

광학 영상을 위한 Cy5.5가 결합된 생체적합성 고분자 마이셀 나노입자의 제조 및 특성분석

김효정^{1,2} · 김병진⁴ · 이하영¹ · 정석현¹ · 정서영² · 육순홍¹ · 신병철¹
성하수¹ · 최연웅⁴ · 하대철⁴ · 조선행^{1†} · 이수민^{3†}

¹한국화학연구원 바이오소재센터, ²경희대학교 약학대학, ³한남대학교 화학과, ⁴한국유나이티드제약
(2009년 7월 31일 접수 · 2009년 8월 6일 수정 · 2009년 10월 9일 승인)

Preparation and Characterization of Cy5.5-conjugated Biocompatible Polymeric Micellar Nanoparticles for Optical Imaging

Hyo Jeong Kim^{1,2}, Byung Jin Kim⁴, Ha Young Lee¹, Suk Hyun Jung¹, Seo Young Jeong², Soon Hong Yuk³,
Byung Cheol Shin¹, Hasoo Seong¹, Youn Woong Choi⁴, Dae Chul Ha⁴, Sun Hang Cho^{1†}, Soo Min Lee^{3†}

¹Biomaterials Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea

²Department of Pharmaceutical Science, College of Pharmacy, Kyung Hee University, 1 Hoegi-dong,
Dongdaemun-gu Seoul 130-701, Korea

³College of chemistry, Hannam University, 133 Ojeong-dong, Daedeok-Gu, Daejeon 306-791, Korea

⁴Korea United Pharm. INC., Nojang-ri, Jeondong-myeon, Yeongi-gun, Chungcheongnam-do, 339-841, Republic of Korea

(Received July 31, 2009 · Revised August 6, 2009 · Accepted October 9, 2009)

ABSTRACT – PHEA (hydroxyethyl-aspartamide)-mPEG (methoxy-polyethyleneglycol)-C₁₆ (hexadecylamine)-ED (ethylenediamine) was prepared as a drug delivery carrier. The structure and molecular weight of polymers were characterized by ¹H-NMR and gel permeation chromatography. Micelle size and shape were measured by electro-photometer light scattering and transmission electron microscope. The mean diameter of micelles was 23 nm in aqueous solution. To evaluate the potential of these polymeric micelles as a drug carrier, PSI-mPEG-C₁₆-ED was conjugated with Cy5.5 for Near-Infrared Fluorescent (NIRF) based optical imaging. PSI-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5 was injected intravenously into mice (n=5) and *in vivo* NIRF imaging was performed during 48 h after injection. The biodistribution study at 24 h after injection showed the long-circulation property of PSI-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5. Therefore, PSI-mPEG-C₁₆-ED micelles could be a promising drug carrier and imaging agent.

Key words – PHEA (hydroxyethyl-aspartamide), micelle, Cy5.5 NHS-ester, NIRF (Near-Infrared Fluorescent), optical imaging

고분자 마이셀은 주사용 약물전달시스템에서 우수한 용해도, 안정성 및 높은 약물 담지 능력으로 인해 생체이용률 증가를 위해 많은 연구가 되어지고 있다. 마이셀을 형성하는 고분자는 친수성과 소수성을 지니며, 여러 가지 관능기를 결합시킬 수 있는 장점을 가지고 있으며, 마이셀이 장시간 체내 순환을 할 경우 간에 축적 및 소실되는 양이 적기 때문에 독성이 줄어들게 되는 장점을 지니고 있다.¹⁻³⁾ 고분자 마이셀 시스템은 친수성 또는 소수성 약물에 대하여 넓고 다양하게 응용할 수 있으며 작은 입자 크기를 제조할 수 있는 장점을 지닌다.⁴⁻⁸⁾

단백질을 이루고 있는 아미노산의 경우 이를 폴리아미노산으로 제조하였을 때 아미드기가 존재하여 관능기를 쉽게

결합시킬 수 있고, 생체 적합성을 가지며 체내에서 분해되는 특징이 있다. 이러한 아미노산 중 카르복실 그룹이 존재하는 아스파르트산(aspartic acid)을 이용하여 폴리숙신이미드(polysuccinimide, PSI)를 중합 할 수 있다. PSI는 카르복실 그룹이 분해되어 고리가 열리게 되면 아미드기가 말단에 존재하게 되어 다른 고분자와 쉽게 공유 결합이 가능하고, 이는 거대분자 프로드럭(prodrug) 제조에 많은 가능성을 지니고 있으며, PSI가 갖는 물에 대한 용해성, 생체적합성 및 생분해성 때문에 제제에 이용하기 용이하며, 의료 및 성형분야에서도 이용이 가능한 것으로 보고되었다.^{5,8)} 또한 최근에 고분자를 약물과 함께 이온 및 공유결합시켜 생체이용률과 약물의 안정성을 높일 수 있는 연구도 보고되었다.⁹⁻¹⁰⁾

분자영상기술은 약학 혹은 의학적 이용분야에서 가장 실용성이 많은 분야이며, 크게 MRI (magnetic resonance imaging), CT (computed tomography)를 이용한 영상 기술, PET (positron emission tomography), 생물발광 (bioluminescence)

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7225, E-mail : shcho@kriict.re.kr
DOI : 10.4333/KPS.2009.39.6.393

