

고분자 나노입자를 이용한 치료용 면역세포 바이오이미징

노영욱 · 권지나 · 정봉현 · 임용택

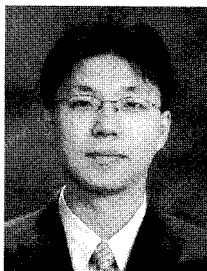
1. 서론

분자영상(molecular imaging)은 세포 내에서 일어나는 여러 분자 수준의 변화를 영상화 하는 기법으로 첨단영상기술과 분자세포생물학이 접목된 분야이며 의학, 유전학, 분자생물학, 세포학, 화학, 약학, 물리학, 의공학, 영상의학, 핵의학 등의 융합을 통하여 최근 급속히 발전하고 있는 분야이다. 생체분자영상의 중요한 이유는 연구하고자 하는 생체 대상이 살아있는 상태에서 세포 또는 분자 수준에서 일어나는 현상들을 영상을 통하여 직접 확인할 수 있도록 해주며 그러한 현상들을 정량화하여 분석할 수 있도록 해준다 는 것이다. 현재 임상적으로 사용되는 분자영상 방법과 그 특성은 표 1과 같다. 표 1에서 알 수 있듯이, 자기공명영상(MRI)을 이용하는 방법은 인체 내부까지 볼 수 있다는 점과, 공간 분해능(resolution)이 광학적인 방법에 비해 우수하다는 장점을 가지고 있다. 그렇지만 광학적인 방법에 비해 민감도(sensitivity)는 좋지 않으며 고가의 의료장비를 필요로 한다. 반면에 형광을 이용하는 광학적인 방법은 저가의 광학장비를 이용하면서도 민감도가 다른 분자영상 방법에 비해 우수한 특성을 가지고 있다. 이

러한 관점에서, 본 특집에서는 주로 자기공명영상과 광학영상 분야의 기술에 대한 내용을 주로 다루었다.

최근 고분자화학과의 융합은 질병의 진단 및 치료를 위한 새로운 분자영상 프로브를 유도하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이 현재 고분자기반 분자영상 프로브들은 생체친화성 고분자로 인해 독성이 낮고 혈류에서 오랫동안 머물 수 있어 생체안정성이 우수하며, 비특이적 결합(nonspecific interaction)을 줄임으로써 표적성을 향상시킬 수 있다.

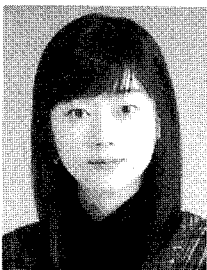
항암면역세포치료제의 개발과 더불어 최근에는 여러 영상기법들을 이용한 생체분자 영상(*in vivo* molecular imaging)에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 면역세포 치료과정에 있어서 면역세포의 이동에 관한 정보는 이들 면역세포의 역할을 예측하고 나아가 치료 시기와 방법을 결정하는데 절대적으로 필요하다. 그러므로 생체 내 세포 추적 영상에 관한 연구는 세포치료제 개발 연구에 중요한 위치를 차지하고 있다. 면역세포의 생체 내 분포와 이동 경로는 면역세포치료요법의 효과 판정에 매우 중대한 사항이므로, 면역세포의 표지 및 추적에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 본 특집에서는 항암면역세포 및 세포치



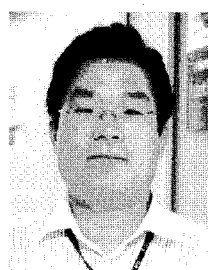
노영욱
2002 전북대학교 생물학과(학사)
2004 전북대학교 생물학과(석사)
2006~ 전북대학교 생물학과 박사과정
현재 한국생명공학연구원 바이오나노연구센터 연구원



정봉현
1982 서울대학교 화학공학과(학사)
1984 한국과학기술원 화학공학과(석사)
1987 한국과학기술원 화학공학과(박사)
1991 California Institute of Technology (Post-Doc)
2003~ 한국생명공학연구원 바이오나노연구센터장
2004~ 과학기술연합대학원대학교 나노바이오 전공 책임교수
2008~ 한국생명공학연구원 융합연구본부장
현재



권지나
2008 충남대학교 고분자공학과(학사)
2008~ 과학기술연합대학원대학교(UST) 석사과정
현재 한국생명공학연구원 바이오나노연구센터 연구원



임용택
1996 서강대학교 화학공학과(학사)
1998 한국과학기술원 화학공학과(석사)
2002 한국과학기술원 생명화학공학과(박사)
2003 하버드 의과대학 박사후 연구원
2004 한국전자통신연구원 바이오소자팀 선임연구원
2004~ 한국생명공학연구원 바이오나노연구센터 선임연구원

Bioimaging of Immunotherapeutic Cells Using Polymer Nanoparticles

한국생명공학연구원 바이오나노연구센터 (Young-Woock Noh, Jina Kwon, Bong Hyun Chung, and Yong Taik Lim, Bio-Nanotechnology Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, 111 Gwhangno, Yuseong-gu, Daejeon 305-806, Korea) e-mail: yongtaik@kribb.re.kr

표 1. 임상용 분자영상(Molecular Imaging) 기술의 특성 비교

Modality	Sensitivity	Resolution			
		Spatial	Temporal	Contrast	Cost
MRI	+	10-100 μm	msec	+++	+++
MRS	+	1 cm	min/h	+	+++
PET	+++	3-4 mm	min	++	+++
SPFCT	++	8-12 mm	min	+	++
Optical fluorescence.	+++	1-2 mm	msec	+++	+
US	+++	50 μm	msec	++	++

료제에 관하여 소개하고, 면역세포 추적에 위한 생체 분자 영상 기법의 연구 동향 및 고분자 물질을 이용한 면역세포 추적 분자 영상의 예를 기술하고자 한다.

