

이 학 석 사 학 위 논 문

근적외선 흡수체 및 CpG motif를
포함하는 광열 암 치료를 위한 에멀전



2020년 2월

부경대학교대학원

화학과

하자윤

이 학 석 사 학 위 논 문

근적외선 흡수체 및 CpG motif를
포함하는 광열 암 치료를 위한 에멀전

지도교수 곽민석

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2020년 2월

부경대학교대학원

화학과

하자윤

하자윤의 이학석사 학위논문을
인준함.

2020년 2월 21일



위 원 장 이학박사 김 학 준 (인)

위 원 이학박사 이 송 이 (인)

위 원 이학박사 곽 민 석 (인)

목 차

목차	i
표 목록	iii
그림 목록	iv
요약 (한글)	vi
Abstract (English)	vii
I. 서론	1
1. 연구배경	1
2. 연구개요	3
가. 에멀전	3
나. IR788-sIPN	6
다. CpG ODN	10
II. 근적외선 흡수체 IR788-sIPN 제조	13
1. 재료 및 기구	13
2. 실험방법 및 결과	13
가. 근적외선 흡수체 Lumogen IR788이 포함된 sIPN 마이셀 구조체 제작	13
나. IR788-sIPN의 분광학적 특성	16
III. 광열 면역 치료 에멀전 제조	17
1. 재료 및 기구	17
2. 실험방법 및 결과	18
가. IR788-sIPN과 CpG ODN 1826을 수상으로 사용한 에멀전 제조	18

나. Hydrophilic-lipophilic balance 계산	20
다. 유변학적 성질 분석	22
라. 레이저를 조사하지 않은 에멀전의 분리	23
IV. 광열 면역 치료 에멀전의 광열효과	25
1. 재료 및 기구	25
2. 실험방법 및 결과	25
가. IR788-sIPN을 함유한 에멀전의 광열 효과 측정	25
나. Photothermal conversion efficiency 계산	30
다. 레이저 조사 전후 IR788 에멀전의 상 변화를 통한 콜로이드 분해 확인	32
V. <i>In vivo</i> 실험을 통한 항암 효과 및 면역 활성화 확인	36
1. 실험 방법 및 결과	36
가. 공동자극분자(costimulatory molecule) 분석을 통한 면역 활성화 확인	36
나. CpG IR788 에멀전의 항암 치료 효과	38
VI. 결론	43
VII. 참고문헌	45

표 목록

표 1.	IR788-sIPN 5 mL 제조를 위해 필요한 시약의 함량과 F127 대비 시약 조성비	15
표 2.	CpG ODN 1826 sequence	17
표 3.	유상 제조를 위해 필요한 시약의 함량과 전체 용량 대비 시약 조성비	19
표 4.	에멀전 제조에 사용한 비이온 계면활성제의 중량 비율	20
표 5.	W/O 에멀전 생성을 위해 요구되는 HLB 문헌값.....	21

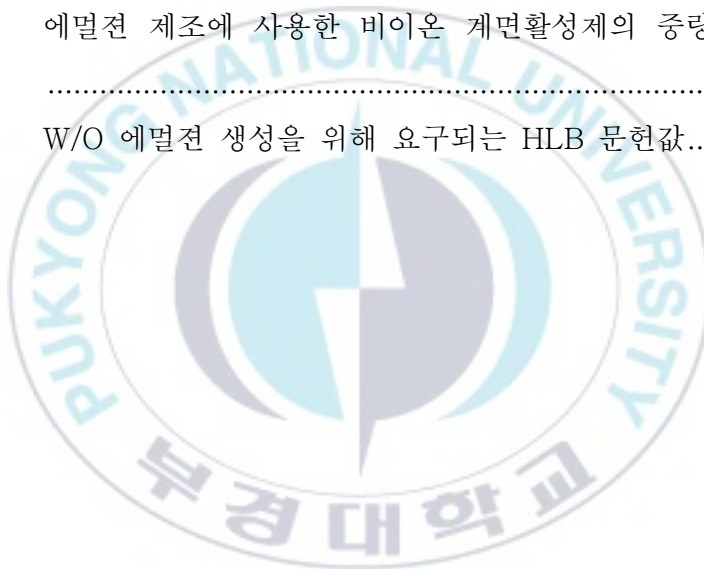


그림 목록

그림 1.	근적외선을 이용한 광열 면역 치료 방법 개요	3
그림 2.	워터인오일 에멀전과 오일인워터 에멀전	4
그림 3.	에멀전 제조에 사용된 유화제 구조식	5
그림 4.	유기 염료 근적외선 흡수체 Lumogen® IR788 구조식	7
그림 5.	양친매성 고분자 Pluronic F127 구조식.....	8
그림 6.	sIPN의 가교제 Pentaerythritol tetraacrylate(PETA)의 구조식	9
그림 7.	IR788을 함유한 sIPN 모식도	9
그림 8.	CpG ODN 1826 motif backbone	11
그림 9.	Lumogen sIPN 형성 과정 개략도	15
그림 10.	IR788-sIPN의 흡수 스펙트럼	16
그림 11.	유상, 수상, 에멀전 용액 사진	19
그림 12.	IR788-sIPN과 CpG를 수상으로 이용해 제조한 워터인오일 에멀전 모식도	21
그림 13.	에멀전과 IR788-sIPN 용액의 점도	22
그림 14.	Bromophenol blue를 이용해 측정한 레이저 비조사시의 에멀전 분리	24
그림 15.	IR788 에멀전의 광열 효과 측정.....	26
그림 16.	열화상 카메라로 촬영한 에멀전의 온도 변화	27
그림 17.	IR788 농도 변화에 따른 IR788 에멀전의 광열 효과	28
그림 18.	레이저 파워에 따른 IR788 에멀전의 광열 효과....	29

그림 19.	레이저 조사에 따른 IR788 에멀전과 IR788-sIPN solution의 온도 변화.....	31
그림 20.	레이저 조사 전후의 IR788 에멀전 이미지	33
그림 21.	레이저 조사 전후의 IR788 에멀전의 콜로이드 크기 히스토그램	34
그림 22.	레이저 조사 전후의 IR788 에멀전 사진	35
그림 23.	비장세포의 공통자극분자 CD40, CD80, CD86 활성 확인	38
그림 24.	에멀전을 이용한 항암 치료 개략도	39
그림 25.	항암 치료 실험에 사용하는 물질의 구분	39
그림 26.	에멀전을 주사한 후 체내 광열 효과 관찰	40
그림 27.	레이저 조사 실험군의 온도 변화 평균값	41
그림 28.	종양의 성장 및 성장 억제 관찰	42

근적외선 흡수체 및 CpG motif를 포함하는 광열 암 치료를 위한 에멀전

하 자 윤

부경대학교 대학원 화학과

요 약

워터인오일(W/O) 에멀전은 수상을 유상에 콜로이드 상태로 분산시킨 물질이다. 에멀전을 광열 암 치료제로 사용하기 위해 유기 근적외선 흡수체인 Lumogen® IR788과 면역 보조제인 CpG를 수상으로 사용하였다. IR788은 근적외선 파장을 갖는 빛 에너지를 열 에너지로 변환하는 분자로서, 고분자 나노 입자에 담지해 안정성 및 친수성을 증가시켰다. 비메틸화 CpG 올리고 가닥은 면역 활성화와 관련된 물질로 광열 흡수체와 함께 사용하여 광열 치료뿐만 아니라 면역 활성을 일으켜 암 치료제의 능력을 증진시킬 수 있다. 제작한 에멀전은 분석 기기를 통해 광열 물질로서의 능력과 그의 특성을 분석하고, 동물 실험을 통해 면역 활성화와 암 치료 효과를 관찰한다.

Emulsion containing near-infrared absorber and CpG motif for
photothermal cancer therapy

Jayun Ha

Department of Chemistry, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

Water-in-oil emulsion (W/O) is a kind of substance in which the water phase is dispersed in the oil phase in a colloidal state. Here we report an emulsion made using Lumogen® IR788, an organic near-infrared (NIR) dye absorber, and an immune adjuvant CpG as the water phase, to be used as a photothermal therapy agent. Inclusion of IR788 in the emulsion gives it the ability to convert light energy into thermal energy, which is then immersed in high-molecular nanoparticles to further increase its stability and hydrophilicity. Furthermore, unmethylated CpG oligo fragments can be used alongside NIR absorber as an immune activation adjuvant, enhancing the cancer therapeutic capability of the emulsion by inducing immune activity, in addition of the photothermal therapy. The resulting emulsion was then analyzed for its ability and characteristics as a photothermal agent using hyperthermia test, while its immune activation in cancer treatment was observed through *in vivo* test.

I . 서론

1. 연구배경

암 치료법으로 연구되고 있는 방법 중, 근적외선 (Near infrared, NIR)을 이용하는 광열치료법은 빛 에너지를 흡수하여 열 에너지로 변환할 수 있는 흡수체를 이용한다. 열을 발산하는 흡수체는 단백질을 aggregation 하거나 변성시키고 DNA 손상을 일으켜 세포 사멸을 유도하는 발열 현상(hyperthermia)를 일으킨다.^{[1]-[2]} 발열 현상이 발생한 조직은 세포자연사(apoptosis)나 세포괴사(necrosis)^{[3]-[5]}로 이어지는데 광열 효과를 일으키는 근적외선은 국소부위에 조사되고 낮은 에너지 레벨의 힘을 가하므로 근적외선을 조사하지 않은 부위는 손상되지 않는다. 또한 물리적인 힘을 가하는 치료법으로 약물에 내성을 지닌 암세포도 효과적으로 제거할 수 있는 장점을 가진다.^[6] 하지만 광열 치료는 종양 세포 내의 균일하지 않은 열분포로 사멸되지 않은 종양 세포가 암의 재발이나 전이를 일으킬 수 있다.^{[7]-[8]} 이를 보완하고자, 최근에는 광열치료와 더불어 면역치료를 병행하여 암 치료에 강력한 상승효과를 내는 연구가 진행되고 있다.^{[9]-[13]}

Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C))나 CpG Oligodeoxynucleotides(CpG ODN)와 같은 면역 보조제를 이용하면, 수지상 세포 내의 toll-like receptor(TLR)에 인식되어 림프구를 자극해 잔여 암세포 및 전이성 암세포를 제거할 수 있다. 또 다른 보조제의 유형으로 면역 반응 물질 전달 시스템으로서의 에멀전, 마이크로스피어와 같은 물질을 들 수 있다. 이들은 전달 물질의 안전성과 면역 반응의 크기를 증가시키는 유형의 보조제로 이용될 수 있다.^{[14] - [15]} 이러한 내용을 바탕으로 광열 흡수체인 유기 염료 Lumogen® IR788-semi interpenetrating network formation(IR788-sIPN)과 면역 보조제 올리고 가닥 CpG ODN1826을 혼합하여 에멀전에 담지해 광열 암 치료제로 사용할 수 있는 방법에 대한 연구를 진행해보았다.

