

# 그래핀의 약물 전달 시스템 및 암 치료 연구 동향

성균관대학교 나노소재기반 휴먼인터페이스  
융합 연구센터 선임 연구원  
윤 옥자

# 1. 서론

- ▶ 나노물질은 높은 생체 친화력, 넓은 표면적, 표면의 기능화에 따라 질병의 진단과 맞춤형 표적 치료에 다양하게 적용되고 생체분자 영상, 바이오 센서등의 연구에 활발히 응용되고 있다.<sup>1</sup>
- ▶ 약물전달시스템은 약물을 시간에 따라 방출·흡수하도록 제어, 특정한 곳에 약물을 전달하는 표적치료, 약물의 부작용을 최소화한 맞춤형 치료 및 조기 진단을 목적으로 한다.
- ▶ 그래핀을 이용한 약물 전달 시스템으로의 응용가능성은 그래핀의 낮은 독성, biocompatibility, stability, 두께와 크기 제어,  $\pi$ - $\pi$  결합에 의한 표면 기능화등의 특성들을 가지고 있기 때문이다.<sup>2</sup>
- ▶ 카본 나노물질인 탄소나노튜브나 그래핀은 암치료의 화학요법에서 multi-drug resistance 를 위한 항암치료제로의 연구와 gene co-delivered하거나 photothermal, photoacoustic, RF ablation등을 이용하여 최선의 암치료 방법을 찾기위해 활발히 연구하고 있다.<sup>3</sup>
- ▶ 본 정보는 그래핀의 약물전달 시스템 및 암 치료 연구에 대한 최근 연구 동향에 대해 기술하고자 한다

## 2. 그래핀의 약물 전달 시스템 연구

### ➤ A novel graphene oxide-para amino benzoic acid nanosheet as effective drug delivery system to treat drug resistant bacteria <sup>4</sup>

- Graphene oxide-para amino benzoic acid nanosheet(GO-PABA)의 평균 크기는 100nm이었고 zeta potential은 34.9 ( $\pm$  7.03) mV 임을 보여줌.
- 효과적으로 tetracycline 약물이 탑재됨을 확인하였고 약물 방출이 효과가 있음을 연구하였음.
- Go-PABA에 탑재된 tetracycline (GO-PABA -tet)의 항균활동 (antimicrobial activity)이 tetracycline에 의한 내성 박테리아 Escherichia coli XL-1에 대한 최소 억제 농도 (minimal inhibitory concentration )와 putative mode 를 결정되는 것을 보고함.
- 이 GO-PABA-tet의 최소억제농도는 110  $\mu$ g/ml이었고 drug resistant bacteria를 치료하기 위한 훌륭한 약물 전달 시스템을 보여줌.
- 또한 GO-PABA는 biocompatibility, 효과적인 물리적 약물탑재, drug resistant bacteria 를 치료 하기 위한 약물 전달 시스템등을 포함한 복합 기능화의 기능을 가지고 있어 생물학적, 치료분야에서 응용이 기대됨.

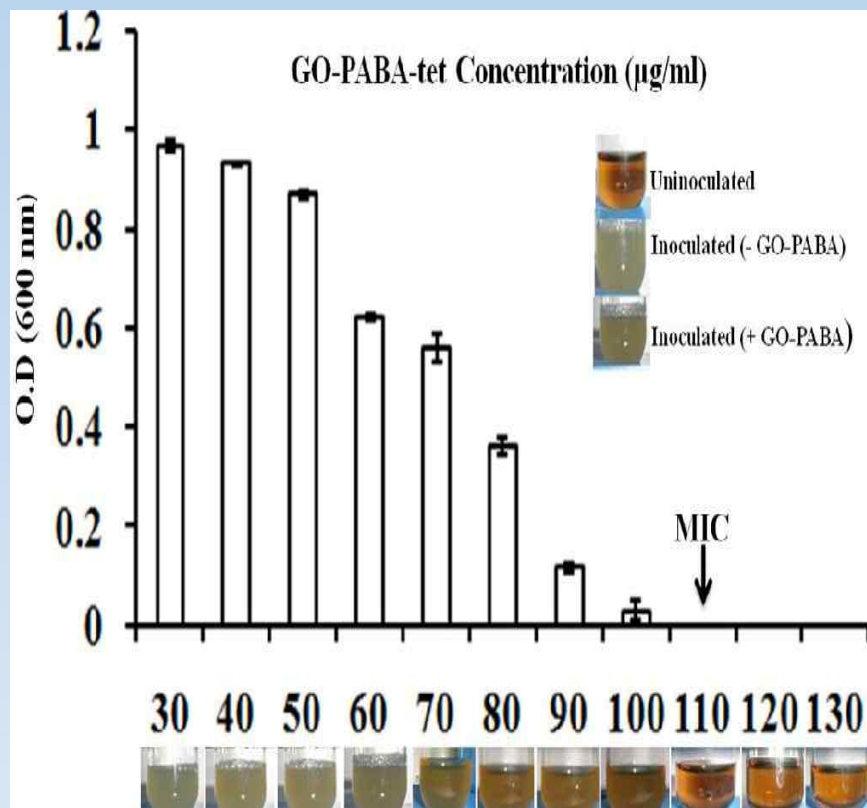


Figure 1. Evaluation of MIC of GO-PABA-tet nanosheet on tetracycline resistant bacteria *Escherichia coli* XL-1. "Uninoculated" represents the only autoclaved nutrient broth (negative control); "Inoculated (-GO-PABA)" represents the autoclaved nutrient with tetracycline resistant bacteria *Escherichia coli* XL-1 without GO-PABA nanosheet; "Inoculated +GO-PABA" designates inoculated medium with GO-PABA nanosheet but without tetracycline loading (positive control).