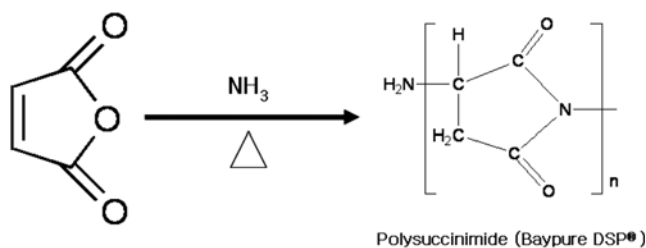
scence) 또는 형광 (fluorescence)을 이용한 광학영상 기술로 구분이 가능하다. 이중에서 광학영상 (optical imaging) 기술은 최근에 활발한 연구와 함께 급속한 발전을 이루어 왔다. 광학영상은 빛을 이용하므로 발색단이 함유된 표식자를 사용해야 하며, 이는 bioluminescence와 fluorescence 발색단으로 나눌 수 있다. 광학영상은 여러 장점을 가지고 있는데, 대표적인 장점으로는 장비에 대한 비용이 핵의학 영상 장비에 비하여 매우 저렴하다는 것, MRI 보다 민감도가 높다는 점, 지속시간이 길고 효과적인 능동적 표적지향이 가능하다는 점과 생체 내에서 일어나는 다중 생리학적 현상을 동시에 영상화하여 분석할 수 있다는 점 등이다.^{11,14)} 강력한 형광과 낮은 소수성으로 인하여, Cy dye는 형광 영상 현미경 측정을 위한 널리 이용되는 label이다. 게다가, Cy dye는 단일 분자의 형광 검출을 위해서 높은 영상 안정성 제공에 유용하다. Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5 그리고 Cy7등의 Cy dye중에 Cy5.5는 Cy3과 Cy5의 중간생성물로서, 최근에 Cy5.5를 이용하여 *in vivo*에서 암진단 및 흡수, 배설, 분포 등의 활발한 광학영상 연구가 수행되고 있다.^{14,15)}

본 연구는 생체적합성 고분자 주사슬에 여러 관능기를 결합시켜 수용액상에서 나노 크기의 마이셀을 제조하고, 형광 물질을 도입하여 광학영상을 위한 약물전달체로의 가능성을 알아보기 위한 실험으로 우선 출발물질을 말레인 무수물 (maleic anhydride)로 하여 합성되어진 생체적합성 고분자 PSI를 주사슬하여 친수성기로 신장의 여과작용에 의해 신체로부터 제거가 용이한 5000 g/mole의 저분자량 methoxy polyethyleneglycol (mPEG)과 인체의 신진대사에 의해 생체적합성 산물로 분해 될 수 있는 생체적합성 고분자와 공유 결합을 시켰다.^{10,12)} 그리고 소수성기 고분자와 아민 작용기를 갖는 고분자로 각각 무촉매 하에서 중합하였다. 중합한 고분자의 구조와 분자량을 분석하고, N-hydroxy succinimidyl ester (NHS-ester)로 개질된 형광물질 Cy5.5 NHS-ester를 도입하여 근적외선 형광 영상 측정을 통하여 동물의 *in vivo*, *ex vivo*에서 형광 분포 및 효율을 측정하여 광학영상 기술에 적용과 응용이 가능한지 고찰하였다.

실험 방법

재료 및 시약

고분자를 합성하기 위한 주사슬로 말레인 언하이드라이드 (maleic anhydride)로부터 합성된 독성이 없는 폴리숙신이미드 (polysuccinimide, PSI)는 Scheme 1에 나타난 Baypure DSP® (8190 g/mol, Lanxess Co. Ltd., Germany) 제품을 사용하였고, 친수성 결사슬로 사용한 methoxy polyethyleneglycol-



Scheme 1—Nontoxic polysuccinimide from Baypure® products / synthesis.

amine (mPEG-NH₂, SunBio Inc. Korea)은 평균분자량 5000 g/mol을 사용하였다. 소수성 결사슬로 사용한 1-Hexadecylamine (C₁₆-NH₂)과 친수성이며 형광물질을 도입하기 위한 결사슬로 사용한 에틸렌디아민 (ethylenediamine, ED)은 Sigma-aldrich에서 구입하여 사용하였다. 용매로 사용된 HPLC 등급의 디메틸포름아미드 (N, N-dimethylformamide, DMF, Burdick & Jackson Inc., U.S.A.)는 4Å 분자체 (Junsei Chemical Co., Ltd., Japan)에 넣고 고순도 질소를 충전하여 보관 및 사용하였다. 반응 후 중합된 고분자를 얻기 위하여 침전 용매로 HPLC 등급의 에틸에테르 (ethylether, Jin Chem. Pharm. Co. Ltd., Korea)를 사용하였다. 형광물질을 도입하기 위하여 N-hydroxy succinimidyl ester로 개질된 형광물질 Cy5.5 NHS-ester (polypropyl test tube containing 1 mg, Amersham Biosciences, GE Healthcare, U.S.A.) 제품을 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 용매 및 시약은 일급시약 및 특급시약을 사용하였다.

PSI에 mPEG-NH₂ 결가지 도입

주사슬인 PSI에 결사슬로 도입되는 친수성 고분자인 mPEG와의 합성은 우선 DMF 25 mL에 PSI 10 g (0.00122 mol)를 녹인 다음 잘 건조된 둥근 플라스크에 넣고, DMF 10 mL에 mPEG-NH₂ 0.3 g (0.00006 mol)를 녹인 용액을 천천히 적가한 후 60°C에서 약 24시간 교반하여 반응시켰다. 모든 과정은 고순도 질소하에서 실시하였으며 중합 후 미반응 단량체와 개시제를 제거하기 위해서 400 mL의 에틸에테르에 반응 용액으로 3회 재결정하여 갈색의 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 거름종이에 걸러 진공상태에서 용매를 제거하여 고운 가루형태의 PSI-mPEG 화합물을 얻었다.

