

환원 민감성 나노 약물 전달체

Redox-Sensitive Nanosized Vehicles as Drug Carriers

김현철 · 정상원 · 김은주 · 이세근 · 이성준

| Hyun-Chul Kim · Sang Won Jeong · Eunjoo Kim · Se Guen Lee · Sung Jun Lee

Nano & Bio Research Division, Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology,
Sang-Ri, Hyeonpung-Myeon, Dalseong-Gun, Daegu 711-873, Korea

E-mail: kimhc@dgist.ac.kr

1. 서론

약물 전달 시스템 개발과 관련하여 낮은 치료 효과와 부작용을 해결하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 일부 시스템의 경우 우수한 결과를 보이는 등 상당한 진전이 있었음에도 불구하고, 대부분 세포 내 전달 과정 또는 표적 세포에서 비효율적인 약물 방출이 문제되고 있다.^{1,2} 치료제(항암제, 광감각제, 항산화제 등)와 바이오표적제(펩타이드, 단백질, DNA, siRNA)가 제대로 된 치료 효과를 발휘하기 위해서는 세포질, 세포핵과 같은 특정 세포로 전달되거나 방출되는 것이 매우 중요하다.^{3,4} 따라서 잠재적 표적 약물 전달 시스템은 긴 생체 내 순환 시간, 환부에 축적, 표적 세포에 결합 등 세포 밖 방해 요소뿐만 아니라 세포 내로 침투, 탈출, 약물 방출 등 세포 내부에서의 장벽 또한 극복되어야 한다. 이러한 문제점을 극복하기 위해 환원 조건, 빛, 낮은 pH에서 감응하는 자극 반응형 약물 전달체에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다. Disulfide reduction과 같은 화학 반응을 이용한 산화-환원 반응형 약물 전달체와 관련하여, disulfide 결합은 인체 내의 구조적 안정성을 유지하기 위해 많은 단백질류에서 쉽게 찾을 수 있는 물질이며, 인체 내에 존재하는 thiol 농도에 따라 가역적으로 환원을 할 수 있다.⁸ glutathione(GSH), cysteine과 같은 thiol 농도가 세포 외액에는 2~20 μM 정도로 존재하고 세포기질에는

Author



김현철

2000 성균관대학교 화학공학과 (학사)
2002 POSTECH 환경공학과 (석사)
2006 POSTECH 환경공학과 (박사)
2006-현재 대구경북과학기술원, 나노바이오연구부 선임연구원



정상원

1987 서울대학교 화학과 (학사)
1994 한국과학기술원 화학과 (박사)
1994-1995 일본 JST, Chemirecognics Project, 선임연구원
1996-1998 LG화학, PO연구소, 선임연구원
1998-2001 University of Arizona, Scientist
2001-2005 Nutrapark Inc, Senior Scientist
2005-현재 대구경북과학기술원, 나노바이오연구부 책임연구원



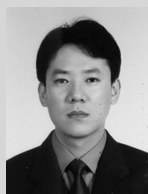
김은주

1990 연세대학교 생화학과 (학사)
1992 연세대학교 생화학과 (석사)
1997-1999 KRICT, Toxicity Research Center, 연구원
2000 서울대학교 환경독성학 (박사)
2000-2004 POSTECH, Center for Environmental Research, 연구원
2005-현재 대구경북과학기술원, 나노바이오연구부 책임연구원



이세근

1994 서울대학교 섬유고분자공학과 (학사)
1996 서울대학교 섬유고분자공학과 (석사)
1997-2005 한국과학기술원, 의과학연구소, 연구원
2005 서울대학교 재료공학(박사)
2005-2006 영남대학교, 유기켈리스트리사업단, Post Doc
2006-현재 대구경북과학기술원, 나노바이오연구부 선임연구원