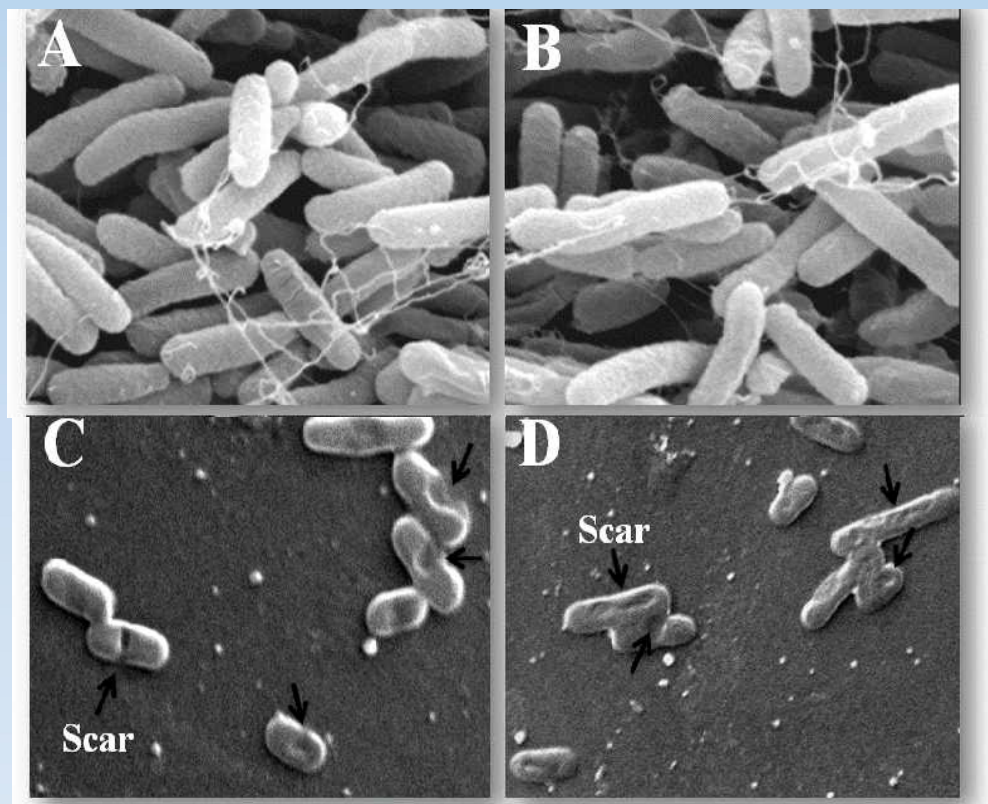


Figure 2. Evaluation of a putative mode of action of GO-PABA-tet nanosheet on tetracycline resistant bacteria *Escherichia coli* XL-1. (A) Untreated *E. coli* XL-1; (B) treated *E. coli* XL-1; (C) treated after 12 hrs; (D) treated after 24 hours under 20,000 X magnification. In (C) scar was appeared in middle region of bacteria; in (D) the scar become bigger and spreading toward the Polar Regions (Considering the same dilution in each FE-SEM analysis of GO-PABA-tet treated bacterial sample preparations before gold coating).

## ➤ Engineered redox-responsive PEG retachment mechanism in PEGylated nano-graphene oxide for Intracellular drug delivery<sup>5</sup>

- 이 연구는 redox-responsive PEG detachment mechanism 을 이용하여 중요한 세포내 약물 전달 문제를 해결하고자함.
- Disulfide linkage 를 매개로 결합한 PEGylated nano-graphene oxide (NGO-SS-mPEG)는 세포내 약물 전달하기 위하여 개발하였으며 약물 전달 시 세포내에서 diffusion barrier라는 문제가 있어 tumor-relevant glutathione (GSH) levels에서 빠르게 방출을 할수있도록 개발하였음.
- NGO-SS-mPEG는 생리학적 환경에서 높은 solubility, stability, circulation 의 성질을 가지는 복합체이고 이것은 세포내 GSH 자극에 따라 선택적으로 NGO로부터 약물을 분리할 수 있음을 증명.
- Redox-sensitive NGO-SS-mPEG nanocarriers는 세포내 GSH의 높은 농도를 가진 표적 암에 빠른 doxorubicin hydrochloride (DXR) 방출에 의하여 세포 증식 억제가 세포 내 GSH 농도의 증가와 직접적인 연관이 있음을 증명하였고 NGO-SS-mPEG는 HeLa cell 안에 흡수되어 cytoplasm 안에 주로 모여 있음을 입증함.
- 이 nanocarriers 는 stability, circulation time, 표적 암에서의 약물 전달, 약물 방출 제어 방법등의 결정적임 문제들을 다루고 있어 photodynamic therapy 와 gene therapy와 같은 biomedical applications의 접근을 제시함.

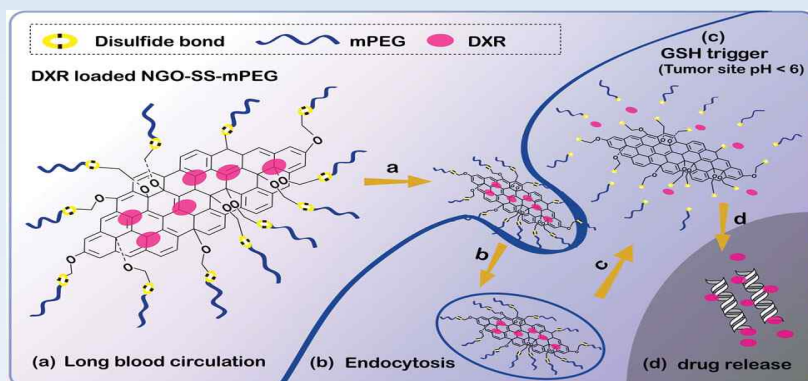


Figure 3. Schematic diagram showing antitumor activity of redox-sensitive DXR-loaded NGO-SS-mPEG: (a) PEG- shielded NGO with disulfide linkage for prolonged blood circulation; (b) endocytosis of NGO-SS-mPEG in tumor cells via the EPR effect; (c) GSH trigger (GSH > fourfold relative to normal cells) resulting in PEG detachment; and d) rapid drug release on the tumor site.