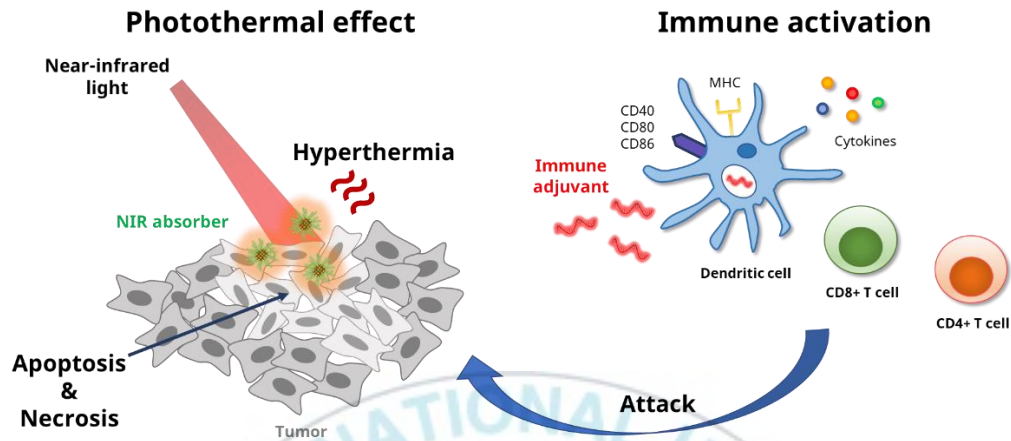


그림 1 근적외선을 이용한 광열 면역 치료 방법 개요. 근적외선 흡수체가 근적외선 파장의 빛을 받아 종양 세포를 사멸로 이끌고, 잔류된 종양 세포를 면역 보조제로 자극한 림프구가 치료한다.

2. 연구개요

가. 에멀전

에멀전은 섞이지 않는 두 액체가 콜로이드 상태로 분산된 물질을 말한다. 두 액체는 용매의 역할로서 분산의 매개체 역할을 하는 연속상(continuous phase)과 용질의 역할을 맡는 분산상(dispersed phase)로 나뉘는데, 이때 연속상이 유상(oil phase)이고 분산상이 수상(water phase)인 경우를 워터인오일 에멀전 (Water-in-Oil emulsion, W/O emulsion)이라 하고,

연속상이 수상, 분산상이 유상인 경우를 오일인워터 에멀전 (Oil-in-Water emulsion, O/W emulsion)이라고 한다. 에멀전은 콜로이드의 경계에서 빛의 산란이 일어나기 때문에 불투명하고 혼탁한 색을 띠게 된다.



그림 2 워터인오일 에멀전과 오일인워터 에멀전. 유화제의 친수성을 띠는 부분이 수상을 유상에 분산시키고(워터인오일 에멀전), 유화제의 친유성을 띠는 부분이 유상을 수상에 분산시킨다(오일인워터 에멀전).

에멀전 제조를 위해서는 섞이지 않는 두 상을 섞기 위해 외부 에너지가 필요하며 유화제를 사용해 표면 장력을 높여 물질의 확산을 촉진하고 에멀전의 안정성을 높인다.^[16] 강하게 교반하거나 초음파를 사용하는 등의 간단한 방법으로 에너지를 공급할 수 있기 때문에 제조 과정이 복잡하지 않고, 정제 과정을 거칠 필요가 없기 때문에 제조에 사용한 물질 모두를 사용할 수

있어 수득률이 높다. 에멀전 제조를 위해 mineral oil을 연속상으로 이용하였고 Span 80, Tween® 80, Triton™ X-100 세 가지 비이온 계면활성제를 유화제로 사용하였다. 계면활성제 이용 시, 단일 계면활성제에 비해 혼합 계면활성제의 사용이 안정적인 에멀전을 생성할 수 있다.^{[17]-[18]} 비이온 계면활성제는 친수성(hydrophilic) 및 친유성(lipophilic)을 갖는 분자로 구성되며 수상과 유상으로 나뉘는 에멀전에서 서로 반대되는 상의 균형을 잡을 수 있다.^[19]

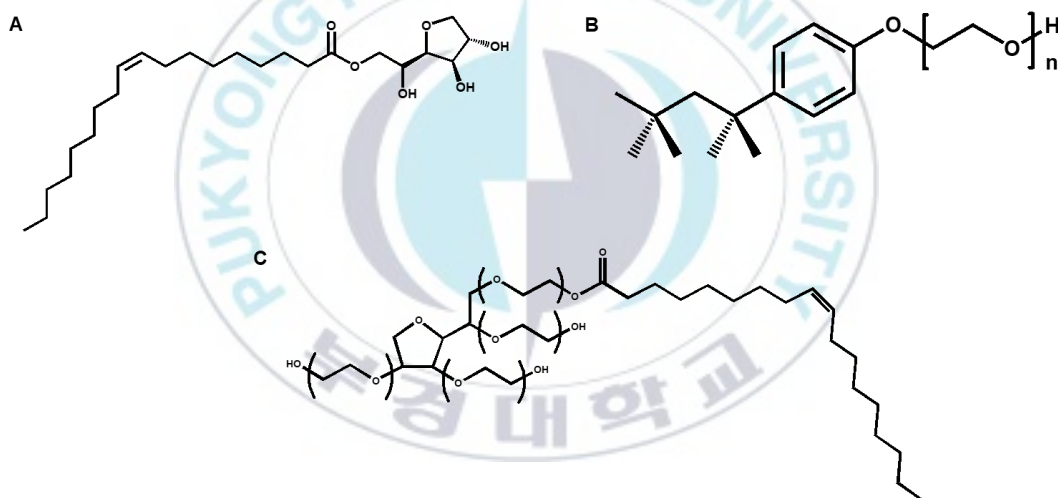


그림 3 에멀전 제조에 사용된 유화제 구조식. (A) Span 80 (B) Triton™ X-100 (C) Tween® 80

제조한 W/O 에멀전은 비이온 계면활성제에 의해 콜로이드 분산 상태를 나타내며 수상이 유상에 분산된다. 그 구조로 인해

수상에 치료 물질을 넣었을 때, 에멀전은 약물 캐리어 또는 전달 시스템으로서 물질의 안정성을 증가시키고 분해를 방지하며 물질의 방출 속도를 느리게 조절해 흡수를 향상할 수 있다. 즉 에멀전을 면역 활성화 물질 전달체로서 사용하면, 분해 방지를 통해 면역 반응을 강화 및 유지할 수 있고 방출 속도 조절로 면역 반응 시간을 증가시켜 약물 투여 빈도를 감소시키는 보조제로 사용할 수 있다. 더불어, 에멀전 캐리어 자체가 면역 반응을 자극할 수 있다는 연구 결과가 있다.^{[14] - [15], [20] - [21]} 조직에서 외부 물질(에멀전)에 대한 대응으로 면역 반응을 일으키는 내용이 중심으로, 주변 조직으로 침입 신호를 보내 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)의 방출을 유도하고 수지상 세포와 같은 면역 세포를 끌어당겨 항원의 흡수 및 림프구를 자극할 수 있다.

나. IR788-sIPN

근적외선 파장은 가시광선에 비해 생체 조직에서 낮은 흡수를 보이고 높은 침투율을 가지므로^[22] 근적외선 파장을 흡수해 다른 에너지로 전환할 수 있는 근적외선 흡수체는 체내에서의 광음향 이미징이나 형광 이미징, 발열 반응 등에 이용되어 왔다. 근적외선 흡수 유기체로 알려진 물질로는 Indocyanine green이나 IR780과 같은 시아닌 염료^[23], perylene 기반의 Lumogen® IR788(IR788) 등이 있는데,^[24] 이 중 IR788은 800 nm 부근의

근적외선 파장의 빛을 흡수하여 열을 발산하도록 설계되어 있어 광열 치료 물질로 사용하기 적합하다.

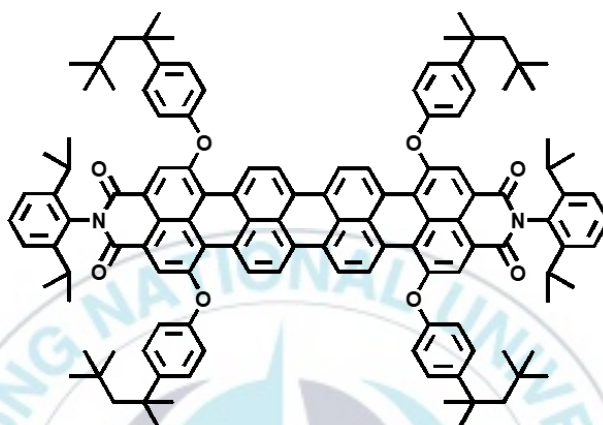


그림 4 유기 염료 근적외선 흡수체 Lumogen® IR788 구조식.

소수성을 띠는 IR788은 수상으로의 분산을 위해 반상호침투 구조체(semi-interpenetrating network formation (sIPN))로 안정화해 사용한다. sIPN은 양친매성 고분자 물질이 마이셀 구조를 이루고 있는 것으로, 소수성을 띠는 마이셀 중심에 IR788이 담지 되고 물리적 특성을 강화하기 위해 가교제를 이용해 일정한 온도와 농도에서 분해되는 것을 막아 안정화한 고분자 구조체이다.^[25]

사용한 양친매성 고분자 물질은 Pluronic F127(F127)으로 그 구조는 그림 5와 같다. 양 말단이 친수성을 띠는 100개의 PEO(polyethyleneoxide) 사슬로 구성되어 있고 중심은 소수성인

65개의 PPO(polypropylene oxide) 사슬로 구성되어 있다.^[26] 이로 인해 소수성 PPO 부분이 코어를 이루며 IR788을 마이셀 고분자 중심에 담지하고, 친수성 PEO 부분이 흡수체를 수상으로 분산시킬 수 있게 된다.

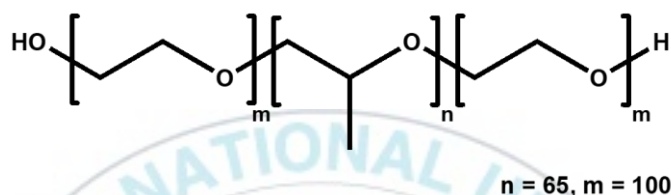


그림 5 양친매성 고분자 Pluronic F127 구조식. 양 말단의 PEO 사슬이 100개, 중심의 PPO 사슬이 65개로 이루어져 있다.

IR788을 담지하며 마이셀로 조립된 F127에 소수성 가교제인 PETA(Pentaerythritol tetraacrylate)를 더해준 뒤 자외선을 조사하면 마이셀 중심에 그물망 구조의 가교 결합이 형성된다.^[27] PETA의 망상 구조 형성으로 인해 IR788-F127 마이셀 구조는 IR788-sIPN 구조로 완성된다. IR788-sIPN은 가교제로 견고히 결합되어 있기 때문에 IR788-F127 마이셀이 분해되는 조건에서도 분해되지 않는 안정된 상태를 보인다. 더불어, IR788-sIPN을 이루고 있는 F127은 생체 적합성이 뛰어난 물질로서 세포 실험에서 생체 적합성을 증가시킨다.^[25]

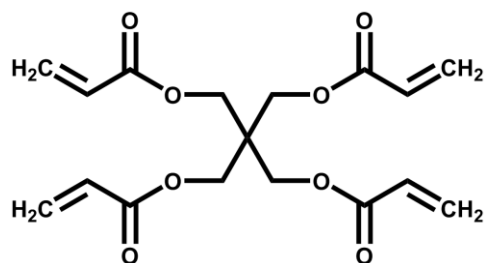


그림 6 sIPN의 가교제 Pentaerythritol tetraacrylate (PETA)의 구조식.

