

Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)로 변형된 온도민감성 리포솜

한희동 · 김승수 · 최호석 · 신병철*

한국화학연구원 화학소재부

충남대학교 화학공학과

(2003. 1. 24 접수)

Temperature-sensitive Liposomes Modified with Poly(*N*-isopropylacrylamide-co-acrylamide)

Hee Dong Han, Sung Soo Kim, Ho Suk Choi, and Byung Cheol Shin*

Advanced Materials Division, KRIST, 100 Jang Dong, Yusong, Daejeon 305-606, Korea

Department of Chemical Engineering, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received January 24, 2003)

요 약. 본 연구에서는 외부온열 온도(-40 °C)에서 항암약물(doxorubicin)이 방출되는 온도민감성 리포솜에 대하여 연구하였다. 온도민감성 리포솜은 외부온열온도에서 하한임계용액온도의 성질을 나타내는 *N*-isopropylacrylamide (NIP-AAm)와 Acrylamide(AAm)의 합성고분자에 의하여 변형되었다. 변형된 리포솜으로부터 약물(doxorubicin)의 방출은 온도와 시간의 변화에 따라서 형광강도를 측정하여 결정하였다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer에 의하여 변형된 리포솜으로부터 약물(doxorubicin)의 방출은 Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 온열온도 범위(-40±2 °C)에서 적절한 전이를 나타내기 때문에 증가하였다. 또한, 리포솜으로부터 약물의 방출은 5분 이내에 완료되었고, 변형된 리포솜의 크기는 120-170 nm 이었다. 본 연구에서는 온도에 의하여 제어 할 수 있는 온도민감성 리포솜을 제조하였다. 이것은 온도 제어에 따른 종양 표적화에 대한 약물전달시스템에서 활용 될 수 있을 것이다.

주제어: 외부 온열, 종양 표적화, 리포솜, 온도민감성 고분자

ABSTRACT. This study has investigated the temperature-sensitive liposomes, which release anticancer drug(doxorubicin) at the hyperthermia temperature(-40 °C). The temperature-sensitive liposomes were modified with a copolymers of *N*-isopropylacrylamide(NIPAAm) and acrylamide(AAm), which exhibit a lower critical solution temperature (LCST) at the hyperthermia temperature. The release of doxorubicin from the modified liposomes was determined by measuring the fluorescence intensity with changing temperature and time. The release of doxorubicin from liposomes modified with poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer was increased significantly, because poly(NIPAAm-co-AAm) could undergo the conformational transition in the narrow hyperthermia temperature region(-40±2 °C). Moreover, we observed that doxorubicin released from liposomes within 5 minutes, and the size of modified liposomes was 120-170 nm. In this study, we have prepared temperature-sensitive liposomes which could be controlled by temperature. They can be applied in the field of a drug delivery system for tumor targeting by temperature control.

Keywords: Hyperthermia, Tumor Targeting, Liposomes, Temperature-Sensitive Polymer

서 론

일반적인 항암제는 전신부여로 인하여 건강한 조직의 파괴와 심각한 휴유증 등으로 많은 부작용을 초래하고 있으며, 이에 따라 환자의 치료가 제한적이고 절제된 치료가 행하여지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 암조직에 특이적으로 표적화하는 방법의 개발이 진행되고 있다. 특히 리포솜을 이용하여 약물을 봉입한 후 부여하는 주사제의 개발이 활발히 진행 중이다.^{1,2} 리포솜은 생체적합성이 매우 우수한 약물 수송체이며 리포솜에 약물을 봉입함으로써 약물의 독성을 줄일 수 있고 치료 효과를 향상시킬 수 있는 약물수송체로 널리 알려져 있다.³ 약물전달 시스템에서 특히 온열 치료는 화학적 치료나 방사선에 의한 치료와 더불어 증양포동성에 상호존재적이기 때문에 고흡 증양의 치료에 의료적으로 이용되고 있다.⁴ 뿐만 아니라 온열 치료는 일반적인 혈관에 비하여 증양혈관내에서 약물의 수송을 유용하게 할 뿐만 아니라 약물의 투과율도 향상시켜 주는 방법으로 알려져 있다.⁵

