

암 치료를 위한 Poly(ethylene glycol)-Doxorubicin/SPION 자성 나노입자의 제조 및 특성분석

김유경[#] · 이선민^{*#} · 김단비^{*} · 노강민 · 오근상 · 조성훈^{**} · 최은표^{***,†} · 김규표^{*,†} · 허강무[†]

충남대학교 고분자공학과, *서울아산병원 의생명연구소,

전남대학교 로봇연구소 마이크로의료로봇센터, *전남대학교 기계공학부

(2018년 7월 10일 접수, 2018년 8월 6일 수정, 2018년 8월 7일 채택)

Preparation and Characterization of Poly(ethylene glycol)-Doxorubicin/SPION Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy

Yugyeong Kim[#], Seonmin Lee^{*#}, Danbee Kim^{*}, Kangmin Noh, Keun Sang Oh, Sunhoon Cho^{**},
Eunpyo Choi^{***,†}, Kyu-pyo Kim^{*,†}, and Kang Moo Huh[†]

Dept. of Polymer Science and Engineering, Chungnam National University, 99 Daehakro, Yuseonggu, Daejeon 34134, Korea

*Asan Medical center, Biomedical Research Center, 88, Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea

**Medical Microrobot Center, Robot Research Initiative, Chonnam National University, Gwangju 61011, Korea

***Department of Mechanical Engineering, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea

(Received July 10, 2018; Revised August 6, 2018; Accepted August 7, 2018)

초록: 본 연구에서는 친수성 poly(ethylene glycol)(PEG)와 소수성 항암제인 독소루비신(DOX)의 화학적 결합에 의해 합성된 PEG-DOX conjugate를 이용하여 암 진단 및 치료가 가능한 자성 나노입자를 제조하고자 하였다. 양친매성 PEG-DOX는 수용액 내에서 자기조립 특성을 보이고, 10 nm 내외의 자성 나노입자(SPION)에 대해 높은 봉입능 및 봉입률을 보였다. 제조된 PEG-DOX/SPION 나노입자는 ~100 nm의 균일한 사이즈 분포를 가지며 phantom 실험을 통해 조영제로서의 가능성을 확인하였다. 세포독성평가에서 DOX에 비해 낮은 독성을 보였고 최대내성용량(MTD) 평가실험에서 사망 개체가 발생하지 않았다. 결과적으로, 고함량의 항암제와 SPION으로 구성된 본 나노입자 시스템은 낮은 독성, MR 조영 특성, 수동적 및 자성 표적화능 등 다양한 생기능성을 기반으로 암 진단 및 치료에 유용한 테라그노스틱 제형에 응용될 수 있을 것으로 기대한다.

Abstract: In this study, an amphiphilic polymer-drug conjugate was synthesized by chemical conjugation of a hydrophilic polymer poly(ethylene glycol) (PEG) with a hydrophobic anticancer agent, doxorubicin (DOX), to prepare magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. The amphiphilic PEG-DOX polymer could self-assemble in the aqueous solution to form nanoparticles (NPs) and efficiently encapsulated superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION) with high loading capacity and loading efficiency. The resulting SPION encapsulated PEG-DOX (PEG-DOX/SPION) NPs were observed to have an average size of ~100 nm with a narrow and unimodal size distribution and demonstrated the characteristic of MR contrast agent from the phantom experiments. In the toxicity assessment, PEG-DOX/SPION NPs showed lower toxicity than pristine DOX, and no mortality was detected at the maximum MTD. As a result, these magnetic NPs with high contents of DOX and SPION could be utilized as a theragnostic formulation for efficient cancer diagnosis and therapy, due to their diverse potential capacities properties, such as low toxicity, MR imaging character, passive and magnetic targeting properties, and so on.

Keyword: polymer-drug conjugate, PEG, doxorubicin, SPION, cancer diagnosis and therapy.

[#]These authors contributed equally to this works.

[†]To whom correspondence should be addressed.

khuh@cnu.ac.kr, ORCID[®] 0000-0002-2406-6659

kkp1122@amc.seoul.kr, ORCID[®] 0000-0001-7848-5923

©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

서 론

암을 극복하기 위해 다양한 치료법이 발전하고 있지만 최근 까지도 방사선 치료와 항암 화학 요법이 주를 이루고 있다.¹ 항암제를 이용한 화학요법의 암 치료는 주로 암과 정상 세포의 혈관 내피 세포들의 구조 차이에 의존하며, 기존 항암제의 경우 대부분 난용성 약물이며 비 특이적으로 체내에 분포하여 부작용을 유발한다.² 특히 독소루비신은 유방암, 난소암, 위암 및 여러 암 종에 효과적인 안트라사이클린계 항암제로 널리 사용되고 있지만, 사용 용량에 따른 심장 독성 등의 여러 부작용으로 사용에 제한이 있어 왔다.³⁻⁵ 따라서 약물의 효능을 향상시키고 부작용을 줄일 수 있는 고분자/약물 컨쥬게이트(polymer-drug conjugate), 리포좀(liposome), 고분자 마이셀(polymeric micelle) 등 다양한 나노입자(nanoparticle) 제형들이 개발되고 있다.⁶⁻⁸

친수성 고분자와 소수성 약물의 화학적 결합을 통해 얻어지는 고분자-약물 컨쥬게이트는 수용액 내 자기조립 특성에 기반한 나노입자 형성이 용이할 뿐 아니라, 소수성 약물의 수용해도 및 분산성을 향상시킬 수 있다.⁹ 또한 혈액 내 체류 시간을 늘려줌으로써 암 조직으로의 전달을 용이하게 해줄 뿐만 아니라, 약물의 독성 및 부작용을 감소시킨다.¹⁰ 약물과의 컨쥬게이션을 위해 사용되는 고분자로는 헤파린, 알부민, 키토산 등의 천연 고분자와 poly(ethylene glycol)(PEG), poly(*N*-(2-hydroxypropyl)methacrylamide) 등의 합성 고분자가 있다.^{9,11,12} 특히 폐길화(PEGylation)에 사용되는 PEG는 생체적 합성이 뛰어나고 단백질과 같은 생체 분자와의 결합 및 흡착 억제 효과로 체내 안정성 및 표적화능이 우수한 나노입자 제조에 사용되고 있다. 다양한 약물들의 효능 개선이 PEG 컨쥬게이션을 통해 이루어지고 있으며, PEG-Intron, Krystexxa, Pegasys 등 상용화된 제품도 다수 있다.¹³