2. 본론

2.1 면역세포

대표적인 항암면역세포로 수지상세포(dendritic cell), T세포, 자연

살해세포(Natural killer cell, NK cell)가 있다(그림 2). 수지상세포는 면역세포가 암세포를 인지할 수 있도록 보조하는 전문적인 항원제시세포(APC; antigen presenting cell)의 한 종류로, 식균(phagocytosis) 혹은 흡음작용(pinocytosis) 등을 통해 암항원을 포획한 후 분해하여 MHC 분자를 통해 세포표면에 표출함으로써 활성화되고 림프절(lymph node)과 같은 2차 면역기관으로 이동하여 암항원 특이적인 T세포의 활성을 유도하는 역할을 한다.

암세포를 직접 제거하는 기능을 하는 세포로는 세포독성 T세포(cytotoxic T lymphocyte, CTL)와 자연살해세포가 있다. 세포독성 T세포의 경우 항원제시세포에 의해 암항원 특이적으로 활성화되어 암세포를 공격하며, 자연살해세포는 T세포와는 달리 직접 감염된 세포나 암세포를 공격하여 제거한다. 암환자의 경우 이러한 세포독성 T세포와 자연살해세포의 수가 매우 적고 기능이 극히 저하되어 있다. 따라서, 이들 면역세포를 주입하여 저하된 면역능력을 높여주는 것이 효과적인 암치료의 방법이다.

2.2 면역세포를 이용한 암치료

항암면역치료는 주로 두 가지 방법이 이용된다. 첫째는 항체와 사

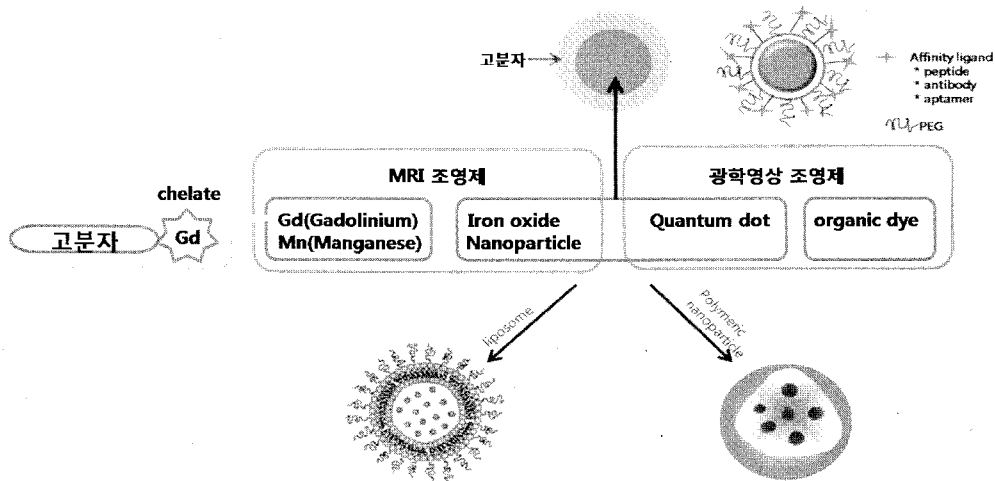


그림 1. 고분자를 기반으로 한 MRI 조영제와 광학영상용 형광물질.