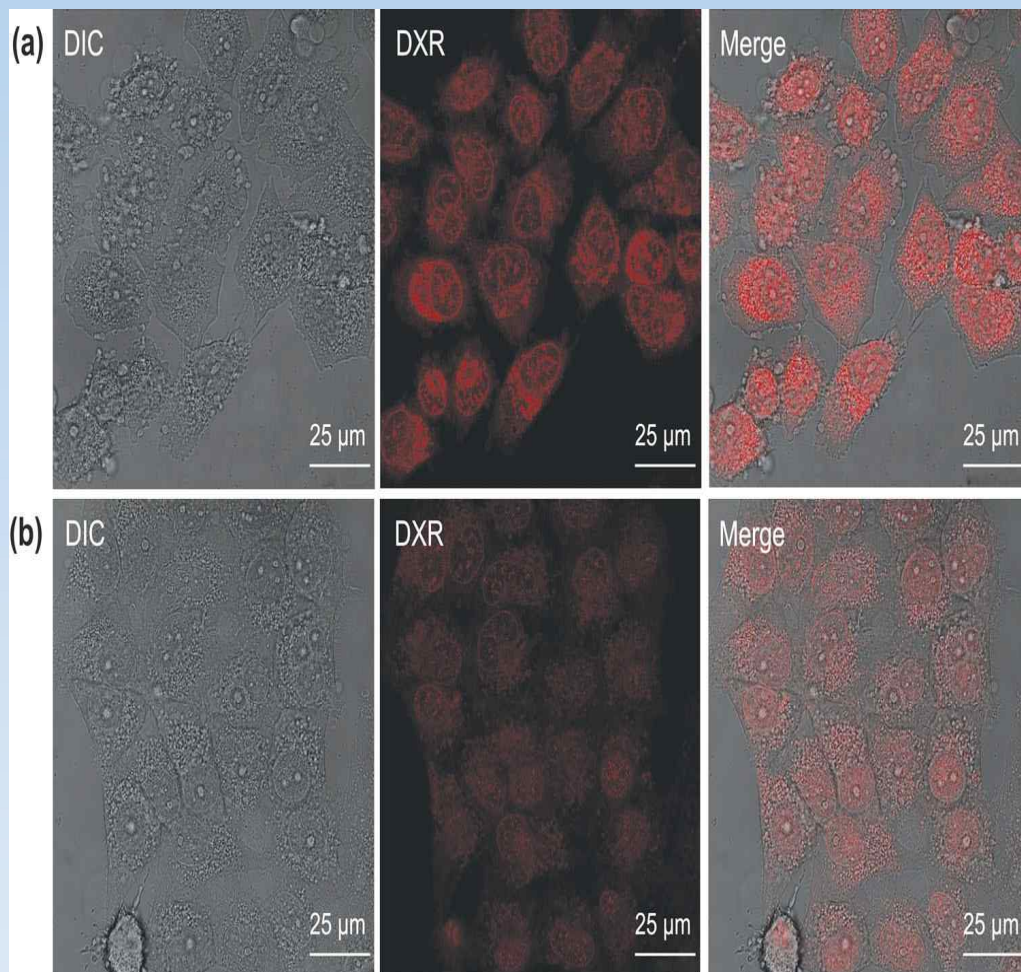


Figure 4. Representative CLSM images of (a) 10 mM GSH-OEt and (b) 0 mM GSH-OEt pretreated HeLa cells after 6 h of incubation with DXR-loaded NGO-SS-mPEG ( $0.25 \text{ mg mL}^{-1}$ ). The red channel visualizes DXR fluorescence.

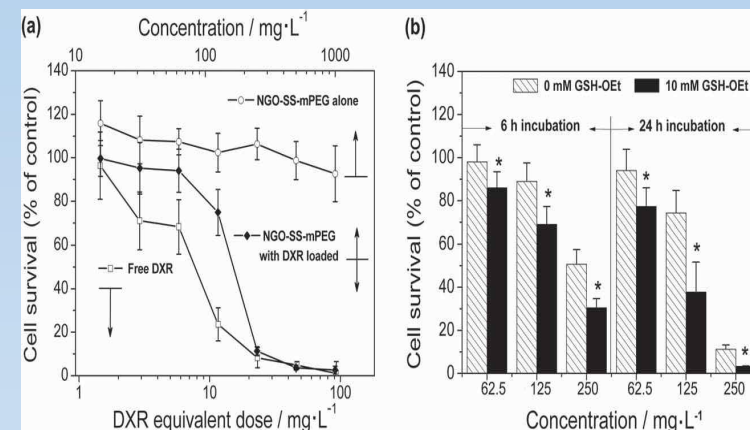


Figure 5. (a) Cell proliferation of HeLa cells incubated with free DXR, NGO-SS-mPEG, and DXR loaded NGO-SS-mPEG for 24 h. Data are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD;  $n = 5$ ). (b) Cell proliferation of pretreated HeLa cells with either 0 or 10 mM GSH-OEt incubated with DXR-loaded NGO-SS-mPEG ( $0.25, 0.125, 0.0625 \text{ mg mL}^{-1}$ ) for the time periods indicated.

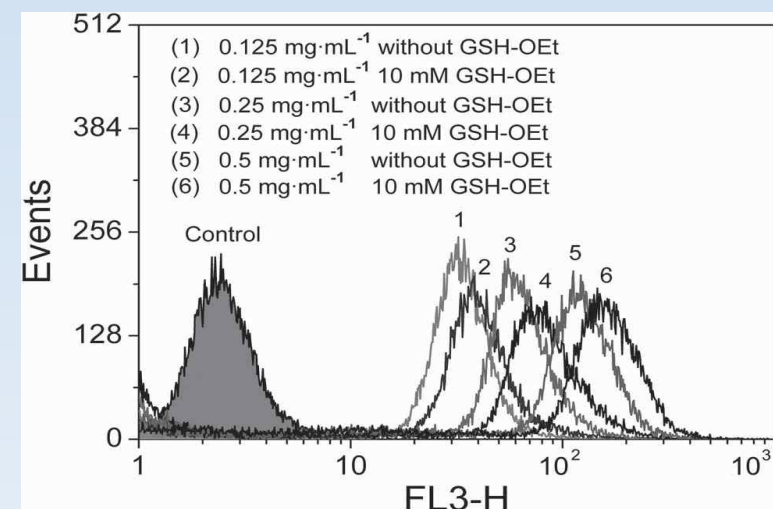


Figure 6 Flow cytometric analyses of nontreated and 10 mM GSH-OEt pretreated HeLa cells incubated with DXR-loaded NGO-SS-mPEG at the concentrations indicated for 2 h. The equivalent DXR dose is  $46.5, 23.3, \text{ and } 11.6 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively. HeLa cells without any treatment are used as control. Fluorescence intensity is denoted as FL3-H.

## ➤ Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets <sup>6</sup>

-합성된 chitosan-functionalized graphene oxides (FGOCs)는 산성 수용액에서 GO의 solubility와 분산성이 향상되었으며 두 가지 약물인 ibuprofen (IBU)와 5-fluorouracil (5-FU)를 탑재하여 약물 방출 제어와 biocompatibility 를 입증하였음.

