

# 조직 플라스미노겐 활성화제의 부작용을 줄이기 위한 자성 약물 전달체

조혜연, 최선민, 박상호, 장휘진, 이재홍\*

연세대학교 의공학과

## Magnetic drug delivery carrier for reducing the side effect of Tissue Plasminogen Activators

Hyeyoun Cho, Seonmin Choi, Sanghyo Park, Hwijin Jang, Jaehong Key\*

Department of Biomedical Engineering, Yonsei University, wonju, Korea

\*jkey@yonsei.ac.kr

### Abstract

Thrombosis is a disease in which a blood clot blocks a blood vessel. Treatment consists of mechanical thrombectomy or thrombolytic therapy. Tissue Plasminogen Activator (tPA), a representative drug of thrombolytic therapy, is a serine protease approved by the FDA. It breaks down the thrombus fibrin network. However, systemic delivery of tPA has a serious side effect of hemorrhagic transformation (HT) due to its short half-life. To eliminate this side effect, it is necessary to reduce the possibility of HT by targeting the desired site using superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) and concealment into the drug delivery carrier.

### 1. 연구 배경

혈전증은 혈전이 혈관을 막아 발생하며 혈전증이 발생한 장기의 위치, 발생한 혈관의 종류에 따라 심근경색, 허혈성 뇌졸중, 정맥 혈전 색전증 등과 같은 다양한 질병들을 유발한다[1]. 허혈성 뇌졸중은 혈전이 뇌동맥을 막아 혈액 공급이 차단되어 생기는 혈전성 질병으로 장애 및 사망을 방지하기 위해서 증상 발생 후 혈전 용해제를 이용하여 막힌 혈관을 재개통시켜 허혈성 손상을 입은 영역을 재관류시켜야 한다. 혈관의 빠른 재개통은 광범위한 세포 사멸, 영구 조직 손상 및 환자의 예후를 손상시키는 장애를 예방하기 위해 필수적이다[2].

허혈성 뇌졸중 치료제로 FDA의 승인을 받은 혈전용해제인 조직 플라스미노겐 활성화제(Tissue Plasminogen Activator, tPA)는 세린 프로테아제로 혈중 플라스미노겐을 활성화하고 활성 형태의 플라스민으로 전환시켜 혈전 섬유소 네트워크를 분해한다. 그러나, tPA의 전신 전달은 5분이라는 짧은 반감기, 플라스미노겐 활성 억제제와 같은 해독제에 의한 생리학적 비활성화, 출혈변환(hemorrhagic transformation, HT)이라는 부작용이 발생한다[3]. 따라서 tPA의 이러한 부작용을 줄이기 위해서는 약물을 원하는 부위에 표적화하고, 혈류에 직접 노출을 줄여 반감기를 증가시키고 급속방출로 인한 출혈을 줄여야 한다. Poly(D, L-lactide-co-glycolide) acid (PLGA)는 생분해성, 생체적합성의 특성의 고분자로 약물 전달체로 많이 사용된다. 산화철 나노입자 (Superparamagnetic Iron oxide nanoparticles, SPIONs)는 외부 자기장에 의해 혈전 부위로의 표적화를 가능하게 한다. 따라서 이 연구에서는 SPIONs과 tPA를 적재한 PLGA 입자를 제작하여 약물의 체내 반감기를 증가시키고, 표적화를 통해 비특이적 체내 축적을 감소시켜 약물의 부작용을 최소화하였다.

### 2. 연구 방법

(1) 산화철 나노입자 (Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles, SPIONs) 합성

산화철 나노입자는 열분해 방식을 이용하여 합성되었다. Iron(III) chloride 1.8g과 sodium oleate 3.65g을 ethyl alcohol, 증류수, hexane 혼합물 28ml에서 용해시켜 일정한 질소

유입 하에 3구 플라스크를 이용하여 60°C에서 4시간동안 가열하여 Iron oleate를 생산하고 증류수로 3회 세척한 후, 회전증발기를 이용해 40°C에서 30분간 증발시켰다. 소수성으로 나노 결정을 개질하기 위해 Iron oleate 1.8g, oleic acid 0.312g, N-tetracosane 3g을 1-octadecene 9ml에 용해시키고 3구 플라스크에서 320°C로 1시간동안 가열하였다. 생성물을 상온에서 식힌 후 hexane으로 용해시키고 acetone을 이용하여 세척하였다[4].