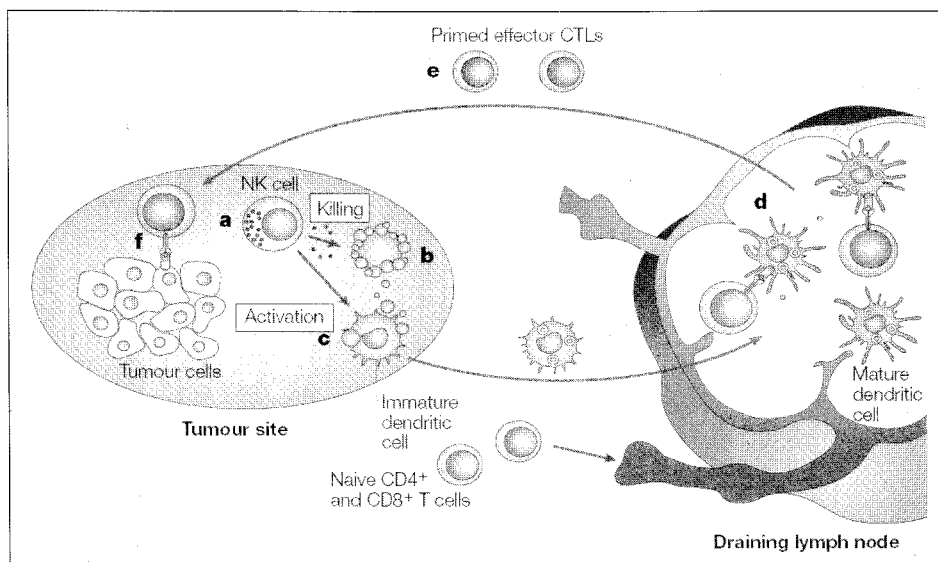


그림 2. 면역세포의 항암면역작용.²

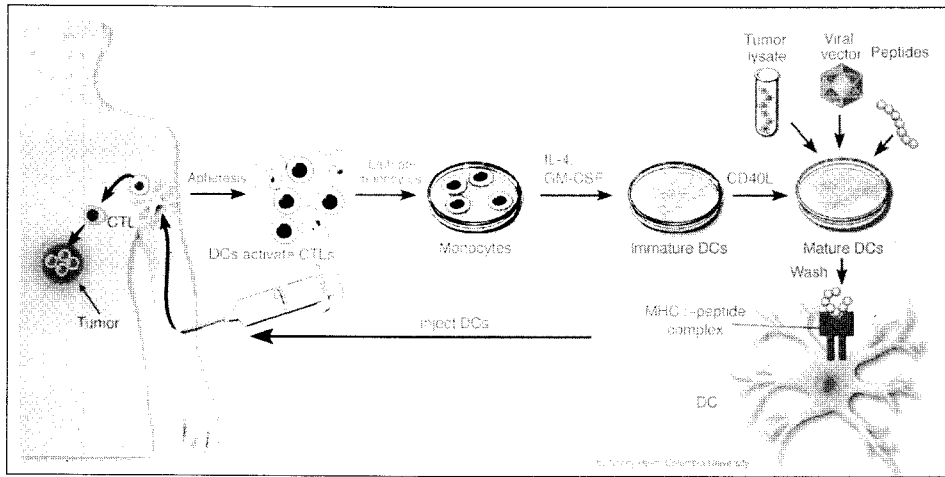


그림 3. 수지상세포를 이용한 항암치료 방법.³

이토카인을 포함하는 외인성의 분자를 사용하는 것으로 생체 내 면역 반응, 특히 T세포와 NK세포의 증식과 분화를 자극하는 면역 보조제인 사이토카인을 암환자에 투여함으로써 생체 내 존재하는 이들 면역 세포들의 면역 능력이 강화될 수 있다. 두 번째는 앞에서 언급한 면역 세포의 활성을 체외에서 인위적으로 강화하여 이를 다시 환자 몸에 주입함으로써 암질환을 치료하는 것으로 독성시험 및 안전성 면에서 우수하다고 평가되고 있다. 가장 큰 장점은 자가 면역세포를 활용하기 때문에 부작용이 없고 전이암이나 치료 후 남은 잔류암 치료에 효과인 점이다. 수지상세포에 의한 항암치료는 환자의 말초혈액으로부터 수지상세포의 전구세포를 분리하여 수지상세포로 분화시킨 후 암항원으로 활성화시켜 다시 환자에게 투여하는 방법이다(그림 3). 현재 세계적으로 임상시험이 진행되고 있는 수지상세포 암 치료제는 흑색암 27종, 신세포암 7종, 전립선암 5종 등 모두 70여 종에 이르는 것으로 추산되고 있다. 국내의 경우 (주)크레아젠이 삼성서울병원 혈액종양내과의 연구진과 공동으로 자가유래 수지상 세포치료제를 이용한 신장암 치료제를 개발하였고 (주)바이텍스와 부산대학교 의과대학의 연구진은 폐암과 직장암을 대상으로 하는 세포치료제를 개발하였고 이외에도 전남대학교 의과대학의 혈액종양내과의 연구진은 림프암 환자에서의 수지상 세포를 활용한 세포치료제의 개발 가능성을 꾸준히 탐색하여 오고 있어 조만간 가시적인 연구결과를 보일 수 있을 것으로 기대되고 있다.

2.3 면역세포 치료에 있어서 생체 분자영상의 필요성

항암세포치료를 위해 주입된 수지상세포는 가장 가까운 림프절로 이동하여 T세포와 NK세포 등 항암면역세포를 활성화하여 이 세포들이 암을 파괴하도록 하는 항암치료제로서의 기능을 수행한다. 그러나, 환자의 상태나 암의 종류에 따른 최적화된 투여경로, 투여량 그리고 투여횟수 및 시기 등 수지상세포의 활성화 요소가 표준화되어 있지 않다. 따라서, 수지상세포가 림프절로 이동하는 과정의 추적 영상법을 이용하여 수지상세포의 세포치료 과정을 모니터링 하는 것이 중요하다.