-약물의 분자구조의 크기에 따라 FGOCs 와 결합 및 release behavior의 차이가 있어 작은 분자 구조를 가지는 두 가지 약물 중 IBU는 benzene ring (presumably higher  $\pi$ -stacking)을 가진 소수성이기 때문에 FGOCs와 강한 결합을 보였고, 5-FU는 benzenoid (presumably less  $\pi$ -stacking)의 resonance 원인으로 diamide group과 친수성 성질을 가지고 있어 약한 결합력을 가짐을 확인함.

-IBU 와 5-FU 약물의 성공적인 controlled release behavior를 보고하였고 약물의 구조와 물리적 특성에 의존함을 증명함.

- FGOCs의 Biocompatible 와 drug release behavior를 증명하였고 생물학적 응용 물질임을 보고함.

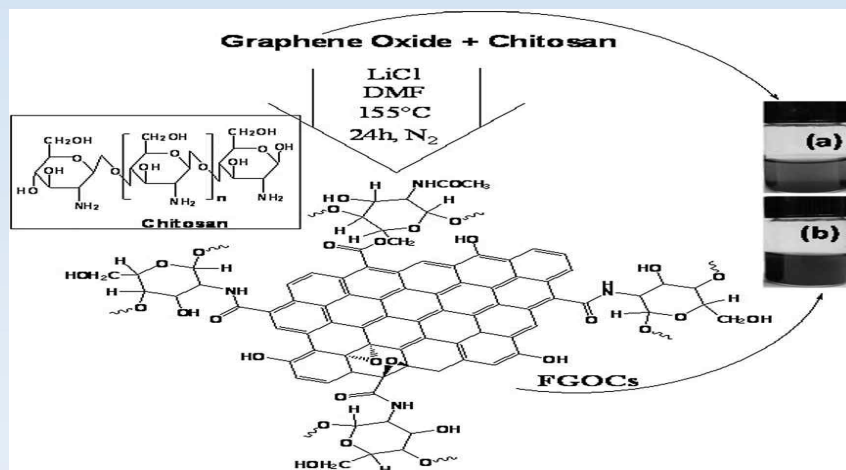


Figure 7. Synthesis of the FGOCs and the dispersion of (a) GO and (b) the FGOCs in an aqueous acetic acid solution (CH<sub>3</sub>COOH/H<sub>2</sub>O 0.2/1). More details on the synthesis and characterization of FGOCs are given in the Supporting Information.

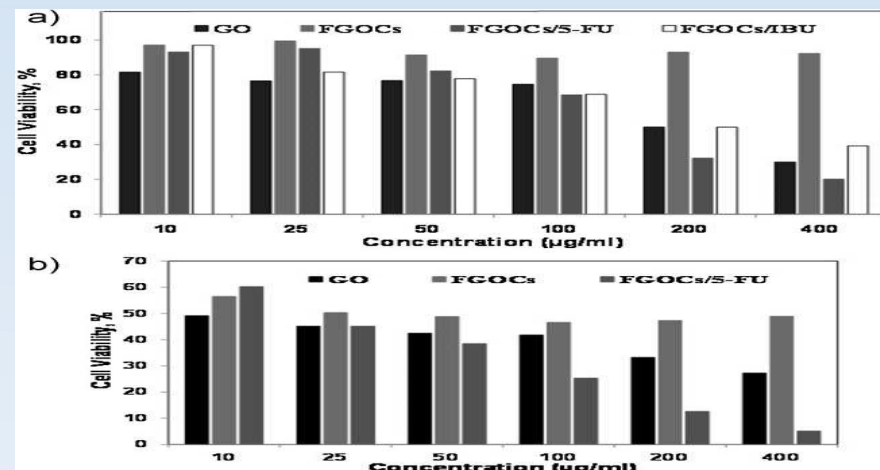


Figure 8. In vitro cell viability assay. a) Relative cell viability of CEM cancer cell line and b) MCF-7 cancer cell line incubated with GO, FGOCs, and drug loaded FGOCs graphene sheets at different concentrations for 5 d (SD3%).

### 3. 그래핀의 암치료 연구

#### ➤ Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs <sup>7</sup>

- 항암제의 탑재 제어(controlled loading)나 표적 전달(targeted delivery)하기 위한 나노 운반체로서 nanoscale graphene oxide (NGO)를 sulfonic acid groups으로 기능화하였고 folic acid (FA) 분자와 공유결합한 후에 FA receptors를 가지고 있는 human breast cancer cells (MCF-7 cells)를 표적화하고자 했음.
- $\pi$ - $\pi$  stacking 과 hydrophobic interactions 에 의하여 FA-conjugated NGO (FA-NGO)위에 두 가지 항암제 doxorubicin (DOX) 와 camptothecin (CPT)를 복합화 하여 탑재함으로써 정확히 MCF-7 cells를 표적화했고 DOX 이나 CPT 중 한 가지 항암제만 탑재한것에 비교하여 높은 세포 독성을 보였음.
- 임상 시험에서 한 가지 항암제의 치료 효과보다 두 가지나 그 이상의 복합 항암제의 치료효과가 좋았음을 고려하여 그래핀 기반 나노운반체를 이용하여 복합 항암제의 탑재 제어나 표적 전달를 이용한 치료효과를 입증하였음.
- 이 연구는 임상에서 환자들의 치료효과를 극대화 시키고 biomedicine 응용이 기대됨.



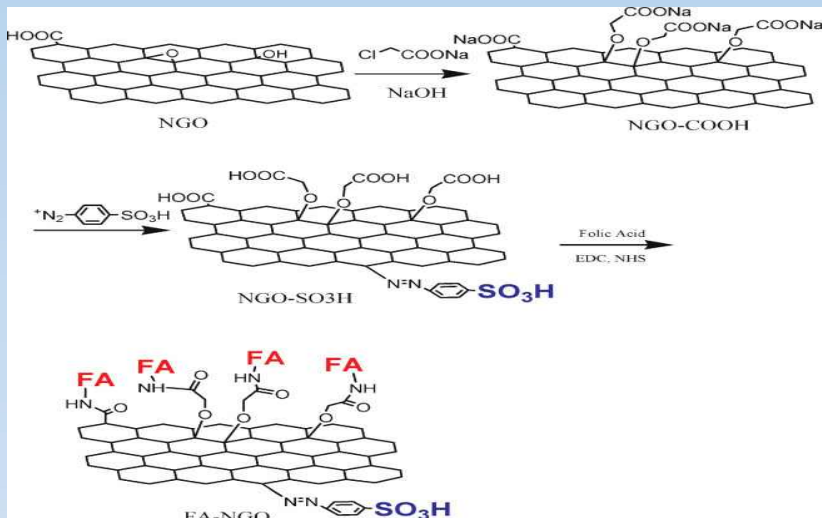


Figure 9. Schematic illustration of the preparation of FA-NGO conjugates. EDC 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; NHS N-hydroxysuccinimide