이성준

2001 영남대학교 섬유공학과 (학사)
2004 영남대학교 섬유공학과 (석사)
2005-현재 대구경북과학기술원 나노바이오연구부 선임연구원

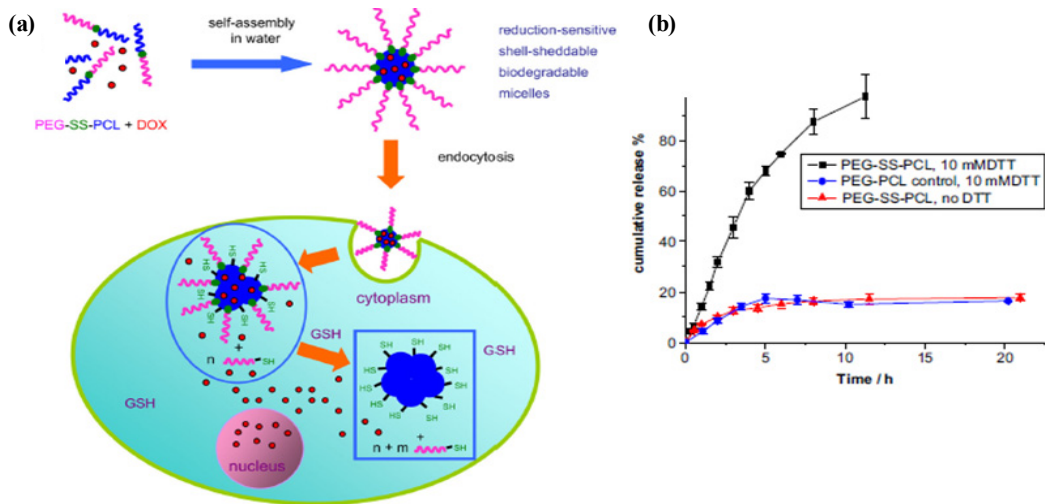


그림 1. (a) Illustration of reduction-sensitive shell-sheddable biodegradable micelles based on PEG-SS-PCL block copolymer for efficient intracellular release of anticancer drugs triggered by glutathione (GSH) tripeptide. (b) Reduction-triggered release of DOX from PEG-SS-PCL micelles (pH 7.4, 50 mM). PEG-PCL micelles was used as a reduction insensitive control.¹¹

2~10 mM 존재하는 것으로 알려져 있다.⁹ 인체 내의 이러한 특징을 이용하여 disulfide 결합이 포함된 나노 약물 전달체를 설계하고 합성하여 GSH와 같은 환원적 환경에서 나노 구조체에 포함된 disulfide 결합의 환원을 통해 구조적 변화를 줌으로서 약물 방출을 제어하는 시스템에 관련된 연구가 진행되고 있다.¹⁰⁻¹²

본 특집에서는 GSH 민감성 고분자 미셀, 나노입자, 캡슐, 고분자 나노겔에 관한 연구에 대하여 소개하고자 한다.

2. 본론

2.1 Redox-Sensitive 고분자 미셀

지난 수십 년간 poly(ethylene glycol)을 근간으로 하는 블록공중합체인 poly(lactide), poly(ϵ -caprolactone)과 같은 생분해성 고분자 미셀이 효과적인 약물 전달을 위해 많은 주목을 받아 왔고, 많은 연구가 진행 되었다. 그러나, 폴리에스터의 생분해와 장시간 동안 확산 제어 메커니즘을 통한 지속적인 약물 방출로 약물 효능이 저하되는 현상이 일반적으로 관찰된다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 Zhong 그룹은 PEG-SS-PCL 및 dextran-SS-PCL 기반의 shell-sheddable 미셀을 합성한 후, doxorubicin(DOX)을 담지하여 세포 기질 또는 세포핵과 유사한 환원적 환경에서 약물 방출 거동을 확인한 결과 12시간 이내에 약물을 정량적으로 방출한다는 것을 확인 하였다(그림 1).¹¹

Wang 그룹은 PCL과 친수성 poly(ethylene phosphate)의 disulfide 결합 블록공중합체(PCL-SS-PEEP)를 이용한 shell-detachable 미셀을 보고 하였다. 이는 GSH 농도에 따라 DOX가 방출됨을 확인하였고, 세포 내에서 GSH에 따른 방출 특성을 확인하기 위해 A549 종양 세포에 인위적으로

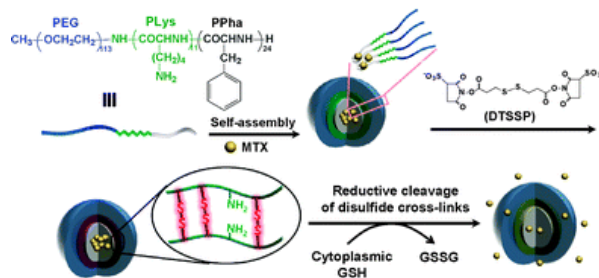


그림 2. Illustration of shell cross-linking in drug-loaded polymer micelles and facilitated drug release in response to cellular GSH.¹⁰

