

# 고분자 나노입자를 이용한 종양 영상 및 치료 기술

최기영 · 민경현 · 박재형 · 김광명 · 정서영

## 1. 서론

미 국립 암 센터에서 밝힌 바와 같이, 나노 기술은 암의 예방, 진단, 영상 및 치료에 있어서 중요한 기여를 할 수 있는 잠재력을 가지고 있다. 나노 기술을 통해 종양의 표적화가 가능해지고 종양에서의 병리/생리학적인 결함을 발견할 수 있다.<sup>1</sup> 또한, 약물, 유전자, 조영제를 질병 부위에 효과적으로 전달할 수 있으며 외부 자극에 의하여 약물 방출을 제어할 수 있을 뿐 아니라 약물의 반응 까지도 영상화할 수 있다.

나노입자는 quantum dots (QDs),<sup>2</sup> 고분자 나노입자,<sup>3</sup> 금 나노입자,<sup>4</sup> 상자성 나노입자<sup>5</sup> 등 다양한 물질들을 조합하여 제조할 수 있는데 이

러한 나노입자들은 암세포에 비하여 100배에서 1,000배까지 작은 크기를 갖기 때문에 쉽게 세포 벽을 통과할 수 있다. 또한, 암 조직 주변에 존재하는 느슨한 신생 혈관 조직과 림프관을 통한 배출기능의 부족으로 인하여 나노입자가 다른 조직이나 기관보다 암 조직 주변에 쉽게 쌓이고 오래 머무르는 현상을 보이는데, 이를 EPR (enhanced permeability and retention) 효과라 한다.<sup>6</sup> 이러한 특징 때문에 나노입자를 이용한 시스템은 맞춤형되고 표적화된 약물 및 조영제 전달을 위하여 효과적으로 사용되고 있다.

한편, 기존의 저분자 약물의 투여와 비교하였을 때 고분자 나노입자를 이용한 전달 시스템을 통해 적게는 10배에서 많게는 100배에

최기영	민경현
2006 경희대학교 고분자공학과(학사)	2006 경희대학교 약학과(학사)
2008 경희대학교 나노의약생명과학과(석사)	2008 경희대학교 나노의약생명과학과(석사)
2008~ 경희대학교 나노의약생명과학과	2008~ 경희대학교 나노의약생명과학과
현재 (박사과정)	현재 (박사과정)

박재형	김광명	정서영
1996 성균관대학교 화학공학과(학사)	1997 성균관대학교 화학공학과(학사)	1975 서울대학교 약학대학 제약학과(학사)
1998 광주과학기술연구원 신소재공학과(석사)	1998 광주과학기술연구원 신소재공학과(석사)	1984 University of Utah (약학박사)
2002 광주과학기술연구원 신소재공학과(박사)	2003 광주과학기술연구원 신소재공학과(박사)	1986 University of Utah (Post-Doc)
2004 한국과학기술연구원 의과학연구소 (Post-Doc)	2004 한국과학기술연구원 의과학연구소 (Post-Doc.)	1993 한국과학기술연구원 선임연구원
2005 Purdue Univ., School of Pharmacy (Post-Doc)	2004~ 한국과학기술연구원 선임연구원	2005 한국과학기술연구원 책임연구원
2005~ 경희대학교 고분자·섬유신소재학과	현재	2005~ 경희대학교 약학대학 교수
현재 조교수		현재
2007~ 경희대학교 나노의약생명과학과 조교수		2007~ 경희대학교 약학대학 학장
현재		현재



### Polymeric Nanoparticles for Cancer Imaging and Therapy

한국과학기술연구원 의과학연구소 (Kwangmeyong Kim, Biomedical Research Center, Korea Institute of Science and Technology (KIST), 39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-791, Korea)

경희대학교 나노의약생명과학과 (Ki Young Choi, Kyung Hyun Min, Jae Hyung Park, and Seo Young Jeong, Department of Life and Nanopharmaceutical Sciences, Kyung Hee University, Hoegi-dong, Dongdaemun-gu, Seoul 130-701, Korea)

e-mail: kim@kist.re.kr

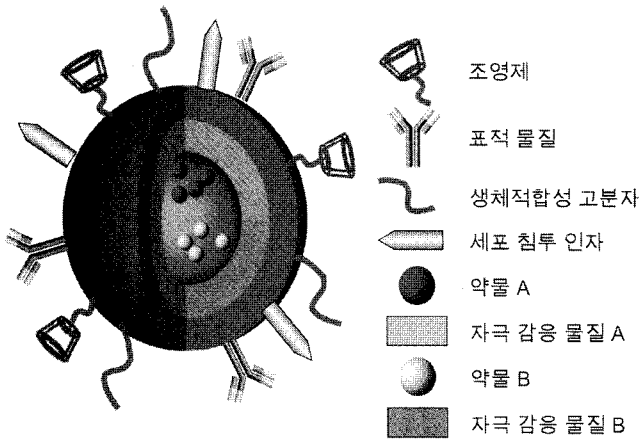


그림 1. 복합기능 고분자 나노입자의 모식도.

이르기까지 보다 많은 양의 약물이 종양 부위로 전달될 수 있고 이를 통해 약효 개선과 부작용 감소의 효과를 가져올 수 있다.<sup>7</sup> 따라서, 항암 치료를 위한 약물전달 시스템에서의 고분자 나노입자의 사용은 암 치료의 혁명적인 발전을 가져올 수 있는 가능성을 열어준다. 한편, 조영제가 도입된 고분자 나노입자 시스템은 광학영상, 자기공명영상(MRI) 등의 다양한 방법을 이용하여 암을 영상화할 수 있는 기회를 제공한다. 따라서, 우리는 암 표적화, 치료, 영상화 등의 다양한 특성들을 한데 모은 복합모드 시스템이 암과의 전쟁에서 유용한 접근방법이 될 수 있을 것이라 믿는다. 그림 1에서 묘사된 바와 같이, 다양한 화학적 방법을 사용하여, 여러 가지의 약물들과 조영제들이 봉입되고 암세포 특이적인 표적 물질들이 표지된 통합 나노입자 시스템의 구축이 가능하다.<sup>8,9</sup> 이러한 복합기능 고분자 나노입자들을 사용하면 암세포들을 감지하고 체내에서 암세포들의 위치를 정확히 파악하여 영상화할 수 있으며, 암세포들을 죽일 수 있을 뿐 아니라 약물의 반응까지도 관찰할 수 있다. 궁극적으로, 복합기능 고분자 나노입자 시스템은 암을 진단하고 치료하기 위한 목적뿐만 아니라 암을 예방하는데 있어서도 획기적인 변화를 가져올 것이며, 최근 부각되고 있는 개인 맞춤형 의학 분야에 있어서도 밝은 미래를 제시할 수 있을 것이다. 본 특집에서는 암의 진단과 치료에 있어서 고분자 나노입자의 중요성을 설명하고 다양한 복합기능 고분자 나노입자 및 고분자 나노복합체들과 이를 응용한 활용 기술 등 최신의 연구 동향을 소개하고자 한다.

## 2. 본론

### 2.1 광학 영상과 치료를 위한 복합기능 고분자 나노입자

#### 2.1.1 치료를 위한 고분자 나노입자

고분자 나노입자는 저분자 약물, 펩타이드, 단백질, 핵산 등을 함유하는 나노입자 치료제로 사용될 수 있다. 고분자 나노입자의 종류에는 고분자 마이셀, 리포솜, 그리고 고분자를 기반으로 한 나노입자 등이 있다. 전통적인 치료전략과 비교하면, 고분자 나노입자는 난용성 약물의 용해도를 증가시키고 약물의 반감기와 표적 지점의 특이성을 증가시킨다.<sup>10-12</sup> 더욱이, 대부분의 나노입자들이 EPR 효과를 통해서 종양 조직에 선택적으로 축적된다.<sup>6</sup> 그 결과, 고분자 나노입자는 일반세포에서의 독성은 감소시키고 종양세포에서 약물농도는 향상시키며 궁극적으로 강력한 치료 효과를 나타낸다. 아래에서, 우리는 임상적응에 있

어서 대표적인 고분자 나노입자 치료에 관하여 서술하고자 한다.