Kataoka 그룹에서는 PEG 블록 공중합체에 DOX를 결합시켜 만든 나노입자가 우수한 수용해도와 재분산성을 가지며 혈청 알부민과의 상호작용을 줄여주고 생체 분포 시간과 치료효과를 향상시켜준다는 연구 결과를 발표했다.¹⁴ 이외에도 PEG와 DOX를 펩티드나 pH 변화에 의해 분해되는 결합을 이용한 고분자-약물 컨쥬게이트에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.¹⁵⁻¹⁷ 이러한 고분자 나노입자는 전신순환을 통한 EPR(enhanced permeability and retention) 효과에 기반하여 암조직으로의 선택적 전달 및 축적이 가능한 것으로 알려져 있으나, 표적화 효과에 있어서는 한계가 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁸ 최근에는 고분자 나노입자에 산화철과 같은 자성 나노입자를 봉입하여 자기장을 통해 표적화 약물전달 효율을 향상시키는 연구가 진행되고 있다.^{19,20}

산화철 나노입자(SPION)는 독특한 자기적 특성과 높은 생체적합성으로 바이오이미징, 약물전달시스템, 세포 및 단백질의 분리 등 다양한 바이오메디컬 분야에 폭넓게 활용되고 있

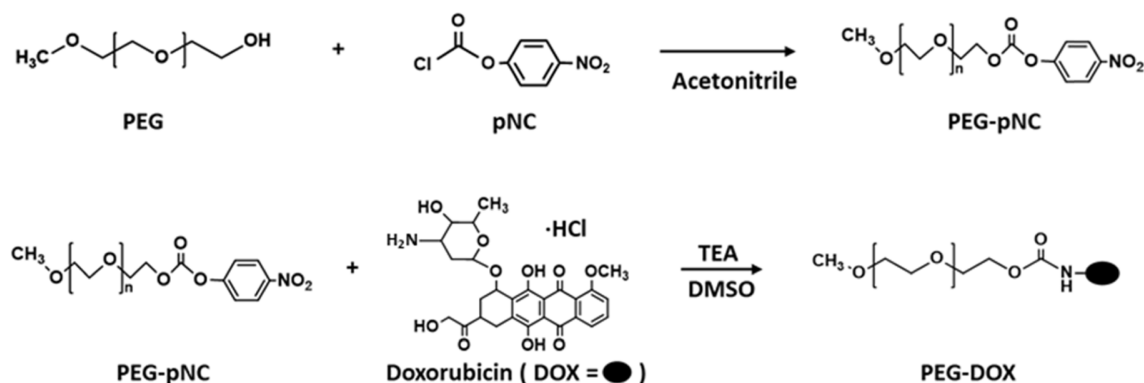
으며, 최근 진단 및 치료가 동시에 가능한 테라그노시스(theragnosis)용 나노제형에 유용하게 사용되고 있다.²¹ SPION은 자기장에 의한 표적화 치료가 가능하며 자기공명영상(MRI)을 통한 암 진단뿐만 아니라 외부에서 국부적으로 가해진 자기장과 EPR 효과에 의해 암 부위에 특이적으로 축적시킬 수 있어, 이를 통한 암 세포 내로의 효율적인 항암제 전달은 항암효과를 증가시킬 수 있고, 전신 부작용을 감소시킨다.²²⁻²⁴

본 연구에서는 친수성 고분자인 PEG와 소수성 항암제인 독소루비신의 화학적 결합을 통해 양친매성 PEG-DOX 컨쥬게이트를 합성하고, 자기조립을 통해 SPION을 효율적으로 봉입하여 다기능성 자성 나노입자(PEG-DOX/SPION NPs)를 제조하였다. 제조된 PEG-DOX/SPION NPs의 물리화학적 특성과 MR 조영제로서의 가능성을 확인하고, MTT assay를 통한 생체 외 세포 독성평가와 최대내성용량 결정을 위한 일반 독성평가를 수행하였다.

실 험

시약 및 시료. Methoxy poly(ethylene glycol) (PEG, Mn=2000), 아세토니트릴, 다이메틸설폭사이드(DMSO), Iron(II) chloride tetrahydrate($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), Iron(III) chloride hexahydrate($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich사(미국)에서 구입하였다. 테트라하이드로퓨란(THF), 트리에틸아민(TEA), *p*-nitrophenyl chloroformate(pNC)는 Tokyo Chemical Industry 사(일본)에서 구입하였다. PEG는 70 °C 진공 상태에서 12시간 건조한 후 사용하였다. 다이에틸에테르와 암모니아수(NH_4OH)는 (주)삼전화학(한국)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Gibco-Invitrogen(Grand Island, NY, USA), 독소루비신(doxorubicin hydrochloride, DOX)은 MedKoo Biosciences(미국), 투석막(MWCO=1000 Da)은 Spectrum Laboratories, Inc.(미국)으로부터 각각 구매했다. 증류수는 3차 증류수를 사용하였다.

PEG-DOX Conjugate의 합성. PEG와 DOX의 직접적인 화학적 결합을 통해 PEG-DOX를 합성하였다(Scheme 1). PEG 10 g과 pNC 12.6 g을 40 mL의 아세토니트릴에 녹였다. 온도를 0 °C로 맞추고 TEA 4.4 mL를 천천히 넣어준 후 상온에서 24시간 반응시켰다. 반응이 진행됨에 따라 생성된 흰색 침전물인 TEA·HCl은 원심 분리와 실린지 필터를 사용하여 제거하였다. 반응용액을 과량의 차가운 다이에틸에테르에 침전시킨 후 진공오븐에서 건조하여 PEG-pNC를 얻었다. PEG-DOX는 PEG-pNC 1 g과 독소루비신 0.27 g을 30 mL의 DMSO에 녹인 후 24시간 동안 교반 하에서 반응시켰다. 반응용액을 이를 동안 증류수에서 투석(MWCO=1000 Da) 후 동결건조하여 파우더 형태의 생성물을 얻었다. 합성된 고분자의 화학적 조성은 ¹H NMR(AVANCE III 600, Bruker, 미국)을 이



Scheme 1. Synthetic scheme for the PEG-DOX conjugate.

용하여 분석하였고, 용매는 DMSO- d_6 을 사용하였다. 또한 ATR-IR(Nicolet iS 5, Thermo Scientific, 미국) 분석을 통하여 합성 고분자의 특성 피크를 확인하였다. 스펙트럼은 4 cm^{-1} 의 분해능에서 16회 스캔하였으며 $500\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 범위에서 측정하였다. DOX의 결합비를 확인하기 위해 UV-vis 분광광도계를 이용해 분석하였다.

SPION의 제조 및 특성분석. SPION의 합성은 기존에 보고된 공침전법을 이용하여 제조하였다.^{25,26} 80°C 로 가열된 1 L의 증류수에 $\text{FeCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.235 g)와 $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.639 g)를 1:2 몰 비로 넣은 후 5.2 mL의 암모니아수를 서서히 첨가한다. 반응에 따라 반응용액의 색깔이 연한 갈색에서 진한 갈색으로 바뀌며 침전물이 생성되는 것을 확인하였다. 반응 후 상온으로 냉각시키고 초음파 처리를 한 후 안정하게 분산된 SPION을 얻는다. 분산된 SPION은 탄소 코팅된 구리 그리드 위에 분산 및 건조시킨 후 가속 전압 300 kV 하에서 TEM(Tecnaï G2, FEI Company, USA) 분석을 통해 형태학적 분석을 하였다. 제조된 SPION은 진동시료형자력계(VSM)를 이용하여 300 K에서 자화도를 측정하였다.