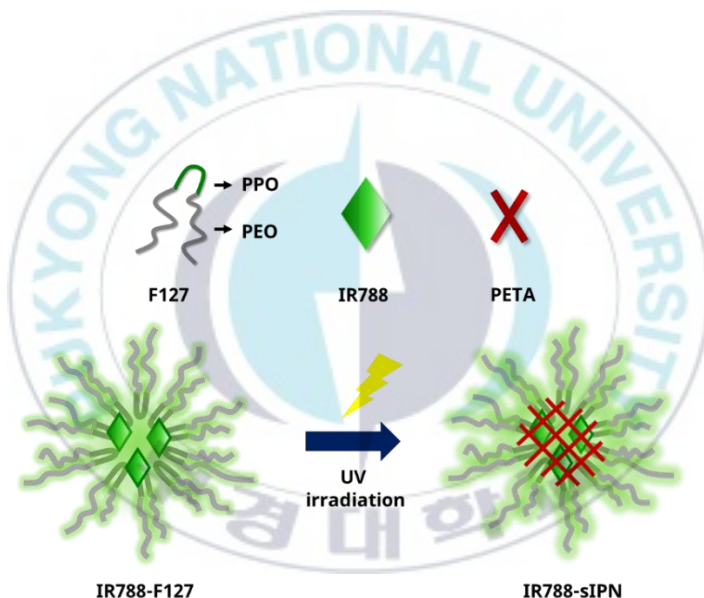


그림 7 IR788을 함유한 sIPN 모식도. 소수성 IR788 흡수체와 F127의 PPO 부분이 중심부를 이루며 자가조립해 마이셀을 형성한다. IR788-F127 마이셀에 자외선을 조사하면 PETA 가교제가 소수성 코어에 그물 구조를 형성하여 IR788-sIPN을 형성한다.

다. CpG ODN

박테리아에서 발현되는 DNA 중 비메틸화 상태의 Cytosine-phosphate-Guanine (CpG) motif는 toll-like receptor 9 (TLR 9)에 의해 인식된다. TLR 9은 면역 반응에 관여하는 수지상 세포의 세포막에 존재하는 수용체이다. 포유류의 생체 내에 CpG oligodeoxynucleotides (ODN)이 투여되면, CpG는 TLR 9에 의해 위험 신호로 인식되는데 이는 포유류의 ODN은 메틸화 되어 있기 때문이다. TLR로 인해 개시되는 면역 반응은 면역 물질이 세포질에 전달되기 위해서 요구되는 특별한 제제가 필요 없다. TLR에 의해 인식되는 면역 물질은 엔도솜(endosome) 형태로 내재화된 후 세포질 내로 진입할 수 있고 TLR 과의 결합도 쉽게 이루어진다.

면역 보조제로 사용한 CpG는 ODN 1826 염기서열로 쥐의 면역 체계를 자극하는 올리고 DNA이다. Nuclease에 의한 CpG의 효소 분해 시간을 지연시키는 것으로 알려진 phosphorothioate backbone을 이용해 안정성을 높였다.^[28]

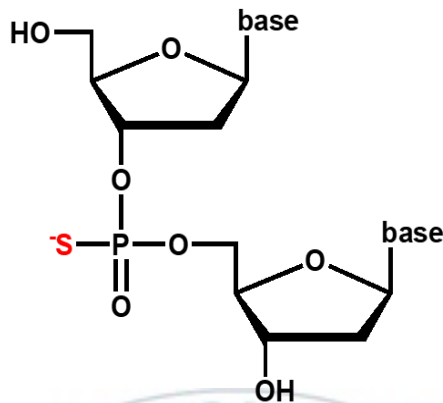


그림 8 CpG ODN 1826 motif backbone. Phosphate backbone을 phosphorothioate backbone으로 변형시킨 올리고를 사용하였다. base = Adenine, Guanine, Thymine, Cytosine

TLR 9에 의해 인식된 CpG는 수지상세포를 성숙시켜 수지상 세포가 사이토카인(cytokine)을 분비하도록 유도해 면역 활성을 개시한다. 또한 MHC class와 공통자극분자(costimulatory molecule) CD40, CD 80, CD86 등을 발현하도록 하는데 MHC class II는 CD4+ T 세포에 항원 조각을 제시하여 CD4+ T 세포를 활성화한다. 활성화된 CD4+ Th2 세포는 B 세포를 자극하여 형질세포로 분화시키고 분화된 B 세포는 항체를 생성하여 면역 활성을 일으킨다. CD4+ Th1 세포는 세포독성 T림프구와 대식 세포를 활성화하여 종양 세포를 특이적으로 파괴하도록 한다. CpG 중 하나인 ODN 1826은 다른 면역 보조제와 비교해 가장 강력한 Th1 면역 반응을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.^[29] 공통자극분자 CD40, CD 80, CD86은

수지상 세포에서 발현되는 T 세포 증식에 필요한 세포 표면 마커로 활성을 분석하면 면역 활성화에 대한 정보를 얻을 수 있다.



II. 근적외선 흡수체 IR788-sIPN 제조

1. 재료 및 기구

IR788-sIPN 제조에 필요한 Pluronic[®] F-127(CAS no. 9003-11-6)와 Pentaerythritol tetraacrylate(CAS no. 4986-89-4)는 Sigma Aldrich로부터 구매해서 사용하였다. 광열 흡수체인 Lumogen[®] IR788 (CAS no. 333304-54-4)은 BASF에서 구매하였다. Stock solution 제조 및 희석에는 ultra-pure water(18.5 MΩ)(Millipore)을 사용하였다. 감압 증류에 과정에 사용한 회전증발농축기는 Rotvapor R-3 (Buchi)이다. IR788-sIPN 분광학적 특성 확인을 위해 실시한 흡광 스펙트럼 측정은 SpectraMax[®] M2 Microplate Reader (Molecular Devices)를 이용하였고 큐벳은 Light path 10mm* inside width 2 mm quartz suprasil(Hellma Analytics)을 이용하였다.

2. 실험방법 및 결과

가. 근적외선 흡수체 Lumogen IR788이 포함된 sIPN 마이셀 구조체 제작

IR788-sIPN의 제조 과정은 그림9와 같다. Pluronic[®] F-127 (F127)을 chloroform에 녹여서 10 wt% F127 solution을

제작한다. 10 wt% F127 solution 5 mL 와 Lumogen® IR788 (IR788) 15 mg을 바이알에 넣고 혼합한다. F127과 IR788 혼합물을 감압 증발시켜 chloroform을 완전히 제거한 후 4.5 mL의 증류수를 넣고 상온 200 rpm shaker에 12시간 이상 교반한다. Pentaerythritol tetraacrylate (PETA)를 chloroform에 녹여서 100 mg/mL solution을 제작하고 바이알에 PETA solution 125 μ L을 넣고 흡후드에 24시간 이상 건조시켜 PETA film을 제작한다. 교반시킨 F127 IR788 혼합물을 건조가 완료된 PETA film 바이알에 넣고 혼합시켜 상온 200 rpm shaker에 12시간 이상 교반한다. 교반이 완료된 바이알에 아르곤 가스를 채워 산소를 없애고 50 $^{\circ}$ C 오븐에 15분간 방치해 마이셀이 분해되지 않게 안정화한다. 산소가 들어가지 않게 유의하며 바이알을 커버 글라스로 막고 50 $^{\circ}$ C UV 상자에 넣고 6분동안 1.5 W/cm²의 세기로 자외선(필터 320–500 nm)을 조사해 PETA를 F127에 가교결합 시킨다. 레이저 조사가 끝난 용액은 상온에서 식히고, 0.2 μ m syringe filter를 이용해 잔여물을 제거해 IR788-sIPN을 완성한다.

표 1 IR788-sIPN 5 mL 제조를 위해 필요한 시약의 함량과 F127 대비 시약 조성비.

시약	함량 (g)	F127 대비 시약 조성 (%)
F127	0.5	100
IR788	15	3.00
PETA	12.5	2.50

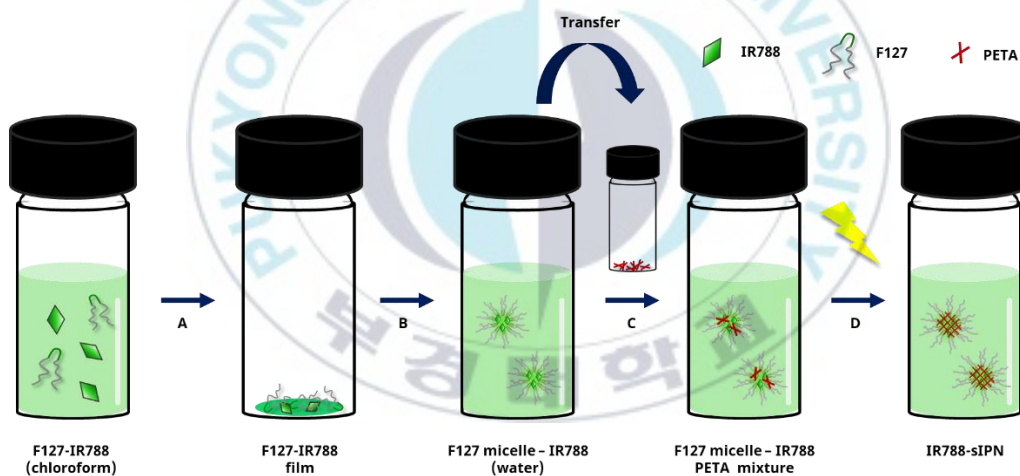


그림 9 Lumogen sIPN 형성 과정 개략도. (A) F127-IR788 혼합물 용매 감압 증류, (B) 증류수 투입 후 교반, (C) PETA film 과 F127 micelle-IR788 혼합, (D) 자외선 조사로 crosslinker 가교 결합 형성.

나. IR788-sIPN의 분광학적 특성

광열 흡수체 IR788이 담지된 sIPN 마이셀의 흡수 스펙트럼을 확인하기 위해 550-900 nm 파장 범위에서 흡광도를 측정하였다.

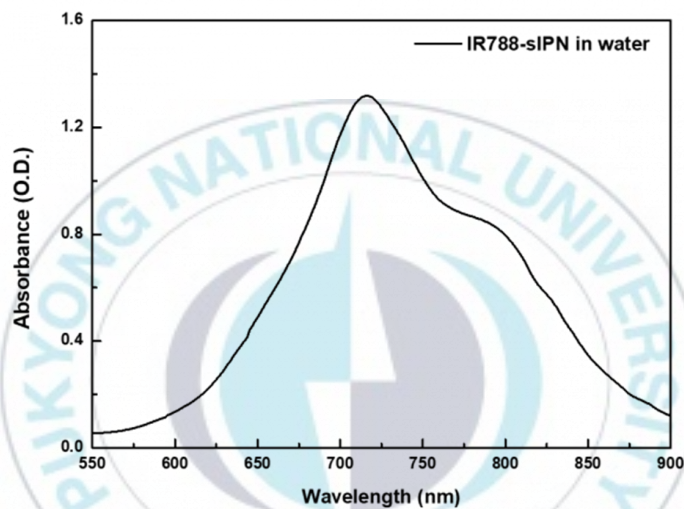


그림 10 IR788-sIPN의 흡수 스펙트럼. 물질은 물에 분산되어 있는 상태이다.

측정을 위해 제조한 IR788-sIPN은 100배 희석하여 사용하였다. 측정 결과 IR788-sIPN은 716 nm에서 1.3183의 최대 흡광도가 관찰되었으며 808 nm의 근적외선 파장에도 0.7335의 높은 흡광 계수를 나타냈다. 이는 NIR 광열 치료로 사용하는 808nm 레이저 사용 시 IR788-sIPN이 높은 열에너지 전환율을 보일 수 있음을 의미한다.

Ⅲ. 광열 면역 치료 에멀전 제조

1. 재료 및 기구

에멀전의 분산상인 유상(oil phase)제조를 위해 mineral oil(CAS no. 8042-47-5)를 삼전화학에서 구매, Span 80(CAS no. 1338-43-8)을 대정시약에서 구매, Tween® 80(CAS no. 9005-65-6)과 Triton™ X-100(CAS no. 9002-93-1)은 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다. 수상은 근적외선 흡수체인 제작한 IR788-sIPN와 면역 보조제인 CpG Oligonucleotide 1826 (CpG)을 사용하였다. CpG는 Bioneer에 합성을 의뢰하여 CpG의 phosphate backbone은 phosphorothioate backbone으로 전환시키고, Bio-RP purification을 한 oligo를 구입하여 사용하였다. CpG의 sequence는 표 2와 같다.