이러한 면역세포 추적 영상법을 통해 (1) 주입된 후 몸 안에서 면역 세포의 이동을 영상화 및 정량할 수 있고 (2) 표적 조직에서 투여된 면역 세포의 수에 비하여 유지된 세포의 수를 측정할 수 있으며 (3) 이미징 조영제의 세포내 전달 기술의 향상을 도와주며 (4) 표적 지점에서 다른 종류의 세포들의 비교를 가능하게 하고 (5) 효과적인 세포치료를 위한 새로운 기술의 개발에 중요한 기능을 담당한다. 이상적인 세

포 추적 기술은 영상화와 정량화를 동시에 할 수 있는 다기능적이어야 하며, 민감도가 높아야 하고 matrix effect가 나타나지 않으며, 오랜 시간 세포 라벨링이 되며, 독성이 없고, 어떠한 면역세포든지 높은 효율과 다양한 표지가 가능해야 할 필요성이 있다. 최근 MRI 조영제 혹은 근적외선 형광물질이 함유된 고분자 나노소재가 개발되고 있고 이를 이용한 면역세포의 표지, 그리고 분자영상법을 통한 생체 내 면역 세포 추적에 관한 연구결과가 꾸준히 보고되고 있다.

2.4 생체 분자영상

생체 분자영상은 환자에게 고통을 주지 않는 방법을 통해서 질병을 영상화하고, 나아가 표적단백질과 반응할 수 있는 리셉터를 통해서 특이적인 생체 대사를 유도함으로써 질병의 생리학적 기능에 대해서 분석할 수 있는 새로운 영상기술이다. 최근 자기공명영상기법을 이용한 연구에서는 산화철 나노입자를 표적에 접착시킨 줄기세포 이동, 세포 추적 등의 활발한 연구가 이루어지고 있는데, 이는 해상도가 우수한 MRI로 세포를 추적 영상할 수 있다는 점과 산화철 나노입자 MRI 조영제들은 이미 임상사용 허가를 받은 물질이라는 점에서 세포 추적 영상화에 실용화를 진행하고 있다. MRI가 분자 영상과 세포 영상 분야에서 점점 그 중요성이 커지고 있지만 낮은 민감도(10^{-5} mole/L)를 보완하기 위하여 민감도가 높은 다른 분자영상 기법과 결합하려는 연구가 진행되고 있다. 광학 영상은 매우 낮은 정도의 영상 신호도 감지할 특이도와 민감도가 높아서 영상의 단점을 효과적으로 보완할 수 있다.

2.4.1 광학영상

광학영상(optical imaging)은 가시영역과 적외선 영역의 파장대의 광자가 나타나는 기술을 사용해서 생물학적 영상을 볼 수 있는 방법을 말한다. 생물학적 조직은 대부분의 빛을 통과시키지 못한다. 작은 동물의 경우에 있어서는 일부의 빛을 통과시킬 수 있지만, 표면의 상태만을 보여줄 수 있을 뿐이다. 그래서 작은 동물모델에서 얻은 영상결과와 실험방법을 임상치료와 연구에 적용하기에는 많은 무리가 있다. 그러나, 생물학적 조직은 특정한 파장에 속하는 빛을 투과시킬 수 있다. 손등에 빛을 대보면 그 주위로 빛이 통과되는 것을 관찰할 수 있는데 이 빛은 스펙트럼 파장에서 적외선 영역에 속하는 빛과 같다. 따라서, 적외선 영역에 속하는 빛의 경우는 쉽게 조직을 투과할 수 있다.

광학영상법의 발전은 최근 특정 세포를 표적하여 제작된 bioluminescence probe와 형광을 이용한 것이 개발됨에 따라 급속도로 이루어지고 있다. 이러한 분자영상의 한 분야인 형광 분자영상은 생체 조

직으로부터 나오는 빛의 흡수, 산란, 그리고 자가 형광을 고려할 때 근적외선 형광영역에서 가장 효율적인 영상신호를 방출하기 때문에 생체에 사용되는 형광은 주로 근적외선 영역의 파장을 가진다. 그리하여 수많은 유기 NIR 형광물질들이 조직, 기관, 세포 및 분자수준에서의 기본적인 과정을 관찰하기 위해 개발되고 있다. **그림 4**는 생체 조직 내에 존재하는 oxygenated (HbO₂) 및 deoxygenated (Hb) 헤모글로빈과 물이 각기 다른 파장의 빛을 흡수하는 효율을 나타낸 그림이다. 혈액 내에 존재하는 헤모글로빈은 가시광선 영역의 빛을 주로 흡수하고, 체내 많은 부분을 차지하고 있는 물과 지방은 적외선 영역에서 주로 빛을 흡수하기 때문에 빛의 흡수 후 여기서 신호 방출의 효율을 고려하면 근적외선 영역대인 700-900 nm에서 빛의 흡수가 최소이다. 그리하여 조직 투과력이 좋고 배후 잡신호가 최소화 된다. 그러므로 생체 내 형광 분자영상을 위한 형광 조영제는 근적외선 영역의 형광을 발광하는 물질로 만들어진다.