임계 미셀 농도(Critical Micelle Concentration, CMC) 측정. 형광 분석기(Cary Eclipse, Varian, USA)를 이용하여 합성된 PEG-DOX의 CMC를 측정하였다. Pyrene(Sigma-Aldrich, 미국)을 형광물질로 사용했으며, 소량의 THF에 녹인 후 3차 증류수에 희석하여 $6.0\times 10^{-7}\text{ M}$ 의 농도로 만들어 주었다. 65°C 에서 3시간 동안 교반하여 잔류 THF를 제거해주고 다양한 농도의 고분자 수용액 샘플들을 제조한 후 pyrene 용액을 고분자 용액과 1:1(v/v)로 혼합하였다. 혼합 시료는 12시간 동안 안정화시킨 후 방출파장 330 nm의 파장으로 excitation시킨 후 350~500 nm 파장대의 흡수 파장을 측정하였다.

PEG-DOX/SPION NPs의 제조 및 분석. 고분자를 녹인 DMSO 용액과 SPION 수용액을 고분자/SPION 중량비 8:2, 7:3, 6:4, 4:6으로 혼합 후 3차 증류수 하에서 하루 동안 투석한다. 시린지 필터($0.45\text{ }\mu\text{m}$)를 사용하여 여과 후 동결 건조를 통해 파우더 상태의 PEG-DOX/SPION NPs를 얻었다. 나노

입자에 봉입된 SPION 함량은 열중량 분석(TGA)을 통해 확인하였으며 승온속도 $10^\circ\text{C}/\text{min}$ 으로 질소 분위기에서 30°C 에서 800°C 까지 올린 후 잔류량을 측정하였다. 나노입자의 크기 및 분포는 1 mg/mL 농도의 나노입자 수용액을 제조하여 동적광산란법(dynamic light scattering, DLS) (ELS-Z, Photol, 일본)을 통해 분석하였다. 형태학적 분석을 위해 나노입자 수용액을 탄소 코팅된 구리 그리드 위에 분산 및 건조시킨 후 가속 전압 300 kV 하에서 TEM(Tecnaï G2, FEI Company, USA) 분석을 수행하였다.

자기공명영상 팬텀(Magnetic Resonance Imaging, MRI Phantom) 분석. MRI를 통한 가시화(visualization)를 확인하기 위하여 PEG-DOX/SPION NPs를 증류수에 분산시킨 후 9.4T/160 mm MRI system(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 이 때 무선주파수 자극과 신호 감지에 40 mm millipede coil을 이용하였다. T2 map은 다음과 같은 조건으로 분석되었다. TR, 3000 ms; TE, 10-150 ms; 15 echoes; average, 1; matrix, 128×128 ; FOV, $70\times 40\text{ mm}^2$; slice thickness, 1 mm; 1.5 mm gap.

세포독성 평가. MTT 분석 방법을 이용하여 PEG-DOX/SPION NPs의 세포독성을 평가하였다. 정상세포인 NIH3T3와 암세포인 HepG2를 사용하였으며, 세포를 $1\times 10^4\text{ cells}/\text{well}$ 농도로 주입한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 배지를 제거하고 시료를 농도별로 각 웰에 $200\text{ }\mu\text{L}$ 씩 처리하고 37°C , 5% CO_2 하의 배양기에서 24시간 동안 세포를 배양했다. 24시간 후 시료를 제거하고, MTT 용액($20\text{ }\mu\text{L}$, 5 mg/mL)을 각 well에 첨가하고 배양기에서 4시간 동안 더 배양하고 매질을 제거한 후, PBS buffer로 2회 세척하고, DMSO를 웰에 $150\text{ }\mu\text{L}$ 씩 주입하여, 세포와의 반응을 통해 형성된 보라색 formazan 결정을 용해시켰다. 각 웰에서 $100\text{ }\mu\text{L}$ 를 분취하여 마이크로플레이트 형광분석기(microplate spectrofluorometer; VICTOR 3 V Multilabel Counter, Perkin Elmer Wellesley, MA, USA)를 이용하여 570 nm 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 세포에 대한 활성을 100%로 하여 상대적인

생존율을 평가하였다.

최대 내성용량(Maximally Tolerated Dose, MTD) 평가. 합성된 나노입자의 기본적인 독성정보를 얻고자 시험 물질의 단회 투여를 통해 개략적인 치사량과 최대 내성용량을 평가하였다. 또한 체중 변화와 나노입자를 과량 투여할 때 발현되는 일반 독성과 급성적 자기손상을 부검을 통해 관찰하였다. 동물은 (주)오리엔트바이오(경기도 가평군)로부터 특정병원 체부재(SPF) SD(Sprague-Dawley)계 Rat 4주령, 12마리(암수 각각 6마리)를 공급받아 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실에 입수하여 약 일주일간의 순화기간을 거쳤다. 자외선 살균 장치를 거친 RO수와 실험용 설치류 전용사료(PURINA, USA)를 자유롭게 섭취하게 하였다. 실험동물사육실은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$ (RH), 조명시간 12시간 점등(조명 08:00~20:00), 시간 및 조도 150~300 Lux, 소음 60 dB 이하, 암모니아 농도 20 ppm 이하, 환기 횟수 최소 10~15회/시간(100% HEPA-filtered air)으로 설정되어 유지되었다. 본 동물실험은 동물실험 윤리규정을 모두 준수하여 실시하였고, 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실의 Institutional Animal Care and Use Committee(IACUC)에 의해 검토되었다.

Rat 수컷(149.5 ± 25.7 g)과 암컷(115 ± 20.1 g)에 Free DOX, PEG-DOX, PEG-DOX/SPION NPs를 복강 내로 투여하였으며, 임상 증상에 따라 용량을 높이거나 낮추어 매일 투여하는 것을 원칙으로 하였다. 개체가 사망하거나 임상증상이 있

는 경우, 새로운 개체로 시험하였다.