PSI-mPEG에 C₁₆ 결가지 도입

합성하여 얻은 PSI-mPEG에 소수성 고분자인 C₁₆-NH₂를 도입하기 위하여 PSI-mPEG 화합물 10 g (0.000476 mol)를 DMF 25 mL에 넣고 녹인 용액을 60°C에서 교반 하면서,

C₁₆-NH₂ 1.6 g (0.0067 mol)를 DMF 10 mL에 녹인 용액을 천천히 적가하여 혼합용액을 제조하였다. 상기에서 얻어진 혼합용액을 24시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 모든 과정은 고순도 질소하에서 실시하였으며 중합 후 미반응 단량체와 개시제를 제거하기 위해서 400 mL의 에틸에테르에 반응용액으로 3회 재결정하여 갈색의 침전물을 얻었다. 얻어진 침전물을 거름종이에 걸러 진공상태에서 용매를 제거하여 고운 가루형태의 PSI-mPEG-C₁₆ 화합물을 얻었다.

PSI-mPEG-C₁₆에 Ethylenediamine 결가지 도입

합성하여 얻은 PSI-mPEG-C₁₆ 화합물 0.21 g (0.00000897 mol)를 DMF 3 mL에 넣고 녹인 용액을 40°C에서 교반하면서, ED 0.5749 g (0.00956 mol)을 DMF 15 mL에 섞은 용액을 천천히 적가하여 교반시켰다. 6시간 동안 반응시킨 후 생성물을 진공상태에서 용매를 최대한 제거하고, 3차 증류수 10 mL에 녹인 후 48시간 동안 막투석(MWCO 3500, Viskase Sales Inc. Chicago, IL, U.S.A.)을 이용하여 반응되지 않은 단량체를 제거하였다. 투석 후 동결건조 과정을 거쳐 고운 가루 형태의 PHEA-mPEG-C₁₆-ED 화합물을 얻었다.

PHEA-mPEG-C₁₆-ED에 Cy5.5 NHS-ester 도입

합성하여 얻은 PHEA-mPEG-C₁₆-ED에 Cy5.5 NHS-ester를 도입하는 방법은 Veiseh *et al.*의 실험 방법에 따라 합성하였다.¹⁴⁾ PHEA-mPEG-C₁₆-ED 17.66 mg (0.65 nmol)을 bicarbonate buffer (pH 8.5) 2 mL에 분산시킨 용액에 Cy5.5 NHS-ester 1 mg (1.3 nmol)을 DMF 200 μ L에 녹인 용액을 암실에서 천천히 적가하여 상온으로 1시간 반응시켰다. 반응 후 막투석(MWCO 3500, Viskase Sales Inc., Chicago, IL, U.S.A.)을 이용하여 4°C암실에서 48시간동안 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 미반응된 Cy5.5 및 NHS-ester를 제거하여 최종 생성물 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5를 얻었다.

합성한 고분자들의 물리·화학적 분석

PSI, PSI-mPEG, PHEA-mPEG-C₁₆, PHEA-mPEG-C₁₆-ED의 분자량을 측정하기 위하여 두개의 칼럼(10 μ m, MIXED-B X2. 500Å)을 가진 GPC (PL-GPC220, Polymer Laboratory, England)를 이용하여 이동상으로 DMF를 사용하였고, 표준 시료로서 폴리스티렌(polystyrene, Showa Denko, Japan)을 사용하여 1 mL/min의 유속으로 측정하였다. 각각의 구성 고분자의 중합결과를 확인하기 위하여 디메틸설포옥사이드 (DMSO, Aldrich, USA)를 용매로 하여 ¹H-NMR

(Bruker 300, 500 MHz, USA)을 통하여 분석하였다.

중합한 고분자 PHEA-mPEG-C₁₆-ED를 10 mg을 3 mL의 3차 증류수에 분산시킨 후 마이셀의 입자 크기와 표면전하는 전기영동 광산란 측정기(electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)를 사용하여 측정하였다. 측정하려는 용액 3 mL을 분취하여 상온에서 측정하였다. 표면전하는 25°C, pH 7에서 측정하였다. 입자의 크기와 형태를 확인하기 위하여 TEM (Transmission Electron Microscope, JEM-2010, JEOL)을 이용하여 측정하였다. TEM 시료는 3차 증류수에 분산시킨 후 탄소 코팅된 300 mesh 구리 격자에 한 방울 떨어뜨리고 건조시킨 후 측정하였다.

Cy5.5 NHS-ester를 도입한 후 막투석을 이용하여 정제하고 최종 생성물 용액에 결합되어 있는 Cy5.5를 정량 분석하기 위하여 자외/가시광 분광 광도기(Shimadzu UV mini 1240, Japan)로 흡광도를 측정하여 아래의 Beer-Lambert law 계산식(1)으로 결합된 Cy5.5의 정량을 결정하였다.¹⁵⁾

$$\text{Beer-Lambert law, } C = A / (kd) \quad (1)$$

A는 흡광도로서, 샘플 1 mL을 최대 흡수파장에서 측정된 흡광도를 나타내며, k는 흡광도 계수로서, 최대 흡수파장에서 45000을 나타내며, d는 자외/가시광 분광광도기를 측정할 때 사용한 석영 cell에서 빛이 투과되는 통로길이 1 cm로서, 1의 값을 나타낸다.

In vivo 근적외선 영상 측정

근적외선 영상 측정을 위해 실험동물은 6주령 BALB/c mice (female, Charles River Laboratories, Yokohama, Japan) 모델을 1주간의 적응기간과 실험 시작 전 12시간부터 금식시킨 후에 사용하였다. 총 5마리의 실험동물들은 1.5% isoflurane로 마취하였고, 형광 영상을 얻기 위한 장비로 luminescence and fluorescence animal imaging system (Xenogen corporation, KBSI-chunchen center, Korea)을 사용하였다. Mouse로부터 방출되는 생체 자가 형광 (biofluorescence)은 고감도 charge-coupled device (CCD) 카메라를 이용하여 샘플 주입 전에 영상을 측정하였다. 형광 이미지(fluorescent images)는 615에서 665 nm 여기 통과대역(excitation passband-filter)을 사용하였고, 695에서 770 nm 방출 통과대역(emission passband-filter)을 사용하고, 0.1초간 노출시켜 얻었다. 광자 유량 농도는 IVIS 영상 장비 프로그램으로 photon/second/cm²로 표현하고 계산하였다.