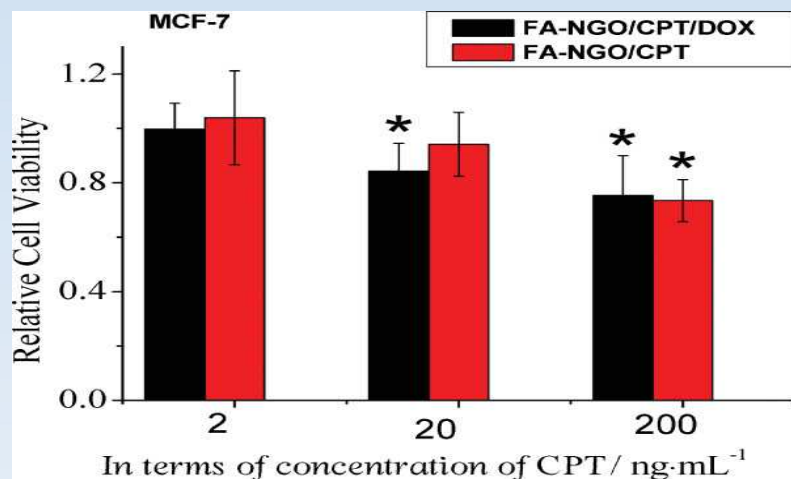


Figure 11. Relative cell viability of MCF-7 treated with FA-NGO/CPT and FA-NGO/DOX/CPT. The asterisks indicate  $P < 0.05$  versus normal cells. When the P value was less than 0.05, differences were considered statistically significant.

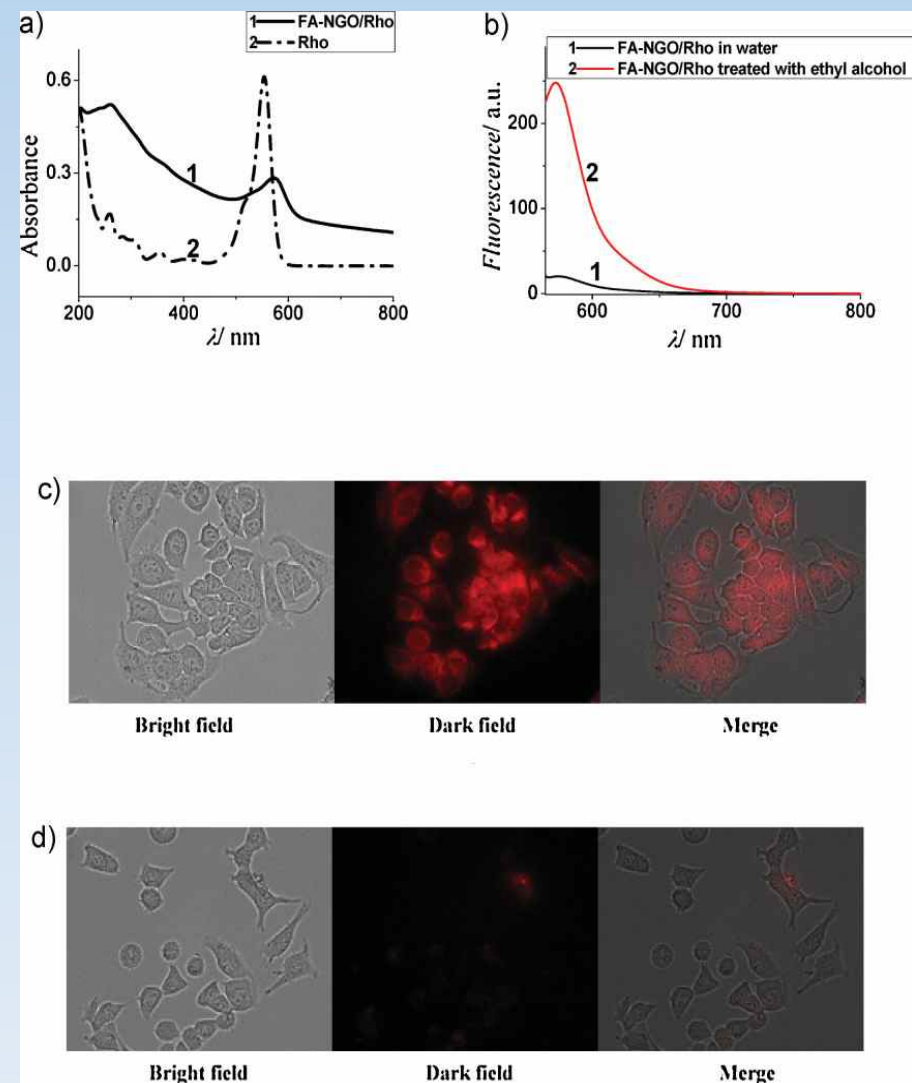


Figure 10. a) UV-Vis and b) fluorescence spectra of Rho B before and after adsorption on FA-NGO (suspended in water and 50% ethyl alcohol, respectively). c) Bright-field (left), fluorescence (center), and merge (right) images of MCF-7 cells incubated with FA-NGO/Rho B for 2 h; d) same as (c) except A549 cells were used.

## ➤ Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity<sup>8</sup>

-이 연구는 암세포를 외부자기장에 의한 자기 표적(magnetic targeting)하기 위한 superparamagnetic iron oxide nanoparticles와 분자 표적 리간드(molecular targeting ligand)를 결합한 multi-functionalized graphene oxide (GO)를 기반으로 암세포에 대한 항암제의 dual-targeting drug delivery 와 pH-sensitive controlled release system을 준비 하여 향상된 효과를 보고함.

-Chemical precipitation method에 의해 GO-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanohybrid준비 → amino groups 를 형성하기 위하여 3-aminopropyl triethoxysilane (APS)의 가수분해에 의한 표면 개질 → targeting agent인 folic acid (FA)를 결합하여 자기적 성질과 tumor dual-targeting properties를 가진 multi-functionalized GO를 준비 →  $\pi$ - $\pi$  결합에 의해 항암제 Doxorubicin hydrochloride (Dox)를 탑재하거나 현광 물질인 fluorescein isothiocyanate labeled 하였음.

-Multi-functionalized GO 는 상자성 성질(superparamagnetic property)에 의한 자기 표적화 하였고 약물 방출이 pH 값에 의존함을 보고함.