GSH-OEt로 전처리하여 GSH 농도에 따른 종양 세포의 사멸 특성을 확인하였다.¹³

미셀의 문제점 중 하나가 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC) 이하에서의 자발적인 해리(dissociation)이다. 미셀에 약물을 봉입하여 주사 할 경우 희석 및 세포와 혈액에 존재하는 생체 분자와의 상호작용에 의한 빠른 해리는 조기 약물 방출과 종양-표적 지향성을 저해하는 요소로 작용한다. 이러한 문제점은 미셀을 가교시킴으로써 어느 정도 그 문제점은 해결하였지만, 매우 안정한 미셀은 표적에도 달했을 때 느린 약물 방출 특성을 나타낸다.

미셀의 생체 내 안정성 및 방출 효과를 높이기 위해, Lee 그룹은 PEG-*b*-poly(L-lysine)-*b*-poly(L-phenylalanine) 구성된 삼중 공중합체를 합성한 후 poly(L-lysine) 블록을 cross-linking agent에 의해 가교시켜 shell cross-linked(SCL) 미셀을 보고하였다. 이러한 SCL 미셀은 destabilizing agent로 작용하는 sodium dodecyl sulfate(SDS)의 높은 농도에서도 안정하고, methotrexate(MTX)의 방출이 가교되지 않은 미셀보다 더 느리다는 것을 확인하였다. *In vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 SCL 미셀은 증가하는 GSH 농도에 따라 약물 방

출이 촉진됨을 확인하였고, MTX가 봉입된 SCL 미셀을 이용하여 A549 종양 세포에 대하여 cytotoxicity를 확인한 결과 세포 수준의 GSH 농도와 상관 관계가 있음을 확인하였다(그림 2).¹⁰

Wang 그룹은 PPE_{SH}: thiol-functionalized poly(phosphoester) PEG-*b*-PPE_{SH}-*b*-PCL로 구성된 가역 반응이 가능한 SCL 미셀을 보고하였다. 이 SCL 미셀도 안정하고 환원적 환경에서 약물 방출이 촉진됨을 확인하고 A549 세포에서 GSH 농도에 따

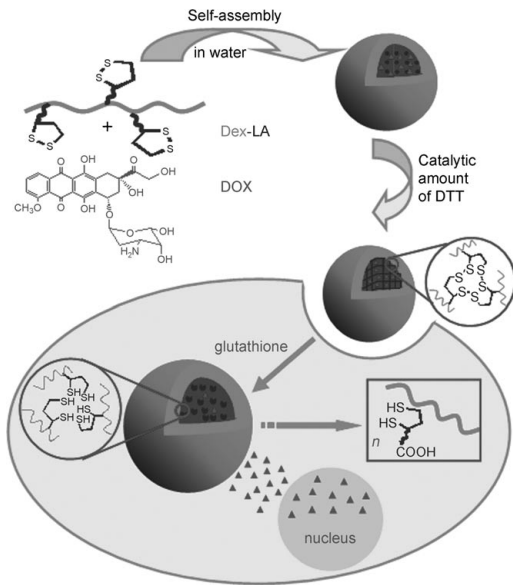


그림 3. Schematic illustration of reversibly stabilized, multifunctional dextran nanoparticles, Dex-LA, readily obtained by coupling lipiolic acid to dextran, forms nanoparticles in water. The addition of a catalytic amount of DTT yields stable nanoparticles through a cross-linking of the core. In cancer cells, fast de-cross-linking takes place as a result of a high concentration of glutathione (GSH) tripeptides, which effects rapid release of the drugs (shown as triangles) to the cell nucleus.¹⁶

른 cytotoxicity를 확인하였다.¹⁴ Ahn 그룹은 세 개의 cysteine기를 포함하면서 self-crosslinking이 가능한 PEG-Cys3-PCL 미셀을 합성하였고, 이 또한 환원적 환경에서 약물 방출이 촉진됨을 보고하였다.¹⁵

2.2 Redox-Sensitive 나노 입자

생분해성 나노 입자는 높은 생체 내 안정성과 세포 내에서 빠른 약물 전달을 광범위하게 연구 되고 있다. 최근 텍스트란과 리포익산으로 구성된 나노 입자에 DTT(dithiothreitol)를 첨가하여 가교된 다기능성 나노 입자가 Zhog 그룹에 의해 개발되었다. 이 나노 입자는 극한 환경에서 매우 안정한 것으로 확인되었으며, 84%의 매우 높은 약물 봉입 효율을 보여 주었다.¹⁶ *In vitro* 실험을 통하여 10 mM DTT 농도에서 DOX의 90% 이상이 11시간 내에 방출됨을 확인하였다. 공초점 현미경(confocal laser scanning microscopy, CLSM)을 사용하여 HeLa 세포주와 RAW 264.7 세포를 관찰한 결과 세포 핵까지 효과적으로 DOX가 전달되는 것을 확인하였다(그림 3).