약물 결합을 위한 Ringsdorf의 연구는 표적지향적 고분자 약물 결합 개념을 탄생시켰다.<sup>13</sup> 고분자-약물 링커는 혈액에서 안정하고, 적절한 용량의 약물을 표적 부위에서 적절한 속도로 방출할 수 있도록 고안되었다. 대표적인 한 가지 예는 *N*-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide (HPMA) copolymer-Gly-Phe-Leu-Gly-doxorubicin (DOX) (PK1) 접합체이다.<sup>14,15</sup> 펩타이드 링커는 혈액에서 안정하지만 엔도사이토시스 과정을 통하여 세포 내부로 침투한 이후에는 라이소자임 효소인 캅테인 B에 의하여 끊어진다.<sup>16</sup> 임상 1상에서, 매 3주에 한번씩 용량을 증가시키면서 최대 내성 용량인(MTD) 320 mgm<sup>-2</sup> (DOX 기준)까지 약을 투여하였다. 이 용량은 DOX 자체 용량의 네 배에서 다섯 배나 높은 용량이다.<sup>17</sup> 비록 약물의 제한적 독성으로 호중구 감소증과 점막염을 보였지만, DOX의 전형적인 독성인 심장 독성이 나타나지 않는 한계 누적 용량은 1,680 mgm<sup>-2</sup>까지 증가하였다. DOX가 접합된 HPMA 고분자(Pk1), 파클리탁셀(PNU166945), 캅테인(MAG-CPT) 그리고 백금을 포함한 약물(AP5280 and AP5346) 등이 임상 실험 중에 있다. 하지만, MAG-CPT와 PNU 166945는 고분자-약물 에스터본드의 빠른 가수분해 때문에 각각 방광독성과 신경독성을 보이고 있다. 따라서, MAG-CPT와 PNU 166945의 경우에는 고분자-약물 결합 부분의 링커를 좀더 최적화할 필요가 있다.

자가 조립 고분자 마이셀은 오랫동안 연구되어 왔으며, 양친성 공중합체 형태로 제조되어 왔다. 대표적인 고분자 마이셀로는 NK911이 있다. NK911은 PEG와 고분자 아스파르트산(PEG-PAA)에 DOX가 접합된 공중합체로 구성되어 있다. NK911의 전임상 연구를 통해서 NK911의 반감기가 2.8시간이고, 혈중 AUC는 DOX 자체보다 15-30배 정도 높으며 종양에서의 AUC는 2-3배 높다는 사실이 밝혀졌다. 임상 1상에서는 전체 고형암을 가진 23명의 환자에 대하여 3주에 한번씩 i.v.로 투약하였다.<sup>18</sup> 최대 내성 용량은 67 mgm<sup>-2</sup>로 관찰되었고 약물의 제한적 독성은 호중구감소증이었다. 23명의 환자 가운데 한 명의 환자에서 전이성 췌장암이 발견되었다. 임상 2상의 추천 용량은 3주에 한번씩 50 mgm<sup>-2</sup>를 투여하기로 결정되었다.

파클리탁셀(Taxol)은 임상에서 난소암, 유방암, 비소세포폐암, 흑색종 그리고 백혈병에 널리 사용되고 있다. 하지만, Taxol의 난용성 때문에 체내투여를 위해서는 Cremophor EL을 사용하여 용해 가능한 제형을 만들어야 하는데 이 제형은 환자에게 독성을 보인다. PEG-poly DL-젯산 공중합체로 구성되어있는 Genexol-PM은 Cremophor EL이 없는 새로운 Taxol 제형으로 동물실험에서 Taxol에 비하여 3배 높은 MTD를 보여주었다.<sup>19,20</sup> 임상 1상, 2상의 결과에 따르면 한국과 미국의 유방암 환자들에 대한 Genexol-PM의 추천 투여용량은 Taxol의 경우 3주에 한번씩 투여하는 용량인 175 mgm<sup>-2</sup>에 비하여 크게 증가된 300 mgm<sup>-2</sup>이었다. 임상실험 결과 39명의 환자들 가운데 5명(13%)은 완전 관해(CR)를 하였고, 19명(49%)은 부분 관해(PR)를, 13명(33%)은 불변(SD), 2명(5%)은 진행(PD)의 결과를 얻었다. 현재, 췌장암에 대한 임상 2상이 미국에서 진행되고 있다.

치료약물의 전달을 위하여 사용되는 리포솜 제제는 난용성 약물을 용해시키기 위하여 주로 이용되고 있다. 또한, 약물을 함유한 리포솜을 투여한 경우 약물 자체를 투여한 경우보다 많은 양의 약물이 종양에 축적되는 경향이 알려져 있다.<sup>21</sup> 대표적인 리포솜 제제인 DOXIL은 DOX를 함유한 80-90 nm의 크기의 PEG-리포솜이다. 표면이

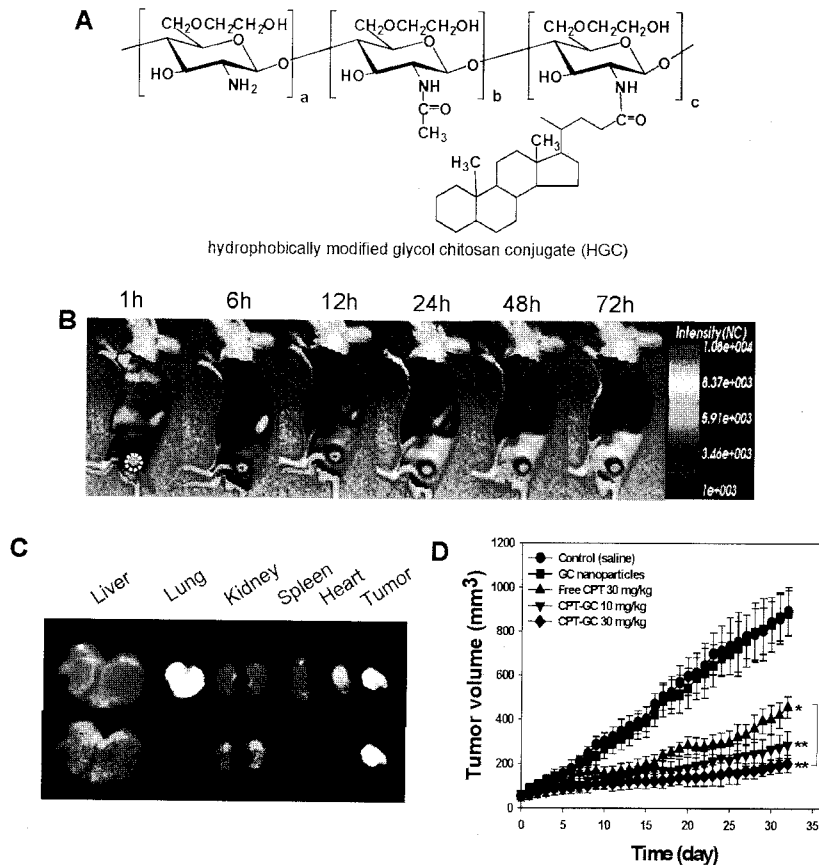
PEG로 이루어진 DOXIL은 면역체계에 의하여 외부 물질로 인식되고 분해되는 현상을 피할 수 있기 때문에 DOX 자체의 반감기보다 100 배 가량 증가한 84시간의 체내 반감기를 갖는다. 또한, 혈액 내에서 90% 정도의 DOX가 리포솜 내부에 봉입된 상태로 유지되며, 그로 인해 종양에 도달할 수 있는 많은 기회를 얻게 된다. 그러나, 리포솜 밖으로 새어 나온 DOX로 인한 독성으로 부작용이 생길 수 있는 가능성을 배제할 수는 없다. 원래, DOXIL은 AIDS 관련 카포시 육종으로 FDA에 승인을 받았으며 현재는 임상에서 난소암과 다기능성 골수종에 쓰이고 있다. 그리고, 다른 종양을 대상으로 한 실험도 임상 1상부터 3상까지 진행되고 있다. 하지만, 리포솜 제형은 약물 방출 시간을 조절할 수 없고 약물을 세포 내부까지 효과적으로 전달하기 힘들다는 단점이 있어 다약제 저항성 종양(multidrug-resistant cancer)에 적용하는 데에는 제한이 따른다.<sup>22</sup>

### 2.1.2 광학 영상을 위한 고분자 나노입자

펩타이드와 같은 다양한 저분자 물질들을 이미징 프로브로 사용하기 위하여 다양한 발색단을 펩타이드에 직접 표지하는 방법이 사용되어 왔다.<sup>23,24</sup> 그리고, 그것들 가운데 많은 프로브들이 *in vitro*와 *in vivo*에서 광목할만한 결과들을 보여주었다. 하지만, 저분자 이미징 프로브들이 비선택적 활성화, 불안정성, 독성 그리고 빠른 분해 속도 등의 특성을 가지고 있으며, 화학 반응 중에 발생하는 생물학적 활성의 변화 때문에 화학적 개질에 상당한 제약이 따른다. 반면에, 고분자를 기반으로 한 이미징 프로브는 표면적이 넓으며(쉽게 개질이 가능), 혈액 내 반

감기가 길고 높은 안정성을 갖는다. 또한, 독성이 적고 효과적인 표적화가 가능하다. 한편, *in vivo* 이미징에서 400-600 nm의 가시광선 범위의 RGB(red, green, blue) 형광체 사용은 조직의 자체형광과 헤모글로빈, 환원헤모글로빈과 수분 등 빛을 흡수하는 구성물들에 의해 제한된다. 하지만 근적외선(NIR)은 가시 광선에 비하여 깊은 부위의 조직까지 더 효과적으로 투과할 수 있다. 그 결과, *in vivo* 이미징의 응용에 근적외선 발색단(여기범위 650-900 nm)이 더욱 선호되고 있다.<sup>25</sup> 게다가, 근적외선 발색단을 사용하기 위해서는 사이클로트론이나, 방사선훈조를 붙이는 과정 혹은 고가의 장비를 사용하는 과정이 불필요하다는 장점이 있다.<sup>26</sup>