근적외선 영역에서 깊은 조직 투과가 가능한 형광분자 영상 기기의 발전과 함께 분자영상 조영제의 개발이 발전되었다. 형광영상

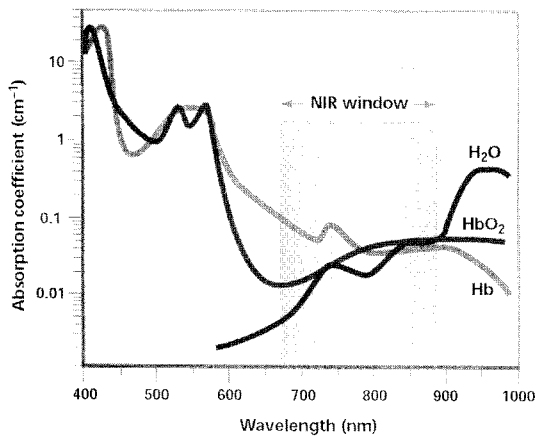


그림 4. 파장에 따른 빛의 생체 조직 투과 능력.¹

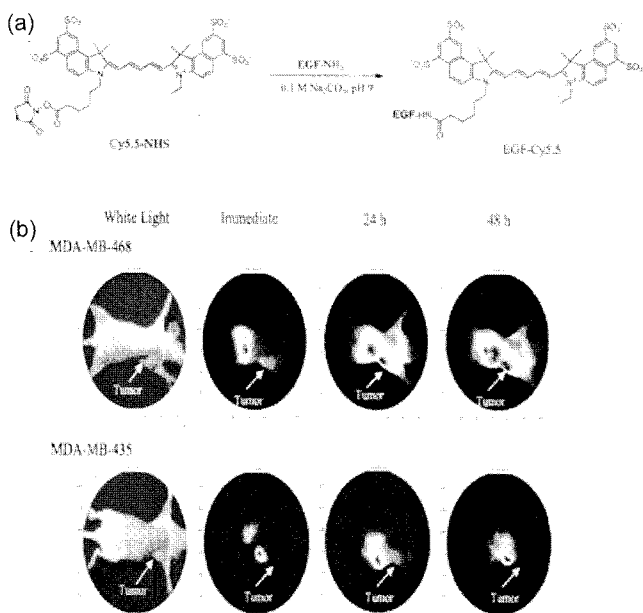


그림 5. (a) 형광물질인 Cy5.5와 표적 지향 단백질 EGF의 결합; (b) MDA-MB-468에 표적된 이미지.⁵

조영제는 비특이적 조영제, 표적형 조영제, 지능형 조영제로 나누어질 수 있다. 비특이적 조영제는 단독으로 사용되는 저분자 색소와 생체고분자를 결합시켜 혈장 내 반감기를 높은 고분자 조영제다. 표적형 조영제는 근적외선 형광색소에 펩타이드, 항체, 또는 RNA 앵타머 등의 리간드를 결합시킨 것으로 표적형 인자를 함유한 조영제가 혈관 내 회전시 질병 위치에 선택적으로 축적되어질 확률이 높은 것을 사용하여 영상의 대조도를 향상시키는 것을 가능하게 한다. **그림 5**에서 보는 바와 같이 EGF와 근적외선 형광물질인 Cy5.5를 결합시켜 EGF receptor가 발현되어 있는 MDA-MB-468 세포에 표적된 영상을 볼 수 있다. 마지막으로 지능형 조영제는 분자 내 생물 현상 변화에 의해 조영제의 결합물이 변형되면서 특정한 부분에서 형광 신호가 발생하는 것으로 FRET (fluorescence resonance energy transfer) 원리가 여기에 속한다.

2.4.2 광학영상용 고분자 나노입자를 이용한 면역세포 추적

앞 절에서 언급했듯이 근적외선 형광물질과 이미징 시스템을 이용하는 것이 생체 내 세포 추적에 매우 효과적이다. 이것은 생체 투과력이 좋고 생체 조직에 의한 빛의 흡수 및 산란이 비교적 적기 때문이다. 최근, Hammer 그룹에서는 near-infrared polymersome를 개발하여 수지상세포를 표지하였다. 이 polymersome은 생체적합성 고분자인 poly(ethylene oxide (1300)-*b*-butadiene (2500)) (PEO-PBD)의 소수성막에 porphyrin-based NIR fluorophore (NIRFs; oligomeric (porphinato) zinc (II) chromophore)를 함유하였다(**그림 6**). 또한, 세포막 투과 능력이 있는 HIV 바이러스 유래의 TAT 펩타이드를 결합하여 수지상세포 표지 효율을 증가시켰으며, 근적외선 형광의 세기가 표지 후 3일 이상 지속적으로 유지되는 결과를 얻었다. NIRFs가 표지된 수지상세포(1×10^5 세포)를 실험동물에 두 가지 경로로 주입한 결과 3일 후 각각 림프절(피하주사), 간과 비장(혈관주사)으로 이동한 수지상세포의 영상을 얻을 수 있었고, 근적외선 고분자 나노물질을 이용한 생체 내 근적외선 광학 영상을 통하여 수지상세포를 성공적으로 추적할 수 있었다(**그림 7**).