표 2 CpG ODN 1826 sequence

ODN	Sequence (5' → 3')	Length (NT)
CpG ODN 1826	TCCATGACGTTCTGACGTT	20

유상과 수상은 교반기(Ts-14S, Jeio Tech)를 이용해 두 상을 섞어 에멀전을 만든다. 제조한 에멀전의 점도 측정을 위해 Discovery HR-2 (TA Instruments) rheometer 를 이용하였다. 에멀전 내에 담지된 물질 방출 경향을 확인하기 위해 사용한

bromophenol blue(CAS no. 115-39-9)는 BIO-RAD 에서 구매하여 사용하였고 사용한 투석막은 Float-A-Lyzer G2 Dialysis Device CE 50 kD MWCO 1 mL(Repligen)이다.

2. 실험방법 및 결과

가. IR788-sIPN과 CpG ODN 1826을 수상으로 사용한 에멀전 제조

에멀전 제작을 위해 먼저 유상(oil phase)을 제작한다. 바이알에 마이크로 피펫을 이용해 Triton X-100, Tween 80, Span 80, Mineral oil 순으로 표 3의 함량만큼 넣어준다. 이때 전체 유상 대비 시약의 조성은 표 3과 같다. 시약을 모두 넣은 바이알은 빛을 차단하고 200 rpm 교반기에서 6시간 이상 교반하여 유상 제작을 완료한다. 수상은 3% IR788-sIPN stock solution 100 μ L와 CpG 500 μ g/ μ L 농도로 100 μ L을 혼합하여 200 μ L를 준비한다. 유상 400 μ L를 2 mL 바이알에 넣고 길이 0.5 cm의 막대형 마그네틱 바를 이용해 1400 rpm으로 교반 한다. 마이크로 피펫을 지면에서 5 cm로 유지한 후 1분간 수상을 유상에 물방울 형태(10 μ L/droplet)로 떨어뜨린다. 그 후 30분 동안 1400 rpm으로 교반을 지속해 에멀전(CpG IR788 emulsion)을 완성한다.

표 3 유상 제조를 위해 필요한 시약의 함량과 전체 용량 대비
시약 조성비

시약	함량 (g)	전체 용량 대비 시약 조성 (%)
Mineral oil	7.984	95.05
Span 80	0.481	4.50
Tween 80	0.042	0.40
Triton X-100	0.005	0.05

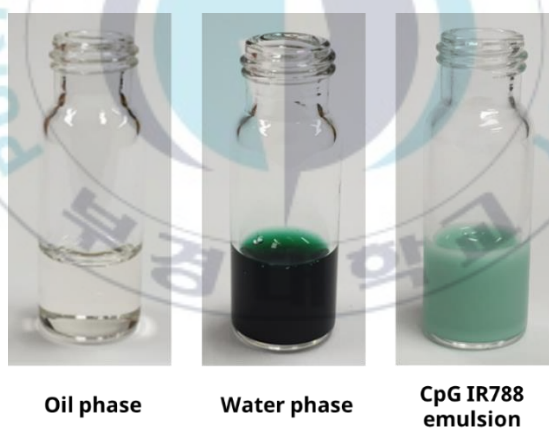


그림 11 유상, 수상, 에멀전 용액 사진. 유상과 수상의 경계에서
빛의 산란이 일어나기 때문에 에멀전은 불투명한 상으로
나타난다.

나. Hydrophilic-lipophilic balance 계산

제작한 에멀전은 Mineral oil에 대한 Hydrophilic-lipophilic balance (HLB) 값 계산을 통해 에멀전이 워터인오일(W/O) 형태를 이루는지, 오일인워터(O/W) 형태를 이루는지 유추할 수 있다. HLB 계산 식은 다음과 같다.

$$\text{Hydrophilic-lipophilic balance (HLB)} = \sum_{n=1}^N x_n \text{HLB}_n$$

여기서 x_n 은 HLB_n 값을 가지는 비이온 계면활성제의 중량 비율을 의미한다. 에멀전 제조에 사용한 비이온 계면활성제는 3가지이고, 표 3에 따라 각각의 중량 비율은 표 4와 같다.

표 4 에멀전 제조에 사용한 비이온 계면활성제의 중량 비율

Surfactant	Span 80	Tween 80	Triton X-100
Weight fraction	0.909	0.0808	0.0101

HLB 값은 Span 80 (4.30), Tween 80 (15.0), Triton X-100 (13.4) ^[30]이므로 제조한 에멀전의 유사인 mineral oil의 HLB 값은 5.26이다. 문헌값을 참조하면 (표 5) mineral oil의 HLB 값이 6(Approx. ± 1)이 될 때 에멀전은 W/O emulsion을

형성하므로 제조한 CpG IR788 emulsion은 수상이 유상에 분산되는 W/O emulsion으로 존재한다는 것을 알 수 있다. (그림 11)

표 5 W/O 에멀전 생성을 위해 요구되는 HLB 문헌값. (Approx. ± 1)^[31]

Ingredients	Gasoline	Kerosene	Mineral Oil
HLB	7	6	6

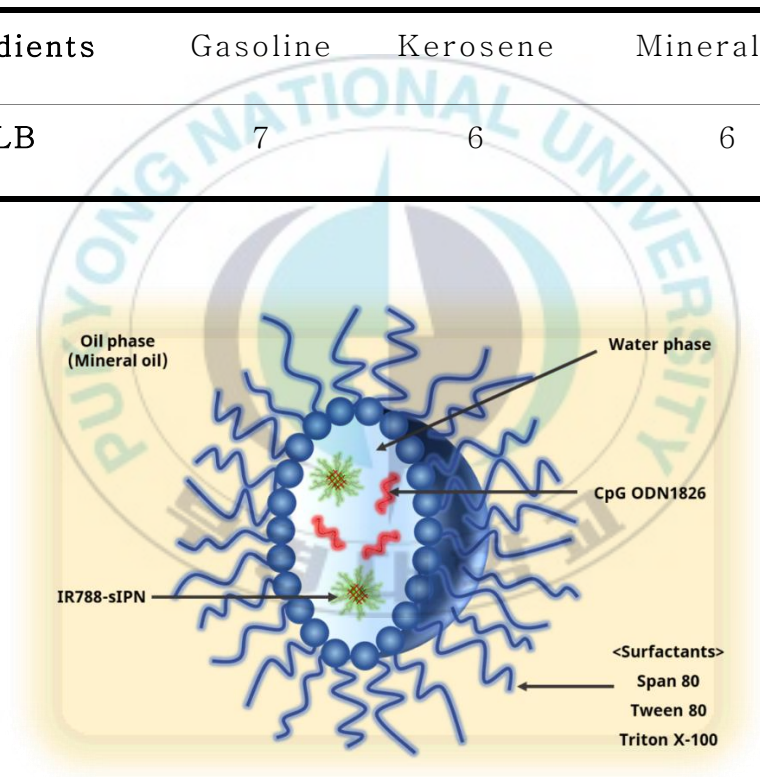


그림 12 IR788-sIPN과 CpG를 수상으로 이용해 제조한 워터인오일 에멀전 모식도. 유화제로 사용한 계면활성제가 수상을 둘러 싸며 수상이 유상에 분산된다.

다. 유변학적 성질 분석

물에 분산시킨 IR788-sIPN과 이를 에멀전화 시킨 물질의 점도 측정을 진행하였다. 상온에서 전단 속력(shear rate) 10^0 Hz~ 10^1 Hz~ 10^2 Hz 범위일 때 각 범위 안에서 5 point 간격으로 측정을 진행하였다. Shear rate가 증가할수록 점도가 감소하는 결과를 나타낸다. 에멀전의 경우 $\log$ shear rate 0.2 sec^{-1} 의 점도 값을 2.0 sec^{-1} 의 점도 값과 비교했을 때 57.6 % 가량 감소했다. IR788-sIPN 용액의 경우 같은 지점에서 비교했을 때 17.2 %가 감소했다.

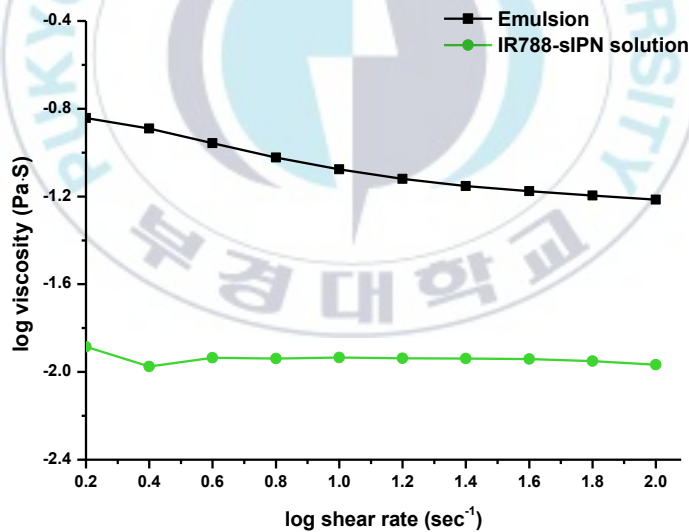


그림 13 에멀전과 IR788-sIPN 용액의 점도. IR788-sIPN 용액은 물에 분산되어 있는 상태이다.

에멀전의 점도가 solution 상태의 물질보다 5.6배에서 11배 높게 나타났다. 이는 연속상으로 이용한 mineral oil이 점성을 지니는 물질이기 때문에 연속상과 분산상(IR788-sIPN) 사이의 접촉으로 생기는 상호작용 때문이기도 하고, 그와 동시에 계면활성제의 영향으로 구형으로 모인 분산상 간의 접착력의 영향으로도 볼 수 있다.^[32]

라. 레이저를 조사하지 않은 에멀전의 분리

에멀전이 체내에 주사 됐을 때, 레이저를 조사하지 않은 에멀전의 분리를 조사하기 위해 실험을 진행하였다. 수상에 면역활성 물질 CpG 대신 bromophenol blue(bpb)를 첨가해 에멀전을 제조하고 이를 투석 망에 넣은 다음 물에 넣어 교반 한다. 교반 환경은 36~37 °C 로 유지하고 400 rpm의 속도로 교반 하여 쥐의 체온과 혈액 순환 환경을 모방한다. 시간 경과에 따라 투석 되어 나오는 bpb의 흡광도를 측정하여 에멀전의 수상에 탑재된 물질의 유출 정도를 확인할 수 있다.

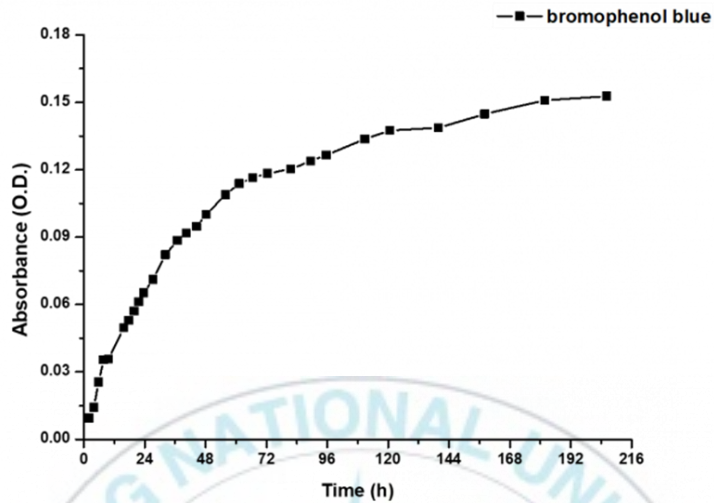


그림 14 Bromophenol blue를 이용해 측정한 레이저 비조사시의
에멀전 분리.