지난 10년 동안, 본 연구팀은 글리콜 키토산 기반의 나노입자 약물 전달체를 연구하였다. 글리콜 키토산을 사용한 이유는 이 물질이 생체 적합성과 생분해성 고분자이며 낮은 면역원성을 가지기 때문이다.<sup>27</sup> 본 연구팀에서 개발한 hydrophobically modified glycol chitosan(HGC) 나노입자는 글리콜 키토산 입자의 친수성 껍질 부분과 담즙산 유도체의 소수성 중심 부분으로 이루어져 있다(그림 2(A)).<sup>28,29</sup> 이 나노입자는 수용액 상태에서 200-400 nm 크기의 자가 집합체를 형성하고 PBS에서 1주동안 안정성을 가진다. 최근에는 다양한 분자량(20, 100, 250 kDa)을 갖는 NIR Cy5.5-labeled HGC(HGC-Cy5.5)가 개발되었으며<sup>30</sup> *in vivo* 체내분포 연구에서 높은 분자량(250 kDa)의 HGC-Cy5.5보다 낮은 분자량의 HGC-Cy5.5가 더 빨리 체내에서 제거되는 것을 발견하였다. 반면에, 높은 분자량의 HGC-Cy5.5는 낮



**그림 2.** (A) Hydrophobically modified glycol chitosan(HGC) 나노입자의 화학 구조; (B) 캄토테신이 봉입된 HGC-Cy5.5 나노입자의 시간에 따른 체내 거동 및 종양 표적화의 *in vivo* NIRF 실시간 광학 영상; (C) 캄토테신이 봉입된 HGC-Cy5.5 나노입자를 투여한 후 3일 이후에 적출된 장기 및 종양의 *ex vivo* NIRF 실시간 광학 영상; (D) MDA-MB231 종양이 이식된 동물모델에서 캄토테신이 봉입된 HGC 나노입자의 항암 효능.<sup>28</sup>

은 분자량의 HGC-Cy5.5보다 높은 종양 선택적 축적 경향을 보인다(20 kDa의 HGC-Cy5.5 보다는 4.1배, 100 kDa의 HGC-Cy5.5 보다는 2.4배). 250 kDa의 HGC-Cy5.5의 선택적 종양 축적 효능은 혈액 내 긴 순환 시간 때문일 것으로 사료된다. 이 프로브는 *in vivo*에서 고형암이나 종양관련 신생혈관의 영상화에 응용되고 있으며, 더 나아가 실험실 수준에서의 *in vivo* 체내분포(biodistribution)나 약물 동태(pharmacokinetics) 측정을 위한 용이한 방법을 제공할 수 있을 것으로 보인다.

하지만, 발색단이 표지된 나노입자 이미징 프로브의 주된 한계는 종양 대비 배경의 비율(TBR)이 높지 않다는 데 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해서는 생체분자나 특정 환경 변화를 정확하게 감지하고 영상화 할 수 있도록 펩타이드와 같은 생리 활성 감응 인자들을 도입할 필요가 있다. Weissleder 연구팀은 최초로 효소에 의해 잘리는 고분자 구조를 기반으로 한 활성화 이미징 프로브를 소개하였다.<sup>25</sup> 그들은 Cy5.5를 결합시키기 위해서 poly-L-lysine(PLL) 주사슬에 methoxy polyethylene glycol(MPEG)이 결합된 공중합체(PGC)를 이용하였으며 각 PLL 주사슬에 평균 92개의 MPEG 분자와 11개의 Cy5.5 분자가 결합되었다((Cy5.5)<sub>11</sub>-PLL-MPEG<sub>92</sub>). PGC 주사슬은 종양 부위의 느슨한 혈관 조직을 투과하여 종양에 쌓일 때까지 오랜 시간 동안 체내에서 순환하기 위한 전달체로서 기능을 한다. 또한, PGC 주사슬은 Cy5.5의 결합 부위로 사용되었는데, 이때 형광체인 Cy5.5는 서로 밀접하게 위치하여 형광체 간의 소광 효과를 나타낸다. 이 프로브의 PGC 주사슬에 남아 있는 lysine 그룹은 효소(cathepsin B(CaB)와 trypsin)에 의해 잘리는 부위로서 44개의 변형되지 않은 lysine 잔기를 가지고 이용한다. 이 프로브는 초기상태(소광상태)에서 동일한 몰 수의 Cy5.5 형광체 보다 15배 낮은 형광 세기를 나타내지만 효소반응에 의해서 잘린 후에는 소광상태의 프로브의 형광 량보다 12배 가량 높은 형광 세기를 보인다. 일련의 이미징 실험을 통하여 CaB 발현이 증가하는 류마티스성 관절염,<sup>31</sup> 동맥경화증<sup>32</sup> 같은 다른 질병들에 대해서도 동일한 현상이 관찰되었다. Lysine 주사슬과 Cy5.5 사이에 펩타이드가 도입된 구조를 갖는 다른 비슷한 프로브들도 역시 *in vivo*에서 다양한 프로테아제(proteases) (cathepsin D,<sup>33</sup> MMP-2,<sup>34</sup> caspase-1<sup>35</sup>)를 성공적으로 영상화하였다. 비록 이 PGC 기반 프로브들이 괄목할만한 이미징 결과를 보여주었지만, 몇몇 단점들로 인하여 이 프로브들의 사용이 제한된다. 비록 프로브에 결합된 PEG가 효과적으로 프로브의 안정성을 증가시키고 *in vivo* 체내 순환 시간을 연장시키지만, PEG 분자들의 입체 장애로 인하여 펩타이드와 효소간의 상호작용이 방해받으며<sup>36</sup> 그러한 방해 요소들은 프로브의 민감성을 현저하게 감소시킨다. 게다가 PGC 주사슬에 강하게 결합되어있는 Cy5.5 형광체는 그들간의 소광효과(quenching)를 효율적으로 증가시키지만, 반면 그들은 프로테아제(protease)에 의해 효과적으로 끊어지진 못할 수도 있다는 단점을 갖는다.

항암제 치료 과정에서 발생하는 세포사멸(apoptosis)을 영상화하기 위한 실시간 분자영상 기술은 항암제가 잘 작용하고 있는지 효과적으로 관찰할 수 있도록 도와주기 때문에 암환자 관리에 도움을 줄 수 있다.<sup>37</sup> 본 연구팀에서는 세포사멸의 초기 신호를 진단하기 위한 NIR 형광-활성화 고분자 나노입자를 개발하였다.<sup>38</sup> 우리는 친수성 고분자인 branched PEI에 소수성 분자인 deoxycholic acid(DOCA)를 접합시켜 만든 생체적합성 고분자 나노입자(PEI-DOCA)에 caspase-3에 잘리는 Cy5.5-DEVDC를 결합시킨 세포사멸 민감성 나

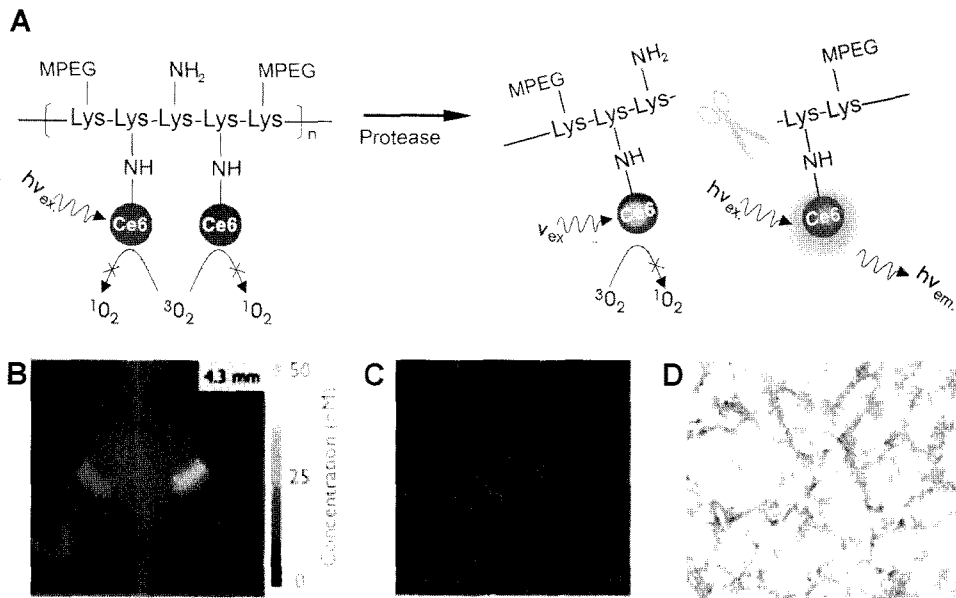
노입자(80-100 nm의 크기)를 개발하였다. PEI-DOCA 나노입자에 공간적으로 가까이 근접해있는 Cy5.5 분자들은 자가소광상태(self-quenched state)에 있다. 하지만, caspase-3가 존재할 때에는 근적외선 형광신호가 10배 증가한다. 종양 괴사 인자 세포사멸 유도 리간드(Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Lignad, TRAIL)를 HeLa 세포에 1시간 동안 처리를 한 후, 세포는 강한 근적외선 형광 신호를 나타내었고 세포사멸 시 발생하는 형태적(apoptotic morphology) 징후를 보여주었다. 반대로, caspase-3에 의해 잘리지 않는 펩타이드를 이용한 대조군의 경우 근적외선 형광 신호를 나타내지 않았다. 결론적으로 자가소광(self-quenched)된 고분자 프로브는 특정 caspase에 대한 매우 높은 특이성을 보여주었다. 이 프로브는 *in vitro*에서 약물의 전달과 세포사멸을 관찰하는데 적용될 수 있을 것이다.