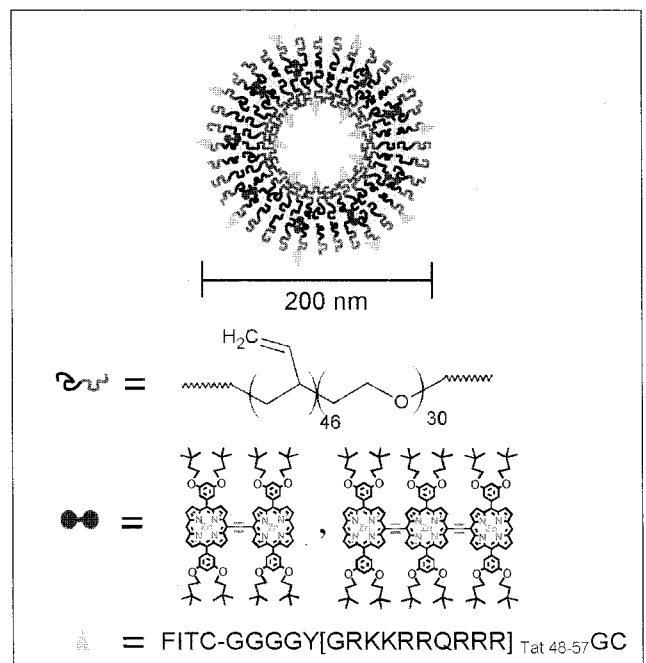


그림 6. Tat 펩타이드가 결합된 근적외선 형광 polymersome.⁶

2.4.3 자기공명영상을 이용한 면역세포 추적

MRI를 이용한 면역세포 추적은 조영제를 면역세포에 표지하여 생체 내에서 영상화한다. 면역세포의 표지는 일반적으로 SPIO, USPIO 또는 CLIO 등과 같은 텍스트라인이 코팅된 산화철 나노 조영제를 사용하며, T 세포와 같이 표지가 어려운 세포는 세포막투과촉진 물질(transfection agents), poly-L-lysine 등을 이용하거나, TAT 펩타이드가 결합된 CLIO 나노 조영제를 이용하였다(그림 8).

2005년 de Vries 그룹에서는 SPIO 나노입자가 표지된 수지상 세포를 흑색종(melanoma) 환자에 투여한 후 수지상세포의 치료 과정을 모니터링 하였다. 또한, ^{111}In 이 표지된 수지상세포와 함께 투여한 경우 MRI와 감마선풋광조영술(planar gamma scintigraphy)을 통해 같은 위치에서 영상을 얻을 수 있었다(그림 9).

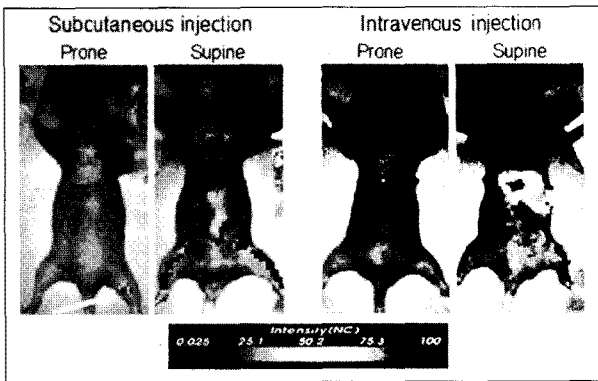


그림 7. NIRFs가 표지된 수지상세포의 생체내 추적 영상. 화살표: 슬하림프절.⁶

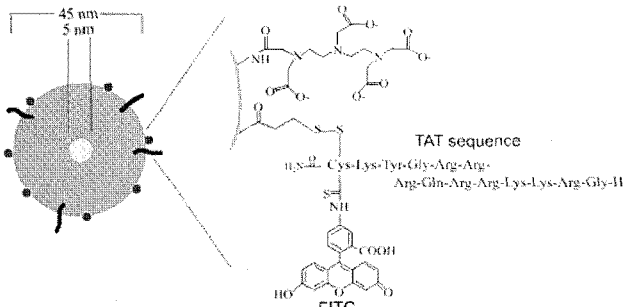


그림 8. TAT 펩타이드가 결합된 CLIO 나노 입자 모식도.⁷

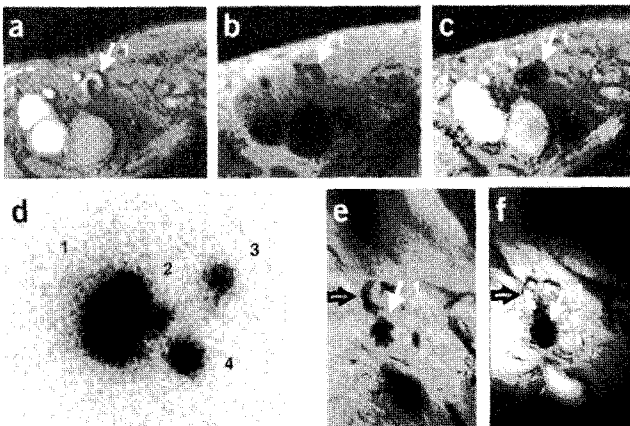


그림 9. MRI와 감마선풋광조영술을 이용한 수지상세포 치료과정 모니터링 영상.⁸

산화철 나노입자와 더불어 최근 perfluorocarbon 나노입자 현탁액을 개발하여 ^{19}F -MRI를 이용한 면역세포 추적영상에 관한 연구가 진행되고 있다. Perfluoropolyether (PFPE)는 수지상세포를 효과적으로 표지할 수 있으며, ^{19}F -MRI는 ^1H -MRI에 비해 신호의 손실이 적어 정확한 영상을 얻을 수 있었다.