독성에 의한 임상 증상의 유무를 투여 전, 투여 직후 및 투여 1시간 후, 6시간 후, 24시간 후에 관찰하였고, 동물의 치사 여부는 오전 및 오후, 1일 2회 관찰하였다. 체중은 투여 개시 직전에 측정하고, 투여 개시 이후부터 각 개체에 대하여 매일 측정하고 기록하였다. 사망 개체는 발견 즉시 혀와 침샘, 흉강, 복강 장기(심장, 간, 신장, 비장, 폐장, 소장, 대장), 안구, 근육 및 좌골 신경을 분리하여 적출하였고, 주요 장기의 무게를 측정한 다음 조직학적 검사를 위해 10% 중성 완충 포르말린 용액에 고정하였다. 그 중 고환은 Bouin 고정액에 안구는 Davidson 고정액에 고정하였다. 고정한 장기·조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직 처리 과정을 거쳐 파라핀 블록을 제작하고 박절하였다. 박절한 조직 절편에 H&E(Hematoxylin and Eosin) 염색을 실시하고, 모든 개체의 조직 병리학적 변화를 관찰하였다. 안락사 개체의 부검은 마지막 투여 종료 후 isoflurane 마취 하에 배대 동맥으로 혈액을 채취한 후, 방혈하여 안락사시킨다. 안락사 후 외관의 육안적 관찰 및 위와 같은 방법을 통해 조직 병리학적 검사와 혈청학적 검사를 수행하였다.

결과 및 토론

PEG-DOX의 합성 및 분석. 생체 적합성이 우수한 친수성 고분자인 PEG와 소수성 항암제인 DOX를 컨쥬게이션하여

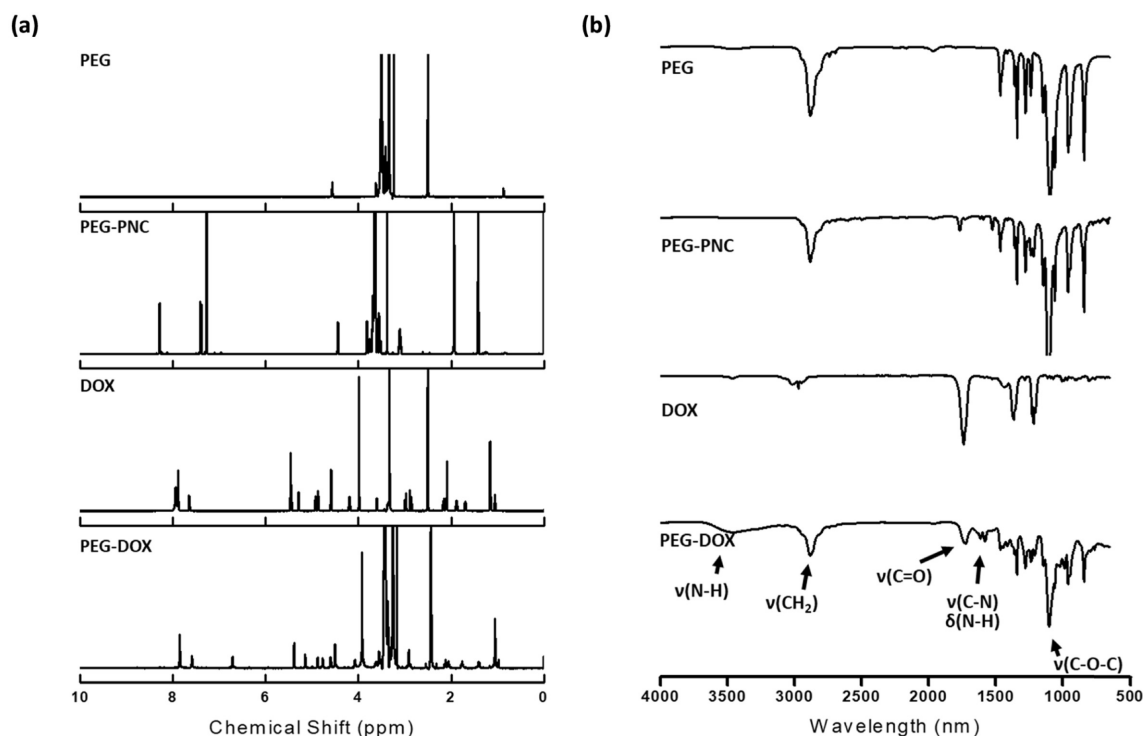


Figure 1. (a) ^1H NMR; (b) ATR-FTIR spectra of PEG, PEG-pNC, DOX, and PEG-DOX conjugate.

PEG-DOX를 합성하였다. DOX과 효율적인 컨주게이션을 위해 먼저 PEG의 OH 말단기를 pNC로 활성화시켜 PEG-pNC를 제조하였고, Figure 1(a)에서처럼 ^1H NMR 분석을 통해 7.4와 8.2 ppm에서 pNC의 특성피크가 나타나는 것을 확인하였다. PEG와 pNC의 특성피크들의 적분비를 통해 활성화율을 계산한 결과 PEG의 OH 말단기가 98% 이상 활성화된 것을 확인하였다. PEG-pNC에 DOX를 컨주게이션한 결과 pNC의 특성피크가 완전히 사라지고 DOX에 해당하는 특성피크가 7.5-7.9 ppm에서 나타나는 것을 확인하였다. DOX의 치환율을 UV/visible 분광분석법을 통해 측정한 결과 98% 이상 치환된 것을 확인하였다. Figure 1(b)에 PEG, PEG-pNC, DOX, PEG-DOX의 ATR-FTIR 분석결과를 나타내었다. PEG-pNC의 스펙트럼에서는 1730 cm^{-1} 에서 카보닐 그룹($\text{C}=\text{O}$)의 특성피크를 확인할 수 있었고, PEG-DOX에서는 1730 cm^{-1} 에서 카보닐 그룹($\text{C}=\text{O}$) 피크, 1104 cm^{-1} 에서 에테르 그룹($\text{C}-\text{O}-\text{C}$)의 피크, $1577\text{--}1613\text{ cm}^{-1}$ 에서의 우레탄결합(OCONH)의 특성피크를 확인함으로써 DOX과의 컨주게이션 반응이 성공적으로 일어났음을 알 수 있었다.

SPION의 제조 및 특성분석. SPION은 Fe^{2+} 와 Fe^{3+} 염에 염기를 첨가하여 공침전시키는 방법으로 제조하였다. 생성된 SPION을 TEM으로 분석한 결과 Figure 2(a)에서와 같이 약 10 nm 크기의 구형의 입자형태를 가지는 것으로 확인하였다. SPION의 자기적 특성을 분석한 결과 Figure 2(b)와 같이 자기장을 인가했을 때는 다른 문헌에서 보고된 결과와 유사한

약 10 emu/g 의 자화값을 보였고, 자기장을 제거하면 자화값이 0이 되는 초상자성 거동을 보였다.²⁷

임계 미셀 농도(CMC) 측정. 일반적으로 양친매성 고분자는 수용액 상에서 소수성 상호작용에 의한 자기조립 특성으로 나노입자를 형성하는 것으로 알려져 있다. 친수성 PEG와 소수성 약물인 DOX의 화학적 결합을 통해 얻어진 PEG-DOX의 수용액상 자기조립 나노입자 형성거동을 확인하기 위해 형광분석법을 통해 CMC를 측정하였다. 고분자의 농도에 따른 pyrene의 흡수스펙트럼에서 394와 374 nm 에서의 형광세기의 비(I_{394}/I_{374})가 급격히 변화하는 변곡점에 해당하는 농도를 CMC로 결정하였다. 측정된 CMC 값은 0.041 mg/mL 로 일반적인 양친매성 PEG 유도체가 보이는 CMC 값과 유사한 값을 가지는 것으로 확인되었다.²⁸