### 2.1.3 광학 영상과 치료를 위한 복합기능 고분자 나노입자

고분자 나노입자는 약물의 치료 효능을 향상시키고 부작용은 줄일 수 있는 효과적인 약물전달시스템으로 사용되어 왔다. 더욱이, 종양 조직에 선택적으로 쌓이는 독특한 나노입자의 특징은 향상된 종양 진단을 위한 플랫폼 기술을 제공한다. 지금까지, 많은 고분자 나노입자가 종양의 영상화만을 위하여 혹은 치료만을 위하여 개발되어 왔다. 하지만 효과적인 종양 탐색과 치료를 위해서는 하나의 입자로 종양의 영상과 치료를 동시에 할 수 있는 새로운 통합적인 나노입자 시스템이 개발되어야 한다.

위에서 설명하였듯이, HGC 나노입자의 소수성을 지닌 나노입자 내의 중심부 때문에 나노입자는 파클리탁셀, 시스플라틴, 캄토테신, 도세탁셀, 그리고 치료 펩타이드와 같은 다양한 약물을 봉입할 수 있다.<sup>28, 39-42</sup> HGC는 파클리탁셀이나 도세탁셀의 낮은 용해도 문제를 해결하기 위해 사용되는 Cremophor EL을 사용하지 않고 파클리탁셀이나 도세탁셀을 녹일 수 있는 제형으로 사용될 수 있다.<sup>39,41</sup> 게다가 HGC는 가수분해로부터 약물의 활성을 보호할 수 있다. CPT와 그 유도체들은 가수분해에 파괴되어 생체 내나 염기성 상태에서 매우 불안정하다.<sup>43</sup> 따라서, PBS(pH 7.4)에서 24시간 후에 대부분의 CPT(60% 이상)는 6시간 내에 불활성의 카복실염기(carboxylate form)로 바뀐다. 하지만 CPT를 HGC에 봉입하였을 때에는 PBS(pH 7.4)에서 24시간이 지난 후에도 80%가 넘는 CPT 분자가 활성의 락톤체(lactone form)로 남아 있었다. 이러한 결과로부터 HGC가 약물의 활성을 유지시켜준다는 사실을 확인할 수 있었다. *In vivo* 형광 이미지에서 약물 함유 HGC-Cy5.5는<sup>28,40,41</sup> 생체 내에서 오랜 시간(대략 체내에서 3일) 동안 순환하며 정상 조직에서보다 두 배에서 네 배 가량 많은 HGC-Cy5.5가 암 조직에 축적된다는 것을 확인하였다(**그림 2(B),(C)**). HGC 나노입자의 암 조직에 대한 선택적인 축적 거동으로 인하여 약물 함유 HGC는 흑색종, 편평상피암 그리고 인간 폐암과 유방암 및 다른 몇 가지 암들에 대해서도 강력한 치료 효능을 보일 수 있었다.<sup>28,40,41</sup> 하지만, 여전히 약물동력학, MTD, 그리고 치료 반응성 등 HGC 나노입자의 체내 거동에 대한 더 많은 정보가 필요한 상황이다.

빛과 광감각제의 상호작용을 이용하는 광감각성 치료제(photo-dynamic therapy, PDT)는 종양치료를 위하여 사용되어 왔다. PDT는 빛을 조사하면 광감각제는 에너지를 산소분자에 전달시키고, 일회 산소(singlet oxygen)나 다른 활성 산소 종들(reactive oxygen species)을 만들어 내는데 이것들이 주위의 조직에 피해를 입히는 원리로 이



**그림 3.** (A) PM-PDT의 개념도; (B) 종양 동물 모델에서 Ce6의 체내 분포; (C) Ce-6가 집합된 L-PGC와 빛을 처리한 이후의 종양 조직 사진; (D) 빛을 조사한 이후 24시간 이후의 TUNEL 염색 사진.<sup>44</sup>

루어진다. 그러나, PDT는 몇 가지 단점을 가지고 있는데 PDT 약제의 제한된 종양 선택성과 눈이나 피부에서의 독성이 그것이다. 최근 Choi 연구팀에서는 이러한 불필요한 독성을 방지하기 위해서 protease를 매개체로 한 PDT (PM-PDT)를 제안하였다.<sup>44</sup> 효소로 끊어질 수 있는 이미징 프로브 개념을 기본으로 하여 PGC 고분자에 형광 신호와 단일산소 발생 (singlet oxygen generation, SOG)을 일으키는 광감각제인 chlorine e6 (Ce6)를 결합시켰으며 결합된 Ce6 분자들은 상호간에 자기-소광 (self-quenching) 현상을 일으킨다. 일단 protease CaB와 접촉을 하면, Ce6 집합 PGC (Ce6-PGC)가 끊기면서 강한 형광이 복원된다. 본래 상태에서 Ce6-PGC의 SOG는 동일한 물 농도의 Ce6와 비교했을 때 13% 정도에 불과하지만, CaB 처리 후에는 79%까지 올라간다. 한편, Ce6-PGC의 체내 투여 24시간 후에 HT1080 종양 부위에 많은 양의 Ce6-PGC가 축적되었으며 (그림 3(B)) Ce6-PGC의 분해 물질들이 주로 켈의 세포질에 분포하고 있었다 (그림 3(C)). 빛을 조사한 후에, 종양 조직에서 세포사멸과 심각한 조직 손상이 관찰되었다 (그림 3(D)). PM-PDT의 전략은 치료 이전에 표적지점과 약물의 농도를 시각화하고 주된 치료제로서 혹은 다른 치료법의 보조제로서 작용하도록 하는 것이다. 하지만, 이 접근방법은 빛의 조직 투과성의 한계 때문에 사용이 제한된다.

오늘날, 종양의 위치를 표적화하고 영상화할 수 있으며 다양한 약물들을 방출할 수 있는 수 있는 정교한 고분자 나노입자들이 개발되고 있다.<sup>45</sup> 종양 표적화와 치료 그리고 영상을 동시에 할 수 있는 복합기능 고분자 나노입자 시스템은 가까운 미래에 종양 치료와 영상을 위한 핵심 기술이 될 것이다.

## 2.2 복합모드(Multimodal) 영상과 치료를 위한 고분자-산화철 나노복합체(Magneto-Polymeric Nanohybrid)

자성 나노입자(magnetic nanoparticles, MNPs)는 MRI 기법을 통하여 다양한 암을 영상화하기 위한 중요한 방법으로 인식되어 왔다.<sup>46,47</sup> 최근에는 임상 진단 및 치료 방법에 있어서 자성 나노입자의 중요성이 부각되고 있다. 자성 나노입자의 안정성, 생체 적합성 및 질병 표

적성을 향상시키기 위해서는 다양한 물질들로 자성 나노입자의 표면을 코팅하거나 다양한 물질들을 자성 나노입자의 표면에 도입해야 하는데,<sup>48</sup> 일반적으로 표면 코팅 물질들로는 지질(lipid),<sup>49</sup> 단백질 (proteins),<sup>50</sup> 덴드리머(dendrimers),<sup>51</sup> PEG와<sup>52</sup> 다당류(polysaccharides)<sup>53</sup> 등이 있다. 임상에서 사용되는 MNPs는 Ferridex, Combidex, Resovist 및 AMI/gerumoxytol 등이 있으며, 이들 대부분이 덱스트란(dextran) 혹은 이와 비슷한 다당류로 코팅된 물질들이다. 그러나, 이러한 MNPs는 질병 부위에 대하여 특이성이 없고 신호 증폭에 있어서도 불만족스런 수준에 머무르고 있다. MRI 조영제의 특이성 및 신호 증폭을 개선시키기 위하여 최근에 종양 진단을 위한 MNP 기반의 표적화 프로브의 개발에 많은 관심이 집중된다. 한편, 약물을 전달하고 방출하기 위한 약물 전달체로서 MNPs를 응용하는 방법 또한 많은 관심을 받고 있다.<sup>54</sup> 표적화 물질들이 표지되고 약물이 함유된 복합기능 MNPs는 보다 정확하고 표적화된 진단/치료의 응용 기술로서 종양이나 분자/세포 수준에서의 손상을 인식하고<sup>51,55-59</sup> 이를 스스로 진단하며 손상된 조직을 치료할 수 있는 진단 치료에의 응용 가능성을 열어주었다.