Jiang 그룹은 공중합체 조성에 따라 20~57 °C 온도 범위에서 LCST를 보이는 온도 감응형 고분자(p(PEG-MEMA-co-Boc-Cyst-MMA)) 결사술에 디설파이드가 도입된 redox-sensitive 나노 입자를 합성하였다. 이 나노 입자는 37 °C, 2 μM DTT 농도에서 24 시간 동안 안정하지만, 3 mM DTT 농도에서는 디설파이드 결합이 파괴되어 물에 대한 용해도가 증가하여 이 나노 입자가 붕괴되는 것을 확인하였다.¹⁷ Feng 그룹은 redox-sensitive nanogated meso-porous silica nanoparticles(MSN)의 입구에 poly(*N*-acryloxysuccinimide)(PNAS)를 grating 시킨 후 cystamine에 의해 가교된 나노 입자를 합성하였다. 이 MSN 내에 rhodamine B를 봉입하여 방출 실험을 한 결과

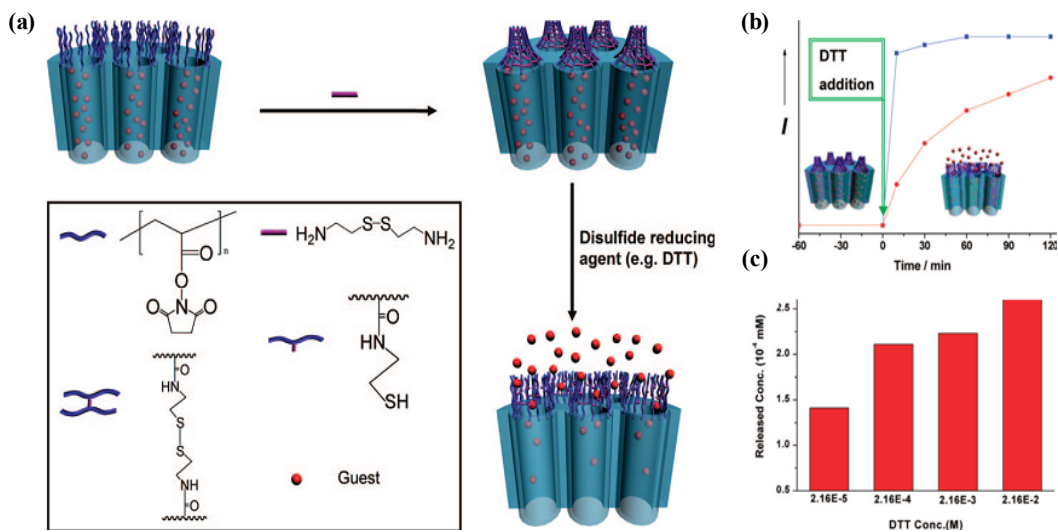


그림 4. (a) Schematic Illustration of Redox-Responsive Nanogated Ensemble Based on Polymeric Network-Capped Mesoporous Silica, (b) Time course of rhodamine B release from hybrid materials in the presence of DTT concentrations 2.16×10^{-2} M (blue) and 2.16×10^{-4} M (red). (c) The DTT concentration-dependent releases. Released dye concentrations are measured after 2 h of the DTT addition.¹⁸

21.6 mM DTT 농도에서 빠른 방출을 보이는 반면 0.216 mM DTT 농도에서는 방출이 느리다는 것을 확인함으로써 방출이 DTT 농도에 의존하고 있음을 확인하였다(그림 4).¹⁸ 또한 이 그룹에서는 이렇게 합성된 MSN에 β -CD를 immobilization 시킨 후 diazotanker를 이용하여 가교시켜 UV, DTT, α -CD에 의해 응답성을 보이는 나노 입자를 합성하였다.¹⁹

2.3 Redox-Sensitive 나노 캡슐

할로우(hollow) 캡슐은 약물을 포함하여 핵산, 펩타이드, 단백질과 같은 생리활성 분자를 담지하여 제어된 전달 시스템에 적용할 수 있는 다목적 운반체이다. 보통 할로우 캡슐은 콜로이드 템플레이트에 고분자를 증착시킨 후 코어만 선택적으로 제거하여 제조된다.