샘플용액 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5의 100 μ L를 정맥

주사한 후 주사 전 영상과 주사 후 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 24 그리고 48시간 때의 영상을 얻었다. 24시간 영상을 얻은 후 해부하여 간(liver), 폐(lung), 심장(heart), 신장(kidney), 비장(spleen), 방광(bladder) 그리고 뇌(brain)를 적출하고 근 적외선 영상을 얻어 비교 및 분석하였다.

결과 및 고찰

PSI, PSI-mPEG 특성 분석

고분자 마이셀을 제조하고 소수성의 PSI 고분자에 생체 내 약물전달체로 이용 시 생체 이용률을 높이기 위해 친수성인 antibiofouling 고분자인 5000 g/mol의 mPEG-NH₂를 무촉매하에서 중합하여 PSI-mPEG를 합성하였다. 중합한 고분자의 구조는 Figure 1 (a)에 제시한 것처럼 PSI에 mPEG를 공유결합 한 후 ¹H-NMR에서 3.5 ppm 부근에서 mPEG의 ethylene oxide 피크의 확인으로 중합여부를 확인할 수 있었다. GPC 분석을 통해 PSI-mPEG의 중합에 따른 분자량 변화를 확인하였다. PSI 고분자는 무게 평균분자량은 8,190 이었고, PSI-mPEG 합성물은 무게 평균분자량 21,000을 갖는 것으로 보아 PSI 한분자당 약 두 분자의 mPEG-NH₂가 결합된 것으로 판단된다. 재결정 과정에서 ethyl ether에 녹지 않은 부분을 건조 후 정량하여 수율을 측정한 결과 약 92% 였다.

PSI-mPEG-C₁₆ 특성 분석

수용액상에서 고분자 마이셀의 형성 시 소수성을 증가시켜 마이셀의 형태를 오랜 시간 유지시켜 안정성을 향상시키고, 소수성간의 결합으로 소수성 약물을 담지하는 기능성이 있는 고분자로 C₁₆-NH₂를 PSI-mPEG 고분자에 도입하였다. 중합한 고분자의 구조는 Figure 1 (b)에 제시한 것처럼 PSI-mPEG에 C₁₆-NH₂를 공유결합한 후 ¹H-NMR에서 C₁₆-NH₂ 합성 전에는 나타나지 않았던 0.8, 1.3 ppm 부근에서 triplet으로 1차 methyl 피크와 2차 C₁₅의 methylene 피크의 확인으로 중합 여부를 확인할 수 있었다. GPC 분석을 통해 PSI-mPEG의 중합에 따른 분자량 변화를 확인하였다. PSI-mPEG-C₁₆ 고분자는 무게 평균분자량이 23,400 이었으며, PSI-mPEG 한분자당 약 10개 분자의 C₁₆-NH₂가 결합된 것으로 판단된다. Ethyl ether에 녹지 않은 부분을 건조 후 정량하여 수율을 측정한 결과 약 88% 였다.

PHEA-mPEG-C₁₆-ED 특성 분석

PSI-mPEG-C₁₆ 합성 고분자에 에틸렌디아민(ethylenediamine, ED)을 도입하여 PSI의 반복체 그룹에서 결가지 도입이 이

루어지지 않은 부분을 에틸렌디아민을 이용하여 ring opening 반응으로 PHEA (poly hydroxyethyl aspartamide)를 합성하였다. 합성된 고분자는 수계에서 잘 분산이 되는 PHEA-mPEG-C₁₆-ED가 합성되었다. 합성한 고분자는 Figure 1 (c)에서 제시한 것처럼 ethylenediamine을 공유결합한 후 ¹H-NMR에서 1.3, 2.4 ppm 부근에서 methylene, amine 피