PEG-DOX/SPION NPs의 제조 및 특성 분석. Figure 3(a)에서와 같이 dialysis법을 이용하여 다양한 조성비의 SPION을 봉입한 PEG-DOX/SPION NPs를 제조하였고, 그 결과를 Table 1에 정리하였다. Figure 3(b)에와 같이 TGA를 이용한 함량분석 결과 PEG-DOX와 SPION의 혼합비가 8:2, 7:3, 6:4, 4:6일 때 봉입함량은 각각 18.7, 27.9, 39.1, 59.9%로 측정되었다. 얻어진 봉입함량이 SPION의 혼합비에 비례한 값을 보였고, 가장 높은 혼합비인 4:6의 경우에도 높은 봉입함량을 보였다. 모든 혼합비에서 봉입과정 중 SPION의 침전은 관찰되지 않았고 안정하게 분산된 나노입자 수용액을 얻을 수 있었다. Figure 3(c)는 PEG-DOX/SPION NPs의 TEM 분석결과를 보여주는 것으로 10 nm 내외의 SPION 입자들이 고분자 나노입자에 봉입되어 30~50 nm 크기의 소수성 코어를 구성하는 것으로 관찰되었다.

Figure 4는 DLS를 이용한 수용액상의 나노입자의 크기와 분포를 확인한 결과이다. 측정된 나노입자의 크기는 PEG-DOX/SPION20 NPs, PEG-DOX/SPION30 NPs, PEG-DOX/SPION40 NPs, PEG-DOX/SPION60 NPs의 경우 각각 103.4, 70.5, 66.7, 63.9 nm로 측정되었다. SPION을 함유하지 않은 PEG-DOX의 경우 148 nm로 측정되었고, SPION 도입 후 나노입자의 크기가 100 nm 이하로 감소하는 경향을 보였다. 이는 소수성 코어를 이루는 DOX 분자와 SPION 입자표면 간의 착체형성 등 적극적인 상호작용에 기인한 것으로 사료된다.²⁹⁻³²

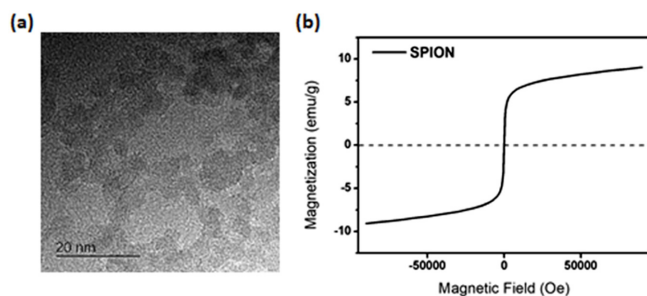


Figure 2. Characterization of SPION. (a) TEM image; (b) VSM magnetization curve.

Table 1. Preparation of PEG-DOX/SPION NPs

Sample name	Feed ratio (w/w) PEG-DOX:SPION	SPION loading content (%) ^a	Size (nm)
PEG-DOX	-	-	148.0±13.5
PEG-DOX/SPION20 NPs	8:2	18.7	104.3±3.05
PEG-DOX/SPION30 NPs	7:3	27.9	70.3±0.68
PEG-DOX/SPION40 NPs	6:4	39.1	66.9±0.15
PEG-DOX/SPION60 NPs	4:6	59.9	64.0±0.17

^aDetermined by TGA measurements.

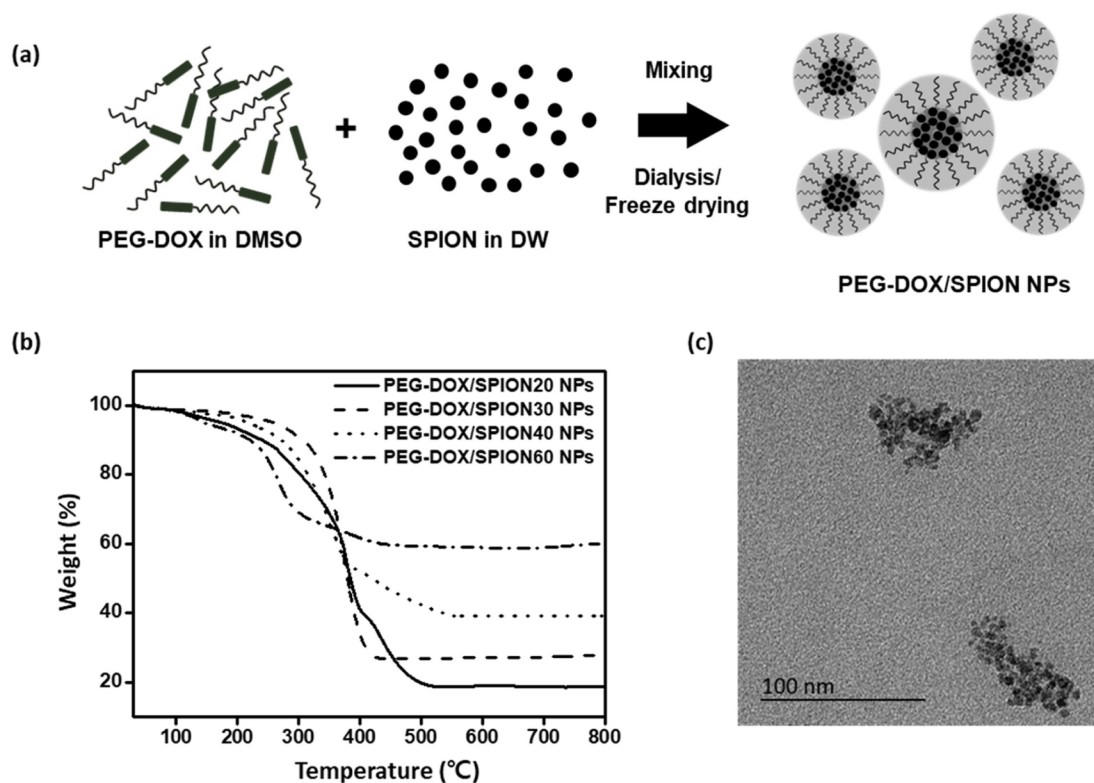


Figure 3. (a) Preparation; characterization ((b) TGA data and (c) TEM image) of PEG-DOX/SPION NPs.