-Cell uptake 연구 결과는 현광 이미지를 통해 암세포의 향상된 dual-targeted delivery property와 Dox 약물에 의한 독성효과를 입증함으로써 multi-functionalized GO 가 tumor combination therapy를 위한 항암제 표적 전달과 controlled release의 훌륭한 응용성을 입증함.

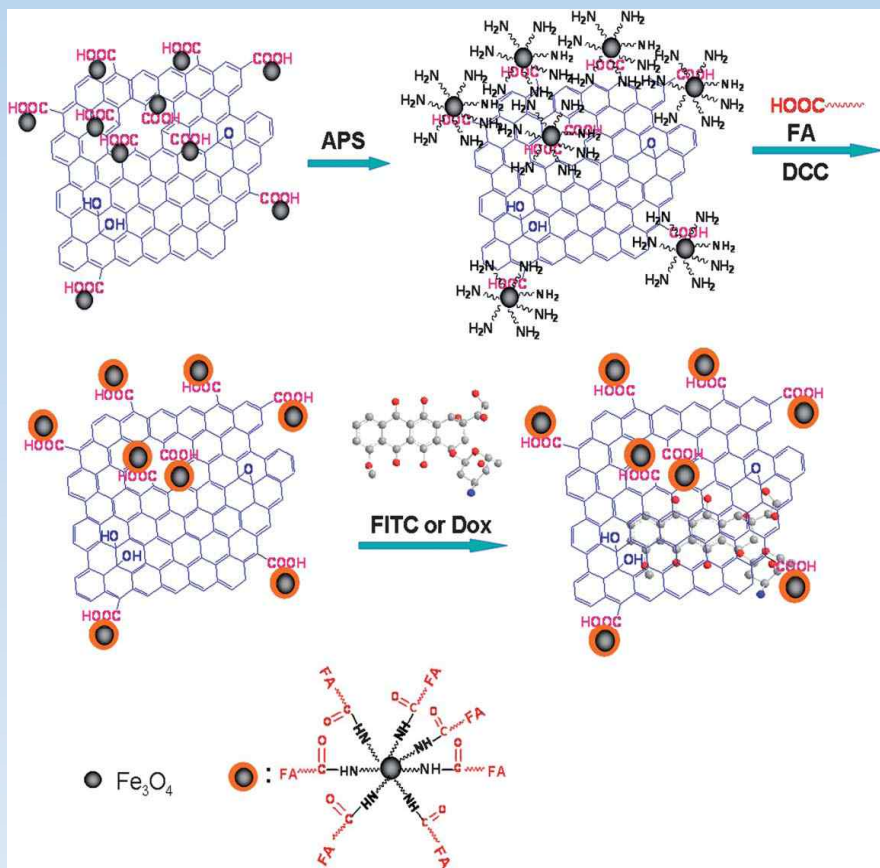


Figure 12. The preparation of the multi-functionalized GO based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity.

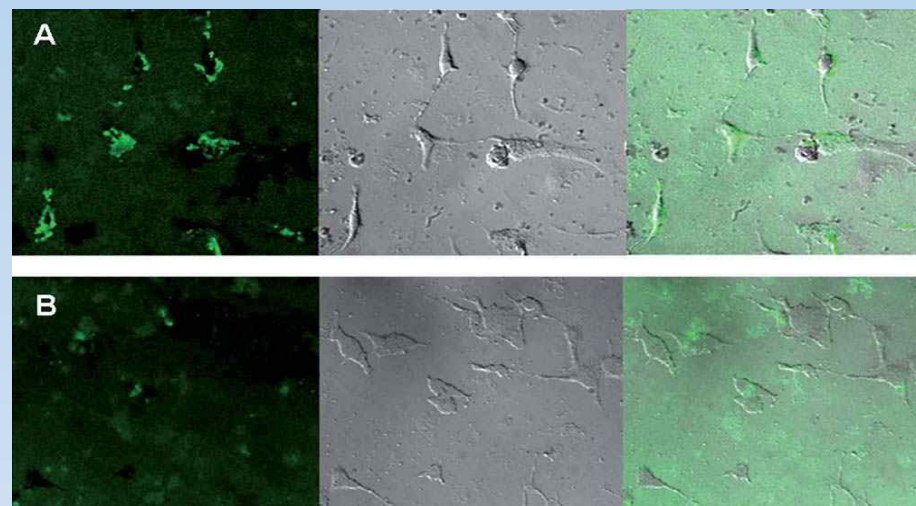


Figure13. Confocal fluorescence images of GO- $Fe_3O_4$ -FA-FITC (A) and GO- $Fe_3O_4$ -FITC (B) after incubation with SK3 at 37 C for 1 h.

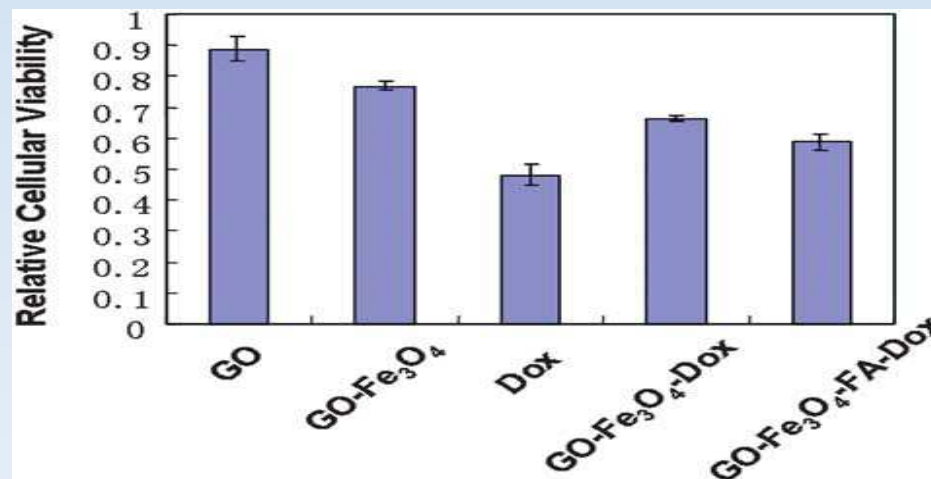


Figure 14. Relative cellular viability of Hela after treatment with GO, GO- $Fe_3O_4$ , Dox, GO- $Fe_3O_4$ -Dox and GO- $Fe_3O_4$ -FA-Dox.