### 2.2.1 복합모드 영상과 약물 전달을 위한 나노복합체

MNPs는 대조 영상을 위한 MRI 조영제로서뿐만 아니라 암의 진단과 치료를 위하여 표적화된 약물 전달체로서 사용되고 있다. MNPs를 진단과 치료에 응용하기 위한 한가지 효과적인 방법은 MNPs에 약물 및 표적 물질을 접합시키는 것이다. 예를 들면, Kohler 연구팀에서는 folate receptor를 과발현하는 암세포를 표적화할 수 있는 치료제인 methotrexate (MTX)가 화학적으로 결합된 MNPs를 개발하였다.<sup>60,61</sup> MTX는 MTX 혹은 PEG-MTX의 COOH와 MNP 표면의 아민 그룹간의 아마이드 결합의 형성(amidation)에 의해서 MNPs와 결합되었다. 이때, MTX는 치료 약물로서 뿐만 아니라 folate receptor를 과발현하는 암세포를 표적화하는 기능을 갖는다.<sup>62</sup> 여러 종류의 세포들을 MNPs와 함께 2시간 가량 배양한 결과 MTX가 접합된 MNPs는 folate receptor를 과발현하는 FR+HeLa 세포에서 정상 세포에 비

하여 10배 가량 높은 세포 내 흡수를 보이며, MCF-7 세포에서는 정상 세포에서 보다 20배 가량 높은 세포 내 흡수 경향을 보였다. 특히, MNPs와 MTX의 화학적 결합은 생리학적 환경에서 안정한 결합을 보이지만, folate receptor를 과발현하는 세포 내로의 침투 이후에는 MTX가 낮은 pH 및 세포 내 효소들에 의하여 방출되어 암세포의 apoptosis를 유발시킨다. 반면에, MNPs에 결합된 MTX의 정상 세포에 대한 독성이 대단히 낮기 때문에 MTX가 결합된 MNPs는 folate receptor를 발현하는 암세포에 대해서는 심각한 독성을 보이면서도 정상 조직에 대한 부작용은 보이지 않는다.

MNPs의 표면을 코팅하는 고분자는 체내에서의 안정성과 생체적합성을 향상시키기 위하여 사용되어 왔다. 하지만, 인체 내의 생리적 환경에서 코팅된 고분자들이 벗겨져서 MNPs가 뭉칠 수 있는 가능성이 여전히 남아있다.<sup>63,64</sup> 이러한 체내에서의 뭉침을 방지하고 혈장 단백질의 흡착을 피하기 위해서 최근에는 코팅된 고분자를 열가교시킨 초상자성 산화철 나노입자(thermally crosslinked superparamagnetic iron oxide nanoparticles, TCL-SPIONs)가 개발되었다. 고분자로는 인체 내 흡착을 방지하기 위하여 Si-OH가 포함된 PEG 고분자, poly(3-(trimethoxysilyl)propyl methacrylate-r-PEG methyl ether methacrylate-r-acryloxysuccinimide)를 사용하였다.<sup>65</sup> TCL-SPIONs를 광학 영상/MRI 복합모드 영상 프로브로써 사용하기 위하여 TCL-SPIONs의 카르복실기를 아민 그룹으로 변환하여 근적외선 형광체인 Cy5.5와 결합시켰다.<sup>66</sup> MRI/형광 광학영상 이미지에서 TCL-SPIONs는 암에 대한 높은 축적성을 나타내었다. 더욱 최근에 그들은 약물전달 및 MRI 조영제의 복합 기능을 갖는 새로운 DOX@TCL-SPIONs를 개발하였다.<sup>67</sup> 그림 4(A)에서 볼 수 있듯이, 양전하를 띤 DOX는 음전하를 띤 TCL-SPIONs 표면의 고분자

와의 정전기적 인력에 의해 고분자 껍질 내에 봉입될 수 있다. 봉입된 DOX는 정상적인 혈관 조직의 중성 pH보다 다소 산성을 띤 종양 조직 주변에서 빠른 방출 거동을 보인다. 따라서, 정맥 주사된 DOX@TCL-SPIONs는 DOX만 투여한 경우보다 장기들에 대해서는 낮은 독성을 보이는 반면 암 조직에서는 뛰어난 치료 효과를 보인다. 그림 4(B)와 (C)에서와 같이, *in vivo* MR 영상과 광학 영상 이미지는 DOX@TCL-SPION가 폐암세포의 일종인 Lewis Lung Carcinoma(LLD)를 효과적으로 영상화할 수 있음을 보여주며, 그림 4(D)를 통하여 충분한 양의 DOX가 종양 조직에 전달되어 뛰어난 항암 효과를 나타냄을 확인할 수 있다.

### 2.2.2 복합모드 영상과 유전자 전달을 위한 나노복합체

Antisense oligonucleotides(ODNs)는 효율적인 antisense therapy를 위하여 사용되어 왔다. 하지만, 임상에서 antisense therapy가 사용되기 위해서는 엔도뉴클레아제(endonuclease)와 엑소뉴클레아제(exonuclease)와 같은 세포 내 효소에 의해서 빨리 분해되고 세포막을 투과하지 못하는 등의 다양한 문제점을 해결해야만 한다.<sup>68,69</sup> 덴드리머(dendrimer)는 다른 viral vector들 보다 사용하기에 안전하고 단순하며 대량 생산이 용이하기 때문에 뛰어난 nonviral vector로 알려져 있다.<sup>70,71</sup> 기존 안티센스 치료법(antisense therapy)의 단점을 해결하기 위하여 Pan 연구팀은 유전자 트랜스펙션(gene transfection)을 위한 전달체로서 polyamidoamine(PAMAM) 덴드리머가 접합된 MNPs를 합성하였다.<sup>72</sup> 우선, G<sub>0</sub> dMNP를 만들기 위하여 MNPs의 표면을 3-aminopropyl-trimethoxysilane(APTS)로 코팅하였으며, 이후 과량의 methacrylate를 첨가하였다. 그 다음, 행금 과정을 거치고 과량의 ethylenediamine을 첨가하여 G<sub>0</sub> dMNP의 methacrylate 그룹이 아민기로 개질된 G<sub>0</sub> dMNP를 제조하였으며 metacrylate와

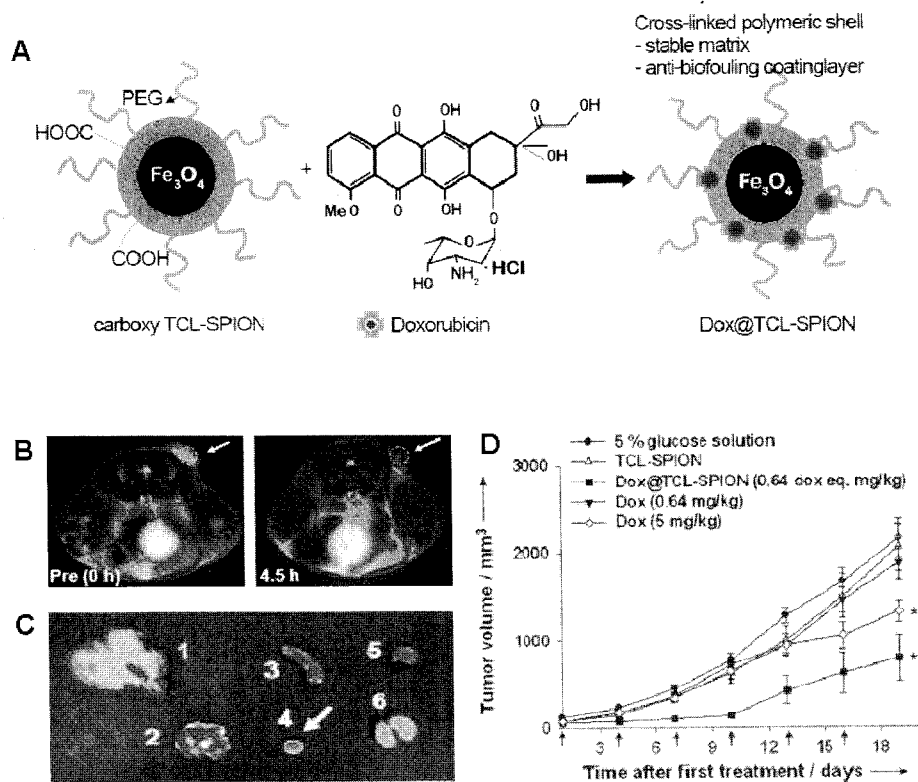


그림 4. (A) DOX@TCL-SPIONs의 모식도; (B) DOX@TCL-SPION를 투여한 후 0시간과 4.5시간에 촬영된 T2 영상; (C) 주요 장기들 및 종양의 광학 영상; (D) 약물을 처리한 이후의 종양 크기 성장 억제 효과.<sup>67</sup>

ethylenediamine을 사용한 단계적 성장 과정을 원하는 세대 수( $G_{1.0}$ – $G_{5.0}$ )까지 반복하였다. 덴드리머의 세대 수가 증가함에 따라 정전기적 인력으로 dMNP에 흡수되는 antisense surviving ODN의 양도 증가하였다. 강한 양전하를 띠는  $G_{5.0}$  dMNP는 암세포의 세포막을 통과하여 세포 내 흡수가 활발히 이루어지며, 암 세포의 성장이 억제될 뿐만 아니라 survivin 유전자와 단백질의 발현도 억제되었다. 이러한 결과는 dMNP가 고효율의 유전자 전달 시스템으로써 셀 내부의 효소에 의한 분해로부터 ODN을 보호한다는 사실을 보여주었다.

