



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공 학 박 사 학 위 논 문

다기능성 단일 탄소나노튜브를
이용한 표적화 된 유방암의
광열치료 연구

The logo of Pukyong National University is a circular emblem. It features a stylized 'P' and 'K' intertwined in the center, with the university's name in English 'PUKYONG NATIONAL UNIVERSITY' around the top half and in Korean '부경대학교' around the bottom half.

2018 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

의생명기계전기융합공학협동과정

서 한 수

공 학 박 사 학 위 논 문

다기능성 단일 탄소나노튜브를
이용한 표적화 된 유방암의
광열치료 연구

지도교수 오 정 환

이 논문을 공학박사학위논문으로 제출함

2018 년 2 월

부 경 대 학 교 대 학 원

의생명기계전기융합공학협동과정

서 한 수

서한수의 공학박사 학위논문을 인준함

2018년 2월 일



위원장	공학박사	김창석	(인)
위원	공학박사	최은서	(인)
위원	공학박사	이용욱	(인)
위원	공학박사	강현욱	(인)
위원	공학박사	오정환	(인)

Targeted breast cancer photothermal therapy based on multifunctional single-walled carbon nanotubes

Hansu Seo

Interdisciplinary Program of Biomedical, Electrical & Mechanical Engineering,
Pukyong National University

Abstract

Recently, photothermal therapy (PTT) technique is greatly considered in cancer therapy owing to its unique advantages of specificity. Among a range of materials have been applied in photothermal therapy, single-walled carbon nanotubes (SWNTs) are considered to be an efficient material owing to their unique properties such as strong optical light absorption of near-infrared (NIR) light and efficient conversion of light to heat. Further, the combined photo-thermal therapy with chemotherapy is an effective approach in cancer treatment. In this way, we propose the modification of SWNTs with anticancer drug Doxorubicin (DOX) loading and anti-HER-2 antibody Herceptin conjugation to target breast cancer. The modified-SWNTs with DOX and Herceptin were utilized for PTT therapy under 808 nm NIR laser irradiation onto the HER-2-positive SK-BR-3 breast cancer cells. The anticancer drug, DOX and Herceptin conjugated SWNTs exhibited an excellent anticancer therapeutic efficiency via HER-2-receptor mediated enhanced-endocytosis and NIR-promoted chemo/photothermal damage following NIR light irradiation. These results suggest that the combination of the targeted

chemo/photothermal therapy might result in the effective photothermal ablation of tumor cells.

Keywords: photothermal therapy, single-walled carbon nanotubes, Herceptin, NIR laser irradiation, endocytosis



목 차

1. 서론.....	1
1.1. 유방암의 특성과 치료 방법.....	1
1.2. 광열 치료 요법.....	2
1.3. 표적 지향형 치료제.....	3
1.4. 허셉틴의 한계 및 부작용.....	4
1.5. 허셉틴이 결합된 다기능성 탄소나노튜브 제조.....	6
1.6. 탄소나노튜브를 이용한 광음향 이미지.....	7
2. 재료 및 방법.....	9
2.1. 재료 및 시료 합성.....	9
가. 시약.....	9
나. 허셉틴이 결합된 표적 지향형 다기능성 탄소나노튜브 제조.....	10
가) PL-PEG 가 코팅된 수용성 SWNT (SP)제조.....	10

나) 허셉틴이 결합된 표적 지향형 SWNT 제조 (SP-HER).....	10
다)독소루비신이 결합된 SP-HER (SP-DOX-HER).....	11
2.2. 특성 분석	11
2.3. 약물 결합량 측정	12
2.4. DOX 약물 방출 거동	12
2.5. 광열 효과 측정.....	13
2.6. 세포 실험	13
가. 세포 배양	13
나. 세포 생존력(cell viability) 측정	14
다. 세포내의 약물 전달 효과 측정	14
라. 세포사멸(Apoptosis) 효과 분석	15
2.7. 동물 실험	16
가. 암세포 발현 마우스의 준비 및 약물 처리 프로토콜	16
나. 종양의 절제술	16

다. 생체내의 광음향 이미지 획득	17
2.8. 통계적 분석	18
3. 결과 및 고찰	19
3.1. 나노입자의 특성 분석	19
3.2. DOX 약물 결합 농도 측정	24
3.3. 약물 방출 속도 거동	24
3.4. 근적외선 레이저 조사에 의한 광열 효과	28
3.5. <i>In vitro</i> study	31
가. 세포 독성 실험	31
나. HER-2 에 양성/음성인 cell line 에서의 표적치료 효과 및 광열치료 효과 연구	32
다. 세포내 약물 전달 효과	37
3.6. 동물 모델에서의 암치료 적용을 위한 분자 영상 이미지 획득	42
가. 동물 실험 모델 준비 및 약물 주입	42

나. 동물 모델에서의 암치료 적용을 위한 분자 영상 이미지 획득.....	42
다. 동물모델에서의 암치료 적용.....	43
라. 동물 모델에서의 분자 영상 이미지 획득과 치료 효과 검증	46
4. 결론.....	51
5. 참고문헌.....	52



그림 목차

Fig. 1. The scheme of Herceptin working for HER-2 protein positive breast cancer. (출처; Target therapy for breast cancer Mammology-Breast Surgery- Eurodoctor.ru - 2008).....	5
Fig. 2. Structured of functionalized single-walled carbon nanotubes (SP-DOX- HER).....	21
Fig. 3. An atomic force microscope (AFM) image of SP-DOX-HER conjugates.....	22
Fig. 4. Raman spectroscopy using the droplets of SP, SP-HER, and SP-DOX-HER solution onto glass slide.....	23
Fig. 5. UV-vis spectroscopy of SP, SP-HER, free Herceptin and DOX. The concentration of SP and loaded DOX content onto SP were dtermined by absorption peak at 808 nm and 498 nm, respectively.....	26
Fig. 6. <i>In vitro</i> drug release profiles of SP-DOX-HER at different condition (pH 7.4 of PBS buffer solution and pH 5.5 of sodium acetate buffer solution with or without 808 nm laser irradiation).....	27
Fig. 7. Determination of the photothermal response of SP-DOX-HER (a) Thermal elevation of SP-DOX-HER aqueous solution at different concentration (0, 5, 15,	

20, and 20 $\mu\text{g/mL}$) under 808 nm laser at power density of 1 W/cm^2 . (b) Temperature elevation of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER as a function of laser power densities (0.5, 1, 1.5 and 2 W/cm^2)..... 29

Fig. 8. Thermal IR image of aqueous solution of SP-DOX-HER at different concentrations (0, 5, 15, 20, and 20 $\mu\text{g/mL}$) under 808 nm laser at power density of 1 W/cm^2 for 10 min. 30

Fig. 9. *In vitro* cell cytotoxic effect of Herceptin antibody conjugated SWNT (SP-HER) against HER-2 negative MDA-MB-231 breast cancer cells for 24 h, 48 h and 72 h. 33

Fig. 10. *In vitro* cell cytotoxic effect of Herceptin antibody conjugated SWNT (SP-HER) against HER-2 positive SK-BR-3 breast cancer cells for 24 h, 48 h and 72 h..... 34

Fig. 11. *In vitro* cell cytotoxicity of free DOX, DOX- and DOX/HER- conjugated SWNTs-treated SK-BR-3 cells with different sample concentration. 35

Fig. 12. *In vitro* photothermal cytotoxic effect of DOX-, SP-DOX-HER and SP-DOX-HER with laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 5 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells. Quantitative analysis of live cells and were analyzed by flow cytometry (FACS). The cells were treated with 12.5 $\mu\text{g/mL}$ of

SP-DOX-HER and corresponding conjugated-DOX concentration with or without NIR laser irradiation. After 2 h, the cells were stained by 7-AAD. 36

Fig. 13. Comparison of DOX cellular uptake with 15 $\mu\text{g/mL}$ of free DOX concentration for 1 h and 2 h onto the SK-BR-3 breast cancer cells. 38

Fig. 14. Comparison of DOX cellular uptake with 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-FITC for 1 h and 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells. 39

Fig. 15. Comparison of DOX cellular uptake with 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER-FITC for 1 h and 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells. 40

Fig. 16. Comparison of DOX cellular uptake and sub-cellular accumulation onto the SK-BR-3 breast cancer cells. (a) DOX fluorescence (FL) intensity of at the various condition after 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min. (b) Quantitative analysis of intracellular DOX FL intensity measured by flow cytometry. 41

Fig. 17. *In vivo* photoacoustic image of (a) before and (b) after intratumor injection of SP-DOX-HER (250 $\mu\text{g/mL}$) in tumor-bearing mouse. 45

Fig. 18. *In vivo* photothermal heating responses. Tumor-bearing mice were intratumor injected with 200 μL of 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER when the tumor

volume reached $\sim 150 \text{ mm}^3$. (a) Temperature changes of PBS and SP-DOX-HER injected tumor and (b) IR thermographic images of PBS and SP-DOX-HER injected tumor-bearing mouse with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm^2 for 5 min and 10 min. 48

Fig. 19. The digital photographs of chemo/photothermal treated tumor-bearing mice after 14 days. Tumor-bearing mice were intratumor injected with $200 \mu\text{L}$ of $5 \mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER when the tumor volume reached $\sim 150 \text{ mm}^3$. Subsequently, tumor-bearing mice were treated with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm^2 for 10 min. 49

Fig. 20. *In vivo* photothermal ablation of cancer cells. Tumor-bearing mice were intratumor injected with $200 \mu\text{L}$ of $5 \mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER when the tumor volume reached $\sim 150 \text{ mm}^3$. Subsequently, tumor-bearing mice were treated with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm^2 for 10 min. Tumor volume growth curves of mice at different treatments indicated in 14 days. Data is expressed as mean $\pm$ SD of the three experiments. 50

1. 서론

1.1. 유방암의 특성과 치료 방법

유방암은 전세계 여성 암의 23%로 최다 발생률을 보이며, 최근 서구화된 생활로 인해 우리나라에서도 그 발생률이 빠르게 증가하고 있는 추세이다(서연옥 2007). 서구 여성의 경우에는 60대 이후에서 유방암의 발병율이 상대적으로 많이 발생하는 데에 비해, 우리나라에서는 비교적 젊은 40대나 50대의 나이에서 유방암이 많이 발생하며, 다른 암에 비해 조기 발견 빈도가 높아 수술에 대한 예후가 좋으나 수술 후에 재발의 위험성이 가장 높고 5년 이후에도 재발할 수 있어 지속적인 약물 복용 및 검사 등의 재발 방지 관리가 중요하다(민효숙, 박선영 et al. 2008).

유방암 환자들은 유방암의 제거를 위해 종양을 축소하고 수술의 효과적인 치료 결과를 위하여 수술에 보조적으로 항암 치료를 시행하고, 치료와 재발 방지를 위해 오랜 기간 동안 약물의 독성에 노출되어 심각한 항암제의 부작용이 발생하고 치료 효율이 감소하는 문제점이 발생하고 있다. 또한, 유방암은 항암치료나 방사선치료만으로 완벽하게 치료하기 어려워 외과적인 수술을 통해 치료를 하고 있는데, 수술 후 합병증 및 유방 복원 성형술 등의 부작용이 발생하여, 부작용을 최소

화하는 새로운 비침습적 유방암의 치료가 요구된다(Camejo, Castillo et al. 2017).

1.2. 광열 치료 요법

암의 치료를 위해 수술, 화학 요법 및 방사선 치료가 주요한 방법으로 시행되고 있지만, 수술적 절제로 인한 조직 및 장기의 소실 및 항암 치료에 대한 부작용이 빈번히 발생하므로 비침습적이고 부작용이 적은 암 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 이러한 암 치료 방법 중의 하나인 광열 치료는 암 부위에 나노입자를 전달한 후 근적외선 레이저를 조사할 때 발생하는 열로 인해 상대적으로 열에 대한 저항성이 낮은 암세포를 선택적으로 죽이는 방법으로 (Brust, Walker et al. 1994) (Brust, Walker et al. 1994), 수술이나 화학치료법을 사용할 때 고통과 부작용을 줄일 수 있고, 치료 효과를 높일 수 있어 최근 화학요법과 결합하여 새로운 치료법으로 주목 받고 있다 (Kang, Guo et al. 2017). 하지만, 광열 치료의 문제점은 열을 발생시키기 위해 생체 내에 주입한 광열물질이 체외로 배출이 되지 않을 경우에는 잠재적인 독성의 위험이 있으며 암 세포 부위로의 정확한 전달이 어려워서 실제 암 치료 기술로 적용하기에 한계를 가진다 (West, Hasanjee et al. 2017). 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 광열물질이 정상세포가

아닌 암세포에만 선택적으로 결합하는 표적화 된 광열물질을 이용하여 화학/광열 치료의 결합요법에 의해 암 치료 효과를 높이하고자 한다 (Zou, Wang et al. 2016) (Park, Yang et al. 2009).

