약물투여 방식과 일반/겸형적혈구를 운반체로 사용한 비교 실험을 통해 겸형적혈구는 다른 그룹에 비해 매우 높은 항암치료 효