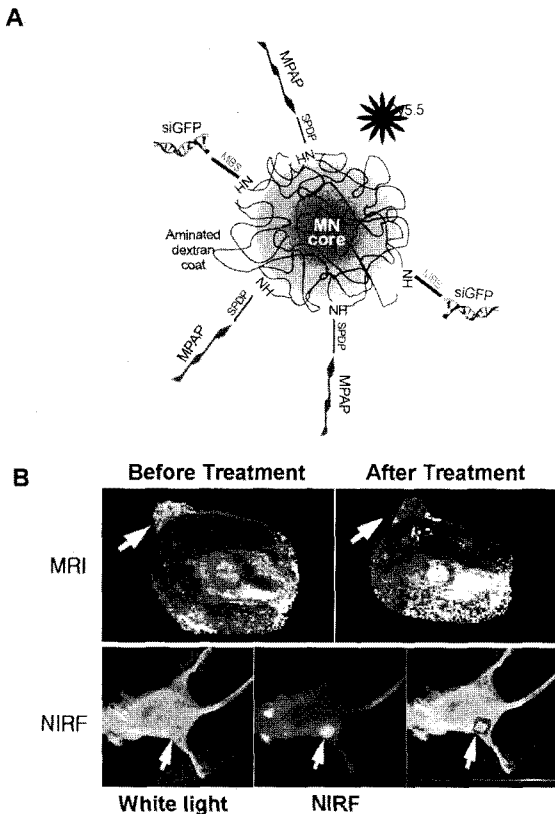
siRNA는 세포질 내에서 RNA 간섭현상(RNA interference, RNAi)의 매개체 역할을 하는 짧은 이중 나선구조의 핵산 분자이다. siRNA 자체로는 세포 내로 침투할 수 없기 때문에 siRNA를 치료제로 사용하기 위해서는 표적 세포의 내부로 siRNA를 효과적으로 전달할 수 있어야 한다. 이를 위하여 리포좀(liposome),<sup>73</sup> 나노입자(nanoparticle)를<sup>74</sup> 포함한 다양한 siRNA 전달 시스템이 개발되었다. 현재까지 siRNA의 생체 영상화 기술은 최근에 siRNA-mediated silencing의 생물 발광 영상화(bioluminescence imaging) 기술에 국한되어 왔다.<sup>75</sup> 하지만, 최근에는 MRI와 근적외선 광학영상기술(NIRF optical imaging)을 사용하여 종양에서의 siRNA 축적을 영상화하고 siRNA를 종양 부위로 효율적으로 전달하기 위하여 복합기능 MNPs를 이용한 비 침습적인 복합모드 영상 기술이 개발되었다.<sup>76</sup> 이를 위하여 치료를 위한 표적 유전자인 siRNA를 Cy5.5로 표지된 MNPs에 공유결합을 통하여 도입하였고 세포 내 침투를 위하여 myristoylated polyarginine peptides(MPAP, membrane translocation peptide)로 MNPs의

표면을 개질하였다(그림 5(A)).<sup>77</sup> NIRF 및 MRI를 통하여 종양 조직 내에서의 복합기능 MNPs의 거동을 추적한 결과 MNPs를 통하여 siRNA 기반의 치료제를 효과적으로 전달하고 영상화할 수 있음을 확인하였다(그림 5(B)). 하지만, 위의 연구팀은 생체 내에서의 효율적인 gene silencing에 관한 정확한 기전을 이해하기 위해서는 더욱 세밀한 연구가 필요할 것이라는 점도 분명히 하였다.

### 2.2.3 복합기능 고분자-산화철 나노복합체

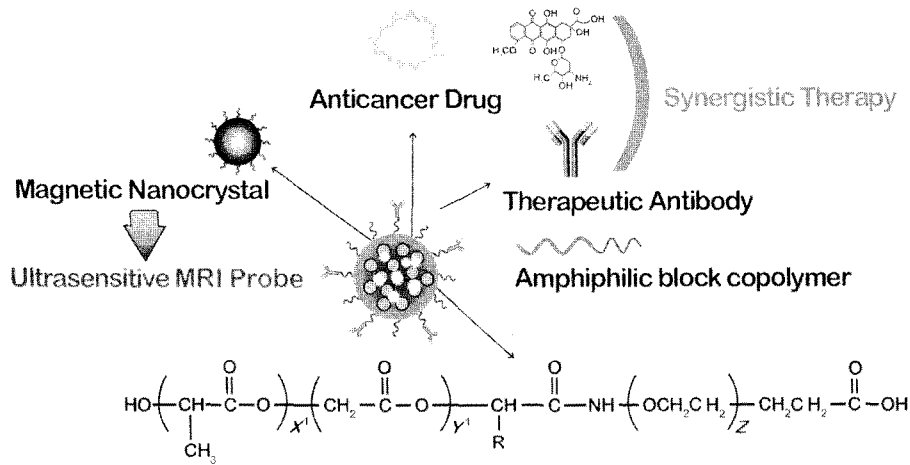
생체적합성 고분자들이 표적화 약물전달 시스템에 적합하다는 사실에 기초하여<sup>78,79</sup> Yang 연구팀에서는 MRI 조영제, 항암제, 항체(antibodies) 및 생분해성 양친성 블록 공중합체까지 한 시스템에 접목시킨 MNPs 복합기능 나노복합체 시스템을 제안하였다. 나노 에멀전 방법을 사용하여 소수성 자성 나노결정체와 DOX를 poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA)-PEG-COOH에 봉입하였고 그 후에 human epidermal growth factor receptor 2(HER)을 도입하여 HER-MMPNs(multifunctional magneto-polymeric nanohybrids)를 합성하였다(그림 6(A)).<sup>80</sup> HER-MMPNs는 높은 농도(1 mM of MMPNs)에서나 다양한 염 농도에서, 그리고 다양한 pH 범위에서도 뛰어난 입자의 안정성을 보였다. 또한, HER-MMPNs는 고분자의 분해에 따른 서방성 약물방출 거동을 보였다. *In vitro* MR 이미지는 비 특이적 항체를 표지한 MMPNs(IRR-MMPNs)를 처리한 세포에서 보다 HER-MMPNs를 처리한 세포에서  $R_2(T_2^{-1})$  값이 대략 320% (NIH3T6.7), 57%(MDA-MB231) 가량으로 높으며, HER-MMPNs의 세포에 대한 친화도에 있어서도 MDA-MB231 세포에 대한 친화도에 비하여 NIH-3T6.7 세포에 대한 친화도가 4.4배 가량 높다는 사실을 보여주면서 MMPNs가 HER2/neu 수용체에 대한 효과적인 표적화 시스템이라는 것을 증명하였다. HER-MMPNs의 NIH3T6.7에 대한 표적화는 *in vivo* MR 영상을 통하여 관찰되었다(그림 6(B)). 또한, 암 세포 특이적인 HER-MMPNs의 세포 내 기질로의 침투(tumor-target-mediated endocytosis)로 인하여 DOX가 세포 내에서 효과적으로 방출되었으며 이는 세포의 성장과 증식을 억제하여 뛰어난 종양의 성장 억제 효과를 보여주었다(그림 6(C)).

Brain Ross 연구팀에서는 빛에 의해서 활성화되는 테라그노스틱(theragnostic, 진단 치료용) 나노시스템을 개발하였다. 이 나노복합체 시스템은 polyacrylamide(PAA) core와 Photofrin(PDT 제제), 산화철(MRI 조영제), F3-peptide(tumor vascular homing peptide) 그리고 체내 순환 시간을 연장시키기 위하여 PEG를 포함하고 있다.<sup>81</sup> 세포 내 흡수를 관찰하기 위하여 나노입자를 형광체인 Alexa Fluor 594로 표지하였다. 만들어진 나노입자는 40 nm의 입자크기를 보인다. 세포와 나노복합체를 4시간 가량 배양한 후 상당량의 F3 표적화 나노입자가 MDA-MB435 유방암 세포 내로 침투하였으며 빛을 조사해준 이후 90% 가량의 세포사멸이 관찰되었다. MRI 이미지 결과는 10분 안에 표적화/비표적화 나노입자들 모두가 암에 축적되었으며 2시간 이후 비표적화 나노입자들은 glioma(9L) tumor로부터 사라졌으나 F3 표적화 나노입자들은 계속해서 축적되었다는 사실을 보여주었다. Dynamic scanning MRI 결과를 통하여 F3 표적화 나노입자들의 종양 내 반감기를 비표적화 나노입자와 비교하였을 때 39분에서 123분으로 연장되었다는 사실을 발견하였다. 나노복합체의 치료 효과를 보는 실험에서는 F3 표적화 나노입자들이 상당 부분의 암 세포에서 괴사를 유발하였으며 종양의 크기도 두드러지게 감소하였다는 사실을 확인하였다. 또한, 비표적화 나노입자나 Photofrin만을 투여한 경우