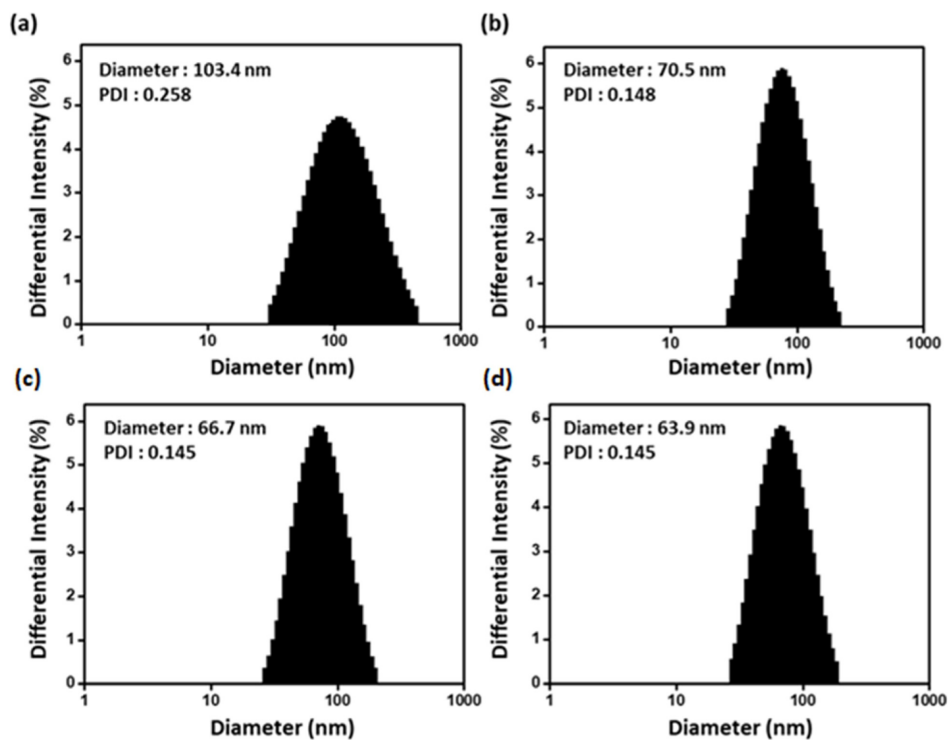


Figure 4. Particle size distribution of (a) PEG-DOX/SPION20 NPs; (b) PEG-DOX/SPION30 NPs; (c) PEG-DOX/SPION40 NPs; (d) PEG-DOX/SPION60 NPs.

자기공명영상 팬텀(Magnetic Resonance Imaging, MRI Phantom). SPION은 T2 조영제로 MR 영상에서 어둡게 나타난다. Figure 5(a)와 5(b)는 PEG-DOX/SPION NPs의 MR 팬텀 이미지와 신호의 강도를 나타내며, 자기공명영상 신호의 강도는 나노입자의 농도가 증가할수록 감소하였다. 감도는 일반적으로 상용화되고 있는 레조비스트(resovist®)와 비교하여 비슷한 감도를 보인다.^{33,34} 이러한 결과는 제조된 나노입자가 MR 조영제로서 응용이 가능하다는 것을 보여준다.

세포 독성평가. PEG-DOX/SPION NPs의 세포 독성평가를 위하여 쥐의 섬유아세포주인 NIH3T3과 사람의 간암 세포주인 HepG-2 cell을 이용하여 생체 외 세포 독성평가를 실시하였다. 독성평가 결과는 마이크로플레이트 형광분석기를 통하여 MTT의 흡광도를 측정하였다. Figure 6(a)와 6(b)를 보면 0.05~10 µg/mL의 7개의 DOX 농도 범위에서 24시간 동안 세포의 생존율을 측정한 결과 모든 세포에서 PEG-DOX가 DOX와 달리 10 µg/mL 농도 이하에서 세포 독성이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있다. NIH3T3세포와 HepG-2세포에서 IC₅₀ 값은 각각 DOX가 0.12, 0.45 µg/mL였고 PEG-DOX가 각각 9.65, 3.72 µg/mL의 값을 보였다. PEG-DOX/SPION NPs의 경우에도 DOX에 비해 세포독성이 낮았고 IC₅₀ 값은 나타나지 않았다. 이는 PEG-DOX/SPION NPs이 생체 내 안정한 물질임을 알 수 있으며 이러한 특성은 약물 특성에 의한 부작용을 줄여주고 고농도의 항암제를 전달하는데 효과적인 것으로

사료된다.

최대 내성용량(Maximally Tolerated Dose, MTD) 평가. 합성된 나노입자의 기본적인 독성정보를 얻고자 시험 물질의 단위 투여를 통해 최대 내성용량과 평가하고 부검을 통해 물질에 의한 손상을 평가하였다. 최대 내성용량의 경우 투여 시 사망하지 않은 가장 높은 용량으로 설정하였으며, 시험 결과 Free DOX 군에서는 50 mg/kg, PEG-DOX 군에서는 2000 mg/kg의 용량에서 암수 모두 사망하였다. 한편, PEG-DOX/SPION NPs 군에서는 300-2000 mg/kg까지의 범위에서 사망개체가 발생하지 않았으며 사망 양상으로 보았을 때 성별에 따른 차이는 보이지 않았다. 성장기의 개체(5-6주령)이었음에도 불구하고 대부분의 사망 개체가 꾸준한 체중 감소를 보였고, 조직병리학적 검사 결과로는 DOX를 투여한 경우 소장상피의 뚜렷한 변성 또는 소실, 소장 및 대장에서 자가 용해 외에 다른 소견은 보이지 않았지만 Figure 7(a)에서처럼 흉선의 위축과 대퇴골 및 흉골에서 골수의 세포충실도 감소가 관찰되었다. PEG-DOX를 투여한 경우에도 Figure 7(b)에서처럼 대퇴

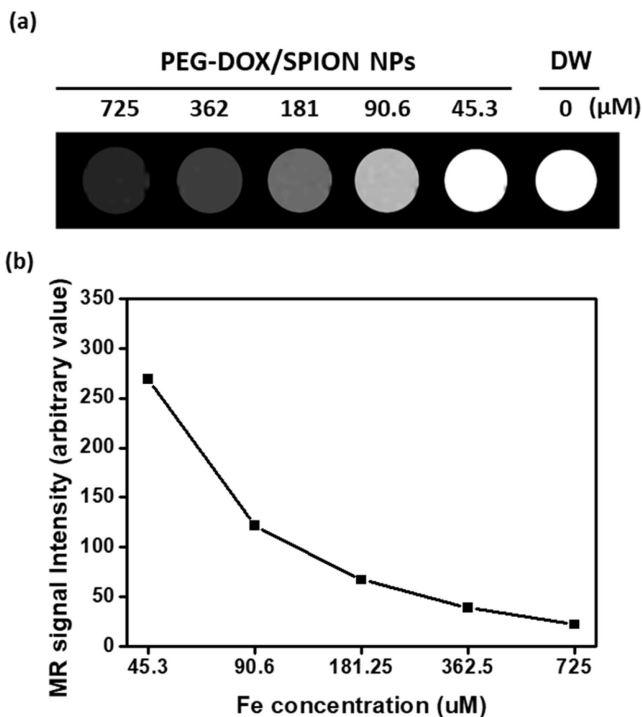


Figure 5. (a) T₂ MR phantom image; (b) T₂ MR signal intensity at different Fe concentration of the PEG-DOX/SPION30 NPs.