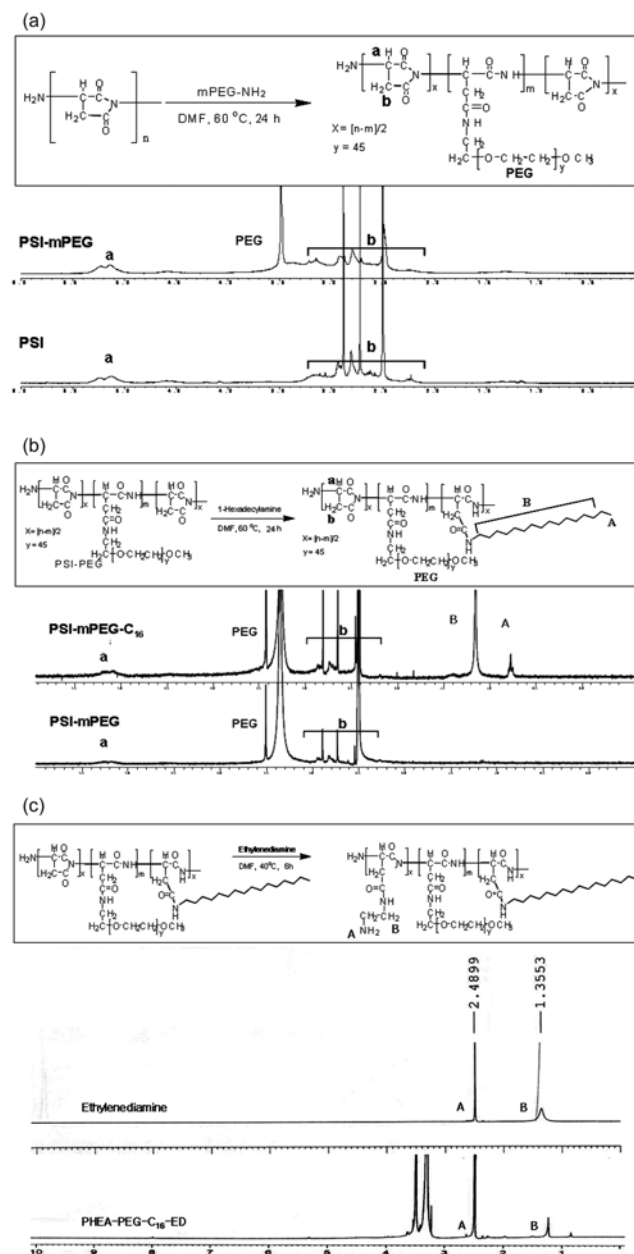


Figure 1—(a) The overall synthetic scheme of PSI-mPEG and ¹H-NMR spectra of PSI, PSI-mPEG. (b) The overall synthetic scheme of PSI-mPEG-C₁₆ and ¹H-NMR spectra of PSI-mPEG, PSI-mPEG-C₁₆. (c) The overall synthetic scheme of PSI-mPEG-C₁₆-ED and ¹H-NMR spectra of Ethylenediamine, PSI-mPEG-C₁₆-ED.

크의 확인을 통해 중합여부를 확인할 수 있었다. GPC 분석을 통해 PSI-mPEG의 중합에 따른 분자량 변화를 확인하였다. PHEA-mPEG-C₁₆-ED의 무게 평균분자량은 27,000이었으며, PSI-mPEG-C₁₆ 한분자당 약 60개 분자의 ED가 결합된 것으로 판단된다. 48시간 막투석을 이용하여 결합되지 않은 단량체를 제거한 후 동결건조 하여 수율을 측정한 결과 약 82% 였다.

Figure 2는 합성된 PHEA-mPEG-C₁₆-ED 고분자가 수용액상에서 마이셀을 형성시켰을 때의 (a) 20 nm 그리고 50 nm scale-bar의 TEM 영상을 통하여 구형의 입자를 갖고, (b) ELS 측정을 통하여 평균 입자크기가 약 23±5.0 nm이었고, 평균 10.6±6.7 nm 입자크기의 레이저 분포도를 갖는 입자가 형성되었음을 확인하였다. 상기의 결과를 바탕으로 구형의 마이셀이 형성됨을 알 수 있었다. 또한 (c) 제타 전위 측정기(zeta-potential)를 측정하여 형성된 입자의 표면 제타

Table 1—Mean particle diameter and zeta potential of PHEA-mPEG-C₁₆-EA/ED

Conjugated polymer	Final products	Mean particle diameter (nm)	Zeta potential (mV)
Ethanolamine (EA)	PHEA-mPEG-C ₁₆ -EA	20.0±4.8	-24.5±6.4
Ethylenediamine (ED)	PHEA-mPEG-C ₁₆ -ED	23.0±4.5	9.7±2.8

[†]Same molar ratio (0.00956 mol) of EA/ED conjugated to PSI-mPEG-C₁₆.

전위값을 측정한 결과 9.7±2.8 mV의 양이온성 값으로부터 폴리숙신이미드에 결합지로 양이온성의 제타전위값을 갖는 에틸렌디아민이 도입되었음을 확인할 수 있었다. 한편, 에틸렌디아민 대신에 에탄올아민(ethanolamine)을 앞서 제시한 실험방법(에틸렌디아민 결합지 도입)과 동일하게 하고 얻은 합성물을 가지고 특성을 분석하였을 때는 Table 1에 나타난 것과 같이 -24.5±6.4 mV의 음이온성의 제타 전위값을 갖고 평균 입자크기는 약 20.0±4.8 nm임을 확인하였다. 이러한 음이온성 제타 전위값은 마이셀을 이루는 입자표면의 친수성 고분자인 mPEG와 에탄올아민의 전자주개(electron donor) 때문이라고 판단된다. 입자 크기 분포는 에틸렌디아민을 공유 결합 시킨 고분자와 큰 차이가 없었으며, 평균 입자크기가 좀 더 작은 것은 제타 전위값이 강한 음이온성으로 입자간의 전위 반발력으로 인한 aggregation이 감소되었기 때문이라고 판단된다.

PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5 특성 분석

Cy5.5 NHS-ester는 Figure 3과 같은 구조를 가지며, NHS-ester 그룹은 펩타이드의 labelling을 위한 가장 편리하

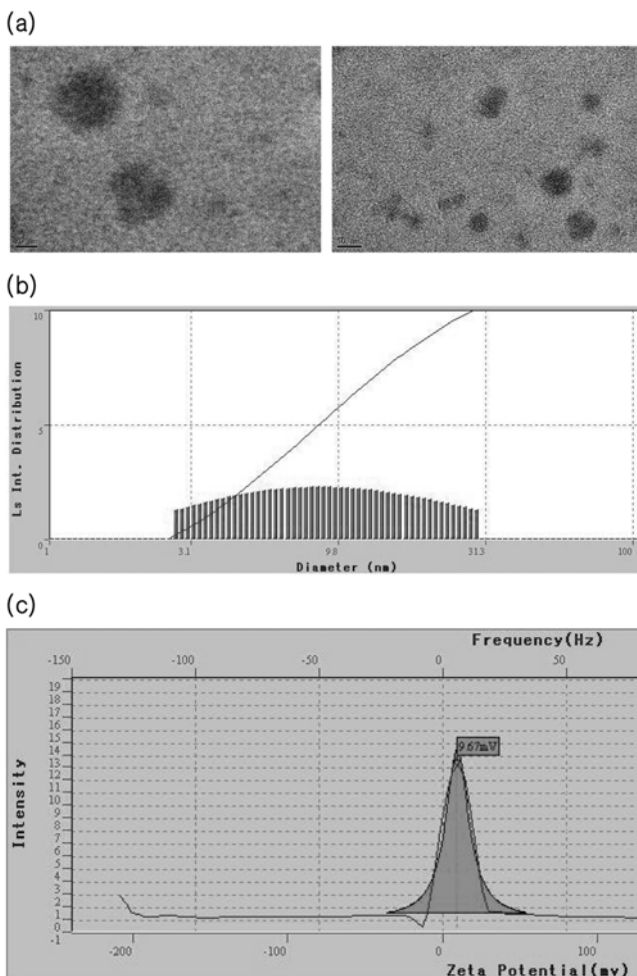


Figure 2—Physical properties of PSI-mPEG-C₁₆-ED micelles. (a) is TEM image, (b) is laser intensity distribution and (c) is distribution of mobility.

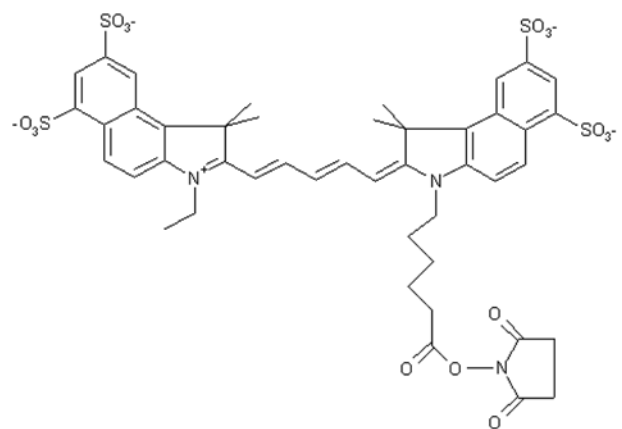


Figure 3—Figure of PSI-mPEG-C₁₆-ED-CY5.5 solution as a concentration after dialysis. (A to B = low to high concentration)

고 많이 이용되는 관능기로서, 아미노 그룹(amino group)의 labelling을 위해 가장 유용한 반응은 알킬레이션(acylation)이다. 대부분의 단백질의 labelling은 pH 7~9 사이에서 phosphate, bicarbonate/carbonate 그리고 borate buffers 등에서 반응시킨다.¹³⁾ 이와 같은 원리에서 Veiseh *et al.*의 실험방법과 같이 Cy5.5 NHS-ester를 결합시켜 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5를 제조하였다.¹⁴⁾ 24시간 동안 투석하여 미반응된 Cy5.5 및 NHS-ester를 제거한 후 얻은 생성물을 PBS를 이용하여 20% (w/w) 비율로 희석한 모습을 Figure 4에 나타내었고, 유관 평가(visual assessment) 하였을 때 고농도에서 저농도로 갈수록 형광이 약했고, 저농도에서는 제조한 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5의 입자의 농도가 낮음을 알 수 있다. 또한 입자 형성 유무와 크기의 확인은 Figure 5의 TEM 영상으로부터 약 3~8 nm의 구형의 입자가 형성되었음을 확인하였다.

제조한 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5의 최초 농도를 PBS로 20배 희석하여 자외/가시광 분광광도계를 이용하여 최대 흡수파장을 측정하였다. Free Cy5.5 dye는 673 nm에서 최대 흡수파장값을 갖는다고 보고되어 있다.¹⁶⁾ Figure 6에 나타난 것과 같이 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5는 678 nm에서

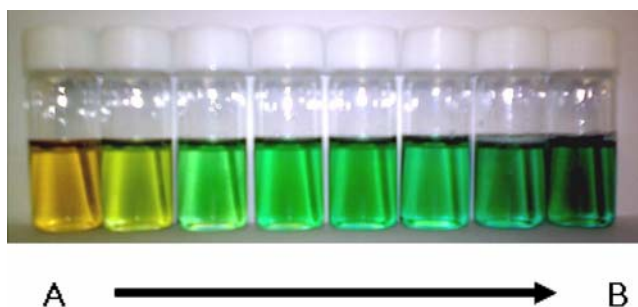


Figure 4—Structure of Cy5.5 mono-functional NHS ester.

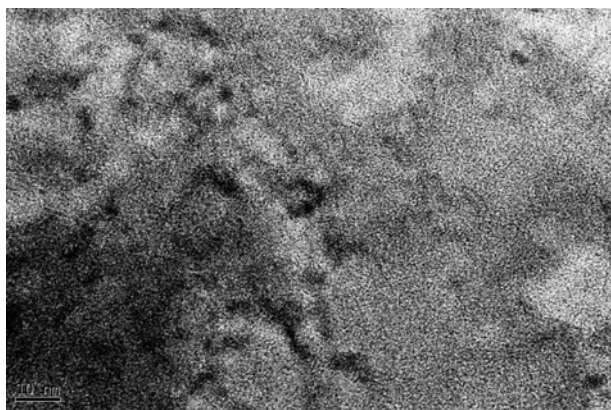


Figure 5—TEM (Transmission Electron Microscope) image of PSI-mPEG-C₁₆-ED-CY5.5 solution.