9일간 일정한 시간 간격으로 bpb 흡광도를 측정한 결과 0~48 시간 동안 가파른 상승곡선을, 48 시간부터 216 시간까지는 완만한 상승의 흡광 곡선을 나타냈다. 이를 통해 에멀전을 체내에 주사하면 이틀간 에멀전의 수상에 탑재된 물질이 다량 방출되고 그 후 물질은 체내에서 서서히 방출될 것이라 예측할 수 있다.

IV. 광열 면역 치료 에멀전의 광열효과

1. 재료 및 기구

에멀전의 광열 효과 측정을 위해 광원으로 808nm 파장의 레이저 MDL-N-808(CNI Laser)를 광원으로 사용하였고 근적외선 이미징 카메라 UW-AAA(Seek Thermal)로 발열 분포를 측정하였다. 레이저 조사 전 후의 콜로이드 상 분포 확인을 위해 사용한 도립현미경은 Motic AE31(Motic)이고 이미지는 400 배율로 지정하고 Motic Pro 205A(Motic)로 저장하였다.

2. 실험방법 및 결과

가. IR788-sIPN을 함유한 에멀전의 광열 효과 측정

IR788-sIPN을 함유한 에멀전(이하 IR788 에멀전)의 광열 효과 측정은 상자를 이용해 외부 환경에서 미칠 수 있는 영향을 차단한 채 진행하였다. 808 nm 레이저 파워는 0.75 W/cm^2 , 5분간 조사하였고 5분 후 레이저를 꺼 온도 변화를 관찰하였다. 수상의 IR788-sIPN의 농도는 $500 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, CpG의 농도는 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 으로 IR788 에멀전을 제작하여 실험을 진행하였다.

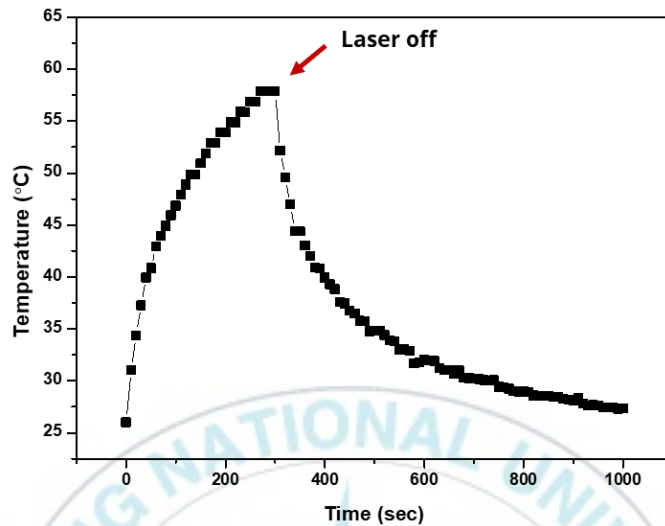


그림 15 IR788 에멀전의 광열 효과 측정.

5분간 808 nm의 레이저를 조사하였을 때, IR788 에멀전에서 발열 반응이 일어나는 것을 확인할 수 있다. 레이저를 조사하는 즉시 발열 반응이 관찰되어 10초 뒤 26 °C에서 31 °C의 온도 변화를 관찰할 수 있고, 온도는 꾸준히 상승하여 레이저 조사 시간이 150초에 도달했을 때 50 °C를 기록하며 세포 괴사(necrosis)를 유발하는 온도에 도달하였다.^[33] 조사 시간 5분에 도달하면 IR788 에멀전은 58 °C의 열을 발산할 수 있게 된다. 조사 시간 5분에 도달한 후 레이저 파워를 0으로 설정하면 그 즉시 IR788 에멀전의 광열 효과는 감소하기 시작한다. 레이저를 끄고 10초 뒤, 온도는 58 °C에서 52 °C로 감소하고 150초 뒤에는 (레이저 조사 시작 시간으로 부터 450초) 37 °C로 세포 사멸에 관여할 수 없는 온도(≤ 43 °C) 분포를

나타낸다.

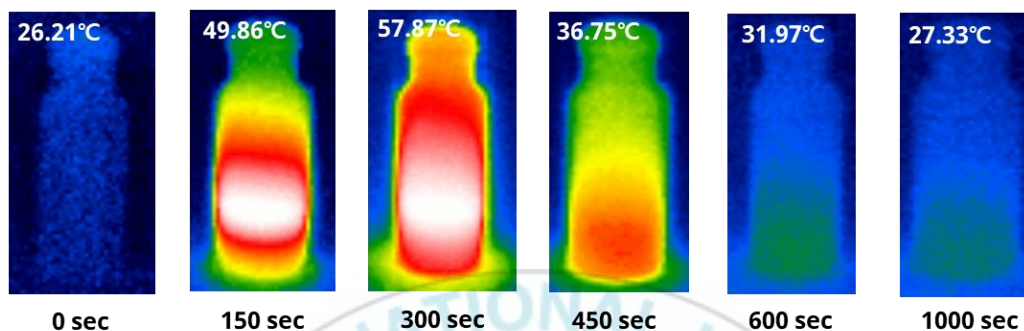


그림 16 열화상 카메라로 촬영한 에멀전의 온도 변화.

광열 물질 IR788의 농도에 따른 온도 변화를 확인하기 위해 IR788 에멀전 내의 IR788-sIPN 농도를 0, 125, 250, 375, 500, 750, 1000 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 나누어 IR788 에멀전을 제작한 후 광열 효과를 실험해보았다. (CpG 농도 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 808nm 레이저 파워 0.75 W/cm²)

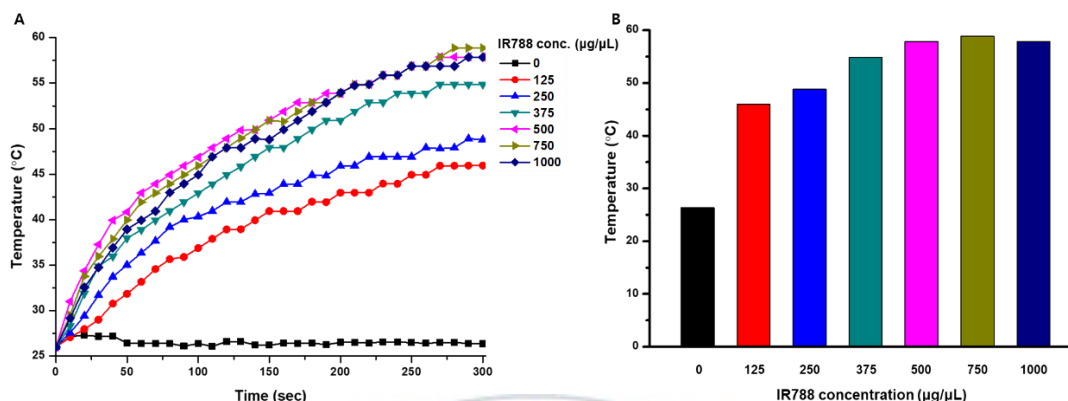


그림 17 IR788 농도 변화에 따른 IR788 에멀전의 광열 효과.

(A) 5분간 IR788 농도가 다른 IR788 에멀전에 레이저를 조사할 때의 광열 효과 (B) (A)에서 레이저 조사 시간 5분일 때의 온도 히스토그램

IR788 에멀전 내에 담지되는 IR788의 농도를 다르게 하여 IR788 에멀전을 제작하고 808nm 레이저를 조사했을 때, 0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도에서 발열 반응이 일어나지 않는다. 이것은 유상이나 CpG가 광열 효과에 기여하는 물질이 아니라는 것을 의미한다. IR788 농도를 증가시키면 따라 IR788 에멀전의 발열 효과도 증가했는데, 그림 17B에서 알 수 있듯이 IR788 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 이상의 온도에서는 IR788의 농도가 증가해도 발열 효과가 거의 증가하지 않았다. 따라서 0.75 W/cm²의 파워를 사용할 경우 IR788은 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 농도로 사용하는 것이 가장 높은 효율을 낼 수 있다.

다음으로 레이저 파워에 따른 온도 변화를 확인하기 위해

레이저 파워 0.5, 0.75, 1, 1.25 W/cm² 4가지 조건에서 IR788 에멀전의 광열 효과를 실험해보았다. (CpG 농도 2 μ g/ μ L, IR788-sIPN 농도 500 μ g/ μ L)

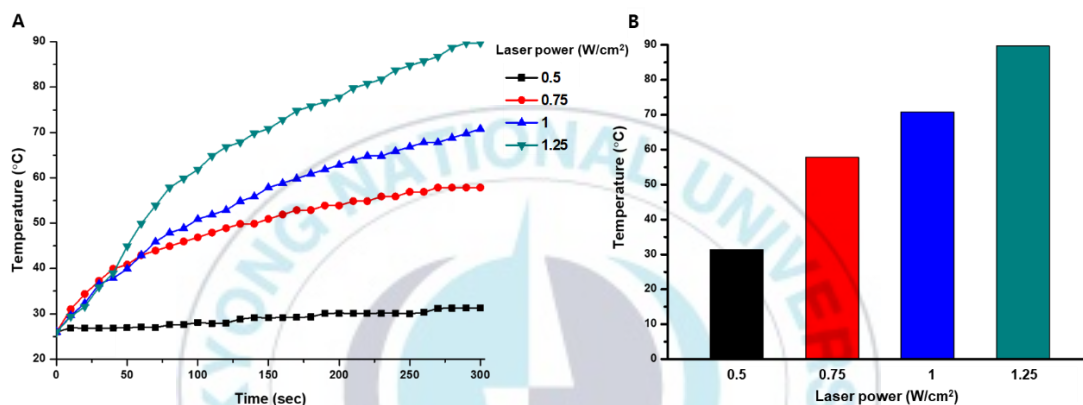


그림 18 레이저 파워에 따른 IR788 에멀전의 광열 효과. (A) 5분간 파워를 다르게 하며 레이저를 조사할 때 IR788 에멀전의 광열 효과 (B) (A)에서 레이저 조사 시간 5분일 때의 온도 히스토그램

같은 농도의 IR788을 담지하고 있는 IR788 에멀전에 다른 파워의 레이저를 조사하였을 때의 온도 변화가 뚜렷하게 관찰된다. 그림 17에서 IR788 농도 변화에 따른 광열 효과를 측정할 때 관찰하지 못한 80 °C 이상의 온도도 관찰되는 것으로 보아 IR788 유기 염료는 레이저 파워에 더 의존적인 광열 효과를

나타내는 것을 알 수 있다. 그림 18B를 보면 0.5 W/cm^2 파워를 제외하고 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 이상의 온도를 기록한다. 즉 세포 괴사를 일으킬 수 있는 조건을 모두 만족하는데 $1, 1.25 \text{ W/cm}^2$ 의 파워로 일어나는 광열 효과는 지나친 고온이 발생해 암 치료 시 정상세포에 큰 영향을 주기 때문에 적합하지 않다. 따라서 진행될 chapter V의 *In vivo* test에는 과량의 IR788 염료를 사용하지 않고 지나친 고온이 발생하지 않는 IR788-sIPN 농도 $500 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, 레이저 파워 0.75 W/cm^2 의 조건으로 실험 환경을 최적화한다.