Carudo 그룹은 실리카 입자를 thiolated poly(methacrylic

acid)(PMASH)와 poly(vinylpyrrolidone)(PVPON)를 층상자기조립법(layer-by-layer, LbL)에 의해 감싼 다음 PMASH의 thiol 그룹을 가교시켜 안정한 디설파이드 결합을 형성시킨 후 실리카 코어를 제거함으로써 할로우 캡슐을 제조하였다.^{20,21} 또한 PVPON 간수소 결합을 pH 7 완충용액에서 파괴하여 PVPON을 제거함으로써 디설파이드에 의해 가교된 PMASH 단일 캡슐이 제조됨을 확인하였다. PMASH 캡슐은 산화 환경에서는 안정하지만, 세포와 유사한 환원적 환경에서는 쉽게 분해됨을 확인하였다.²²⁻²⁴ 최근에 Kim 그룹에서는 템플레이트를 이용하지 않고, 양친매성 cucurbit[6] uril(CB[6])를 자기 조립에 의해 캡슐을 제조한 후 디설파이드를 포함하는 링커를 이용하여 shell-crosslinking을 시킴으로써 환원-응답성 나노 캡슐을 제조하였다(그림 6). 이 캡슐은 평균 직경이 70 nm이고 셸의 두께가 2 nm였으며, DTT에 의해 30

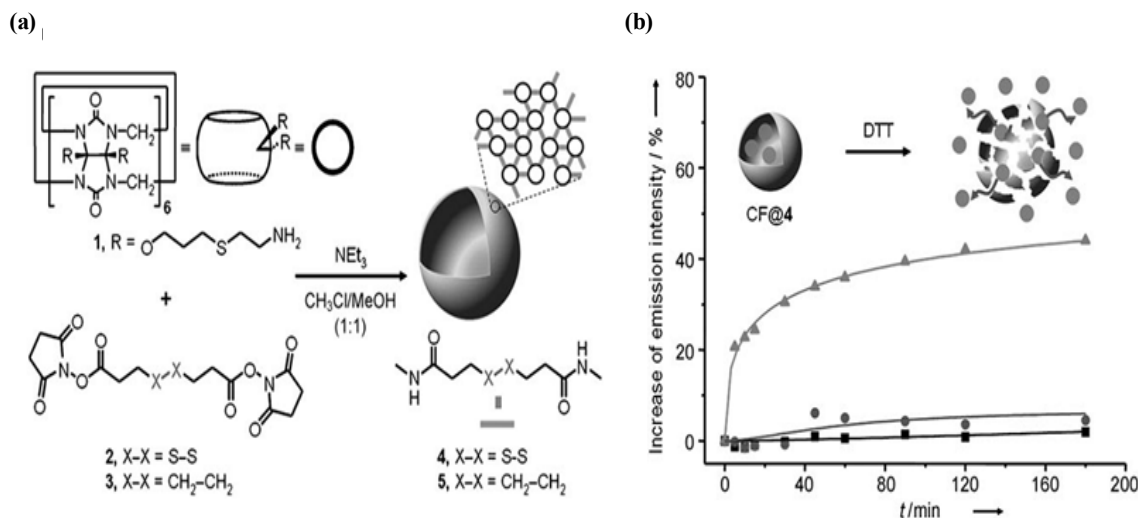


그림 5. (a) Synthesis of polymer nanocapsules 4 and 5, with and without disulfide bridges, respectively, (b) Increase in the emission intensity at 516 nm as a function of time for CF@4, stirred in 5% methanol/PBS in the presence (▲) and absence (●) of 100 mM DTT, and CF@4 stirred in 5% methanol/PBS in the presence of 100 mM DTT (■).²⁵