1.3. 표적 지향형 치료제

항암제는 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포에도 모두 영향을 주지만, 표적치료 항암제는 암세포에서 발현이 증가되는 특정 표적인자만을 선택적으로 결합하여 그 작용을 억제하여 정상세포에의 부작용을 최소화 하고 암세포에 대한 치료 효과를 향상시키는 장점을 가진다. ‘HER-2’(인간표피 성장 수용체-2)는 세포의 성장에 관여하는 단백질로 HER-2 과발현 유방암은 전체 유방암의 20~30%를 차지하며, 암세포가 빠르게 성장하도록 신호를 보내기 때문에 HER-2 과발현 유방암의 경우 재 발하는 경우가 많으며 치료 예후가 좋지 않다. 한국 로슈의 ‘허셉틴’(성분명 트라스투주맙)은 유방암의 대표적 표적 치료제로서, 유방암 세포의 HER-2 단백질 수용체를 표적으로 하여 작용을 나타내는데, 암 세포 표면의 HER-2에 결합하여 신호전달을 차단하고 암세포 성장을 억제해주며, 체내 면역체계 활성화를 도움을 주는 역할을 한다. 허셉틴은 HER-2 수용체에 결합하며 종양세포가 복제하여 종양이 증식되는 것을 막아 종양의 진행을 늦출 수 있을 뿐 아니라, HER-2를 과발현 하

는 전이성 유방암에서 기존의 항암제와 병용 적용하는 경우 좋은 효과를 내고 있으며, 최근에는 허셉틴이 유방암뿐만 아니라, HER-2 과발현된 진행성 위암에도 효과가 있는 것으로 확인되었다 (Peiris, Spector et al. 2017).

1.4. 허셉틴의 한계 및 부작용

HER-2 표적치료제인 허셉틴은 HER-2 양성 유방암 환자에 60% 이상의 뛰어난 병리학적 치료결과를 나타내기도 하며, 수술 전 후 항암화학약품과 함께 쓰이는 보조요법으로 종양의 크기를 줄여주는 용도로 사용되는 한계가 있어 단독으로 사용 시에는 그 치료 효과가 크게 줄어든다. 그래서, 허셉틴의 치료는 항암화학요법과 병용하는 방법이 보편적이며, 방사선 치료, 광열 효과 등 다른 치료와 동시에 병용할 경우 치료효과가 증대된다. 허셉틴의 표적 치료 방법은 기존의 항암 약물요법과 같은 부작용이 관찰되지는 않았으나, 일주일에 한번 또는 3주일에 한번을 30~90분에 걸쳐 정맥주사로 1년의 오랜 기간 동안 투여 받아야 함으로 허셉틴 치료 환자의 22% 정도에서 심장 기능 이상의 부작용이 보고되었다. 그래서, 심장기능에 이상이 있는 환자에게는 투여가 제한되고 규칙적인 심장 기능 평가가 필요한 단점이 있다.

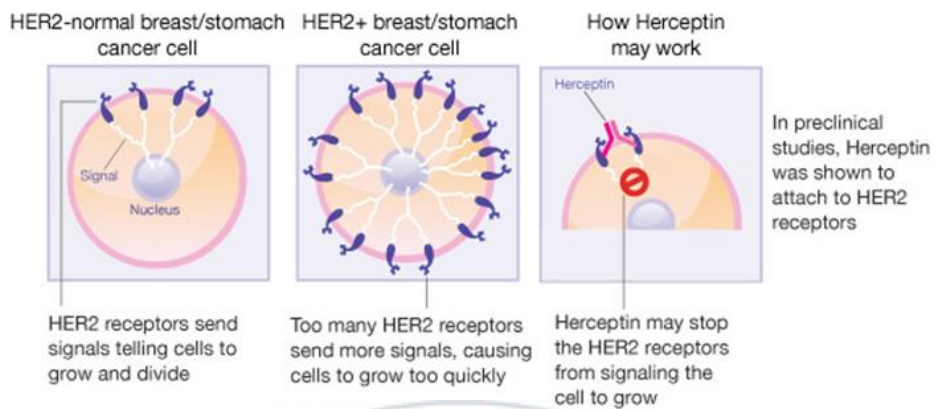


Fig. 1. The scheme of Herceptin working for HER-2 protein positive breast cancer.

(출처; Target therapy for breast cancer Mammology-Breast Surgery-Eurodoctor.ru - 2008)

1.5. 허셉틴이 결합된 다기능성 탄소나노튜브 제조

단일벽 탄소나노튜브(SWNT)는 구조적, 전기적 특성 때문에 근적외선 영역의 레이저를 흡수하여 비침습적인 광열치료의 광흡수제로 사용이 가능하다. 단일벽 탄소나노튜브가 포함된 암세포가 근적외선(NIR)에 노출되면 탄소나노튜브의 광에너지가 열에너지로 전환되어 세포를 죽일 수 있어 암세포를 제거하기 위한 표적화 된 암세포 치료에 적용이 가능하다. 또한, SWNT의 넓은 표면 구조적 특징을 이용하여 다양한 약물, 단백질 및 항체를 결합시킬 수 있어 암 치료 및 검사에 다양한 생의학 적 적용이 가능하다 (Kim, Ramasamy et al. 2014).

SWNT는 소수성으로 물에 불용성이며 독성의 문제가 제기되어 수용성 화 및 생체 적합형으로 변형이 필요한데, PL-PEG(Polyethylene glycol phospholipid)는 소수성인 SWNT의 표면을 코팅시켜 수용성화할 뿐 아니라, 나노입자가 종양세포에 흡수되는 것을 촉진하고, 암세포 내에 머무는 시간을 연장시키는 효과가 있고, 또한 PEG 분자의 말단에 작용기를 이용함으로 쉽게 허셉틴을 화학적으로 결합시킬 수 있어 표적화 할 수 있는 구조를 가진다 (Liu, Tabakman et al. 2009) (Kohay, Sarisozen et al. 2017). 허셉틴이 결합된 PL-PEG 코팅 SWNT는 HER-2가 과발현된 암세포에 대해 표적화 할 수 있는 장점을 가지며, 암 발병 부위로의 선택적인 열전달 효능을 향상시켜 열치료의 효율성과 안정성을 높여 광열

치료의 효과를 극대화 시킬 수 있다.

1.6. 탄소나노튜브를 이용한 광음향 이미지

탄소나노튜브는 근적외선 범위에서 강한 흡광도와 높은 열팽창 계수를 가진다. 이러한 적외선 영역에서의 광학적인 특성으로 인해 탄소나노튜브는 근적외선을 이용한 종양의 광열치료와 동시에 광음향 이미징(photoacoustic imaging)에의 적용이 가능하다 (De La Zerda, Zavaleta et al. 2008).

광음향 이미지 기술은 광학기법과 초음파 영상법을 결합한 기술로 생체 조직을 이온화시키지 않는 비침습적인 진단기술로서, 우수한 명암비와 대조능을 가지고 있기 때문에 차세대 고분해능 의료영상 기술로 많은 관심을 받고 있다. 또한 암세포와 결합한 광열물질을 검출하는데 2인치의 영상 투과 및 비침습적인 방법으로 인해 유방암의 조기 진단에 이용이 가능하다. 특히, 표적화 된 약물인 허셉틴이 결합된 기능화 된 탄소나노튜브를 이용하여 기존의 조직검사를 통해 얻기 어려웠던, 비침투성, 생분해성, 생체적합형 운반체로서 암세포 주변 혈관을 통해 전달된 나노입자의 암세포를 치료하는 과정을 실시간 평가 및 모니터링으로 향후 조기암 진단율의 획기적 향상뿐 아니라 진단과 치료제의 두 가지 역할을 동시에 수행할 수 있게 해주어 암치료에 크게 기

여하리라 기대된다.

본 연구에서는 HER-2가 발현된 유방암에 특이성을 갖는 표적지향형 탄소나노튜브와 결합된 암세포의 광음향 이미지의 획득으로 비침습적으로 생체내부의 암세포 진단 및 샘플의 위치 관찰이 가능하고, 동시에 병변 부위에 약물 전달 시스템과 근적외선 레이저를 이용한 광열치료 적용의 시너지 효과로 암 치료효과를 극대화시키며 부작용을 최소화하는 데 목적이 있다.



2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 시료 합성

가. 시약

본 연구에 사용된 Hipco single-walled carbon nanotubes는 Unidym (Sunnyvale, CA, USA)에서 구입하였으며, 제조사의 protocol에 따라 정제하였다. 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(amino (polyethylene-glycol)-2000) (PL-PEG)는 Avanti Polar Lipids Inc에서 구입하였고, Doxorubicin hydrochloride (DOX), Sulfo-SMCC, Traut's reagent 및 EDTA는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. Sodium bicarbonate, Chloroform, ethanol와 Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei chemical Co. (Tokyo, Japan)로부터 구입하였다. Phosphate -Buffered Saline (PBS)와 Dulbecco's Phosphate- Buffered Saline (DPBS)는 Hyclone (UT, USA)에서 구입하였으며, herceptin은 부산대학교병원에서 연구용으로 제공 받았으며, 모든 시약은 정제 없이 그대로 사용하였다.

나. 허셉틴이 결합된 표적 지향형 다기능성 탄소나노튜브 제조

가) PL-PEG 가 코팅된 수용성 SWNT (SP)제조

허셉틴과 독소루비신이 결합된 다기능성 탄소나노튜브는 기존의 연구에서 보고된 방법을 사용하여 3 단계로 제조하였다 (Liu, Tabakman et al. 2009). 먼저, 1 mg 의 Raw Hipco SWNT 를 5 mg 의 PL-PEG 를 5 mL 의 물에 가한 후 초음파 분산기에서 1 시간동안 반응시켰다.

초고속원심분리기를 이용하여 24,000 rpm 에서 6 시간 동안 원심분리 후 상층액을 분리하였다. 과량의 PL-PEG 를 제거하기 위하여 100 kDa 의 centrifugal filter device 를 이용하여 4,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하고, 이 과정을 4~5 회 반복 시행하였다. 808 nm 에서 흡광도를 측정하여 제조된 SP(몰흡광계수 = $0.0465 \text{ cm}^{-1}\text{cm}^{-1}$)의 농도를 측정한다.

나) 허셉틴이 결합된 표적 지향형 SWNT 제조 (SP-HER)

다음으로, Her-2 에 세포 특이성을 가지는 허셉틴은 SWNT 표면에 코팅된 PL-PEG 말단의 NH_2 - group 의 반응을 통해 결합되었다. 요약하면, 0.5 mL 의 SP($50 \mu\text{g/mL}$)를 0.5 mg 의 sulfo-SMCC 및 60 μL 의 PBS (10X)와 2 시간 반응시켜 활성화 시켰다. Sulfo-SMCC-SWNT 는 1.7 $\mu\text{L/ml}$ Traut' reagent (5 mM)과 1 μL EDTA (0.5 M)로 활성화 된 6 μL 의 허셉틴($140 \mu\text{M}$)

과 4°C 에서 2 시간 반응시켰다. 그리고, 반응 용액에 50 μ L PBS (1X)와 0.5 M EDTA 를 가한 후 4°C 에서 24 시간 반응시킨 후 10 KDa centrifugal filter device 를 사용하여 생성물을 정제하였다.

다)독소루비신이 결합된 SP-HER (SP-DOX-HER)

항암제인 독소루비신을 SWNT 의 표면에 결합시키기 위하여, 1mL SP(50 μ g/mL)를 60 μ L DOX (10 mM), 40 μ L PBS (10X)와 2 μ L NaHCO₃ (0.5 M)를 4°C 에서 24 시간 반응시킨 후, 10 KDa centrifugal filter device 를 사용하여 미반응된 DOX 를 제거하고 생성물을 정제하였다.