나. Photothermal conversion efficiency 계산

Photothermal conversion efficiency (PCE)는 다음의 식으로 계산이 가능하다^{[34] - [35]}.

$$\eta = \frac{hA(T_{max} - T_{surr}) - Q_{Dis}}{I(1 - 10^{-A_{808nm}})}$$

위의 식을 이용하여 $500 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 농도로 IR788-sIPN 이 포함된 에멀전 상태의 물질과, 동일한 농도를 갖는 IR788-sIPN 수용액 상태인 물질의 PCE를 비교하였다. 이때, $\tau = hA / m_D C_D$ 으로, τ 는 열 손실과 관련된 시간 상수로, 레이저를 끈 후 온도 감소 프로파일을 측정하여 확인할 수 있다. 시간에 따른 온도 변화에 자연로그를 적용하여 나타낸 상수 값은 그림 19B와 같다.

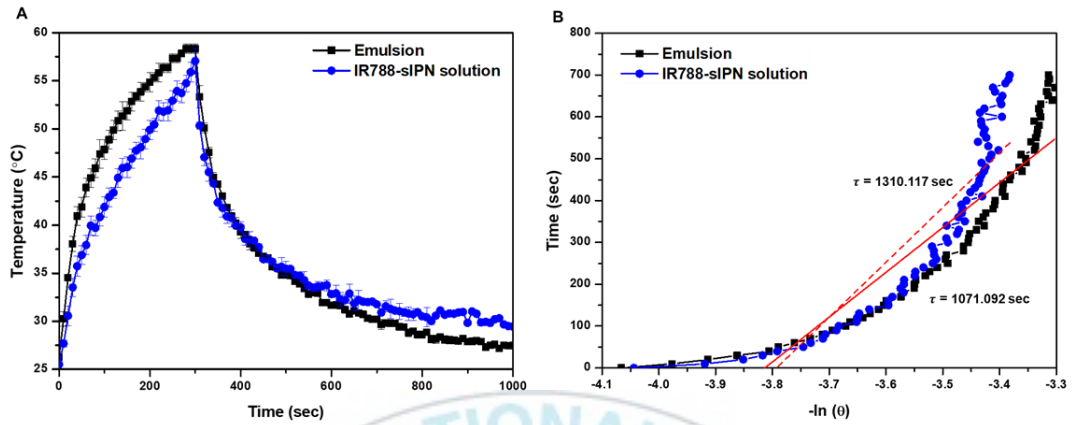


그림 19 레이저 조사에 따른 IR788 에멀전과 IR788-sIPN solution의 온도 변화. (A) 0~300초간 레이저 조사 후 레이저를 켜지 않았을 때 300~1000초 구간에 나타나는 온도 감소 (B) 온도 감소 데이터로부터 얻은 시간 상수

m_D 은 IR788을 용해시키기 위한 용매의 질량(IR788 에멀전, IR788-sIPN 수용액 모두 500 g), C_D 는 용매의 열 용량으로 IR788 에멀전의 경우 mineral oil의 열 용량 1.966 J/g °C, 수용액의 경우 물의 열 용량 4.186 J/g °C 이다^[36]. hA 는

$$hA = \frac{m_D C_D}{\tau}$$

이므로 IR788 에멀전의 $hA = 0.918$ J/°Csec, IR788-sIPN 수용액의 $hA = 1.598$ J/°Csec이다. IR788 에멀전의 최고 온도는 $T_{\max} = 58.342$ °C, 주변 온도 $T_{\text{surr}} = 26.556$ °C, 수용액의 $T_{\max}$

= 57.050 °C, $T_{surr} = 25.520$ °C 로 측정되었다. 두 물질의 용매 mineral oil 과 물의 경우 $Q_{Dis} = Q_{surr}$ 이므로 주변으로 흩어진 열 Q_{surr} 값은

$$Q_{surr} = hA(T_{max} - T_{surr})$$

이므로 용매에 레이저를 조사한 후 온도 변화를 관찰하여 얻은 에멀전의 $Q_{surr} = 0.186$ W, IR788-sIPN 수용액의 $Q_{surr} = 0.392$ W이다. I는 조사한 레이저의 파워로, 레이저 조사 면적 (1.33 cm^2)과 단위면적당 레이저 파워 (1.9 W/cm^2)를 곱하여 얻을 수 있다 (2.52 W). 808 nm 에서의 두 물질의 흡광도는 11.405 이므로 IR788 에멀전과 IR788-sIPN 수용액의 PCE 값은 11.505 %, 19.838 %으로 IR788-sIPN 수용액의 열 전환 효율이 IR788 에멀전에 비해 약 8 % 높은 것을 확인할 수 있다.

다. 레이저 조사 전후 IR788 에멀전의 상 변화를 통한 콜로이드 분해 확인

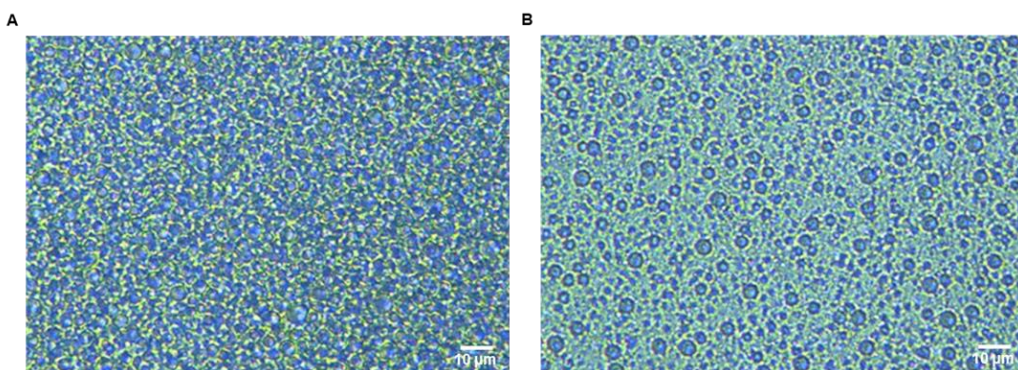


그림 20 레이저 조사 전후의 IR788 에멀전 이미지. (A) 808 nm 레이저 조사 전의 IR788 에멀전 이미지 (B) 808 nm 레이저 조사 후 IR788 에멀전 이미지

그림 12와 같이 수상이 유상에 마이셀 콜로이드 상태로 분산된 이미지를 그림 20에서 관찰할 수 있다. 그림 20은 슬라이드 글라스 위에 2 μ L의 IR788 에멀전을 점적하고 커버글라스를 덮어 관찰한 광학현미경 사진이다. 그림 20A와 B에서 각각 레이저 조사 전/후의 IR788 에멀전 상을 관찰할 수 있다. IR788 에멀전에 레이저를 조사하면 광열 흡수체인 IR788에 의한 발열반응으로 콜로이드 내부의 에너지가 높아져 불안정해진 콜로이드 구조가 붕괴된다. CpG IR788 에멀전은 W/O 에멀전으로 마이셀 내부에 친수성을 띠는 수상이 담지 되어 있으므로 레이저 조사 시 IR788과 면역 보조제인 CpG가 방출된다. 이로 인해 레이저 조사 후의 사진인 20B에서 원형으로 뭉쳐 있는 수상의 밀도가 감소한 것을 확인할 수 있다.

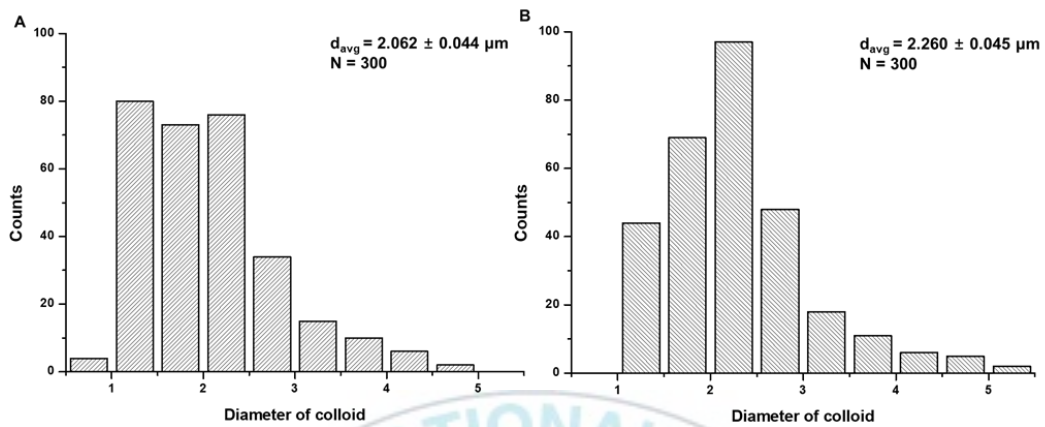


그림 21 레이저 조사 전후의 IR788 에멀전의 콜로이드 크기 히스토그램. (A) 레이저 조사 전, (B) 레이저 조사 후

Image J 프로그램을 이용해 레이저 조사 전 후 에멀전 콜로이드의 지름을 분석하였다. 레이저 조사 전의 지름은 $2.018 \sim 2.106 \mu m$ 이고 레이저 조사 후의 지름은 $2.215 \sim 2.305 \mu m$ 로 레이저 조사 후 에멀전의 콜로이드 크기는 약 9.6 % 증가하였다. 이를 통해 레이저 조사가 에멀전의 콜로이드 구조와 안정성에 영향을 미쳤다는 것을 확인할 수 있다.

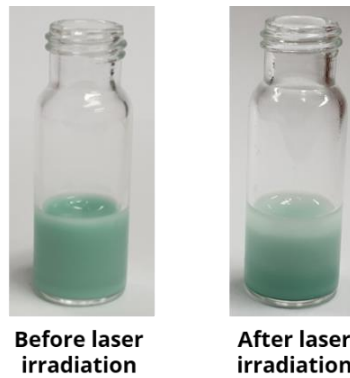


그림 22 레이저 조사 전후의 IR788 에멀전 사진.

레이저 조사 전의 IR788 에멀전은 수상이 유상에 콜로이드 형태로 분산되며 불투명한 상태이다. 레이저 조사 후, 콜로이드 입자가 붕괴되며 밀도가 상대적으로 낮은 유상의 투명한 mineral oil(밀도 $0.8 \sim 0.87 \text{ g/cm}^3$)이 IR788 에멀전 위로 떠오르거나, IR788을 포함하고 있어 짙은 녹색의 수상(밀도 $\geq 1 \text{ g/cm}^3$)이 IR788 에멀전 아래로 가라앉은 것을 확인할 수 있다.

V. *In vivo* 실험을 통한 항암 효과 및 면역 활성화 확인

이 장에서 실행된 동물 실험은 영남대학교 의생명공학과와의
진준오 교수님과의 협업으로 진행되었다.

1. 실험 방법 및 결과

가. 공통자극분자(costimulatory molecule) 분석을 통한 면역 활성화 확인

면역 활성화 물질 CpG와 근적외선 흡수체 IR788이 포함된
에멀전(이하 CpG IR788 에멀전)의 면역 활성화 확인을 위해
BALB/c 쥐 8마리와 PBS, 수용액상의 CpG, CpG IR788 에멀전을
준비하였다. 수용액상의 CpG와 CpG IR788 에멀전의 CpG 농도는
2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 로 동일하다. 실험은 1. PBS 2. (수용액상의) CpG 3.
CpG IR788 에멀전 4. CpG IR788 에멀전 주사 후 레이저를
조사한 그룹으로 나누어 진행하였다. 한 그룹당 쥐는 두 마리를
사용하였고, 비장(spleen) 주위의 피부에 샘플을 50 μL 씩 동량
주사했다. 4번 그룹은 물질 주사 직후 바로 808 nm 레이저를
조사하여 IR788의 광열 반응을 일으켰다. 물질 주사 18시간 후

에테르를 이용해 마취시킨 쥐들을 희생시켜 비장을 추출했다.