**그림 5.** (A) 근적외선 형광체 Cy5.5, 세포 침투 펩타이드(MPAP)와 siRNA 표적 유전자 물질이 결합된 복합기능 나노프로브의 모식도; (B) 약물 처리 이전과 이후의 LS174T 암세포가 이식된 동물 종양모델의 *in vivo* MR 영상 및 NIRF 광학 영상.<sup>76</sup>

A



B



C

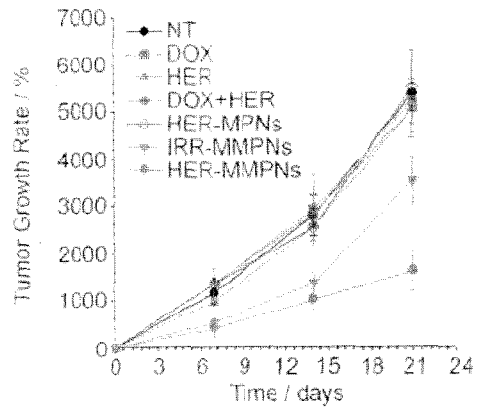


그림 6. (A) MMPNs의 제조 모식도; (B)HER-MMPNs의 암 표적화 MR 영상; (C) 동물 모델에서의 치료 효능 실험 결과.<sup>80</sup>

나 레이저만을 조사한 군에 비하여 F3 표적화 나노입자를 투여한 군의 생존 기간이 크게 증가하였다. 특히 치료 60일 이후에 다섯 마리 가운데 3마리의 동물에서 뇌 종양이 완전히 사라졌다.

현재 MNPs는 다양한 질병들의 MRI를 위한 임상적인 도구로써 사용되고 있다. 가까운 미래에는 치료 약물과 표적화 물질, 그리고 MRI 조영제 등을 결합시킨 복합기능 MNPs의 새로운 발전으로 인해 질병에 대한 연구와 임상에 있어서의 정보의 축적이 가능해질 것이다.

### 3. 결론

종양 치료 및 영상을 위한 나노기술의 주요한 목적은 보다 안전하고 효과적인 진단 치료 방법을 개발하는 것이다. 종양 치료를 위한 약물전달 시스템 및 비침습적 종양 영상을 위한 복합기능 고분자 나노입자의 의료적인 응용은 그 가능성이 이미 입증되었으며 임상에서의 사용을 위한 큰 가능성을 지니고 있다. 복합기능 고분자 나노입자는 다양한 항암제들을 종양 부위로 전달하여 암세포의 증식과 관련된 생물학적 경로를 차단시킨다. 이러한 나노입자들은 치료제들의 약효를 증가시키며 부작용은 극적으로 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 복합기능 고분자 나노입자를 사용한 *in vivo* 바이오 이미징은 상용화된 이미징 기술을 사용하여 인식할 수 있는 크기보다 훨씬 더 작은 크기의 종양을 진단할 수 있는 능력을 갖는다. 더욱이 치료 이후에는

기대한 바와 같은 치료 효과를 보이는지에 대한 빠른 정보를 얻을 수 있다. 나노플랫폼 기술은 종양 치료를 위한 분야에서 중요성이 점점 증가되고 있으며, 이 기술은 이후 수 십년간 지속적으로 발전할 것으로 보인다. 그러나, 많은 나노플랫폼 기술은 아직 개발 초기 단계에 있으며 나노플랫폼 기술이 임상 실험에 적용되고 제품화되기 전까지는 아직 더욱 많은 연구가 필요하다. 가장 중요한 점은, 나노기술이 정밀한 안전성 시험을 거쳐야 하며, 일반적인 제품화를 위한 대량생산 과정과 연관된 문제점들을 해결해야 한다는 것이다. 종양 영상과 치료를 위한 나노플랫폼 기술의 응용은 아직 시작 단계에 있으며 갈 길이 멀다. 하지만, 나노 바이오 기술의 실용 가능성은 미래의 치료/진단 기술을 위한 새로운 도구로써의 잠재력을 보여주고 있다.

### 참고문헌

1. X. Wang, L. Yang, Z. G. Chen, and D. M. Shin, *CA Cancer. J. Clin.*, **58**, 97 (2008).
2. W. C. Chan and S. Nie, *Science*, **281**, 2016 (1998).
3. J. S. Hrkach, M. T. Peracchia, A. Domb, N. Lotan, and R. Langer, *Biomaterials*, **18**, 27 (1997).
4. L. R. Hirsch, A. M. Gobin, A. R. Lowery, F. Tam, R. A. Drezek, N. J. Halas, and J. L. West, *Ann. Biomed. Eng.*, **34**, 15 (2006).



5. D. L. Thorek, A. K. Chen, J. Czupryna, and A. Tsourkas, *Ann. Biomed. Eng.*, **34**, 23 (2006).
6. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *J. Control. Release*, **65**, 271 (2000).
7. G. Kaul and M. Amiji, *Pharm. Res.*, **19**, 1061 (2002).
8. N. Sanvicens and M. P. Marco, *Trends Biotechnol.*, **26**, 425 (2008).
9. V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1532 (2006).
10. T. M. Allen and P. R. Cullis, *Science*, **303**, 1818 (2004).
11. D. F. Emerich and C. G. Thanos, *Biomol. Eng.*, **23**, 171 (2006).
12. Y. E. Koo, G. R. Reddy, M. Bhojani, R. Schneider, M. A. Philbert, A. Rehemtulla, B. D. Ross, and R. Kopelman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 1556 (2006).
13. H. Ringsdorf, *J. Polym. Sci. OPolym. Symp.*, **51**, 135 (1975).
14. L. W. Seymour, K. Ulbrich, P. S. Steyger, M. Brereton, V. Subr, J. Strohal, and R. Duncan, *Br. J. Cancer*, **70**, 636 (1994).
15. E. Gianasi, M. Wasil, E. G. Evagorou, A. Keddle, G. Wilson, and R. Duncan, *Eur. J. Cancer*, **35**, 994 (1999).
16. P. Rejmanova, J. Kopecek, R. Duncan, and J. B. Lloyd, *Biomaterials*, **6**, 45 (1985).
17. P. A. Vasey, S. B. Kaye, R. Morrison, C. Twelves, P. Wilson, R. Duncan, A. H. Thomson, L. S. Murray, T. E. Hilditch, T. Murray, S. Burtles, D. Fraier, E. Frigerio, and J. Cassidy, *Clin. Cancer Res.*, **5**, 83 (1999).
18. Y. Matsumura, T. Hamaguchi, T. Ura, K. Muro, Y. Yamada, Y. Shimada, K. Shirao, T. Okusaka, H. Ueno, M. Ikeda, and N. Watanabe, *Br. J. Cancer*, **91**, 1775 (2004).
19. T. Y. Kim, D. W. Kim, J. Y. Chung, S. G. Shin, S. C. Kim, D. S. Heo, N. K. Kim, and Y. J. Bang, *Clin. Cancer Res.*, **10**, 3708 (2004).
20. K. S. Lee, H. C. Chung, A. S. Im, Y. H. Park, S. B. Kim, C. S. Kim, and J. Ro, *J. Clin. Oncol.*, **24(Suppl. 18)**, 10520 (2006).
21. V. P. Torchilin, A. N. Lukyanov, Z. Gao, and B. Papahadjopoulos-Sternberg, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6039 (2003).
22. W. C. Zamboni, *Clin. Cancer Res.*, **11**, 8230 (2005).
23. S. A. Boppart, A. L. Oldenburg, C. Xu, and D. L. Marks, *J. Biomed. Opt.*, **10**, 41208 (2005).
24. A. M. Morawski, G. A. Lanza, and S. A. Wickline, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **16**, 89 (2005).
25. R. Weissleder, C. H. Tung, U. Mahmood, and A. Bogdanov, Jr., *Nat. Biotechnol.*, **17**, 375 (1999).
26. X. Chen, P. S. Conti, and R. A. Moats, *Cancer Res.*, **64**, 8009 (2004).
27. Y. Zhang and M. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.*, **62**, 378 (2002).
28. K. H. Min, K. Park, Y. S. Kim, S. M. Bae, S. Lee, H. G. Jo, R. W. Park, I. S. Kim, S. Y. Jeong, K. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **127**, 208 (2008).
29. S. Kwon, J. H. Park, H. Chung, I. C. Kwon, S. Y. Jeong, and I.-S. Kim, *Langmuir*, **19**, 10188 (2003).
30. K. Park, J. H. Kim, Y. S. Nam, S. Lee, H. Y. Nam, K. Kim, J. H. Park, I. S. Kim, K. Choi, S. Y. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **122**, 305 (2007).
31. A. Wunder, C. H. Tung, U. Muller-Ladner, R. Weissleder, and U. Mahmood, *Arthritis. Rheum.*, **50**, 2459 (2004).
32. J. Chen, C. H. Tung, U. Mahmood, V. Ntziachristos, R. Gyurko, M. C. Fishman, P. L. Huang, and R. Weissleder, *Circulation*, **105**, 2766 (2002).
33. C. H. Tung, S. Bredow, U. Mahmood, and R. Weissleder, *Bioconjug. Chem.*, **10**, 892 (1999).
34. C. Bremer, C. H. Tung, and R. Weissleder, *Nat. Med.*, **7**, 743 (2001).
35. S. M. Messerli, S. Prabhakar, Y. Tang, K. Shah, M. L. Cortes, V. Murthy, R. Weissleder, X. O. Breakefield, and C. H. Tung, *Neoplasia*, **6**, 95 (2004).
36. J. M. Harris and R. B. Chess, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 214 (2003).
37. D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer, *Cell*, **96**, 245 (1999).
38. K. Kim, M. Lee, H. Park, J. H. Kim, S. Kim, H. Chung, K. Choi, I. S. Kim, B. L. Seong, and I. C. Kwon, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3490 (2006).
39. J. H. Kim, Y. S. Kim, S. Kim, J. H. Park, K. Kim, K. Choi, H. Chung, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **111**, 228 (2006).
40. J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, S. Lee, H. Y. Nam, K. H. Min, H. G. Jo, J. H. Park, K. Choi, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, K. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **127**, 41 (2008).
41. H. Y. Hwang, I. S. Kim, I. C. Kwon, and Y. H. Kim, *J. Control. Release*, **128**, 23 (2008).
42. J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, E. Kang, S. Lee, H. Y. Nam, K. Kim, J. H. Park, D. Y. Chi, R. W. Park, I. S. Kim, K. Choi, and I. Chan Kwon, *Biomaterials*, **29**, 1920 (2008).
43. P. Opanasopit, M. Yokoyama, M. Watanabe, K. Kawano, Y. Maitani, and T. Okano, *J. Control. Release*, **104**, 313 (2005).
44. Y. Choi, R. Weissleder, and C. H. Tung, *Cancer Res.*, **66**, 7225 (2006).
45. Y. Xing, A. M. Smith, A. Agrawal, G. Ruan, and S. Nie, *Int. J. Nanomedicine*, **1**, 473 (2006).
46. E. A. Schellenberger, F. Reynolds, R. Weissleder, and L. Josephson, *ChemBiochem.*, **5**, 275 (2004).
47. A. Peer, S. Strauss, E. Witz, H. Manor, and A. Eidelman, *Eur. J. Radiol.*, **15**, 220 (1992).
48. J. Qin, S. Laurent, Y. S. Jo, A. Roch, M. Mikhaylova, Z. M. Bhujwalla, R. N. Muller, and M. Muhammed, *Adv. Mater.*, **19**, 1874 (2007).
49. N. Nitin, L. E. LaConte, O. Zurkiya, X. Hu, and G. Bao, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 706 (2004).
50. C. Wilhelm, C. Billotey, J. Roger, J. N. Pons, J. C. Bacri, and F. Gazeau, *Biomaterials*, **24**, 1001 (2003).
51. J. W. Bulte, T. Douglas, B. Witwer, S. C. Zhang, E. Strable, B. K. Lewis, H. Zywicke, B. Miller, P. van Gelderen, B. M. Moskowitz, I. D. Duncan, and J. A. Frank, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1141 (2001).
52. L. Illum, A. E. Church, M. D. Butterworth, A. Arien, J. Whetstone, and S. S. Davis, *Pharm. Res.*, **18**, 640 (2001).
53. K. E. Kellar, D. K. Fujii, W. H. Gunther, K. Briley-Saebo, A. Bjornerud, M. Spiller, and S. H. Koenig, *J. Magn. Reson. Imaging*, **11**, 488 (2000).
54. M. F. Kircher, U. Mahmood, R. S. King, R. Weissleder, and L.