(2) PDMS 형판 생산

Electron beam lithography 방식으로 제작된 직경 3μm 디스크 형태의 홈이 있는 실리콘 주형에 PDMS 용액을 첨가하여 동일한 크기와 모양의 패턴이 있는 PDMS 형판을 생산하였다[5].

(2) PVA 형판 생산

Poly(vinyl alcohol) 48g과 증류수 800ml을 교반하여 만든 PVA 용액을 PDMS 형판에 첨가하고 건조시켜 실리콘 주형과 동일한 패턴을 가진 PVA 형판을 생산하였다.

(3) Rhodamine B-tPA 결합

Rhodamine B (RhoB), DCC, NHS 혼합물을 물비 1:20:20으로 5ml chloroform에 녹이고 20mg의 tPA를 혼합하여 1,150rpm에서 24시간동안 교반하였다. 반응이 되지 않은 잔여물을 제거하기 위해 dialysis bag으로 24시간동안 투석을 진행하고 동결건조하여 RhoB-tPA를 결합하였다.

(4) 입자 생산 (RhoB-tPA SPION DPPs)

70mg PLGA와 500μg SPIONs 및 1mg Rhodamine B-tPA를 DCM 100μl, chloroform 100μl, DMSO 50μl에 녹여 먼도날을 사용하여 PVA 형판에 균일하게 로딩하였다. 로딩된 PVA 형판은 유기용매를 증발시키고 2시간동안 증류수에 교반시켜 녹였다. 나일론 필터와 멤브레인 필터로 불순물을 제거하고 원심분리하여 상층액을 제거한 후 동결건조하여 Rhodamine B-tPA와 SPIONs를 적재한 3μm 디스크 형태의 입자(Rho B-tPA SPION DPPs)를 생산하였다.

(5) 외부 자기장에 의한 모집 효율 실험

입자를 1mg/ml로 유리 바이알에 넣고 0.42T의 자석에 노출시켜 시간에 따라 모집된 입자를 관찰하고 상층액을 제거, 동결 건조하여 정량화하였다.

(6) 약물 방출 실험

생산된 입자를 1mg/ml의 농도로 PBS에 녹여 dialysis bag에 넣고 정해진 시간에 따라 방출된 Rhodamine B-tPA의 fluorescence를 확인하였다. Fluorescence는 형광 분광법을 사용하여 plate reader로 excitation 553nm, emission 574nm에서 측정되었고 입자에서 약물이 전부 방출되었을 때의 방출량을 100%로 하여 각 시간대의 약물 방출량의 비율을 계산하였다.