2.2. 특성 분석

제조된 다기능성 SP-DOX-HER 의 평균 길이는 mica substrate 위에서 contact mode 로 Atomic microscope (AFM; Bruker, Icon-PT-PLUS, Germany)를 이용하여 측정하였으며, 분광학적 특성은 Raman spectroscopy (Nanofinder 30, Tokyo Instrument, Japan)에 의해 측정되었다. 또한, SP 와 SP-DOX 의 광학적 특성 및 농도는 UV-vis spectroscopy (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

2.3. 약물 결합량 측정

SWNT 표면에 결합된 결합된 DOX 의 함량은 490 nm 에서 DOX 결합 전후의 흡광도의 차이와 490 nm 에서 DOX 의 표준 검량곡선을 바탕으로 계산되었다 (Kim, Ramasamy et al. 2014). 또한, SWNT 에 코팅된 PL-PEG 말단에 결합된 결합된 허셉틴의 양을 정량하기 위해 BCA protein assay 를 시행하여 탄소나노튜브의 결합된 허셉틴의 양을 계산하였다 (Smith, Krohn et al. 1985).

2.4. DOX 약물 방출 거동

DOX 약물의 방출 거동을 측정하기 위하여, 1 mL SP-DOX-HER 샘플이 담긴 dialysis tube (MWCO = 10,000 Da, spectra/Por)을 10 mL pH 7.4 (PBS buffer)와 pH 5.5 (acetate buffer)의 용액에 담근 후, 37°C에서 100 rpm으로 교반한다. 808 nm 레이저($1\text{W}/\text{cm}^2$)를 5분간 조사하여 레이저 조사 전·후의 약물 방출 거동을 비교한다 (Liu, Ko et al. 2014). 일정 시간 간격으로 tube 외곽 용액을 UV-vis spectroscopy에서 490 nm의 흡광도를 측정하여 SWNT 표면으로부터 방출된 DOX의 양을 정량하고 누적 방출률을 시간에 따라 표시한다.

2.5. 광열 효과 측정

제조된 SP-DOX-HER 의 광열효과를 측정하기 위하여, 여러가지 농도(0, 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)와 레이저의 세기(0, 0.5, 1, 2 W/cm^2)의 808 nm 의 근적외선을 조사하여 thermocouple 을 이용하여 1 초 시간 단위로 용액의 온도를 측정하였다. 이 때, 대조군으로는 증류수를 사용하였다. 또한, 적외선 화상 카메라(FLIR i5, FLIR instrument, MA, USA)로 용액의 온도 변화 및 분포도를 관찰하였다.

2.6. 세포 실험

가. 세포 배양

본 연구에서 사용된 MDA-MB-231 과 SK-BR-3 human breast cancer cells은 한국 세포주 은행(KCLB; Seoul, Korea)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS; Hyclone)과 1% penicillin/streptomycin (Hyclone)을 포함한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Hyclone) 배지를 이용하여 온도 37°C, 5% CO_2 조건의 incubator에서 배양하였으며 세포 배지는 2~3일 간격으로 교환해 주었다.

나. 세포 생존력(cell viability) 측정

항암제와 광열효과에 의한 세포 증식 억제 및 사멸을 알아보기 위해 세포 생존력을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. SK-BR-3 세포를 96 well plate에 2×10^4 cells/well의 밀도로 24 시간 배양시킨 후, 시료를 농도별로 처리하여 24 시간 후에 배지를 제거하고 0.5 mg/mL MTT solution을 첨가한 후 4시간 동안 incubator에서 반응시키고 PBS로 2 회 세척 후 100 μ L의 DMSO로 가하여 활성화 세포에 의해 형성된 formazan crystals을 녹인 후, GENios microplate reader (GENios, TECAN, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하고, 시료를 가하지 않은 대조군(Control)의 흡광도와 비교하여 세포 생존력을 퍼센트 비율로 나타내었다.

다. 세포내의 약물 전달 효과 측정

약물 전달효과에 의해 항암제인 DOX의 세포내의 결합은 confocal microscope에 의해 측정되었다. SK-BR-3 세포들은 35 mm confocal dish에 2×10^5 의 세포 밀도로 배양되었다. DOX, SP-DOX 및 SP-DOX-HER 샘플과 2시간 처리한 후 808 nm 레이저($1\text{W}/\text{cm}^2$)를 5분간 조사하고 추가적으로 2시간동안 배양하였다. 배양한 세포들을 차가운 PBS로 세척 후 4%의 파라포름알데하이드 용액에서 고정시킨 후 세포핵을 Hoechst 33342로

20분간 염색하였다. 세포를 PBS로 세척 후 confocal microscope(ZEISS, LSM 700, Jena, Germany)를 이용하여 세포내의 DOX의 붉은 형광 분포를 관찰하였다.

또한, 세포내의 DOX 약물 결합의 세기를 정량화하기 위하여, 배양된 SK-BR-3 세포를 DOX, SP-DOX-HER와 SP-DOX-HER+레이저의 조건에서 처리한 후, 차가운 PBS로 세척 후 트립신으로 수확하여 PBS에 resuspension하고 flow cytometry (BD FACSVerse, BD Biosciences, CA, USA)에서 붉은 형광의 세기를 측정하였다.

라. 세포사멸(Apoptosis) 효과 분석

세포의 산화적 스트레스에 의한 apoptosis의 분석은 Annexin V-FITC/PI double staining kit (BD Bioscience, CA, USA)를 이용하여 flow cytometer에서 측정하였다. 세포를 60 mm cell culture dish에 5×10^5 cells의 밀도로 24 시간 배양시킨 후, 시료를 처리하고 24시간 더 배양시킨다. 부착 세포를 trypsin으로 떼어내어 세포를 수확한 후 원심분리하고 차가운 PBS로 washing한다. 100 μ L의 1X binding buffer를 가하고 cell을 resuspension하고 annexin V-FITC/PI stock solution을 각각 5 μ L와 10 μ L을 가하고 빛을 차단한 후 실온에서 15분간 방치한다. 400 μ L의 1X binding buffer를 가한 후

FACS를 이용하여 apoptotic cell을 정량하였다.

2.7. 동물 실험

가. 암세포 발현 마우스의 준비 및 약물 처리 프로토콜

본 실험에서 사용된 암세포 발현 마우스 모델은 18-21 g의 7주령의 BALB/C 암컷 누드 마우스를 Orient Bio Inc. (Gyeonggi-Do, Korea)에서 공급받아 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $50 \pm 20\%$, 조명 12시간, 조도 150~300 Lux의 청정동물사육실의 사육 조건하에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

동물실험의 모든 과정은 부산대학교병원 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 수행하였다. 암세포 발현 마우스 모델을 준비하기 위하여 플라스크에 배양된 4×10^6 개의 SK-BR-3 세포를 마우스 옆구리 피하지방에 주입한 후 종양의 크기가 $\sim 160 \text{ mm}^3$ 가 되면 치료를 진행하였다.

나. 종양의 절제술

암이 발현된 마우스의 종양 부위에 100 μL 의 시료를 주입하여 종양에 국소적으로 머물게 한 후, 808 nm 레이저($1\text{W}/\text{cm}^2$)를 5분간 2회 조사하여

42~45°C의 열을 발생시켰다. 이 때, thermometer probe를 시료가 주입된 종양의 가운데에 위치시킨 후 레이저 조사 시 시간에 따른 온도 변화를 측정하였고, 열화상카메라로 마우스 종양 부위의 온도 분포도를 관찰하였다. 광열 치료효과를 검증하기 위하여, 광열 치료 후 2일간격으로 2주간 다음의 식에 따라 종양의 크기를 측정하였다 (Niu, Xu et al. 2017).

$$\text{종양의 크기} = \frac{(\text{종양의 길이}) \times (\text{종양의 너비})^2}{2}$$

다. 생체내의 광음향 이미지 획득

광음향 이미지 시스템은 Bui et al (Bui, Hlaing et al. 2015)에 의해 기술된 바와 같이 측정되었으며, 종양의 크기가 ~ 160 mm³ 도달하였을 때, 종양 부위에 직접적으로 10 µg/mL 시료를 100 µL 주입하여 1시간 후 광음향 이미지를 획득하였다. 광음향 시스템은 5 ns의 pulse width와 10 Hz의 repetition rate의 Nd:YAG laser에 의해 구현되는 optical parametric oscillator (OPO) laser (Surelite OPO Plus, Continuum, CA, USA)가 장착 되었으며, 10 MHz의 transducer (Plympus NDT, Waltham, MA, USA)에 의해 x축과 y축으로 100 × 100 µm의 scanning step size로 시료 주입 전후의 광음향 이미지를 획득하였다.

2.8. 통계적 분석

모든 실험들은 3 회 이상씩 독립적으로 실시하였으며, 측정된 결과는 평균과 표준편차로 표시하였고, 각 실험의 대조군에 대하여 student t-test 를 이용하여 p-value 값이 0.05 이하($p < 0.05$)인 경우에는 통계적으로 유의하다고 분석하였다.



3. 결과 및 고찰

3.1. 나노입자의 특성 분석

본 연구에서는 유방암의 표적치료를 위하여 허셉틴과 DOX 가 결합된 단일탄소나노튜브를 성공적으로 합성하였고, 그 모식도를 Fig. 2 에 나타내었다. 먼저, 불용성인 SWNT 는 생체적합형 물질인 PL-PEG(Polyethylene glycol phospholipid) amine 을 non-covalent 방법으로 코팅하여 수용성화 한 후, 탄소나노튜브에 코팅된 PL-PEG-amine 의 말단기인 amine 과의 화학적인 결합을 이용해서 허셉틴을 탄소나노튜브에 conjugation 시켜 HER-2 과발현된 유방암에 표적화 하였다. 또한, 약물전달 시스템과 결합하여 암치료 효과를 극대화하기 위해 탄소나노튜브 표면에 hydrophobic interaction 이용하여 항암제인 독소루비신을 결합시켰다.

합성된 SWNTs (SP)와 SWNTs-Herceptin (SP-HER)은 수용액에서 aggregation이 없이 안정한 상태를 나타내었으며, 합성된 기능성 탄소나노튜브를 Atomic force microscopy (AFM)과 FT-Raman spectroscopy를 이용하여 구조적인 특성을 조사하고, Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었다.

PL-PEG-amine으로 수용성으로 개질된 SWNT는 수용액에서 aggregation 없이 안정한 상태를 나타내었으며, Atomic force microscopy (AFM)를 통해 100~150 nm의 균일한 길이를 가지는 것을 확인하였다. Raman spectroscopy

에서 탄소나노튜브의 특징적인 피크인 G-band ($1,580\text{ cm}^{-1}$), D-band ($\sim 1,300\text{ cm}^{-1}$), RBM modes ($100 \sim 300\text{ cm}^{-1}$)를 확인하였으며, RBM mode의 narrow width를 통해 1~1.2 nm의 탄소나노튜브의 지름을 확인하였다 (Michel, Paillet et al. 2011).