- Josephson, *Cancer Res.*, **63**, 8122 (2003).
55. R. Weissleder, A. Moore, U. Mahmood, R. Bhoradc, H. Benveniste, E. A. Chiocca, and J. P. Basilion, *Nat. Med.*, **6**, 351 (2000).
  56. H. W. Kang, L. Josephson, A. Petrovsky, R. Weissleder, and A. Bogdanov, Jr., *Bioconjug. Chem.*, **13**, 122 (2002).
  57. M. Zhao, D. A. Beauregard, L. Loizou, B. Davletov, and K. M. Brindle, *Nat. Med.*, **7**, 1241 (2001).
  58. Y. M. Huh, Y. W. Jun, H. T. Song, S. Kim, J. S. Choi, J. H. Lee, S. Yoon, K. S. Kim, J. S. Shin, J. S. Suh, and J. Cheon, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12387 (2005).
  59. J. H. Lee, Y. M. Huh, Y. W. Jun, J. W. Seo, J. T. Jang, H. T. Song, S. Kim, E. J. Cho, H. G. Yoon, J. S. Suh, and J. Cheon, *Nat. Med.*, **13**, 95 (2007).
  60. N. Kohler, C. Sun, J. Wang, and M. Zhang, *Langmuir*, **21**, 8858 (2005).
  61. N. Kohler, C. Sun, A. Fichtenholtz, J. Gunn, C. Fang, and M. Zhang, *Small*, **2**, 785 (2006).
  62. S. J. Duthie, *Nutrition*, **17**, 736 (2001).
  63. Y. Zhang, N. Kohler, and M. Zhang, *Biomaterials*, **23**, 1553 (2002).
  64. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.*, **53**, 283 (2001).
  65. H. Lee, E. Lee, K. Kim, N. K. Jang, Y. Y. Jeong, and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 7383 (2006).
  66. H. Lee, M. K. Yu, S. Park, S. Moon, J. J. Min, Y. Y. Jeong, H. W. Kang, and S. Jon, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 12739 (2007).
  67. M. K. Yu, Y. Y. Jeong, J. Park, S. Park, J. W. Kim, J. J. Min, K. Kim, and S. Jon, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **47**, 5362 (2008).
  68. D. T. Denhardt, *Ann. NY Acad. Sci.*, **660**, 70 (1992).
  69. I. Tarkanyi, A. Horvath, I. Szatmari, H. Eizert, G. Vamosi, S. Damjanovich, E. Segal-Bendirdjian, and J. Aradi, *FEBS Lett.*, **579**, 1411 (2005).
  70. I. J. Majoros, A. Myc, T. Thomas, C. B. Mehta, and J. R. Baker, Jr., *Biomacromolecules*, **7**, 572 (2006).
  71. D. R. Radu, C. Y. Lai, K. Jefinija, E. W. Rowe, S. Jefinija, and V. S. Lin, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 13216 (2004).
  72. B. Pan, D. Cui, Y. Sheng, C. Ozkan, F. Gao, R. He, Q. Li, P. Xu, and T. Huang, *Cancer Res.*, **67**, 8156 (2007).
  73. T. S. Zimmermann, A. C. Lee, A. Akinc, B. Bramlage, D. Bumcrot, M. N. Fedoruk, J. Harborth, J. A. Heyes, L. B. Jeffs, M. John, A. D. Judge, K. Lam, K. McClintock, L. V. Nechev, L. R. Palmer, T. Racic, I. Rohl, S. Seiffert, S. Shanmugam, V. Sood, J. Soutschek, I. Toudjarska, A. J. Wheat, E. Yaworski, W. Zedalis, V. Koteliansky, M. Manoharan, H. P. Vornlocher, and I. MacLachlan, *Nature*, **441**, 111 (2006).
  74. D. W. Bartlett and M. E. Davis, *Bioconjug. Chem.*, **18**, 456 (2007).
  75. F. Takeshita, Y. Minakuchi, S. Nagahara, K. Honma, H. Sasaki, K. Hirai, T. Teratani, N. Namatame, Y. Yamamoto, K. Hanai, T. Kato, A. Sano, and T. Ochiya, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12177 (2005).
  76. Z. Medarova, W. Pham, C. Farrar, V. Petkova, and A. Moore, *Nat. Med.*, **13**, 372 (2007).
  77. M. Mae and U. Langel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **6**, 509 (2006).
  78. S. Sengupta, D. Eavarone, I. Capila, G. Zhao, N. Watson, T. Kiziltepe, and R. Sasisekharan, *Nature*, **436**, 568 (2005).
  79. O. C. Farokhzad, J. Cheng, B. A. Teply, I. Sherifi, S. Jon, P. W. Kantoff, J. P. Richie, and R. Langer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6315 (2006).
  80. J. Yang, C. H. Lee, H. J. Ko, J. S. Suh, H. G. Yoon, K. Lee, Y. M. Huh, and S. Haam, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **46**, 8836 (2007).
  81. G. R. Reddy, M. S. Bhojani, P. McConville, J. Moody, B. A. Moffat, D. E. Hall, G. Kim, Y. E. Koo, M. J. Woolliscroft, J. V. Sugai, T. D. Johnson, M. A. Philbert, R. Kopelman, A. Rehemtulla, and B. D. Ross, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 6677 (2006).