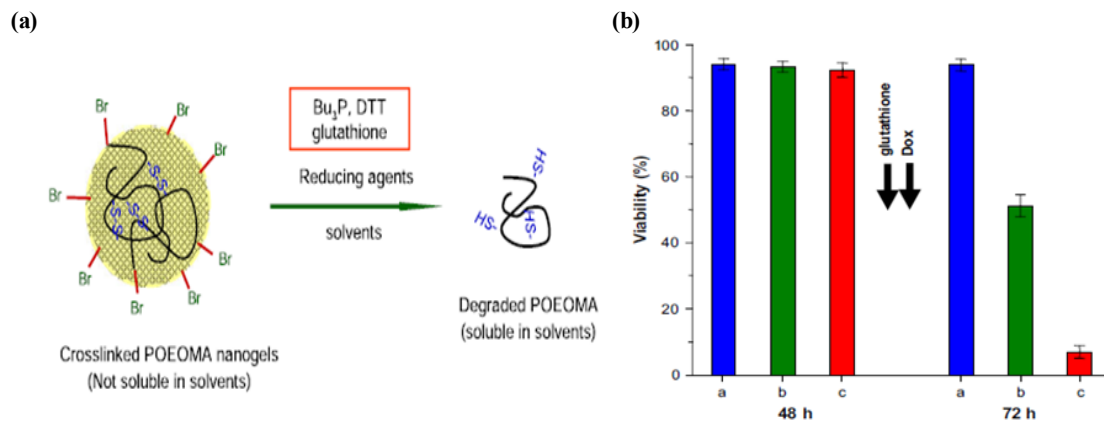


그림 6. (a) Schematic representation of reductive degradation of crosslinked ATRP nanogels into corresponding thiol-containing POEOMA segments in the presence of various reducing agents, (b) Viability of HeLa cells after incubation for 48 and 72 h in different systems: (a) control; (b) Dox-loaded nanogels, where glutathione was added after 48 h incubation to release Dox from Dox-loaded nanogels; (c) control, where free Dox was added after 48 h incubation.²⁷

분 간 처리했을 때 파괴됨을 확인하였다. 또한 *in vitro* 방출 연구를 통해 봉입된 약물인 carboxyfluorescein(CF)는 100 mM DTT 빠르게 방출됨을 확인하였다.²⁵ Zhang 그룹은 β -cyclodextrin에 의해 기능화된 실리카 나노 입자에 cystamine-conjugated chitosan과 dextran sulfate을 이용하여 층상자기조립법을 이용하여 polyelectrolyte 나노 캡슐을 합성하였다. 모델 단백질로서 bovine serum albumin(BSA)을 사용하여 *in vitro* 실험을 한 결과, 10 mM GSH 농도에서 단백질의 방출이 증가된다는 것을 확인하였다.²⁶

2.4 Redox-Sensitive 나노젤

나노젤은 수 마이크로에서 수 십 나노미터 범위의 크기와 높은 수분 함량을 가지는 생체 적합 삼차원 물질이다. 나노젤은 항암제, 단백질, 플라스미드 DNA 등과 같은 다양한 물질을 담지하고 전달하는데 응용될 수 있다. Matyjaszewski 그룹은 inverse mini-emulsion atom transfer radical polymerization (ATRP)과 disulfide-thiol exchange 반응을 통해 reduction-sensitive 나노젤을 합성하였다.²⁷ 이 나노젤은 항암제, 탄수화물, 단백질 등 다양한 생체 분자를 담지할 수 있다. 이 나노젤은 DOX에 대하여 50~70%의 봉입 효율을 보여 주며, DOX가 봉입된 나노젤이 디설파이드 결합에 의해 가교되었을 시 독성이 없으나, 20 wt% GSH를 첨가하면 disulfide-thiol exchange 반응에 의해 DOX의 방출이 증가하여 HeLa 세포의 성장이 현저하게 저해 된다는 것을 확인하였다(그림 6).²⁷ Moeller 그룹은 thiol-functionalized star-shaped poly(ethylene oxide-co-propylene)과 선형 polyglycidol을 이용하여 디설파이드 crosslinker가 형성된 생분해성 나노젤을 합성하였다. 이 나노젤은 10 mM GSH 농도에서 disulfide-thiol exchange 반응에 의해 6시간 후 분해된다.²⁸

3. 결론

GSH-responsive 나노 구조체는 GSH에 의해 세포 내에서 나노 운반체를 빠르게 분해하여 세포기질과 세포핵으로 약물을 전달하기 위한 이상적이고 혼한 내부 자극으로 인식된다. 이러한 표적 지향성 세포 내 약물 전달 방법은 약물 효능을 크게 증가시키고, multi-drug resistance(MDR)을 극복하고, 약물과 운반체로부터 발생하는 부작용을 줄일 수 있다. Redox-responsive한 disulfide chemistry를 통하여 항암제, 항산화제, 펩타이드, 단백질, 핵산 등을 효과적으로 전달하기 위한 다기능성 전달 시스템의 구현이 가능하리라 기대된다. 한편, redox-sensitive 나노 운반체가 세포기질이나 세포핵의 redox 환경에서 파괴된다는 직접적인 증거가 없기 때문에 세포 내에서 정확한 거동 또한 규명되어야 할 것이다.