추출한 비장 내 세포를 fluorescence-activated cell sorting(FACS)을 이용해 유세포 분석을 진행하였다. 유세포 분석으로 확인한 공통자극분자는 cluster of differentiation인 CD40, CD80, CD86이다. 이들은 비장의 수지상 세포에서 발현되는 marker로서 T 세포 증식을 자극하는 물질이다. 이는 광범위한 면역 반응과 염증 반응을 중재하는데 필수적인 물질이기 때문에 면역 활성화에 관한 분석 정보로 사용할 수 있다.

모든 공통자극분자에서 레이저를 조사한 CpG IR788 에멀전의 신호가 가장 높게 나타났다. 같은 물질을 사용했음에도 레이저를 조사하지 않은 그룹은 면역 활성화가 대조군인 PBS와 크게 차이가 없었으며, 레이저 조사를 하지 않은 CpG IR788 에멀전은 면역 활성화에 영향이 미미하다는 것을 보여준다. 또한 수용액상의 CpG의 공통자극분자 활성화 신호가 레이저를 조사한 CpG IR788 에멀전보다 작게 나타났다. 따라서 레이저 조사로 인해 발생한 CpG IR788 에멀전의 발열 반응이 에멀전에 담지된 면역 보조제인 CpG의 방출 및 체내 흡수의 가속화를 도와준다는 것을 알 수 있다.

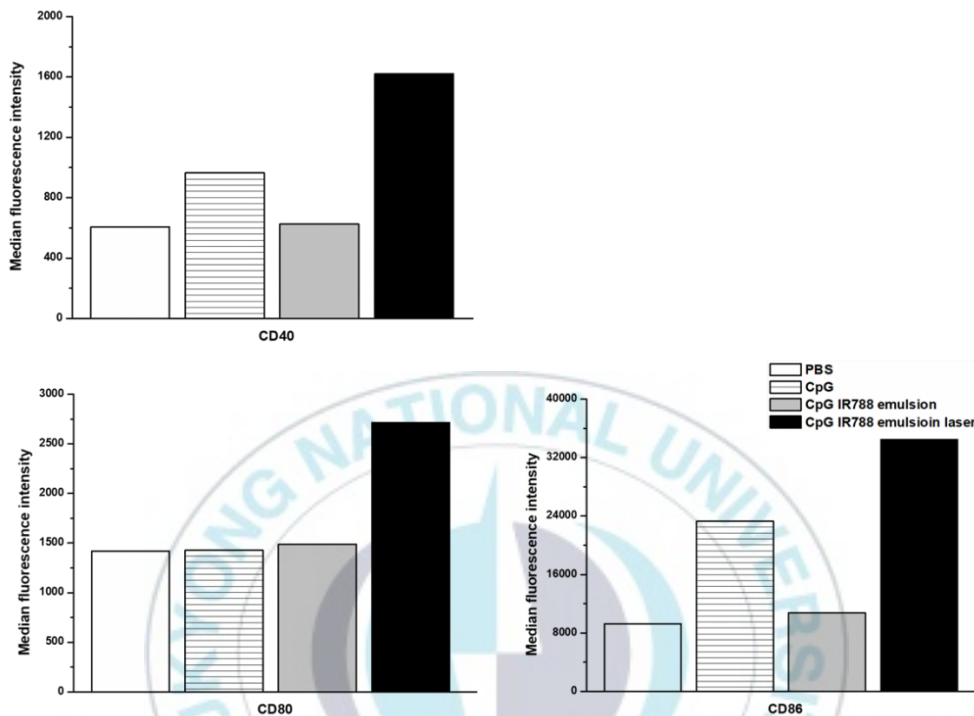


그림 23 비장세포의 공통자극분자 CD40, CD80, CD 86 활성 확인.

나. CpG IR788 에멀전의 항암 치료 효과

에멀전을 이용한 항암 치료 개요는 그림 24와 같다. 1차 종양 4T1 (mouse breast tumor)을 3×10^5 $100 \mu\text{L}$ 로 BALB/c 쥐에 주사한다. 그 후 일주일간 쥐 안에서 종양 세포가 자라도록 한 다음 그림 24와 그림 25에 제시된 것과 같이 5가지 그룹으로 나누어 물질을 종양 위치에 직접 주사하였다. (한 그룹당 쥐

5마리)

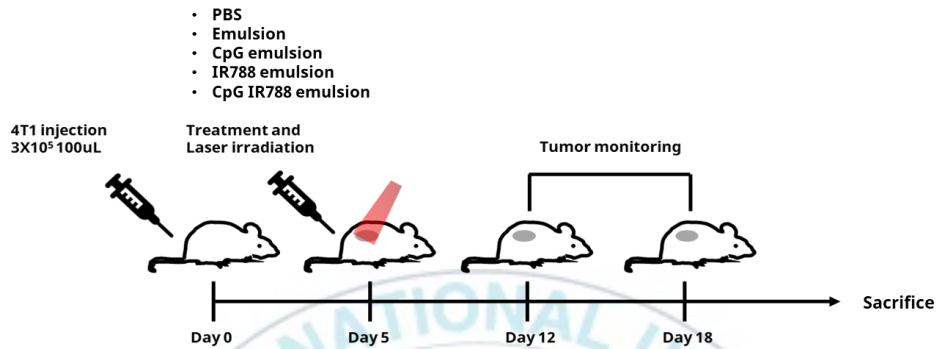


그림 24 에멀전을 이용한 항암 치료 개략도.

	PBS	Emulsion	CpG Emulsion	IR788 Emulsion	CpG IR788 Emulsion
 CpG	-	-	+	-	+
 IR788-sIPN	-	-	-	+	+

그림 25 항암 치료 실험에 사용하는 물질의 구분. CpG 농도는 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, IR788-sIPN 농도는 500 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

물질을 주사한 뒤 808 nm 레이저 (0.75 W/cm^2 , 5분간 조사)를 5가지 그룹에 조사하고 이들을 실험군1 이라고 한다(총 25마리). 실험군1에 대한 대조군인 실험군2는 실험군1과 실험과정은 동일하지만 레이저를 조사하지 않고 실험을 진행한 팀이다.

5개 그룹의 물질을 종양 내에 주사한 후 레이저를 조사하고 열 화상 카메라를 이용해 광열 효과를 관찰한 결과, IR788-sIPN이 포함된 에멀전 실험군에서 55°C 를 초과하는 광열 효과를 보였다(그림 26, 27). 이는 세포괴사를 일으킬 수 있는 온도로 IR788-sIPN이 포함된 에멀전이 광열 치료 물질로 사용될 수 있음을 의미한다.

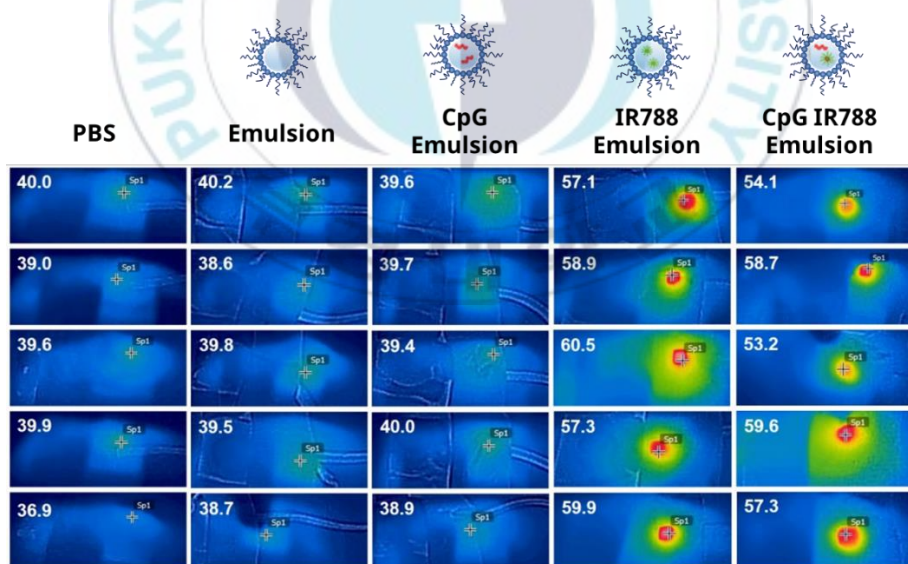


그림 26 에멀전을 주사한 후 체내 광열 효과 관찰. 레이저 조사 후 4분 30초 경과 후 기록한 사진.

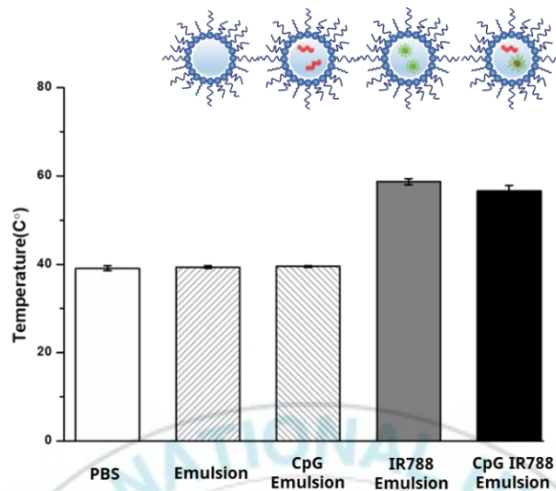


그림 27 레이저 조사 실험군의 온도 변화 평균값.

레이저 조사 후 2주간 암의 성장 정도 또는 성장 억제 정도를 육안으로 관찰하였다 (그림 28). 광열 효과를 나타낼 수 있는 IR788 에멀전 그룹과 CpG IR788 에멀전 그룹의 경우 레이저를 조사한 실험군1 쥐의 종양 성장이 억제되고 있는 것이 관찰되었다. (그림 28A) 반면에 PBS나 에멀전 그룹은 그림 28A, B와 같이 암세포가 과성장 하여 조직이 괴사하는 모습을 보이고 있고, 종양 성장의 억제가 이루어지지 않았음을 확인할 수 있다. 이 점을 통해 IR788-sIPN이 체내에서 근적외선의 빛을 받아 열을 발생시켜 종양을 파괴하고 성장을 저해하여 광열 물질 치료제로서 효과를 나타낼 수 있음을 알 수 있다.