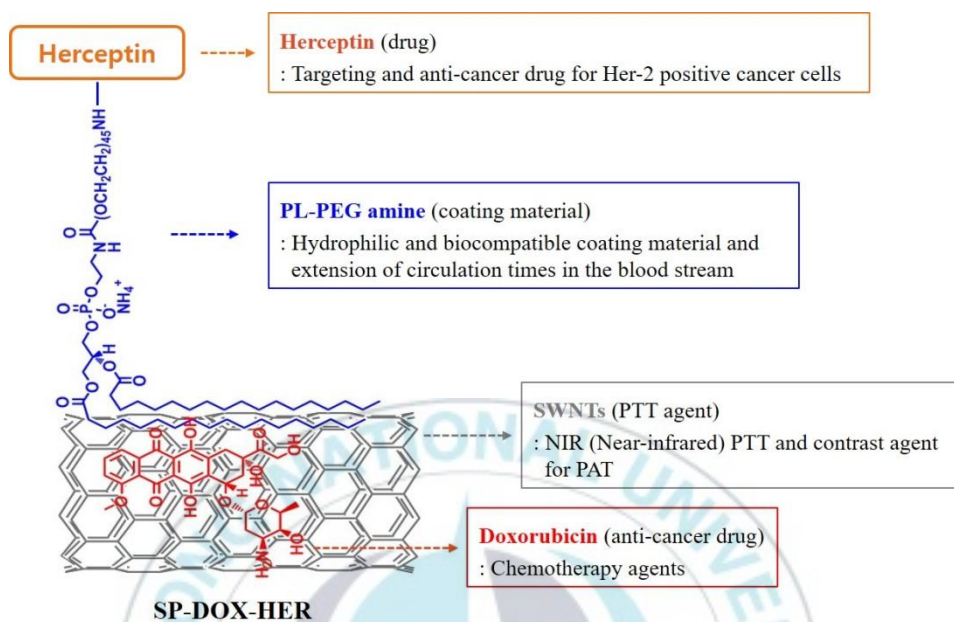


Fig. 2. Structured of functionalized single-walled carbon nanotubes (SP-DOX-HER)

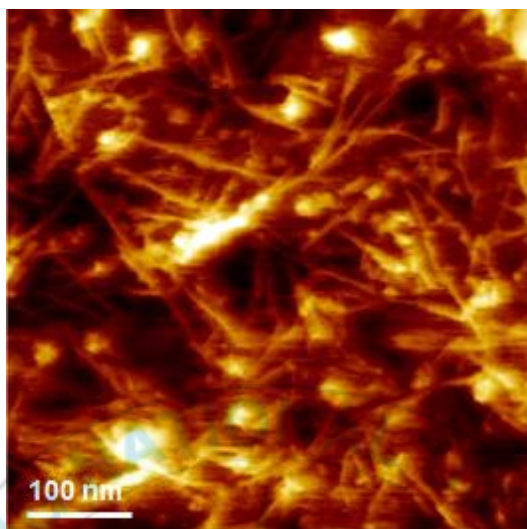


Fig. 3. An atomic force microscope (AFM) image of SP-DOX-HER conjugates.

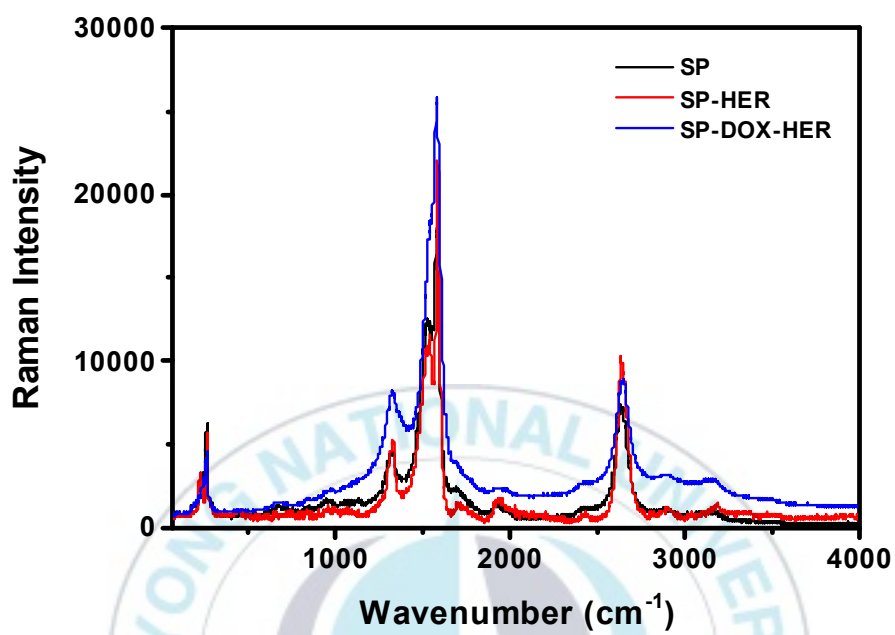


Fig. 4. Raman spectroscopy using the droplets of SP, SP-HER, and SP-DOX-HER solution onto glass slide.

3.2. DOX 약물 결합 농도 측정

제조된 SP-DOX-HER의 광학적 특성을 UV-vis spectroscopy (Fig. 5)를 이용하여 측정하고 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 측정 결과, SWNT는 근적외선 영역에서의 광범위한 흡광도를 나타내었고, DOX의 결합 후에 490 nm에의 DOX의 특징적인 peak 생성으로 DOX의 결합을 확인하였다.

다음으로, 약물전달시스템의 효율을 측정하기 위하여 SWNT에 결합된 DOX와 허셉틴의 양을 측정하였다. DOX 결합량을 합성된 490 nm의 파장에서 SP와 SP-DOX-HER 나노입자의 흡광도의 차이를 계산하고 DOX 표준 검량선에서 도출된 일차식에서 결합된 DOX를 계산하였다.

SWNT 표면에 π - π interaction으로 결합된 DOX는 490 nm에서의 DOX의 흡광도를 기반으로 하여 1 g SWNT당 3.2 g의 DOX가 결합되어 있음을 계산하였다 (Liu, Sun et al. 2007). 탄소나노튜브에 결합된 허셉틴의 양을 정량하기 위해, 탄소나노튜브의 결합된 허셉틴의 양을 BCA protein assay에 의해 계산하였고, 1 g SWNT당 2.23 g의 허셉틴이 결합되어 있음을 계산하였다.

3.3. 약물 방출 속도 거동

암세포에서의 항암제 약물의 전달효율을 측정하기 위하여, 정상세포인

pH 7.4과 암세포의 pH 5.5 완충용액에서의 조건에서 약물 방출률을 측정하였다. SWNT에 결합된 DOX의 방출 속도는 암세포의 낮은 pH와 광열치료의 조건하에 약물방출이 크게 향상되는 것을 확인하였다. DOX는 SWNT 표면에 π - π interaction 으로 약하게 결합되어 있어 산성의 조건에서는 DOX이 protonation 되어 암세포의 낮은 pH 조건에서는 용해도가 증가하여 SWNT 표면에서 쉽게 해리된다 (Gu, Cheng et al. 2011). 특히, 약물 전달 시스템과 광열치료의 결합으로 인해 뛰어난 시너지 효과를 나타내었다. 결과적으로, 탄소나노튜브에 결합된 항암제가 암세포의 낮은 pH와 근적외선 결합시 약물 방출 속도가 증가되고, 암세포 내로 결합되는 약물의 양이 증가되어 적용되는 약물의 양을 줄일 수 있을 뿐 아니라 정상세포에 대한 부작용을 줄여 줄 수 있을 것으로 기대된다.

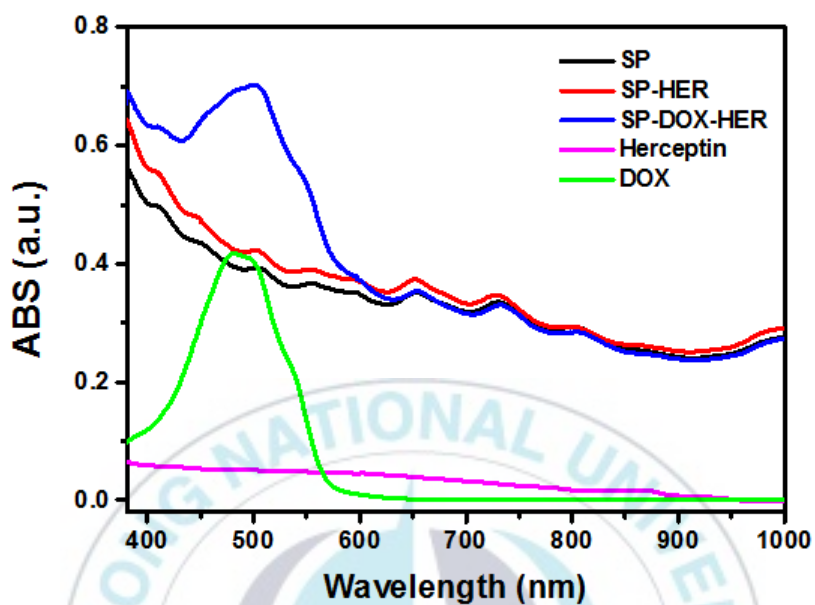


Fig. 5. UV-vis spectroscopy of SP, SP-HER, free Herceptin and DOX. The concentration of SP and loaded DOX content onto SP were determined by absorption peak at 808 nm and 498 nm, respectively.

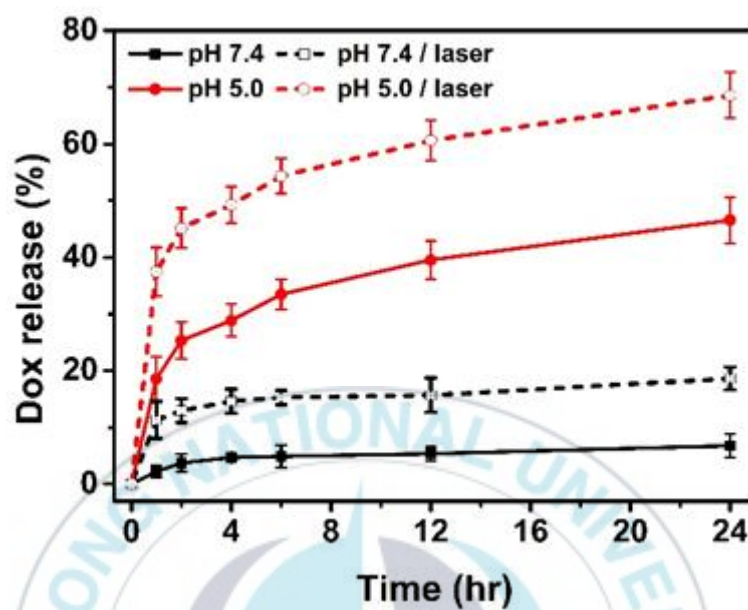


Fig. 6. *In vitro* drug release profiles of SP-DOX-HER at different condition (pH 7.4 of PBS buffer solution and pH 5.5 of sodium acetate buffer solution with or without 808 nm laser irradiation).

3.4. 근적외선 레이저 조사에 의한 광열 효과

808 nm의 근적외선 레이저를 이용하여 합성된 다기능성 SWNTs (SP-DOX-HER) 용액의 농도와 레이저의 세기에 따른 광열 효과를 측정하였고, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 생체내의 광열효과를 예측하기 위해 시료의 농도와 레이저의 세기를 변수로 하여 광열 효과에 의한 온도 변화를 측정하였다. 합성된 SWNT 수용액에서의 광열 치료에 의한 온도 변화를 측정한 결과, 샘플의 농도와 laser power가 증가함에 따라 광열 치료 온도도 증가하였다. 수용액과 tissue phantom에서 발열효과에 의한 thermal image를 측정한 결과, 빠른 대류영향(convection effect)으로 인해 반응 용기 내에서 균일한 온도 분포도를 나타내었고 열 손실(heat loss)로 인해 일정 시간이 지나 후 평형에 도달하였다. SWNT의 넓은 적외선 영역 범위의 광학적 특성으로 인해 광열치료 적용 시에 빠른 열적 반응 및 높은 열전환 효율을 나타내는 것을 실험 결과를 통해 확인하였다.