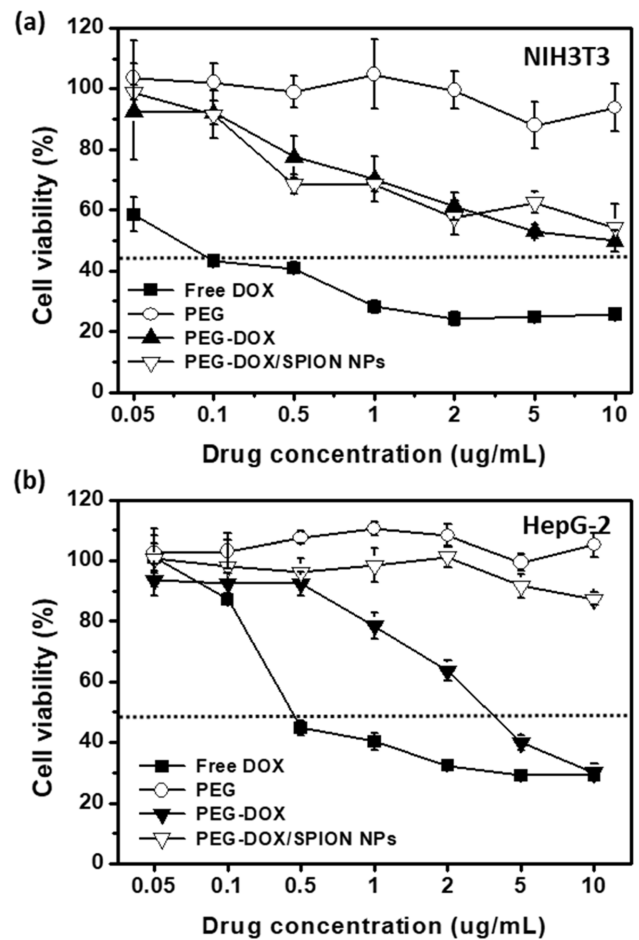


Figure 6. Cytotoxicity of DOX, PEG-DOX, and PEG-DOX/SPION30 NPs on (a) NIH3T3; (b) HepG-2 cell.

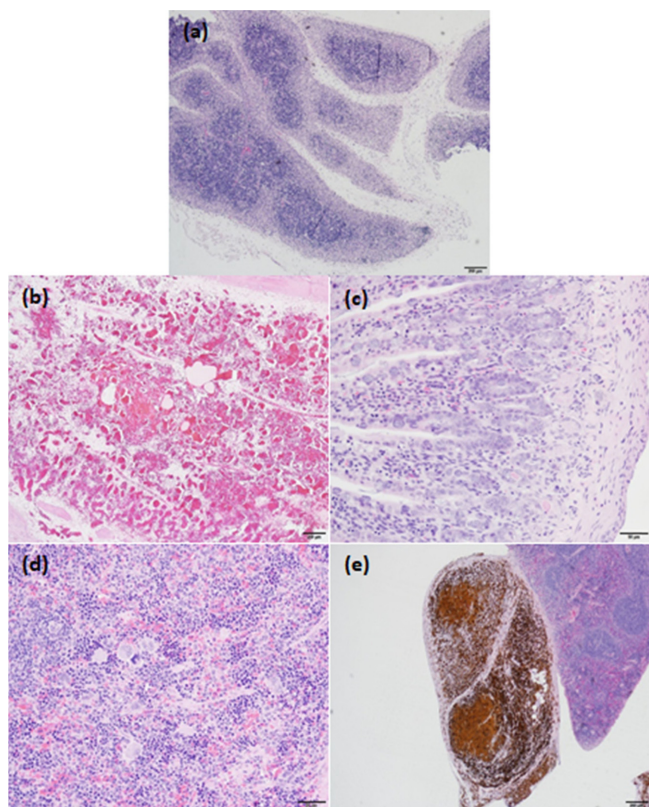


Figure 7. Histological examination. Free DOX; (a) Thymus, atrophy, marked, $\times 40$; (b) PEG-DOX; Femur (bone marrow), decreased cellularity, marked, $\times 40$; (c) PEG-DOX; Jejunum, degeneration/regeneration, moderate, $\times 200$; (d) PEG-DOX/SPION NPs; Spleen, extramedullary hematopoiesis, moderate, $\times 200$; (e) PEG-DOX/SPION NPs; Spleen, granulomatous inflammation, moderate, $\times 40$.

골 및 흉골에서 골수의 세포충실도 감소가 관찰되었고, 흉선 및 림프절은 심한 정도의 위축을 보였으며 Figure 7(c)의 장 점막의 염증세포 침윤 및 상피 변성 및 재생이 소장에서 뚜렷하게 관찰되었다. 또한 신장 피질에서 원위세뇨관의 확장, 세뇨관의 호염기성 증가가 미약한 정도로 관찰되었고, 간과 부신을 비롯한 복강장기와 폐 등 전신적으로 혈관 내 구균으로 추정되는 물질이 다수 발견되었다. PEG-DOX/SPION NPs를 투여한 경우 Figure 7(d)에서 보이듯이 간 및 비장에서 골수 외 조혈이 관찰되었고, Figure 7(e)의 물질을 탐식한 다수의 대식세포를 포함한 육아종성 염증이 복강 장막 전반에 걸쳐 관찰되었다. 신장에서는 원위세뇨관의 확장이 미약하게 있었고 여러 장기에서 탐식 대식세포가 관찰되었다. 결론적으로 조직병리검사 결과, DOX 및 PEG-DOX를 투여한 군에서는 전반적으로 소장 및 대장 점막 상피의 변성 및 재생(degeneration/regeneration), 골수의 세포충실도 감소(decreased cellularity)가 특징적이었다. PEG-DOX군은 다른 군들에 비해 비장, 흉선, 림프절 등 림프구 계열 조직 및 기관의 위축

Table 2. Maximum Tolerated Dose (MTD)

Sample name	MTD (mg/kg)
Free-DOX	45
PEG-DOX	1500
PEG-DOX/SPION NPs	2000

이 두드러지게 관찰되었다. PEG-DOX/SPION NPs를 투여한 군에서는 복강 전반에 걸쳐 물질을 탐식한 대식세포가 모여 형성한 육아종성 염증이 빈번하게 관찰되었다. 더불어 간과 비장에서 골수 외 조혈(extramedullary hematopoiesis)이 상당한 정도로 관찰되었다. 이외 나노입자의 영향으로 보이는 소견은 관찰되지 않았으며, Table 2와 같이 MTD는 성별에 관계없이 Free DOX 45 mg/kg, PEG-DOX 1500 mg/kg, PEG-DOX/SPION NPs 2000 mg/kg로 설정하였다.