2.5 이중모드(MR/NIR) 조영제를 포함하는 고분자 나노입자를 이용한 수지상세포 추적

본 연구실에서는 근적외선 형광물질과 산화철 나노입자를 함유하는 고분자 나노입자를 개발하여 수지상세포의 생체 내 추적을 위한 이중모드 이미징이 가능하도록 하였다(그림 10).

이중 모드 분자영상용 고분자 입자는 근적외선 형광물질인 Indocyanin green (ICG)과 산화철 나노입자를 함유하는 PLGA 고분자 나노입자로 제조하였다(그림 11). ICG는 감광성 형광물질로 생체에 독성이 없고 근적외선 영역의 빛의 흡수율이 높아 임상 조영제로서 FDA 승인되어 임상에서 사용 중인 형광물질이다. 그리고, 산화철 나노입자 역시 이미 임상사용 허가를 받은 물질이므로 임상에 적용하기 쉬운 ICG와 산화철 나노입자를 이용하였다. 한편, 생분해성 고분자인 PLGA (polylactic-co-glycolic acid)는 인체 내에서의 무해성, 안정성 및 생체 친화성이 있고 PLA (poly [lactic acid])와 PGA (poly [glycolic acid])의 성분 비율에 따라 인체 내에서 분해되는 속도가 좌우되는 특성이 있으므로, 이 고분자에 약물이 함유될 경우에는 약물이 방출되는 속도가 조절될 수 있다는 특징을 지니고 있다.

ICG와 산화철 나노입자를 함유하는 PLGA 고분자 입자는 외부 수상에 유화제로서 사용된 poly (vinyl alcohol)을 가지고 이중에멀전(double emulsion; W₁/O/W₂) 방법으로 제조되었으며 특히, 음전하를 띠는 ICG가 여러 단백질들과 비공유성으로 결합하는 특성을 이용하여 사람 혈청 단백질(HSA)과 ICG가 결합된 복합체를 이용함으로써, ICG의 함유율을 증가시켰다. 이러한 PLGA 고분자 나노입자를 이용할 경우 수지상세포에 ICG와 산화철 나노입자를 효과적으로 표지할 수 있었으며, 이 수지상세포(1×10^6 세포)를 마우스의 발바닥 피하로 주입하여 2일 후 수지상세포가 슬하림프절로 이동하여 이 수지상세포의 근적외선 광학영상(그림 12(a))과 자기공명영상(그림 12(b))을 슬하림프절에서 얻을 수 있었다. 게다가, 근적외선 광학영상

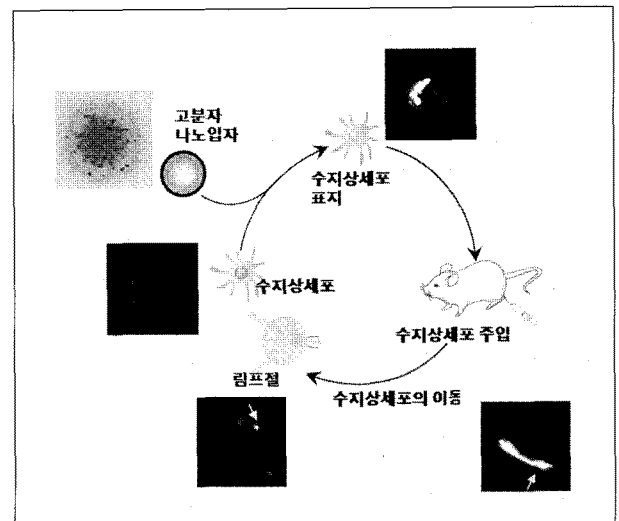


그림 10. 고분자 나노입자를 이용한 수지상세포의 생체내 추적영상 모식도.