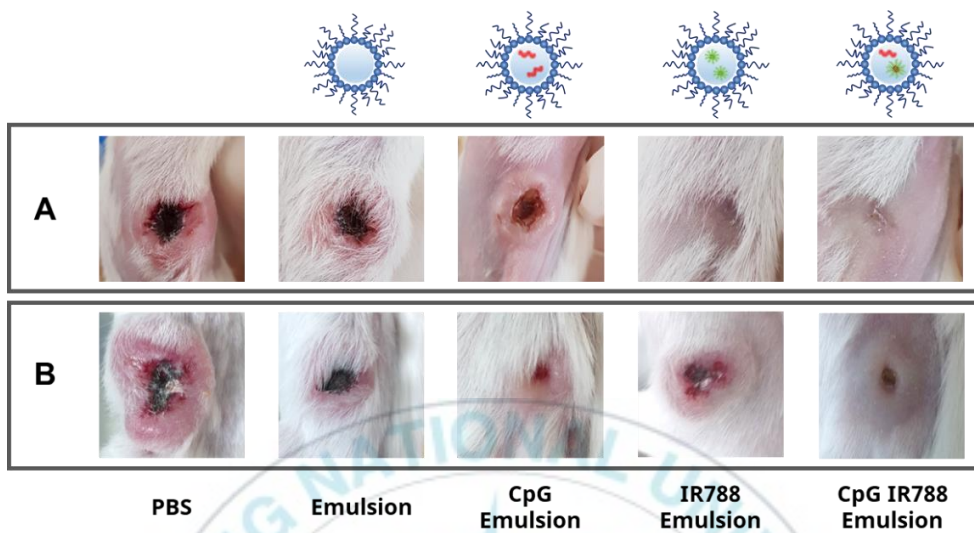


그림 28 종양의 성장 및 성장 억제 관찰. 물질 주사 및 레이저 조사 2주 후 (A) 레이저 조사를 한 실험군1, (B) 레이저 조사를 하지 않은 실험군2

VI. 결론

면역 활성을 유발하는 면역 보조제 CpG와 근적외선 흡수체 IR788을 포함하는 수상을 유상에 분산시켜 종양에 대해 광열 치료뿐만 아니라 면역 치료가 가능한 에멀전을 제조하였다. 소수성의 IR788은 양친매성 분자 및 가교제를 이용하여 수상에 분산되고 마이셀보다 높은 안정성을 가지는 sIPN 형태(IR788-sIPN)로 사용하였다. 먼저 IR788-sIPN을 유상에 분산시켜 워터인오일 에멀전을 제조하고, 물성과 광열 특성을 연구하였다. 에멀전은 IR788-sIPN보다 높은 점도를 가지며 빛을 조사하지 않았을 때, 수상에 포함된 물질이 매우 서서히 방출되었다. 반면, 근적외선 파장의 빛(808 nm)을 조사할 때는 즉시 콜로이드 구조가 붕괴되며 유상과 수상이 분리되어 물질의 층이 나뉘는 것을 확인할 수 있었다. 에멀전의 광열 특성을 알아보기 위하여 IR788-sIPN의 농도를 조절한 에멀전에 빛의 파워를 조절하여 조사한 후 온도 상승 정도를 관찰하였다. 최적화된 조건에서 에멀전은 매우 빠른 속도로 세포사멸을 일으키는 55℃ 이상의 온도에 도달하였으며, 약 12%의 열 전환 효율을 나타내어 에멀전이 광열 치료 물질로 사용될 수 있음을 보여주었다. 다음으로, 광열 흡수체와 더불어 암 치료에 강력한 상승 효과를 위하여 면역 보조제인 CpG를 함께 사용하여 실험을 진행하였다. 이를 위해 CpG와 IR788-sIPN을 유상에 분산시킨 에멀전(CpG IR788 에멀전)을 쥐에 주사한 후 빛을 조사해 면역 활성을 분석하였다. 그 결과 CpG가 수지상세포의 TLR-9에 의해 인식되어 공통자극분자가 발현되는 결과를 나타냈고, 이를 통해

CpG가 포함된 물질이 면역 활성을 일으키는 것을 확인하였다. 또한 CpG IR788 에멀전은 빛을 조사하지 않은 CpG 물질보다 높은 공통자극분자 발현값을 보이며 IR788-sIPN이 발생시킨 광열 반응이 CpG의 면역 활성을 가속화하는 것을 확인하였다. 마지막으로 CpG IR788 에멀전에 의해 치료되는 종양을 관찰하기 위해 에멀전을 유방암을 가진 쥐에 주사하고 빛을 조사한 후 2주 동안 관찰하였다. 빛을 조사할 때 CpG IR788 에멀전은 55 ℃ 이상의 온도를 나타냈고 2주간 병변 부위가 과성장하거나 괴사하는 일 없이 눈에 띄게 줄어 종양 성장이 억제되고 있음을 육안으로 관찰할 수 있었다.



VII. 참고문헌

- [1] Roti Roti, J. L. (2008). Cellular responses to hyperthermia (40–46 C): Cell killing and molecular events. *International Journal of hyperthermia*, 24(1), 3–15.
- [2] Pérez-Hernández, M., del Pino, P., Mitchell, S. G., Moros, M., Stepien, G., Pelaz, B., ... & de la Fuente, J. M. (2014). Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. *ACS nano*, 9(1), 52–61.
- [3] Mocan, T., Matea, C. T., Cojocaru, I., Ilie, I., Tabaran, F. A., Zaharie, F., ... & Mocan, L. (2014). Photothermal treatment of human pancreatic cancer using PEGylated multi-walled carbon nanotubes induces apoptosis by triggering mitochondrial membrane depolarization mechanism. *Journal of Cancer*, 5(8), 679.
- [4] Li, J. L., & Gu, M. (2010). Surface plasmonic gold nanorods for enhanced two-photon microscopic imaging and apoptosis induction of cancer cells. *Biomaterials*, 31(36), 9492–9498.
- [5] Riley, R. S., & Day, E. S. (2017). Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 9(4), e1449.

- [6] Carpin, L. B., Bickford, L. R., Agollah, G., Yu, T. K., Schiff, R., Li, Y., & Drezek, R. A. (2011). Immunoconjugated gold nanoshell-mediated photothermal ablation of trastuzumab-resistant breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment*, 125(1), 27–34.
- [7] Cai, X., Jia, X., Gao, W., Zhang, K., Ma, M., Wang, S., ... & Chen, H. (2015). A Versatile Nanotheranostic Agent for Efficient Dual-Mode Imaging Guided Synergistic Chemo-Thermal Tumor Therapy. *Advanced Functional Materials*, 25(17), 2520–2529.
- [8] Su, S., Ding, Y., Li, Y., Wu, Y., & Nie, G. (2016). Integration of photothermal therapy and synergistic chemotherapy by a porphyrin self-assembled micelle confers chemosensitivity in triple-negative breast cancer. *Biomaterials*, 80, 169–178.
- [9] Song, W., Kuang, J., Li, C. X., Zhang, M., Zheng, D., Zeng, X., ... & Zhang, X. Z. (2018). Enhanced immunotherapy based on photodynamic therapy for both primary and lung metastasis tumor eradication. *ACS nano*, 12(2), 1978–1989.
- [10] Tao, Y., Ju, E., Liu, Z., Dong, K., Ren, J., & Qu, X. (2014). Engineered, self-assembled near-infrared photothermal agents for combined tumor immunotherapy and chemo-photothermal therapy. *Biomaterials*, 35(24), 6646–6656.

- [11] Guo, L., Yan, D. D., Yang, D., Li, Y., Wang, X., Zalewski, O., ... & Lu, W. (2014). Combinatorial photothermal and immuno cancer therapy using chitosan-coated hollow copper sulfide nanoparticles. *ACS nano*, 8(6), 5670–5681.
- [12] Bear, A. S., Kennedy, L. C., Young, J. K., Perna, S. K., Almeida, J. P. M., Lin, A. Y., ... & Foster, A. E. (2013). Elimination of metastatic melanoma using gold nanoshell-enabled photothermal therapy and adoptive T cell transfer. *PLoS One*, 8(7), e69073.
- [13] Wang, C., Xu, L., Liang, C., Xiang, J., Peng, R., & Liu, Z. (2014). Immunological responses triggered by photothermal therapy with carbon nanotubes in combination with anti-CTLA-4 therapy to inhibit cancer metastasis. *Advanced Materials*, 26(48), 8154–8162.
- [14] Wack, A., Baudner, B. C., Hilbert, A. K., Manini, I., Nuti, S., Tavarini, S., ... & Montomoli, E. (2008). Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*, 26(4), 552–561.
- [15] O'Hagan, D. T., Ott, G. S., Nest, G. V., Rappuoli, R., & Giudice, G. D. (2013). The history of MF59® adjuvant: a phoenix that arose from the ashes. *Expert review of vaccines*, 12(1), 13–30.

- [16] Raman, A. K. Y., Venkataramani, D., Bhagwat, S., Martin, T., Clark, P. E., & Aichele, C. P. (2016). Emulsion stability of surfactant and solid stabilized water-in-oil emulsions after hydrate formation and dissociation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 506, 607–621.
- [17] Uson, N., Garcia, M. J., & Solans, C. (2004). Formation of water-in-oil (W/O) nano-emulsions in a water/mixed non-ionic surfactant/oil systems prepared by a low-energy emulsification method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 250(1–3), 415–421.
- [18] Peng, L. C., Liu, C. H., Kwan, C. C., & Huang, K. F. (2010). Optimization of water-in-oil nanoemulsions by mixed surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 370(1–3), 136–142.
- [19] Ibrahim, N., Raman, I. A., & Yusop, M. R. (2015). Effects of functional group of non-ionic surfactants on the stability of emulsion. *Malaysian journal of analytical sciences*, 19(1), 261–267.
- [20] Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhay, S., Baras, B., Jacob, V., ... & Kielland, A. (2011). Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine*,

29(13), 2461–2473.

[21] Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33(4), 492–503.

[22] Ash, C., Dubec, M., Donne, K., & Bashford, T. (2017). Effect of wavelength and beam width on penetration in light–tissue interaction using computational methods. *Lasers in medical science*, 32(8), 1909–1918.

[23] Wang, K., Zhang, Y., Wang, J., Yuan, A., Sun, M., Wu, J., & Hu, Y. (2016). Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. *Scientific reports*, 6, 27421.

[24] Conceição, D., Ferreira, D., & Ferreira, L. (2013). Photochemistry and cytotoxicity evaluation of heptamethinecyanine Near Infrared (NIR) dyes. *International journal of molecular sciences*, 14(9), 18557–18571.

[25] Soeriawidjaja, B. F., Kang, M., Kim, H., Yang, H. K., Kim, J. H., & Kwak, M. (2019). Near infrared dye-encapsulated polymeric nanoparticles with enhanced photostability under hyperthermal condition. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, 687(1), 53–59.

[26] Alexandridis, P., & Hatton, T. A. (1995). Poly (ethylene

oxide) poly (propylene oxide) poly (ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 96(1–2), 1–46.

[27] Doytcheva, M., Dotcheva, D., Stamenova, R., & Tsvetanov, C. (2001). UV-initiated crosslinking of poly (ethylene oxide) with pentaerythritol triacrylate in solid state. *Macromolecular Materials and Engineering*, 286(1), 30–33.

[28] Rakoff-Nahoum, S., & Medzhitov, R. (2009). Toll-like receptors and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(1), 57.

[29] Weeratna, R. D., Makinen, S. R., McCluskie, M. J., & Davis, H. L. (2005). TLR agonists as vaccine adjuvants: comparison of CpG ODN and Resiquimod (R-848). *Vaccine*, 23(45), 5263–5270.

[30] Jin, X., Streett, D. A., Dunlap, C. A., & Lyn, M. E. (2008). Application of hydrophilic–lipophilic balance (HLB) number to optimize a compatible non-ionic surfactant for dried aerial conidia of *Beauveria bassiana*. *Biological Control*, 46(2), 226–233.

[31] ICI Americas Inc, The HLB SYSTEM, publication of ICI Americas Inc, 1984

[32] Bibette, J., Mason, T. G., Gang, H., Weitz, D. A., & Poulin, P. (1993). Structure of adhesive emulsions. *Langmuir*, 9(12), 3352–3356.

[33] Zhang, Y., Zhan, X., Xiong, J., Peng, S., Huang, W., Joshi, R., ... & Zhou, N. (2018). Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Scientific reports*, 8(1), 8720.

[34] Roper, D. K., Ahn, W., & Hoepfner, M. (2007). Microscale heat transfer transduced by surface plasmon resonant gold nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 111(9), 3636–3641.

[35] Liu, C., Zhang, S., Li, J., Wei, J., Müllen, K., & Yin, M. (2019). A Water-Soluble, NIR-Absorbing Quaterrylenediimide Chromophore for Photoacoustic Imaging and Efficient Photothermal Cancer Therapy. *Angewandte Chemie International Edition*, 58(6), 1638–1642.

[36] Godfrey, D., & Herguth, W.R. Physical and chemical properties of industrial mineral oils affecting lubrication. United States.