결론

본 연구에서는 생체적합성이 뛰어난 PEG에 소수성 항암제인 DOX를 컨쥬게이션하여 PEG-DOX를 합성한 후, SPION을 봉입하여 PEG-DOX/SPION NPs를 제조하였다. 제조된 나노입자는 SPION을 60%까지 안정적으로 봉입할 수 있었으며, 100 nm 이내의 균일한 크기를 갖는 입자 형성이 가능하였다. 고함량의 항암제와 자성 나노입자로 구성된 나노입자는, Phantom 실험을 통해 MR 조영제로서 이용가능함을 확인하였다. DOX에 비해 현저히 낮은 세포독성을 보였고, 최대 내성용량 평가 결과 Free DOX, PEG-DOX, PEG-DOX/SPION NPs의 MTD값은 각각 45, 1500, 2000 mg/kg으로 나타났다. PEG-DOX/SPION NPs의 경우 최고농도인 2000 mg/kg에서도 사망개체가 발생하지 않았다. PEG-DOX/SPION NPs의 MR 조영 특성, 수동적 및 자석 표적화능 등 다양한 생기능성을 기반으로 암 진단 및 치료에 유용한 테라그노스틱 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 산업통상자원부 산업기술혁신사업 [10060059, 정밀 약물표적 및 방출기능을 갖는 외부 구동형 나노로봇 시스템 개발]으로 지원된 연구결과입니다.

참고문헌

1. A. Urruticoechea, R. Alemany, J. Balart, A. Villanueva, F. Vinals, and G. Capella, *Curr. Pharm. Des.*, **16**, 3 (2010).
2. H. Maeda, K. Greish, and J. Fang, *Adv. Polym. Sci.*, **193**, 103 (2006).
3. K. Chatterjee, J. Zhang, N. Honbo, and J. S. Karliner, *Cardiol.*, **115**, 155 (2010).
4. Y. Octavia, C. G. Tocchetti, K. L. Gabrielson, S. Janssens, H. J.

- Crijns, and A. L. Moens, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **52**, 1213 (2012).
5. M. Volkova and R. Russell, *Curr. Cardiol. Rev.*, **7**, 214 (2011).
6. K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. G. Chen, and D. M. Shin, *Clin. Cancer Res.*, **14**, 1310 (2008).
7. K. J. Cho, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **5**, 172 (2008).
8. A. Z. Wilczewska, K. Niemirowicz, K. H. Markiewicz, and H. Car, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 1020 (2012).
9. J. Khandare and T. Minko, *Prog. Polym. Sci.*, **31**, 359 (2006).
10. R. Mahato, W. Tai, and K. Cheng, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 659 (2011).
11. N. Larson and H. Ghandehari, *Chem. Mater.*, **24**, 840 (2012).
12. J. Kopeček, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 49 (2013).
13. P. L. Turecek, M. J. Bossard, F. Schoetens, and I. A. Ivens, *J. Pharm. Sci.*, **105**, 460 (2016).
14. M. Yokoyama, M. Miyauchi, N. Yamada, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, and S. Inoue, *Cancer Res.*, **50**, 1693 (1990).
15. F. M. Veronese, O. Schiavon, G. Pasut, R. Mendichi, L. Andersson, A. Tsirk, H. Ford, G. Wu, S. Kneller, J. Davies, and R. Duncan, *Bioconjugate Chem.*, **16**, 775 (2005).
16. H. Wang, J. He, D. Cao, M. Zhang, F. Li, K. C. Tam, and P. Ni, *Polym. Chem.*, **6**, 4809 (2015).
17. M. Pechar, A. Braunova, and K. Ulrich, *J. Bioact. Compat. Polym.*, **20**, 319 (2005).
18. J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **63**, 136 (2011).
19. T. Krasia-Christoforou and T. K. Georgiou, *J. Mater. Chem. B*, **1**, 3002 (2013).
20. V. Mulens, M. d. P. Morales, and D. F. Barber, *Int. Sch. Res. Notices*, **2013**, 14 (2013).
21. D. E. Lee, H. Koo, I. C. Sun, J. H. Ryu, K. Kim, and I. C. Kwon, *Chem. Soc. Rev.*, **41**, 2656 (2012).
22. S. D. Jo, S. H. Ku, Y. Y. Won, S. H. Kim, and I. C. Kwon, *Theranostics*, **6**, 1362 (2016).
23. R. Thomas, I. K. Park, and Y. Y. Jeong, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 15910 (2013).
24. R. A. Revia and M. Zhang, *Mater. Today*, **19**, 157 (2016).
25. S. H. Yuk, K. S. Oh, S. H. Cho, B. S. Lee, S. Y. Kim, B. K. Kwak, K. Kim, and I. C. Kwon, *Biomacromolecules*, **12**, 2335 (2011).
26. H. Lee, E. Lee, D. K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong, and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7383 (2006).
27. G. Gnanaprakash, S. A. Yyappan, T. Jayakumar, J. Philip, and B. Raj, *Nanotechnology*, **17**, 5851 (2006).
28. Y. Zhang, Y. Huang, W. Zhao, J. Lu, P. Zhang, X. Zhang, J. Li, X. Gao, R. Venkataramanan, and S. Li, *AAPS J.*, **16**, 1282 (2014).
29. J. Gautier, E. Allard-Vannier, E. Munnier, M. Souce, and I. Chourpa, *J. Control. Release*, **169**, 48 (2013).
30. J. Gautier, E. Munnier, L. Douziech-Eyrolles, A. Paillard, P. Dubois, and L. Chourpa, *Analyst*, **138**, 7354 (2013).
31. N. R. Bachur, R. D. Friedman, and R. G. Holenbeck, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **12**, 5 (1984).
32. M. Fiallo, A. Laigle, A. Garnier-Suillerot, C. Amirand, J. Dallini, L. Chinsky, M. Duquesne, B. Jolles, F. Sureau, P. Turpin, and P. Vigny, *Biochim. Biophys. Acta*, **1177**, 236 (1993).
33. D. C. Ha, H. Y. Lee, Y. W. Son, S. H. Yuk, Y. W. Choi, B. K. Kwak, B. C. Shin, C. W. Cho, and S. H. Cho, *Nanoscale Res. Lett.*, **9**, 38 (2014).
34. A. M. Reddy, B. K. Kwak, H. J. Shim, C. Ahn, H. S. Lee, Y. J. Suh, and E. S. Park, *J. Korean Med. Sci.*, **25**, 211 (2010).