3. 연구 결과

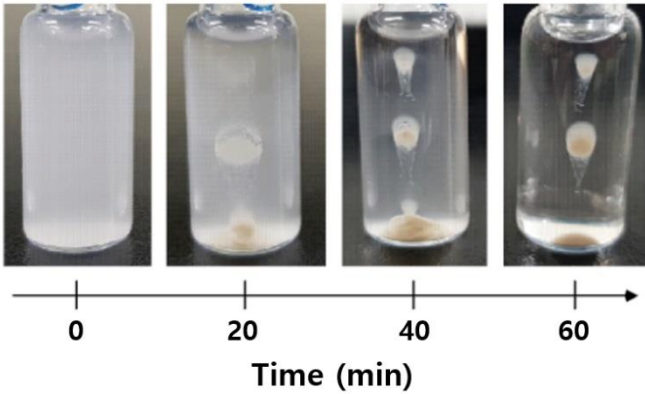


그림 1. Rhob-tPA SPION DPPs의 외부 자기장에 의한 모집 효율 이미지

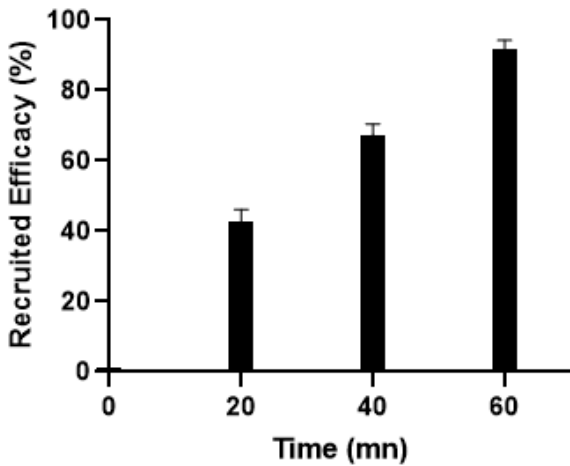


그림 2. Rhob-tPA SPION DPPs의 외부 자기장에 따른 모집 효율 정량화

그림 1.과 2.는 외부 자기장에 의한 입자의 모집 효율을 측정한 결과이다. 입자의 42.7%, 67.4%, 91.5%가 각각 20분, 40분, 60분에 걸쳐 입자 내부의 산화철 나노입자에 의해 자석으로 당겨지는 것을 확인할 수 있었다.

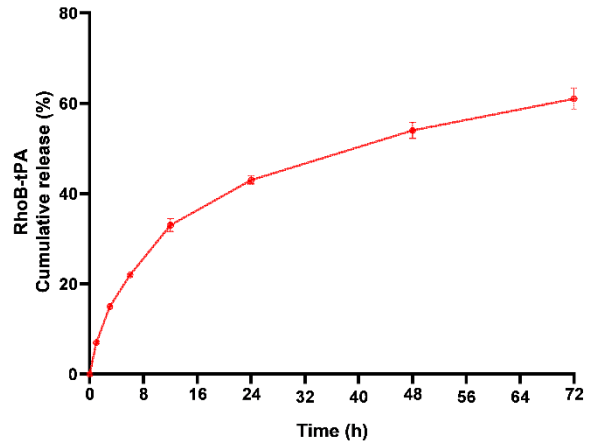


그림 3. Rhob-tPA SPION DPPs의 Rhob-tPA 방출 그래프

약물의 방출량을 확인하기 위해 형광을 띤 Rhodamine B를 tPA에 접합하여 입자를 생산하였다. 약물은 초기 1시간에 7.2%, 3시간에 14.5%만이 방출되었고 72시간이 되어서야 60.6%가 방출되었다.

결론적으로 본 연구의 약물 전달체 Rhob-tPA SPION DPPs는 약물의 급속 방출을 지연시키고 내부의 산화철 나노입자에 의해 외부 자기장의 영향으로 표적화가 가능하여 약물의 부작용을 최소화할 수 있다. 이러한 약물 전달체는 허혈성 뇌졸중 이외에도 다양한 혈전증 치료에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

4. Acknowledgements

이 연구는 National Research Foundation of Korea (NRF) 과제의 지원을 받아 수행하였음. (NRF-2018-R1D1-A1-B070-42339 and NRF-2019-K2A9A2A08000123)

5.참고 문헌

[1] A. Zenych, and C. Jacqmarcq. “Fucoidan-functionalized polysaccharide submicroparticles loaded with alteplase for efficient targeted thrombolytic therapy.” *Biomaterials*, Vol.277, No.121102, 2021

[2] J. Kwon, and J. Rha. “Recent advances in thrombolysis of acute ischemic stroke.” *Journal of the Korean Medical Association*, Vol.56.5, p.402-409, 2013

[3] W. Wang, and M. Li. “Hemorrhagic Transformation After Tissue Plaminogen Activator Reperfusion Therapy for Ischemic Stroke: Mechanisms, Models, and Biomarkers.” *Molecular neurobiology*, Vol.52.3, p.1572-1579, 2015

[4] Y. Liu, T. Chen. “Facile surface functionalization of hydrophobic magnetic nanoparticles.” *Journal of the American Chemical Society*, Vol.135.35, p.12552-12555, 2014

[5] J. Key, and S. Aryal. “Engineering discoidal polymeric nanoconstructs with enhanced magneto-optical properties for tumor imaging.” *Biomaterials*, Vol.34.21, p.5402-5410, 2013