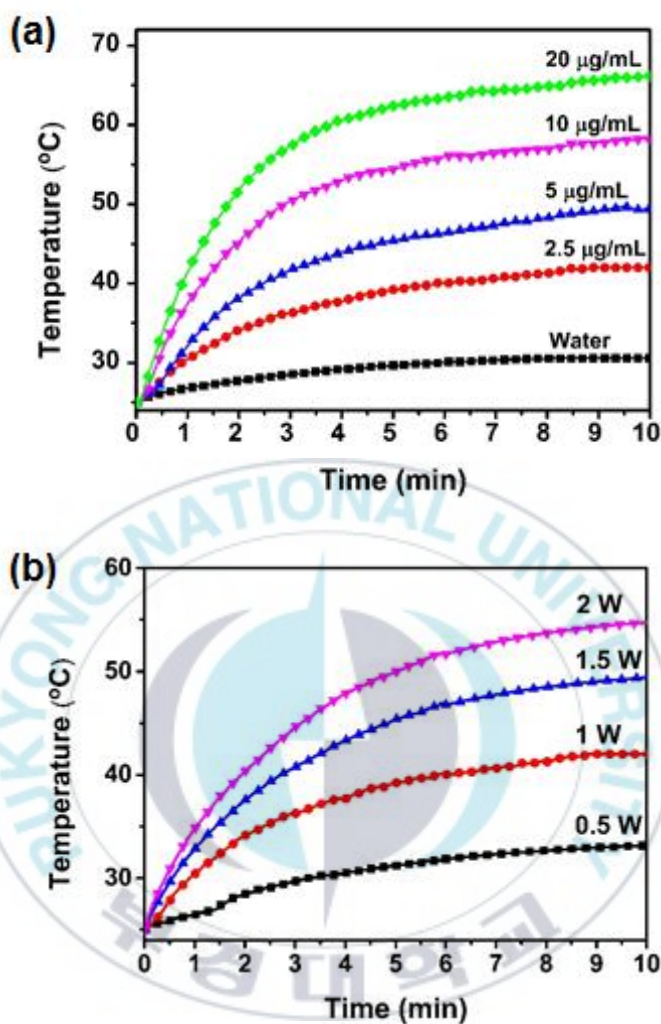


Fig. 7. Determination of the photothermal response of SP-DOX-HER (a) Thermal elevation of SP-DOX-HER aqueous solution at different concentration (0, 5, 15, 20, and 20 $\mu\text{g/mL}$) under 808 nm laser at power density of 1 W/cm^2 . (b) Temperature elevation of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER as a function of laser power densities (0.5, 1, 1.5 and 2 W/cm^2).

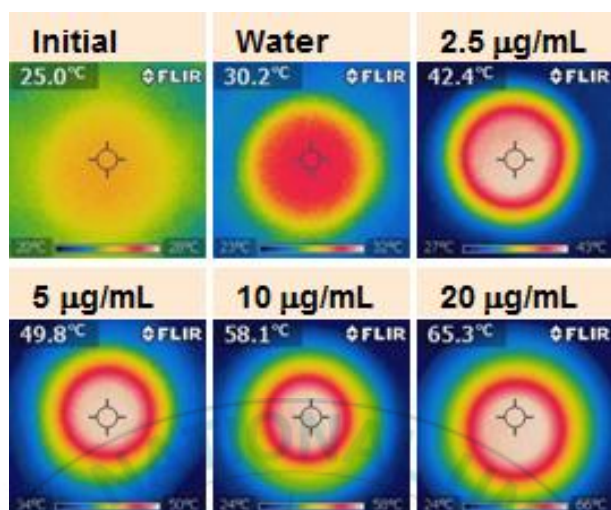


Fig. 8. Thermal IR image of aqueous solution of SP-DOX-HER at different concentrations (0, 5, 15, 20, and 20 µg/mL) under 808 nm laser at power density of 1 W/cm² for 10 min.

3.5. *In vitro* study

합성된 허셉틴과 독소루비신이 결합된 탄소나노튜브를 이용하여 세포실험을 통한 최적의 광음향/표적 광열 치료 효율을 위한 탄소나노튜브의 농도를 검증하고, 표적화된 탄소나노튜브의 세포 내 안정성 검증을 시행하였으며, HER-2에 양성인 SK_BR-3 유방암 세포주에서의 표적 치료 효과를 비교하였다.

가. 세포 독성 실험

제조된 다기능성 SWNT의 암세포 치료효과를 확인하기 위하여 세포내 독성 실험을 실시하고 그 결과를 Fig.8~Fig.10에 나타내었다. 허셉틴의 potential toxicity 측정 결과, HER-2 negative cells인 MDA-MB-231 cells의 경우에는 80 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도와 72 시간 이내의 조건에서는 세포 독성의 영향이 적었으나, HER-2 positive SK-BR-3 cells은 Herceptin 농도와 incubation time에 따라 세포독성이 크게 증가하는 것으로 확인되었고, 농도에 의한 영향보다 incubation time에 의한 영향이 더 큰 것으로 사료된다.

항암제 약물에 의한 세포 독성을 확인한 결과 DOX가 결합된 SWNT는 DOX 단독으로 적용할 경우에 세포 독성은 약간 낮게 나타났으며, Herceptin과 DOX를 결합 시에 Herceptin을 결합시키지 않은 경우에 비해 10% 정도의 증가된 암세포 치료효과를 나타내었다. 특히, Herceptin과

DOX가 결합된 SWNT를 광열치료와 결합시켰을 경우에는 생존 세포수가 10% 이하로 크게 감소하여 광열치료와 약물치료의 결합에 의해 항암 효과가 크게 증가한 것으로 사료된다.

나. HER-2 에 양성/음성인 cell line 에서의 표적치료 효과 및 광열치료 효과 연구

HER-2에 양성과 음성인 SK-BR-3와 MDA-MB-231 유방암 세포에 대하여 FITC가 표지된 Herceptin-conjugated SWNT와 DOX의 형광 강도를 비교한 결과 양성인 SK-BR-3에서의 형광 강도가 증가하고, NIR laser irradiation 후 nucleus에 약물의 축적이 증가한 것을 확인하였고, 광열치료 적용 후에 대부분의 세포에서 cytoplasm이 손실과 더불어 세포내의 핵에서의 약물의 sub-cellular localization이 증가한 것을 3D confocal microscopy와 flow cytometry를 통해 검증하였다.

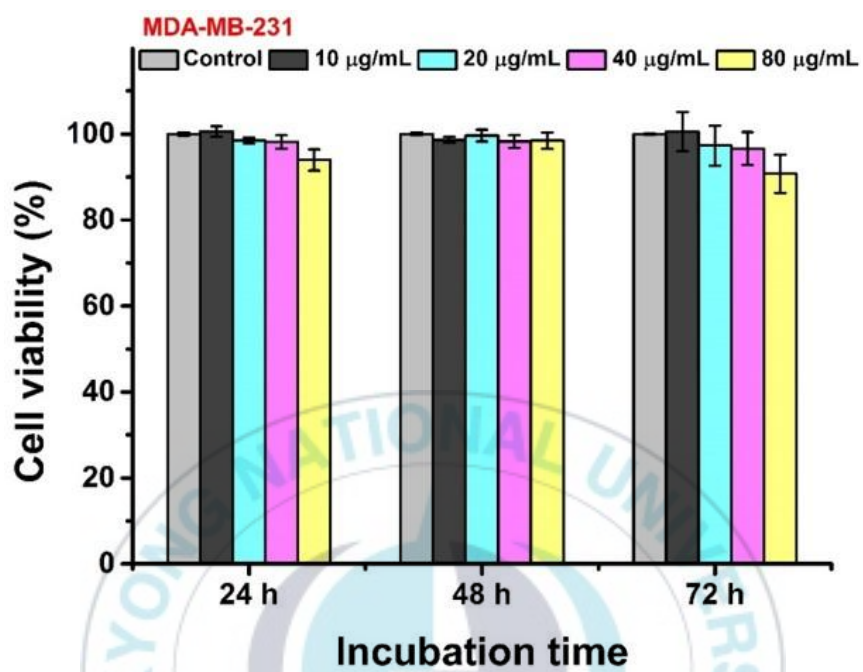


Fig. 9. *In vitro* cell cytotoxic effect of Herceptin antibody conjugated SWNT (SP-HER) against HER-2 negative MDA-MB-231 breast cancer cells for 24 h, 48 h and 72 h.

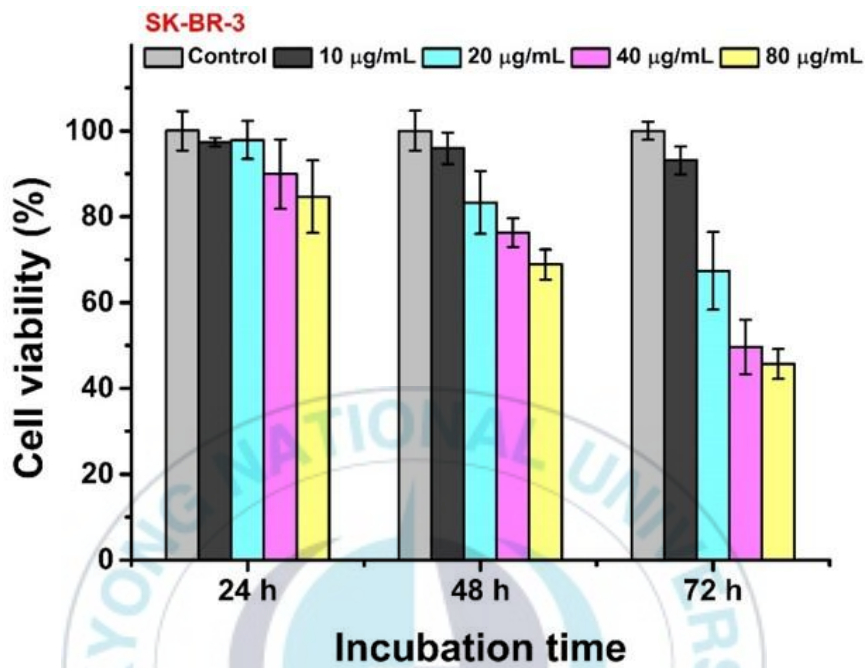


Fig. 10. *In vitro* cell cytotoxic effect of Herceptin antibody conjugated SWNT (SP-HER) against HER-2 positive SK-BR-3 breast cancer cells for 24 h, 48 h and 72 h.

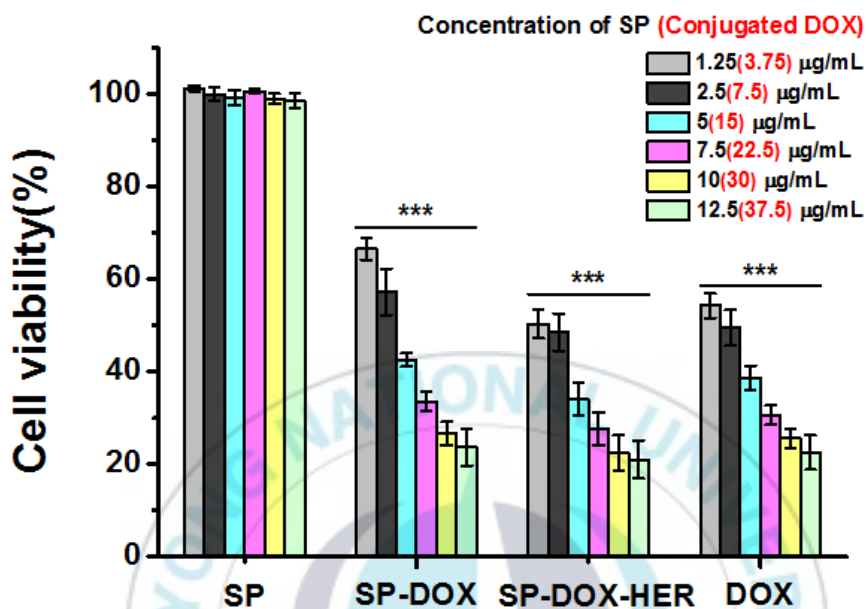


Fig. 11. *In vitro* cell cytotoxicity of free DOX, DOX- and DOX/HER- conjugated SWNTs-treated SK-BR-3 cells with different sample concentration.

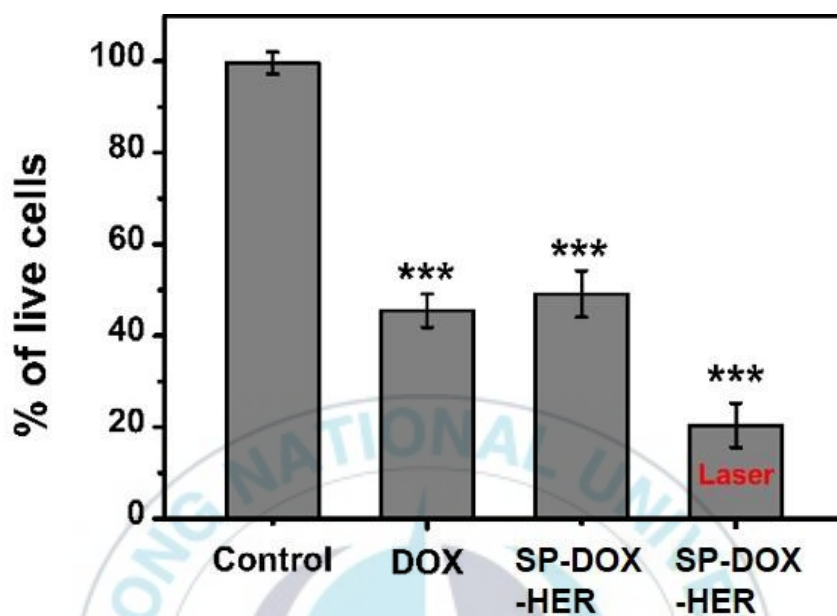


Fig. 12. *In vitro* photothermal cytotoxic effect of DOX-, SP-DOX-HER and SP-DOX-HER with laser irradiation at laser power density of 1 W/cm² for 5 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells. Quantitative analysis of live cells and were analyzed by flow cytometry (FACS). The cells were treated with 12.5 µg/mL of SP-DOX-HER and corresponding conjugated-DOX concentration with or without NIR laser irradiation. After 2 h, the cells were stained by 7-AAD.