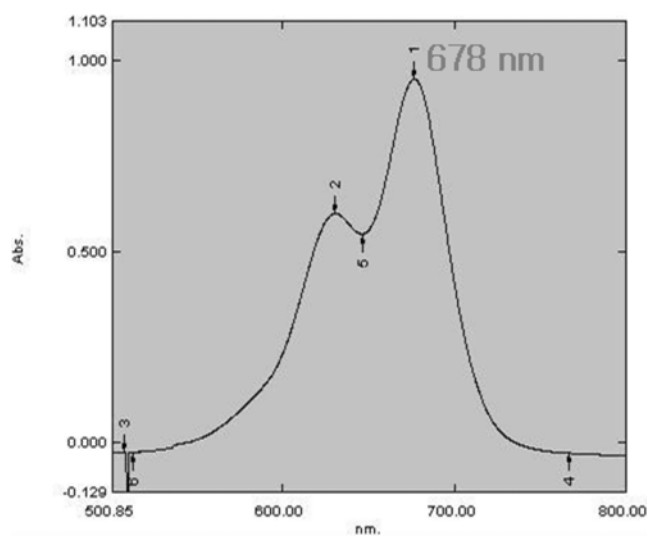


Figure 6—Excitation spectra of PSI-mPEG-C₁₆-ED-CY5.5 solution. (Absorbance max = 678 nm)

최대 흡수파장이 측정되었고, Beer-Lambert law의 계산식에 따라 Cy5.5가 도입된 양을 정량 분석한 결과 제조한 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5 용액 전체에는 Cy5.5가 0.928 μg 이 포함되어 있는 것을 확인하였다. Cy5.5는 약 92% 이상이 결합된 것으로 판단되며, 합성고분자 PHEA-mPEG-C₁₆과 높은 결합 효율을 나타냄을 알 수 있다.

In vivo 근적외선 영상 분석

실험동물에 정맥 주사한 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5의 샘플 용액 100 μL 는 Cy5.5가 약 0.428 μm 포함되어 있다. 실험 시작 전 12시간 동안 금식 시킨 쥐는 샘플 주입 전에 생체 자가 형광은 검출되지 않았다. 샘플 주입 후 형광이미지는 0.1 sec 노출시간만으로 샘플 주입 후 30분부터 충분한 포화(saturation)가 이루어졌다. Figure 7은 샘플 주입 전 생체 자가 형광 영상 (A)과 주입 후 24시간 때의 형광이미지를 얻은 영상 (B)이다. 간, 신장, 폐, 방광 등을 중심으로 높은 형광 효율을 나타내었다. 이는 친수성이며 작은 입자크기를 갖는 Cy5.5가 결합된 고분자 마이셀이 신장을 걸쳐 여러 장기로 순환 후 도달되어지기 때문으로 사료되어진다. Figure 8은 샘플 주입 후 24시간 때의 장기를 적출하여 형광이미지를 얻기 전과 후의 영상으로써, 간에 가장 높은 형광 효율을 나타냄으로써 Cy5.5가 결합된 샘플 입자가 순환되는 것을 알 수 있었다. 신장에서는 중심 부분이 낮은 형광 효율을 나타내었고 바깥쪽이 높은 형광 효율을 나타내는 것으로 보아 여과 또는 배출되고 있는 것으로 판단된다. 한편, 샘플 입자는 뇌에서도 약하게 형광 효율이 검출되었고,

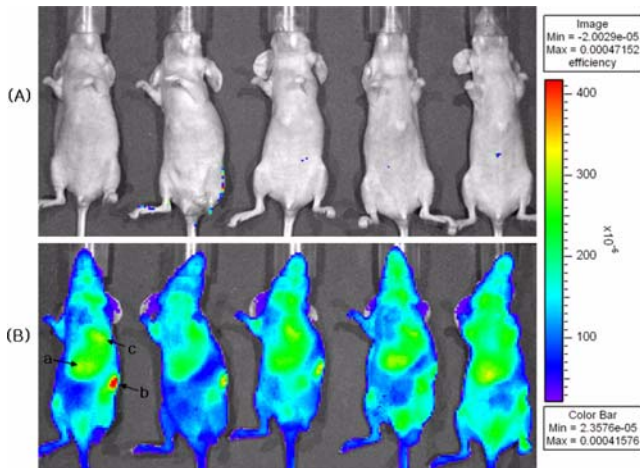


Figure 7—(A) Biofluorescence emitted from the mice before the sample injection were captured by a high sensitivity charge-coupled device camera. (B) A fluorescence intensity image acquired 24 h after intravenous injection PSI-mPEG-C₁₆-ED-CY5.5 solution, which has circulated and accumulated within the (a) liver, (b) kidney and (c) lung.

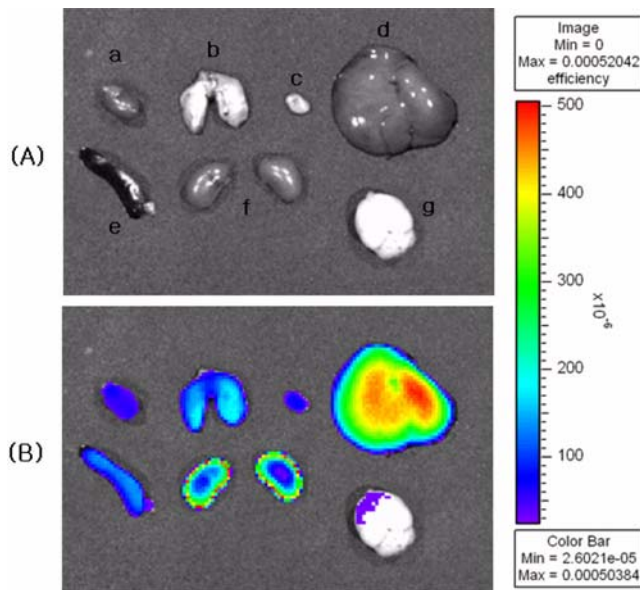


Figure 8—*Ex vivo* images acquired 24 h after intravenous injection PSI-mPEG-C₁₆-ED-CY5.5 solution. Shown are the photographic image (A) and optical fluorescence image (B) of organs after resection. (a=heart, b=lung, c=bladder, d=liver, e=spleen, f=kidney, g=brain)

샘플 주입 후 48시간 때 적출 시에도 검출이 되어, 뇌 조영을 위한 물질로 응용이 기대된다.