## ➤ In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes<sup>9</sup>

-악성 종양치료시 외과적 치료가 어려울 경우 고열요법으로 열치료 (thermal ablation)를 선택 하는데 이미 이에대한 연구로 carbon nanotubes (CNT), gold nanoparticle에 near-infrared (NIR) radiation의 발열을 일으키는 파장대 700-1100 nm range에 노출시켜 나노입자들의 진동에너지 (vibrational energy)가 발생되고 이러한 에너지가 종양세포를 사멸시키기에 충분한 열로 에너지 전환되어 치료하는 photothermal therapy 를 보고함.

-Laser, ultrasound, microwave 또는 radio frequency에 의한 열치료는 악성 종양에 대한 고유 특이성이 없어 적합하지 않으며 열 치료를 위해서는 독성을 줄이고 효율성을 증가시켜야함.

-이 연구에서는 그래핀 나노 입자와 CNT의 Near-infrared (NIR)에 의한 photothermal anticancer activity 를 비교하였음.

-낮은 NIR-absorbing capacity (808 nm, 2 W/cm<sup>2</sup>) 임에도 불구하고 DNA 또는 sodium dodecylbenzene sulfonate-solubilized single-wall CNT (CNT<sub>DNA</sub> 또는 CNT<sub>SDBS</sub>)보다 polyvinyl pyrrolidone-coated graphene sheets (Gpvp)가 열이 더 많이 발생하였고 결과적으로 in vitro에서 U251 human glioma cells 의 photothermal 사멸이 증가함.

-그래핀과 CNT는 thermodynamic, optical, geometrical properties등을 가지고 있으나 그래핀이 CNT보다 분산성이 더 좋고 더 작은 크기제어에 의하여 효율성이 증가함을 보고하고 있음. 그 결과 그래핀을 매개로한 종양 세포의 photothermal killing 은 종양세포의 oxidative stress와 mitochondrial damage를 일으킨다는 것을 입증하여 확인함.

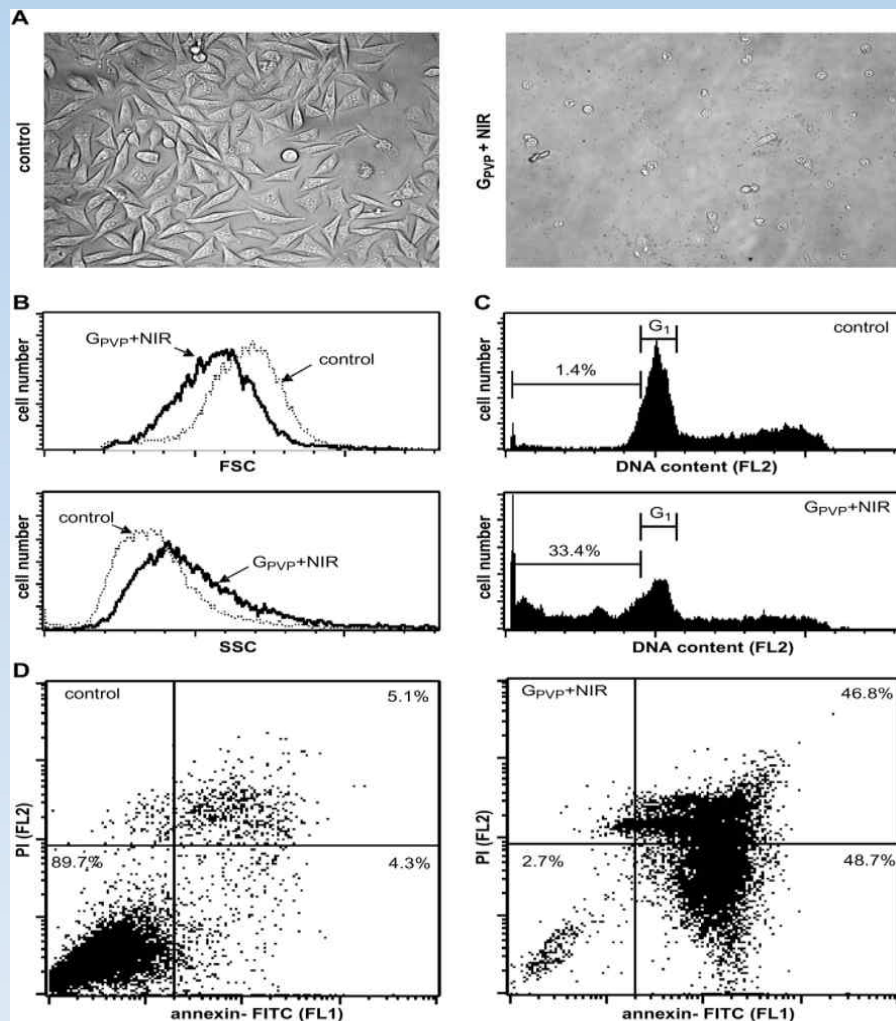


Figure 15. The type of graphene-induced photothermal cell death. (AeD) U251 cells were exposed for 3 min to NIR laser (808 nm, 2 W/cm<sup>2</sup>) in the absence or presence of GPVP (10 mg/ml). After 24 h, the cell morphology was examined by inverted microscopy (A), while flow cytometry was used to assess the cell size (FSC) and granularity (SSC) (B), DNA fragmentation (C) or externalization of phosphatidylserine and membrane permeability (Ann/PI-staining) (D). The representative photomicrographs, histograms and dot plots from one of three experiments are presented (no significant changes were observed in cell cultures exposed to NIR or GPVP alone - not shown).