다. 세포내 약물 전달 효과

세포핵(Nucleus)은 세포의 유전자의 정보가 저장되어 있는 곳으로 약물 내성을 줄이고 약물전달 효과를 증가시키기 위해서는 세포내기관인 nucleus에의 약물 축적이 무엇보다도 중요하며, 세포핵(nucleus)으로의 확산을 증가시키기 위해서는 미토콘드리아 막(mitochondria membrane)의 손실(loss)이 수반되어야 한다.

약물전달의 메커니즘을 이해하기 위해 세포(cell)에 결합된 SWNT를 확인하기 위해 Herceptin과 DOX가 결합된 SWNT에 FITC를 이용한 세포 라벨링(cell labeling)을 하고 세포 내 결합을 confocal microscopy로 측정하고 Fig. 13~15에 나타내었다. 시간이 증가할수록 DOX의 세포핵(nucleus)에서의 축적이 증가하였으며, free DOX와 Herceptin에 표적화 된 SK-BR-3에서의 축적농도가 증가하였다. FITC는 레이저 조사(laser irradiation) 전에는 세포(cell)의 cytoplasm에 분포하고 있으나, 레이저 조사(laser irradiation)에 의해 세포핵(nucleus)에도 localization된 것을 확인하였고, 이는 laser irradiation에 의해 mitochondria membrane loss에 의해 DOX가 nucleus로 확산되어 nucleus accumulation이 증가할 뿐 아니라 SWNT도 세포핵(nucleus)으로 entering되는 것으로 사료된다.

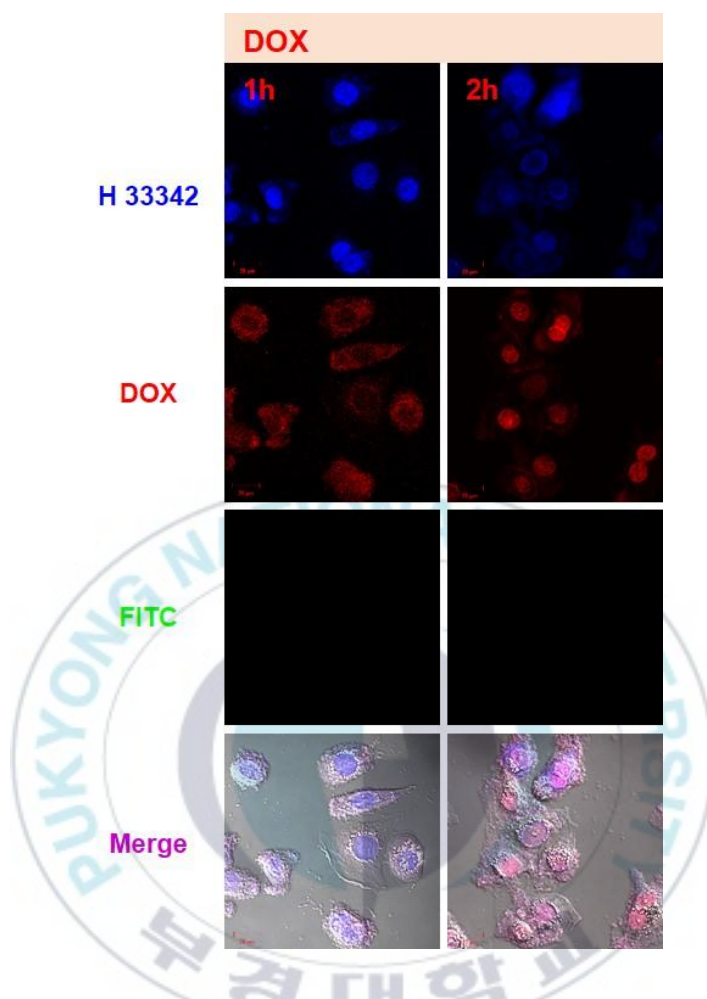


Fig. 13. Comparison of DOX cellular uptake with 15 $\mu\text{g/mL}$ of free DOX concentration for 1 h and 2 h onto the SK-BR-3 breast cancer cells.

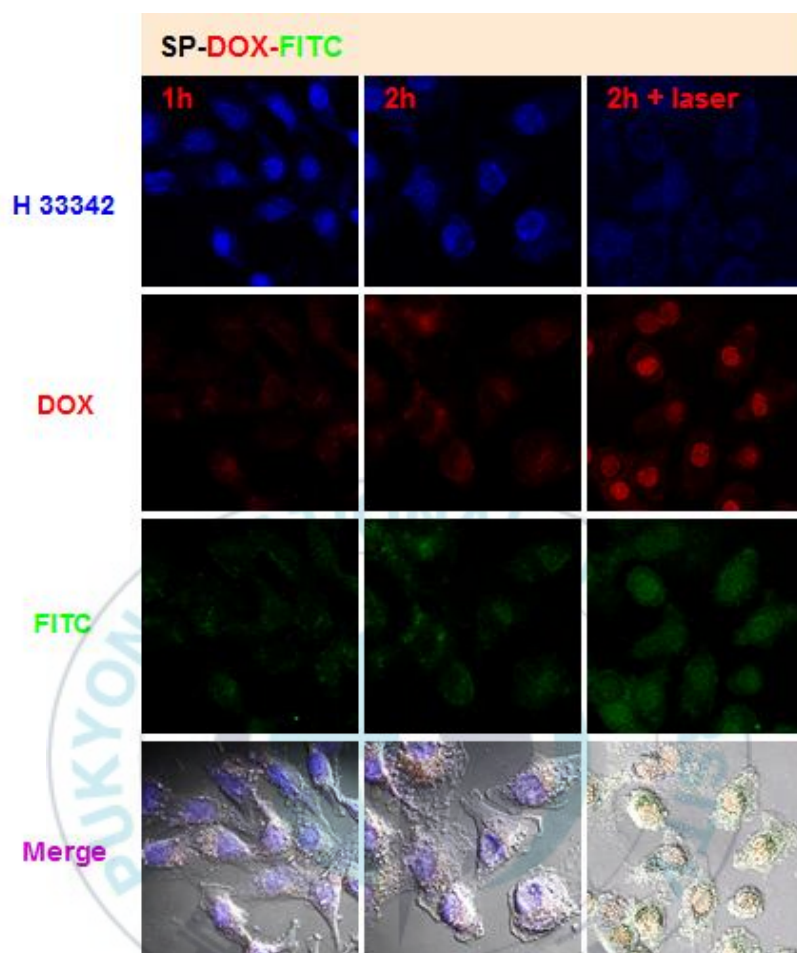


Fig. 14. Comparison of DOX cellular uptake with 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-FITC for 1 h and 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells.

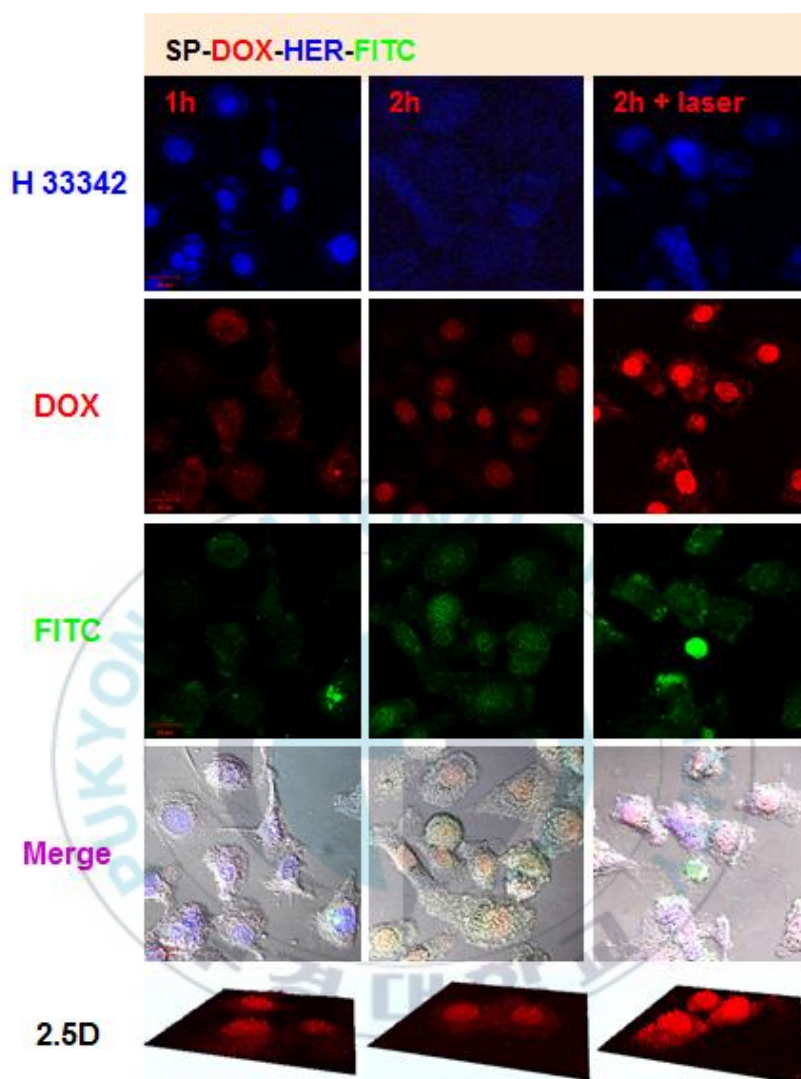


Fig. 15. Comparison of DOX cellular uptake with 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER-FITC for 1 h and 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min onto the SK-BR-3 breast cancer cells.

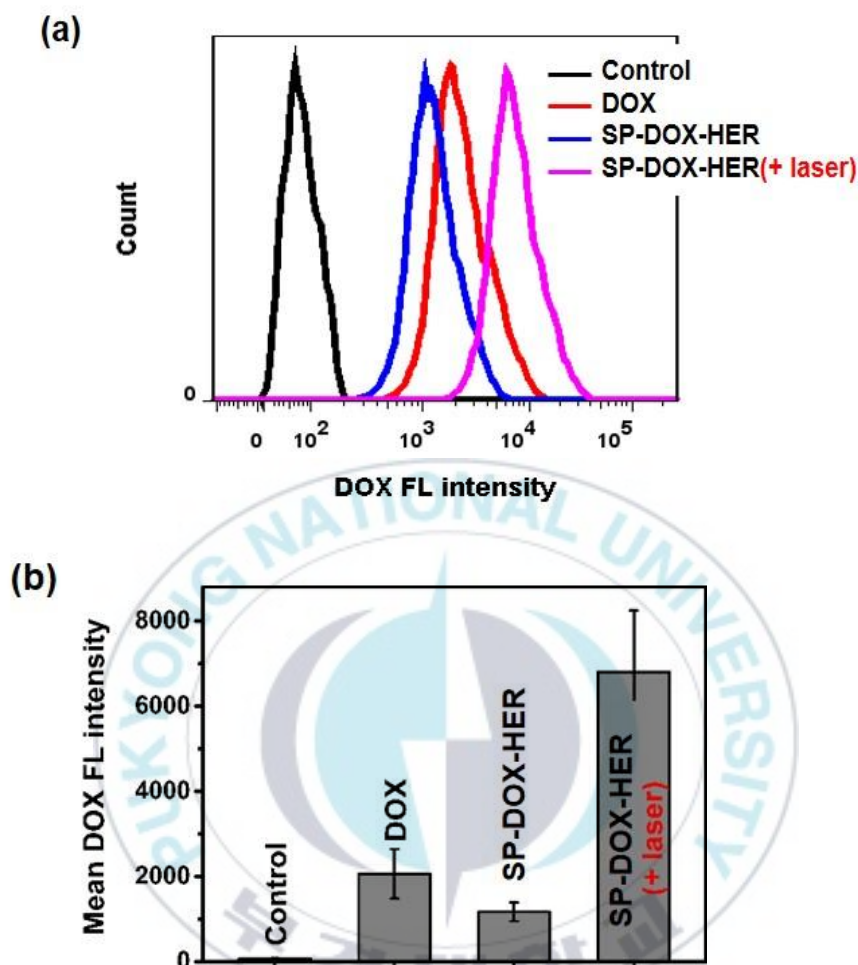


Fig. 16. Comparison of DOX cellular uptake and sub-cellular accumulation onto the SK-BR-3 breast cancer cells. (a) DOX fluorescence (FL) intensity of at the various condition after 2 h with or without 808 nm NIR laser irradiation at laser power density of 1 W/cm^2 for 10 min. (b) Quantitative analysis of intracellular DOX FL intensity measured by flow cytometry.