결론

본 연구에서는 출발물질을 말레인 무수물로 합성되어진

생체적합성 고분자 PSI를 주사슬하여 친수성과 소수성기 그리고 아민 작용기의 고분자로 각각 무축매하에서 중합하여 PHEA-mPEG-C₁₆-ED를 합성하였다. 합성한 PSI-mPEG, PSI-mPEG-C₁₆, PHEA-mPEG-C₁₆-ED 고분자는 평균 87%의 수율로 합성되었고, ¹H-NMR, GPC를 통하여 구조 및 결합여부 그리고 분자량을 분석하였다. PHEA-mPEG-C₁₆-ED는 수용액상에서 고분자 마이셀을 제조할 수 있었으며, 구형의 형태와 평균 23.0±4.8 nm의 입자 크기를 가지고, Cy5.5 전달체로서 제조하였다. 이 합성 고분자에 Cy5.5 NHS-ester를 도입하고 전자투과현미경과 자외/가시광 분광광도기를 이용하여 약 3~8 nm의 입자 크기를 갖고, 약 92%의 Cy5.5 결합률을 갖는 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5를 제조할 수 있었다.

PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5는 근적외선 형광 영상을 통하여 실험동물 mice에서 *in vivo*, *ex vivo* 형광 효율을 측정하였다. 간, 신장 그리고 폐등의 여러 장기에서 샘플 입자가 순환하는 것을 예측할 수 있다. 또한, 뇌에서도 약한 형광 효율을 나타내어 뇌 조영제로 응용이 기대되었고, 생체 적합성이며 장기 내에서 장기간 순환이 가능한 샘플 입자는 근적외선 형광 영상을 통하여 여러 장점이 있는 광학영상 (optical imaging) 분야에서 활용이 가능하다고 판단된다.

이상의 결과로부터 PHEA-mPEG-C₁₆-ED-Cy5.5 입자는 생체 내에서 순환되어 흡수차에 따른 장기 분포와 EPR (enhanced permeability retention) effect를 통하여 형광 이미지로부터 병변조직과 정상조직 구별할 수 있을 것이라는 판단되어 종양(cancer)을 갖는 동물 모델에서 근적외선 영상을 측정하여 표적지향(targeting) 전달체로 활용 가능성을 확인하기 위한 실험을 계획하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 정부(교육 과학부)와 전국 대학 교육 협의회, 대학 교수 국내 교류 연구비 지원과 한남대학교 지원으로 수행된 연구로 이에 감사를 드립니다. 또한 본 연구에서 근적외선 영상 측정은 한국기초과학 연구원 춘천센터에서 수행하였고, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

- 1) V.P. Torchilin, *J. Control. Release.*, **73**, 137-172, (2001).
- 2) D.D. Lasic, *Nature.*, **355**, 279-280, (1992).
- 3) K. Kazunori, H. Atsushi and N. Yukio, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **47**, 113-131, (2001).
- 4) M. Yokoyama, A. Satoh, Y. Sakurai, T. Okano, Y. Matsumura,

- T. Kazunori and K. Kataoka, *J. Control. Release.*, **55**, 219-229, (1998).
- 5) A. Lavasanifar, J. Samuel and G.S. Kwon, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **54**, 169-190, (2002).
- 6) N. Nishiyama and K. Kataoka, *Pharmacology & Therapeutics.*, **112**, 630-648, (2006).
- 7) M. Yokoyama, S. Fukushima, R. Uehara, K. Okamoto, K. Kataoka, Y. Sakurai and T. Okano, *J. Control. Release.*, **50**, 79-92, (1998).
- 8) G. Giammona, G. Puglisi, G. Cavallaro, A. Spadaro and G. Pitarresi, *J. Control. Release.*, **33**, 261-271, (1995).
- 9) G. Giammona, B. Carlisi and S. Palazzo, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **25**, 2813-2818, (1987).
- 10) G. Cavallaro, M. Licciardi, G. Giammona, P. Caliceti, A. Semenzato and S. Salmaso, *J. Control. Release.*, **89**, 285-295, (2003).
- 11) Y.H. Yun and Y.W. Cho, *Polym. Sci. and Tech.*, **18**, 4, (2007).
- 12) H. Choi, G. Khang, H. Shin, J.M. Rhee and H.B. Lee, *Int. J. Pharm.*, **195**, 234-203, (2002).
- 13) G.H. Haggis, D. Michie, A.R. Muir, K.B. Roberts and P.M.B. Walker, *Longmans (Bristol) Green & Co. LTD.*, (1965).
- 14) M. Veisesh, P. Gabikian, S.B. Bahrami, O. Veisesh, M. Zhang, R.C. Hackman, A.C. Ravanpay, M.R. Stroud, Y. Kusuma, S. J. Hansen, D. Kwok, N.M. Munoz, R.W. Sze, W.M. Grady, N.M. Greenberg, R.G. Ellenbogen and J.M. Olson, *Cancer Res.*, **67**, 14, (2007).
- 15) A. Hansch, I. Hilger, O. Frey, D. Sauner, M. Gajda, M. Haas, A. Malich, J. Bottcher, R. Brauer and W.A. Kaiser, *J. Experimental Animal Sci.*, **43**, 129-139, (2006).
- 16) S.R. Mujumdar, R.B. Mujumdar, C.M. Grant and A.S. Waggoner, *Biocon. Chem.*, **7**, 356-362, (1996).