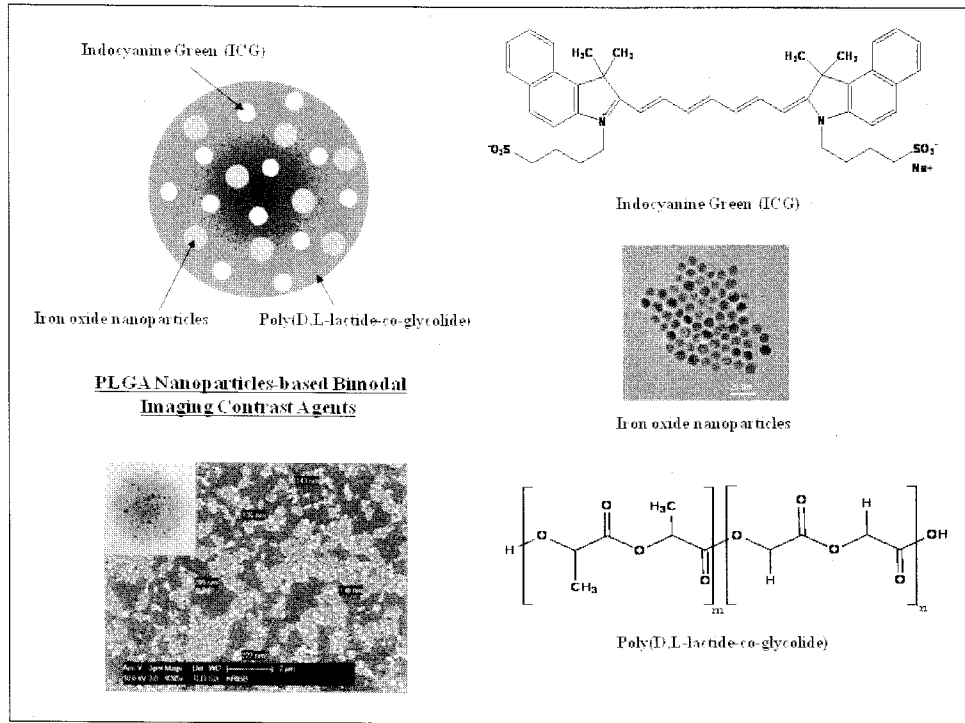


그림 11. ICG와 산화철 나노 입자를 함유하는 PLGA 고분자 입자의 모식도와 전자현미경 사진.⁹

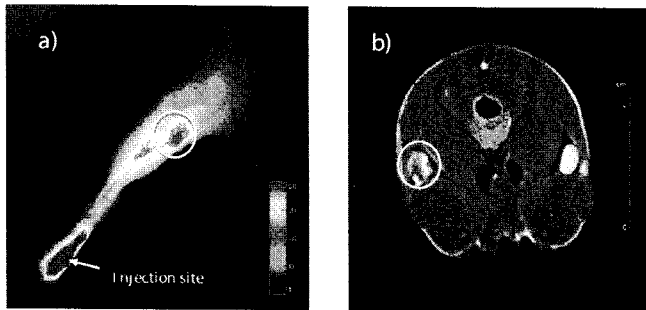


그림 12. PLGA 고분자 나노입자가 표지된 수지상세포의 *in vivo* 분자영상. (a) 슬하림프절로 이동한 수지상세포의 근적외선 광학영상, (b) 슬하림프절로 이동한 수지상세포의 자기공명영상, 원: 슬하림프절.⁹

을 통하여 이동하지 않고 주입위치에 남아있는 수지상세포와 이동 중에 있는 수지상세포를 모두 관찰할 수 있었으며, 모든 영상이 비침윤 이미징(non-invasive imaging) 기법에 의해 수행됨으로써, 이러한 고분자 나노입자를 이용한 영상 기술이 임상에서 세포치료제의 치료과정을 모니터링하는데 활용될 수 있는 가능성을 제시해주고 있다.

3. 결론

최근에, 미국 등 일부 선진국을 중심으로 방사성 동위원소, MRI 조영제 및 근적외선 형광 물질을 이용한 면역세포 영상 기술 개발에 관한 연구가 진행되고 있다. 각종 암이나 난치병을 치료하는 방법의 하나로, 면역세포치료제 개발은 이미, 각 국가가 주도적으로 많은 정책을 지원할 만큼, 전 세계적으로 가장 큰 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 관점에서 볼 때, 면역세포 분자영상 기술의 개발은 이러한 세포치료제의 치료 기전 및 치료 효과를 검증할 수 있는 도구로써, 새로운 세포 치료제의 개발 및 원천기술의 확보, 더 나아가서는 세포치료제

의 활용분야 등에서 다양하게 활용될 수 있는 핵심 분야이다. 특히, 생체적합성과 생분해성을 가진 고분자를 기반으로 한 생체영상 프로브의 개발은 다양한 분자영상 기법의 결합을 가능하게 하였다. 뿐만 아니라, 앞으로 세포 분자영상과 동시에 치료 능력을 높이는 다기능성 분자영상 분야의 연구가 가속화될 것으로 기대된다.

참고문헌

1. J.-H. Kim, K. Park, H. Y. Nam, S. Lee, and K. Kim, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 1031 (2007).
2. J. Vakkila and M. T. Lotze, *Nature Reviews Immunology*, **4**, 641 (2004).
3. J. A. Berzofsky, M. Terabe, S. Oh, I. M. Belyakov, J. D. Ahlers, J. E. Janik, and J. C. Morris, *J. Clin. Invest.*, **113**, 1515 (2004).
4. R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 316 (2001).
5. S. Ke, X. Wen, M. Gurfinkel, and C. Charnsangavej, *Cancer Res.*, **63**, 7870 (2003)
6. N. A. Christian, M. C. Milone, S. S. Ranka, G. Li, P. R. Frail, and K. P. Davis, *Bioconjugate Chem.*, **18**, 31 (2007).
7. M. Lewin, N. Carlesso, C.-H. Tung, X.-W. Tang, D. Cory, D. T. Scadden, and R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.*, **18**, 410 (2000).
8. I. Jolanda M de Vries, W. Joost Lesterhuis, Jelle O. Barentsz, Pauline Verdijk, J. Han van Krieken, and Otto C. Boerman, *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1407 (2005).
9. Y. T. Lim, Y.-W. Noh, J. H. Han, Q.-Y. Cai, K.-H. Yoon, and B. H. Chung, *Small*, **4**, 1640 (2008).