3.6. 동물 모델에서의 암치료 적용을 위한 분자 영상 이미지 획득

가. 동물 실험 모델 준비 및 약물 주입

동물 실험을 시행하기 위하여 HER-2와 과발현된 유방암 전이 동물 모델을 준비하기 위해 HER-2 양성인 5×10^6 개의 SK-BR-3 유방암 세포를 누드 마우스(nude mouse)의 피하조직에 주입하고 종양이 발현되기를 기다렸다. 동물 모델에서의 종양이 발현되면 합성된 허셉틴과 DOX가 결합된 탄소나노튜브를 종양 조직에 직접적으로 주입하여 종양 조직 내에서의 SP-Herceptin의 광음향 이미지 획득하였고, 광음향 이미징 유도를 통한 HER-2 발현된 종양 부위에서의 근적외선 레이저 조사에 의한 광열 치료 효과를 유도하고 광열 치료에 의한 온도 분포도를 측정하였다. 또한, 실시간으로 암 치료 전후의 동물 모델에서의 암세포의 실시간 성장 속도 및 치료 속도 정량화 및 종양의 생체 이미지를 획득하여 광열 치료 및 약물 전달 시스템의 결합에 의한 암세포의 성장을 관찰하고 암 치료 효과를 검증하였다.

나. 동물 모델에서의 암치료 적용을 위한 분자 영상 이미지 획득

생체 내에서의 광음향 이미지 획득을 위하여, 합성된 SP-DOX- HER-FITC

를 동물모델의 종양 조직에 intratumor injection하고 광음향 이미지를 측정하였고 그 결과를 Fig. 17에 나타내었다. 광음향 이미지 측정 결과, 시료 주입 후 2시간 경과 후에도 SP-DOX-HER-FITC 시료에 의한 선명한 광음향 이미지를 획득하였고, 이 결과 SP-HER-DOX-FITC는 광음향 시스템의 나노프로브(nanoprobe)로 사용될 수 있음을 입증하였다.

다. 동물모델에서의 암치료 적용

표적화 된 SP-DOX-HER-FITC를 종양 조직에 직접적으로 주입하였다. 생체내의 광열 치료 결과, 광열치료에 의해 온도의 증가를 확인하였고 광열 치료 및 약물 전달 시스템의 결합에 의한 치료의 효과를 검증하였으며, 치료온도 50℃ 전후로 10분 동안 치료 시 14일 후에 종양이 치료되는 것을 확인하였다. SP-DOX-HER-FITC를 종양 조직에 직접주입하고 종양이 발현된 마우스의 혈관에 분포하는 SP-DOX-HER-FITC의 광음향 이미지를 획득한 결과, 암세포 주변 혈관을 통해 전달된 나노입자의 분포가 확인되었으며, 이를 통해 암세포를 치료하는 과정을 실시간 평가 및 모니터링 하였으며, 나노입자 및 암세포 분포 부위에 광열치료를 적용함으로써 암 치료 효과를 극대화 할 수 있었다. 또한, 암 치료 전후의 동물 모델에서의 암세포의 실시간 성장 속도 및 치료 속도 정량화 및 종양의 생체 이미지를 획득하였다.



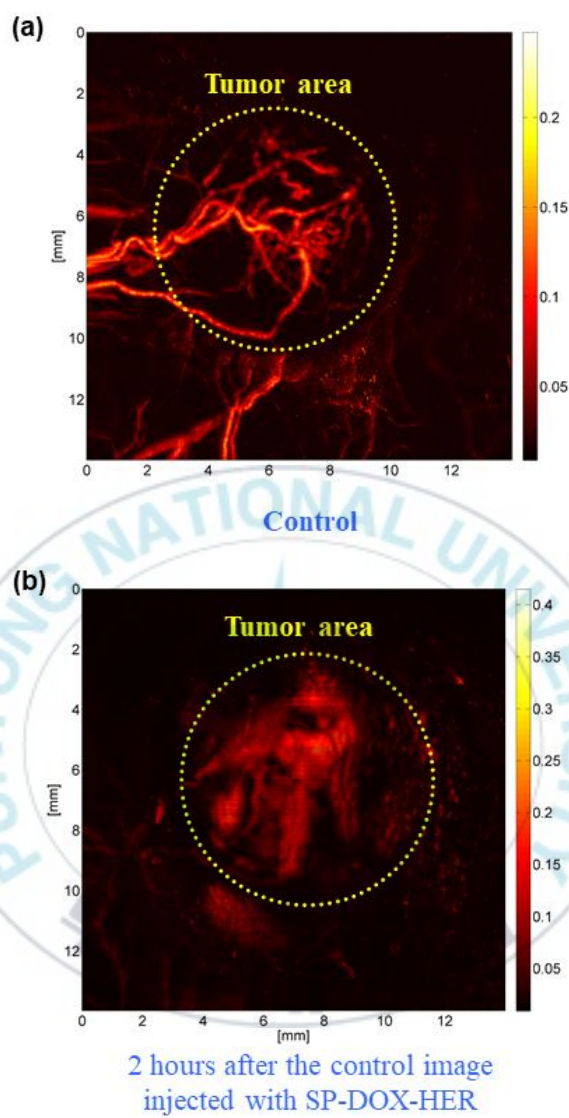


Fig. 17. *In vivo* photoacoustic image of (a) before and (b) after intratumor injection of SP-DOX-HER (250 $\mu\text{g/mL}$) in tumor-bearing mouse.

라. 동물 모델에서의 분자 영상 이미지 획득과 치료 효과 검증

분자영상 이미지를 통해 암을 진단하고 암세포의 크기에 적용될 약물 용량을 예상하고 intratumor injection 된 SWNT 는 암세포 내에 높은 농도로 집중되어 우수한 치료효과를 나타내었다. 종양에 직접 주입하는 경우는 혈관 내에 주입하는 경우보다 발열효과 및 암세포의 치료효과가 증가하였고, 치료하는 동안 thermal camera 로 발열효과를 모니터링 하여 국소 부위에 높은 농도로 분포되어 있는 나노입자의 높은 발열로 인한 주변 조직에의 부작용을 최소화하였고, 같은 물질과 같은 농도라도 나노입자의 주입 방법 및 분포에 따라 발열효과는 다를 수 있으므로 보다 폭넓은 적용 연구 결과가 필요하다.

약물전달 효과와의 시너지 효과로 인해 50℃ 이하의 낮은 광열치료 온도 범위의 적용으로도 우수한 암 치료 효과를 보였으며 치료 부위의 상처가 적으며 예후가 좋았다. 허셉틴이 결합된 PL-PEG 코팅 SWNT는 HER-2가 과발현된 암세포에 대해 표적화 할 수 있는 장점과 동시에 광음향이미징의 뛰어난 조영제(contrast agent)로 사용 가능하여, 정맥주사(intravenously injection) 후 암세포 주변의 혈관의 이미지 강도가 증가하여 암세포 주변 혈관을 통해 전달된 Herceptin-conjugated SWNT의 실시간 분포를 확인할 수 있었으며, 그 결과 암세포를 치료하는 과정을 실시간 평가 및 모니터링으로 향후 조기 암 진단율의 획기적 향상뿐 아니라 진단과 치료제의 두

가지 역할을 동시에 수행할 수 있게 해주어 초기 암 진단을 완성함으로써
암에 의한 사망과 고통을 감소시킬 수 있을 것으로 기대된다.



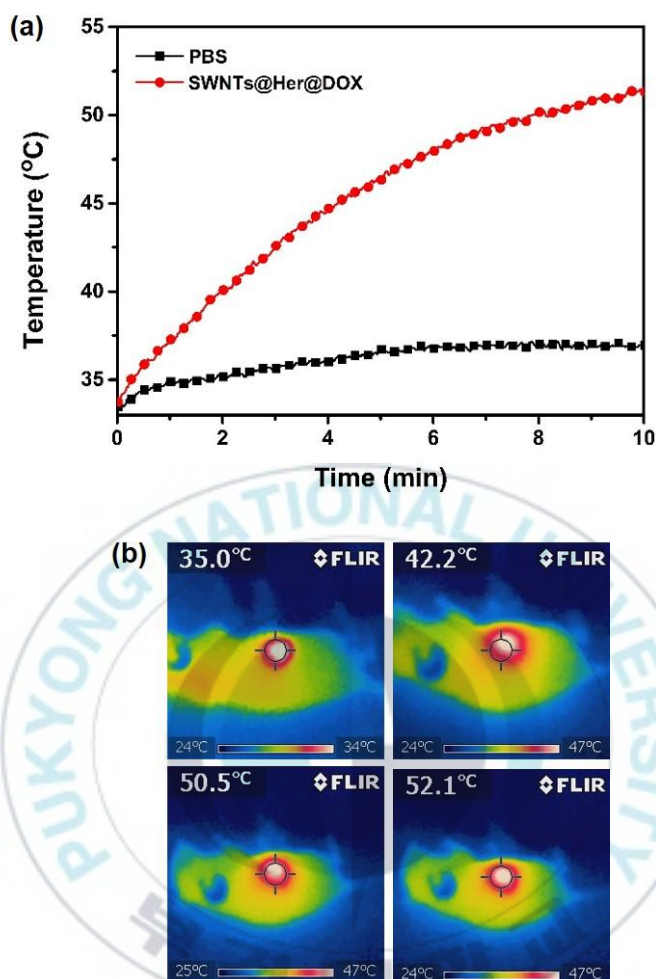


Fig. 18. *In vivo* photothermal heating responses. Tumor-bearing mice were intratumor injected with 200 μ L of 5 μ g/mL of SP-DOX-HER when the tumor volume reached ~ 150 mm³. (a) Temperature changes of PBS and SP-DOX-HER injected tumor and (b) IR thermographic images of PBS and SP-DOX-HER injected tumor-bearing mouse with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm² for 5 min and 10 min.

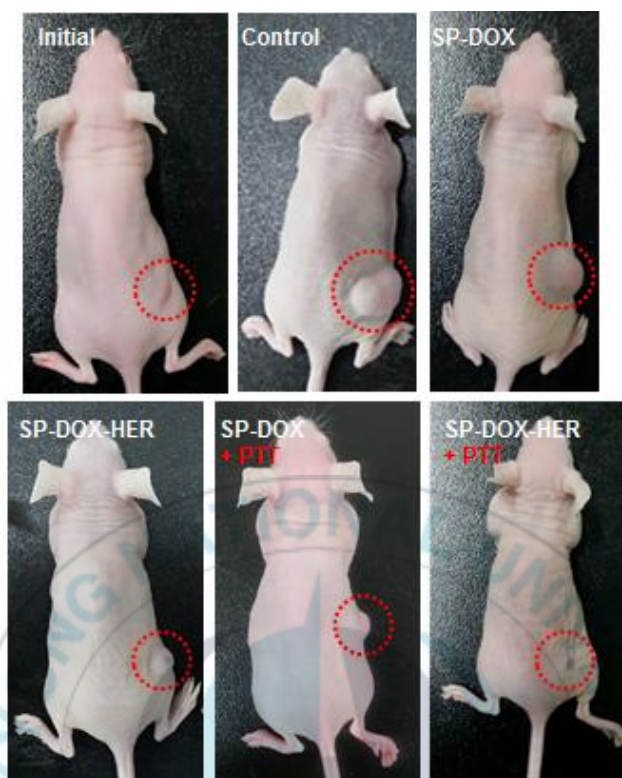


Fig. 19. The digital photographs of chemo/photothermal treated tumor-bearing mice after 14 days. Tumor-bearing mice were intratumor injected with 200 μL of 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER when the tumor volume reached $\sim 150 \text{ mm}^3$. Subsequently, tumor-bearing mice were treated with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm^2 for 10 min.