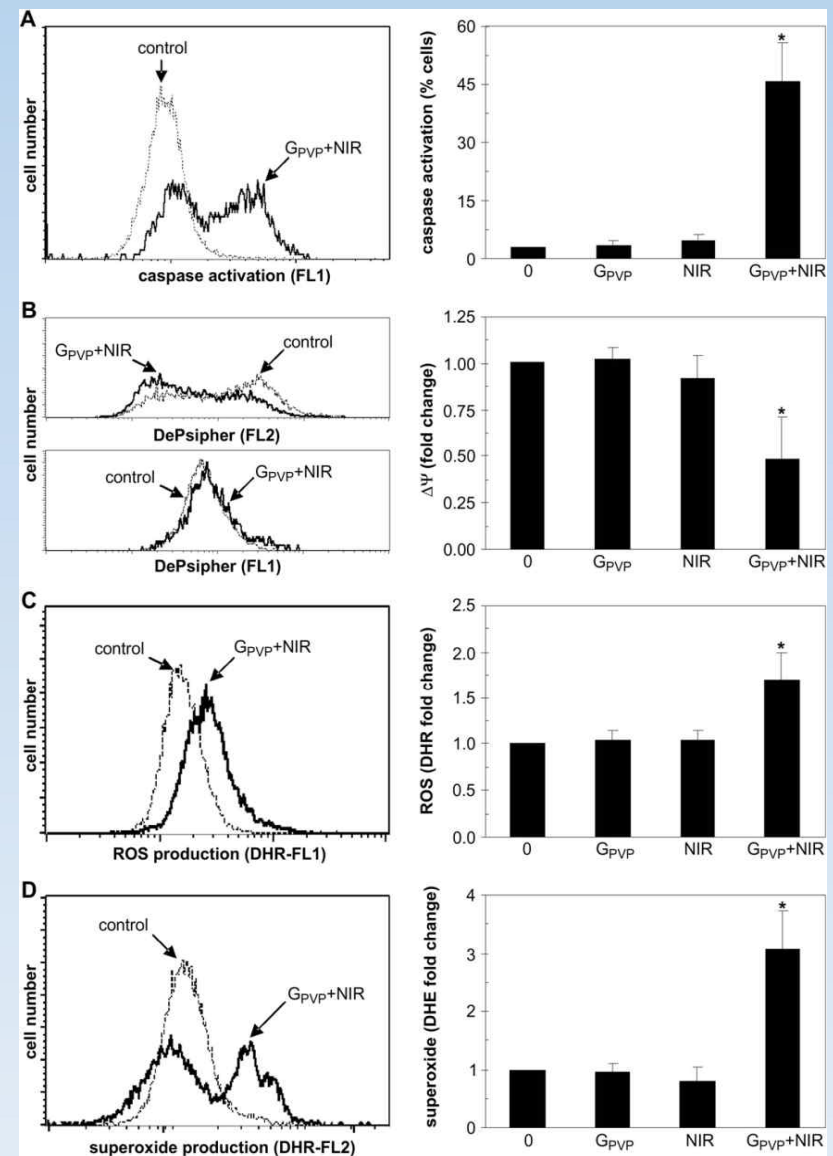


Figure 16. The intracellular mechanisms of graphene-induced photothermal cell death. (AeD) U251 cells were exposed for 3 min to NIR laser (808 nm, 2 W/cm<sup>2</sup>) in the absence or presence of GPVP (10 mg/ml). After 24 h, flow cytometry was used to assess caspase activation (ApoStat staining; A), while the mitochondrial membrane potential (DJ) (DePsipher staining; B), production of ROS (DHR staining; C) and superoxide (DHE staining; D) were measured after 4 h.

## 4. 결론

- ▶ 그래핀의 낮은 독성, biocompatibility, stability, 두께와 크기 제어,  $\pi$ - $\pi$  결합에 의한 표면 기능화 등 우수한 물성을 이용하여 시간에 따라 약물의 제어 방출, 표적 치료, 맞춤형 치료 진단이 가능한 약물전달 시스템 개발이 활발히 보고되고 있다. 또한 암치료를 위한 mixed anticancer drugs<sup>7</sup>, tumor combination Therapy<sup>8</sup>, photothermal therapy<sup>9</sup> 등의 연구 보고가 진행하고 있다.
- ▶ 그래핀의 약물전달 시스템 및 암치료 연구 동향 및 보고는 기존에 보고된 탄소나노튜브와 비교하여 thermodynamic, optical, geometrical properties 등 유사한 결과를 보이고 있으나 그래핀이 CNT보다 분산성이 더 좋고 더 작은 크기제어에 의한 효율성, 저비용 등에 의하여 약물전달 시스템 및 암치료 연구에 더 좋은 효과를 보고하고 있다.
- ▶ 이러한 결과는 in vitro에서의 연구뿐만 아니라 in vivo 적용에 의한 연구 결과를 기대할 수 있으며 임상에서 환자들의 맞춤형 치료효과에 의한 약물의 부작용을 최소화하고 biomedicine에 널리 적용될 것을 기대됨.

## 5. 참고문헌

1. 윤혜원 .강건욱 .정준기 .이동수, "나노의학: 나노물질을 이용한 약물전달시스템과 나노입자의 표적화" Nucl. Med. Mol. Imaging 42 (2008) 337-46.
2. 서태석, 그래핀 기반의 나노바이오 융합 기술, 2011년 21호 "바이오융합기술
3. Z. Liu, J. T. Robinson, S. M. Tabakman, K. Y., H. Dai, "Carbon materials for drug delivery & cancer therapy" materialstoday 14 (2011) 316-23.
4. D. Ghosh, S. Chandra, A. Chakraborty, S. K. Ghosh, P. Pramanik, "A novel graphene oxide-para amino benzoic acid nanosheet as effective drug delivery system to treat drug resistant bacteria" IJPSDR 2( 2010) 127-33.
5. H. Wen, C. Dong, H. Dong, A. Shen, W. Xia, X. Cai, Y. Song, X. Li, Y. Li, D. Shi. "Engineered redox-responsive PEG detachment mechanism in PEGylated nano-graphene oxide for intracellular drug delivery" small X (2011) 1-10.
6. V. K. Rana, M.-C. Choi, J.-Y. Kong, G. Y. Kim, M. J. Kim, S.-H. Kim, S. Mishra, R. P. Singh, C.-S. Ha, "Synthesis and drug-delivery behavior of chitosan-functionalized graphene oxide hybrid nanosheets" Macromol. Mater. Eng. 296 (2011) 131-40.
7. L. Zhang, J. Xia, Q. Zhao, L. Liu, Z. Zhang," Functional graphene oxide as a nanocarrier for controlled loading and targeted delivery of mixed anticancer drugs " small 6 (2010) 537-544.
8. X. Yang, Y. Wang, X. Huang, Y. Ma, Y. Huang, R. Yang, H. Duana, Y. chen, "Multi-functionalized graphene oxide based anticancer drug-carrier with dual-targeting function and pH-sensitivity" J. Mater. Chem. 21 (2011) 3448-54.
9. Z. M. Markovic, L. M. Harhaji-Trajkovic, B. M. Todorovic-Markovic, D. P. Kepic, K. M. Arsikin, S. P. Jovanovic, A. C. Pantovic, M. D. Dramicanin, V. S. Trajkovic, " In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes" Biomaterials 32 (2011) 1121-9.