참고문헌

1. R. Langer, *Nature*, **392**, 5 (1998).
2. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, *J. Control. Release.*, **70**, 1 (2001).
3. V. P. Torchilin, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 343 (2006).
4. A. Nori and J. Kopecek, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 609 (2005).
5. C. J. F. Rijcken, O. Soga, W. E. Hennink, and C.F. van Nostrum, *J. Control. Release.*, **120**, 131 (2007).
6. F. H. Meng, Z. Y. Zhong, and J. Feijen, *Biomacromolecules.*, **10**, 197 (2009).
7. V. Torchilin, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **71**, 431 (2009).
8. K. H. Sun, Y. S. Sohn, and B. Jeong, *Biomacromolecules.*, **7**, 2871 (2006).
9. G. Saito, J. A. Swanson, and K-D. Lee, *Adv. Drug Del. Rev.*, **55**, 199 (2003).
10. A. N. Koo, H. J. Lee, S. E. Kim, J. H. Chang, C. Park, C. Kim, J. H. Park, and S. C. Lee, *Chem Commun.*, 6570 (2008).
11. H. Sun, B. Guo, X. Li, R. Cheng, F. Meng, H. Liu, and Z. Zhong, *Biomacromolecules.*, **11**, 848 (2010).
12. J-H. Ryu, R. Roy, J. Ventura, and S. Thayumanavan, *Langmuir*, **26**, 7086 (2010).
13. L. Y. Tang, Y. C. Wang, Y. Li, J. Z. Du, and J. Wang, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 1095 (2009).
14. Y. C. Wang, Y. Li, T. M. Sun, M.H. Xiong, J.A. Wu, Y.Y. Yang, and J. Wang, *Macromol. Rapid Commun.*, **31**, 1201 (2010).
15. J. E. Kim, E. J. Cha, and C.H. Ahn, *Macromol. Chem. Phys.*, **211**, 956 (2010).
16. Y. L. Li, L. Zhu, Z. Z. Liu, R. Cheng, F. H. Meng, J. H. Cui, S. J. Ji, and Z. Y. Zhong, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9914 (2009).
17. L. H. Li, X. L. Jiang, and R.X. Zhuo, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **47**, 5989 (2009).
18. R. Liu, X. Zhao, T. Wu, and P. Y. Feng, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 14418 (2008).
19. R. Liu, Y. Zhang, and P. Y. Feng, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 15128 (2009).
20. A. N. Zelikin, J. F. Quinn, and F. Caruso, *Biomacromolecules.*, **7**, 27 (2006).
21. A.N. Zelikin, Q. Li, and F. Caruso, *Chem. Mater.*, **20**, 2655 (2008).
22. S. F. Chong, A. Sexton, R. De Rose, S. J. Kent, A. N. Zelikin, and F. Caruso, *Biomaterials.*, **30**, 5178 (2009).
23. R. De Rose, and A.N. Zelikin, A. P. R. Johnston, A. Sexton, S. F. Chong, C. Cortez, W. Mulholland, F. Caruso, and S. J. Kent., *Adv. Mater.*, **20**, 4698 (2008).
24. A. Sexton, P. G. Whitney, S. F. Chong, A. N. Zelikin, A. P. R. Johnston, R. De Rose, A. G. Brooks, F. Caruso, and S. J. Kent, *ACS Nano.*, **3**, 3391 (2009).
25. E. Kim, D. Kim, H. Jung, J. Lee, S. Paul, N. Selvapalam, Y. Yang, N. Lim, C.G. Park, and K. Kim, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 4405, (2010).
26. S. Shu, X. Zhang, Z. Wu, Z. Wang, and C. Li, *Biomaterials.*, **31**, 6039 (2010).
27. J. K. Oh, C. B. Tang, H. F. Gao, N.V. Tsarevsky, and K. Matyjaszewski., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 5578 (2006).
28. J. Groll, S. Singh, K. Albrecht, and M. Moeller, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, **47**, 5543 (2009).