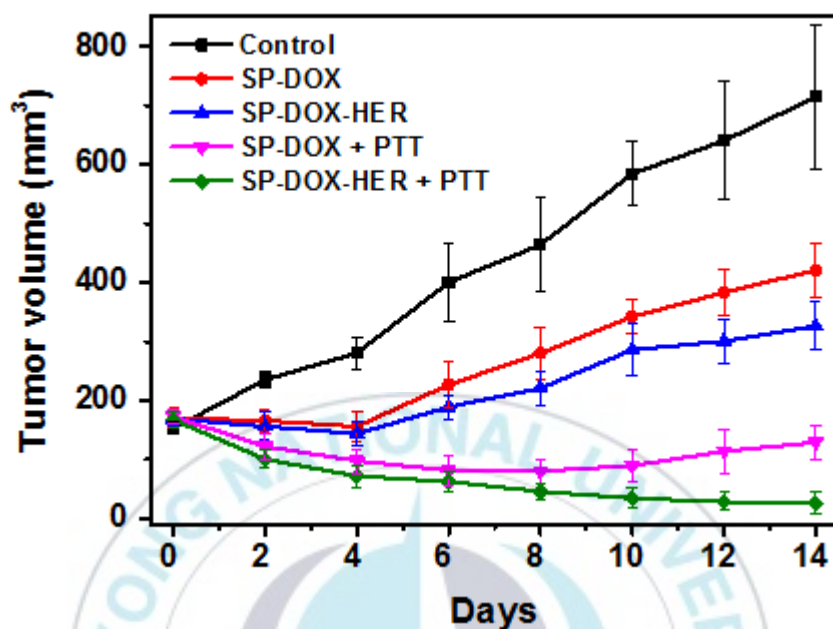


Fig. 20. *In vivo* photothermal ablation of cancer cells. Tumor-bearing mice were intratumor injected with 200 μL of 5 $\mu\text{g/mL}$ of SP-DOX-HER when the tumor volume reached $\sim 150 \text{ mm}^3$. Subsequently, tumor-bearing mice were treated with 808 nm NIR laser irradiation at 1 W/cm^2 for 10 min. Tumor volume growth curves of mice at different treatments indicated in 14 days. Data is expressed as mean $\pm$ SD of the three experiments.

4. 결론

표적물질인 허셉틴과 약물이 결합된 표적 지향형 다기능성 탄소나노튜브를 제조하고 HER-2 과발현된 유방암에 세포 독성이 증가하는 것을 확인하였고, 광열효과의 결합에 의해 우수한 암치료 효과를 확인하였다. Herceptin이 결합된 기능성 탄소나노튜브는 HER-2 단백질의 표적화에 의해 세포내의 결합이 증가되었으며, 근적외선 레이저 파장의 조사 후에 항암제인 DOX의 형광이미지가 증가되는 것으로 인해 세포내의 축적이 증가하는 것을 확인하였다.

근적외선 영역의 레이저 파장을 이용하여 광열 효과를 유도하고 실시간으로 다기능성 탄소나노튜브의 열적 이미지 영상을 획득하고 치료효과를 검증하였으며, 동물 모델에서의 종양의 생체 이미지를 획득하고 암세포의 실시간 성장 속도 및 암세포 크기의 정량화 가능성을 확보하였다. 앞으로의 지속적인 연구로 항암 효과를 가지는 생체 친화 물질의 조영제를 개발하고 이의 임상적인 실험을 통해 구체적인 조건을 확립하고 기술적인 성과로의 연계가 기대된다.

5. 참고문헌

Brust, M., M. Walker, D. Bethell, D. J. Schiffrin and R. Whyman (1994). "Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase liquid-liquid system." Journal of the Chemical Society, Chemical Communications(7): 801-802.

Bui, N. Q., K. K. Hlaing, V. P. Nguyen, T. H. Nguyen, Y. O. Oh, X. F. Fan, Y. W. Lee, S. Y. Nam, H. W. Kang and J. Oh (2015). "Intravascular ultrasonic-photoacoustic (IVUP) endoscope with 2.2-mm diameter catheter for medical imaging." Comput Med Imaging Graph 45: 57-62.

Camejo, N., C. Castillo, L. Richter, N. Artagaveytia, A. I. Hernandez and L. B. Delgado (2017). Quality indicators at a breast cancer (BC) unit in a Uruguayan university hospital according to the requirements of European Society of Breast Cancer specialists, American Society of Clinical Oncology.

De La Zerda, A., C. Zavaleta, S. Keren, S. Vaithilingam, S. Bodapati, Z. Liu, J. Levi, B. R. Smith, T.-J. Ma and O. Oralkan (2008). "Carbon nanotubes as photoacoustic molecular imaging agents in living mice." Nature nanotechnology 3(9): 557-562.

Gu, Y.-J., J. Cheng, J. Jin, S. H. Cheng and W.-T. Wong (2011). "Development and evaluation of pH-responsive single-walled carbon nanotube-doxorubicin complexes in cancer cells." International journal of nanomedicine 6: 2889.

Kang, X., X. Guo, W. An, X. Niu, S. Li, Z. Liu, Y. Yang, N. Wang, Q. Jiang and C. Yan (2017). "Photothermal therapeutic application of gold nanorods-porphyrin-trastuzumab complexes in HER2-positive breast cancer." Scientific Reports 7: 42069.

Kim, J. H., T. Ramasamy, T. H. Tran, J. Y. Choi, H. J. Cho, C. S. Yong and J. O. Kim (2014). "Polyelectrolyte complex micelles by self-assembly of polypeptide-based triblock copolymer for doxorubicin delivery." asian journal of pharmaceutical sciences 9(4): 191-198.

Kohay, H., C. Sarisozen, R. Sawant, A. Jhaveri, V. P. Torchilin and Y. G. Mishaal (2017). "PEG-PE/clay composite carriers for doxorubicin: Effect of composite structure on release, cell interaction and cytotoxicity." Acta Biomaterialia 55: 443-454.

Liu, S., A. C.-T. Ko, W. Li, W. Zhong and M. Xing (2014). "NIR initiated and pH sensitive single-wall carbon nanotubes for doxorubicin intracellular delivery." Journal of Materials Chemistry B 2(9): 1125-1135.

Liu, Z., X. Sun, N. Nakayama-Ratchford and H. Dai (2007). "Supramolecular chemistry on water-soluble carbon nanotubes for drug loading and delivery." ACS nano 1(1): 50-56.

Liu, Z., S. M. Tabakman, Z. Chen and H. Dai (2009). "Preparation of carbon nanotube bioconjugates for biomedical applications." Nature protocols 4(9): 1372-1381.

Michel, T., M. Paillet, A. Zahab, D. Nakabayashi, V. Jourdain, R. Parret and J. Sauvajol (2011). "About the indexing of the structure of single-walled carbon nanotubes from resonant Raman scattering." Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology 1(4): 045007.

Niu, C., Y. Xu, S. An, M. Zhang, Y. Hu, L. Wang and Q. Peng (2017). "Near-infrared induced phase-shifted ICG/Fe₃O₄ loaded PLGA nanoparticles for photothermal tumor ablation." Scientific reports 7(1): 5490.

Park, H., J. Yang, J. Lee, S. Haam, I.-H. Choi and K.-H. Yoo (2009). "Multifunctional nanoparticles for combined doxorubicin and photothermal treatments." ACS nano 3(10): 2919-2926.

Peiris, D., A. F. Spector, H. Lomax-Browne, T. Azimi, B. Ramesh, M. Loizidou, H. Welch and M. V. Dwek (2017). "Cellular glycosylation affects Herceptin binding and sensitivity of breast cancer cells to doxorubicin and growth factors." Scientific Reports 7: 43006.

Smith, P. K., R. I. Krohn, G. Hermanson, A. Mallia, F. Gartner, M. Provenzano, E. Fujimoto, N. Goeke, B. Olson and D. Klenk (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Analytical biochemistry 150(1): 76-85.

West, C. L., A. M. Hasanjee, B. Young, R. Wolf II, K. Silk, R. Ingalls, F. Zhou and W. R. Chen (2017). Comparing the photothermal effects of gold nanorods and single-walled carbon nanotubes in cancer models. Proc. of SPIE Vol.

Zou, L., H. Wang, B. He, L. Zeng, T. Tan, H. Cao, X. He, Z. Zhang, S. Guo and Y. Li (2016). "Current Approaches of Photothermal Therapy in Treating Cancer Metastasis with Nanotherapeutics." cancer cells 6(6): 763.

민효숙, 박선영, 임정선, 박미옥, 원효진 and 김종임 (2008). "유방암 생존자의 재발방지 행위와 삶의 질." Journal of Korean Academy of Nursing 38(2): 187-194.

서연옥 (2007). "유방암 환자의 삶의 질 영향요인." 대한간호학회지 37(4): 459-466.



감사의 글

40대에 석사학위를 받고 이런 저런 바쁜 직장생활로 미루어두었던 박사과정을 50이 넘어 시작하게 되었습니다. 뒤돌아보면 마냥 게을리하던 나를 채찍질 하는 수단으로 학위과정을 시작하게 된 것 같습니다. 박사과정의 입학에 기꺼이 반겨주셨던 지도교수이신 오정환교수님께 감사를 드리고 싶습니다. 기존 대학원생에 비해 많은 나이로 입학한 저를 잘 이끌어주시고 연구의 길을 알려주셔서 지금 결실을 보지 않으나 싶습니다. 또한 이 논문이 나오기까지 논문의 방향을 제시해주시고 세포실험 등 많은 것을 가르쳐주시고 학위과정 중 많은 도움을 주신 오운옥박사님께도 감사를 드립니다. 직장생활 끝내고 학교에 와서 실험에 대하여 무지한 저에게 여러 가지 실험에 대해서 상세히 알려주시고 도와주셨습니다. 그리고 같은 실험실에서 생활했고 제가 박사과정 들어왔을 때부터 석사과정 들어와서 항상 내게 긍정적 스트로크를 주었던 베트남인 Quang, 미얀마인 Kyu Kyu, 그리고 중국인 FAN에게도 감사를 전하고 싶습니다. FAN과 Quang은 현재 박사과정을 하고 있으니 좋은 결실을 기원합니다. 그리고 실험실에서 연구교수로 재직 중인 인도인 Mani, Santa, Raja, Modal박사님에게도 감사를 드립니다. 제가 모르는 것을 물으면 항상 친절히 가르쳐주셨습니다.

늦은 나이에 박사과정을 시작하게 된 아들을 지지해주시고 지원해주셨던 부모님께 먼저 감사의 말을 전하고 싶습니다. 그리고 제 아내와 바쁜 아빠를 항상 지지해주었던 두 딸에게도 고마움을 전합니다.

또한 직장생활과 병행하며 학위과정을 시작한 저를 지지해주셨던 부산대학교병원 의공학과를 있게 하신 양산부산대학교병원 전계록교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 그리고 학위과정을 시작할 수 있게 도와주신 본원 의공학과장이신 노정훈교수님과 지지해주신 전시수선생님께도 감사를 드립니다. 항상 격려를 해주신 남경원교수님, 조명현팀장님, 이현주선생님, 윤성욱 선생, 그리고 먼저 학위 취득한 김수홍 선생에게도 감사를 드립니다. 또한 본원 의공학과 직원 김재한, 하창훈, 손환익, 조희규, 박보경, 박상희, 이의용, 이다영선생에게도 감사의 말을 전하고 싶습니다. 부서원들의 도움이 있었기에 무사히 박사과정을 마칠 수 있었다고 생각합니다.

지면으로 일일이 언급하지 못했지만, 저를 아끼고 사랑해주시는 모든 분들 감사합니다. 겸손하고 바른 모습으로 한층 더 성장하고 학위가 끝이 아니라 시작으로 더욱 정진하겠습니다.