한편, 이러한 리포솜을 이용하여 약물의 방출 안정성 향상과, 부과율, 온도민감성등을 향상시키기 위하여 온도민감성 고분자(PNIPAAm)를 리포솜에 결합하는 연구가 활발히 진행 중에 있다.⁶⁻⁸ 일반적인 약물 수송체로 리포솜을 적용할 때의 단점으로는 정맥투여시 간의 세망내피계에 의해 포획되어 빠르게 순환 혈에서 제거되는 현상과 헤파택 보관시 응집, 융합, 인지질의 가수분해, 산화 및 봉입 약물의 누출 등의 물리화학적 불안정이라 할 수 있다. 이러한 단점을 보완하기 위하여 리포솜 입자를 고분자를 이용하여 코팅함으로써 이들의 물리화학적 단점을 극복하는 시도가 이루어지고 있다.⁹⁻¹²

온도민감성 고분자는 외부 자극 약물전달 체계에서 많이 응용되고 있으며,¹³ 열민감성 고분자의 팽윤 이론은 Tanaka 등¹⁴에 의하여 보고 되기도 하였다.^{15,16} 본 실험에서는 poly(*N*-substituted acrylamide)계열과 같이 *N* 위치에 치환된 아미이드 그룹을 가지고 수용액 상에서 열에 의해 LCST(lower critical solution temperature) 성질을 나타내는 고분자를 리포솜과 결합시키기 위하여 이용하였다. 이와 같은 온도민감성을 나타내는 고분자 중 poly(*N*-isopropyl acrylamide)(PNIPAAm)는 poly(*N*-substituted acrylamide)계열 중 하나로 34 °C 부근에서 LCST를 가지는 물질로 알려져 있는 고분자이다.^{6,7,17,18}

따라서, 본 연구의 목적은 온도민감성 리포솜이 외부

온열(hyperthermia)에 의하여 목표로 하는 치료조직에 선택적 특이성(투과, 방출, 파열)을 나타내도록 리포솜을 제조하는 것이다. 온도민감성을 부여하기 위하여 인지질의 비율을 미세하게 조절하여 온열온도(40 °C)에 적합한 인지질 리포솜을 제조한 후, 인지질 리포솜의 약물방출을 향상시키기 위하여 온도민감고분자(PNIPAAm)를 리포솜 표면에 도입하여 제조함으로써 종양에 대한 선택적인 표적화와 약물의 방출을 향상시키고자 하였다.

실험방법

시약 및 기기

시약. 본 실험에서 온도민감성 리포솜을 제조하기 위하여 사용된 시약으로서 지질의 주성분인 1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine(DPPC), L- α -Phosphatidylcholine(soy-Hydrogenated)(HSPC), cholesterol(CHOL), 1,2-Distearoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamine-*N*-[Methoxy(Polyethylene glycol)-2000](DSPE-PEG-2000)는 Avanti Polar Lipids Inc.(Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였고, 모델 약물로는 항암성분을 지니고 있는 Doxorubicin(DOX)을 Sigma-Aldrich Co.(Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

N-isopropylacrylamide(NIPAAm)은 Tokyo Kasei Kogyo (Japan)에서 구입하여 사용하였으며 hexane benzene (60:40)으로 제결정 정제한 후 사용하였다. Acrylamide(AAM)는 Polysciences(Warrington, PA)에서 구입하여 사용하였고, 2-aminooctanethiol(AET)와 개시제인 α,α -azobis(isobutyronitrile)(AIBN)은 Aldrich Co.(Milwaukee, Wisconsin, USA)에서 구입하여 그대로 사용하였다. 이 밖에 리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-co-AAM) copolymer의 양을 평가하기 위하여 사용한 NIS-fluorescein(5(&6)-Carboxyfluorescein *N*-succinimidy Ester)은 Sigma-Aldrich Co.(Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, methylalcohol, diethyl ether등의 용매는 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

기기. 본 실험에서 사용된 기기로서 리포솜 제조시에 사용된 기기로는 extruder(Northern Lipids Inc.), gel permeation chromatography(Retriever 500, Isco, Inc. USA), rotary evaporator(Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)를 사용하였고, 제조되어진 리포솜의 크기와 약물방출 농도를 particle analyzer(Otuka, Japan)와 fluorescence spectrophotometer(Tyvon-Spex, Instruments, S.A, Inc)를

사용하여 측정하였다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 분자량은 Gel Permeation Chromatography(GPC, KF 804 column, intelligent refractive index detector(RI930), intelligent HPLC pump(PU980), Jasco)를 사용하여 측정하였다.

Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 합성

NIPAAm과 AAm은 라디칼 중합반응에 의하여 합성하였으며, 합성과정은 다음의 과정에 의하여 진행되었다. NIPAAm과 AAAm의 양이 100 mmol이 되도록 칭량한 후 메탄올 40 ml에 넣고 NIPAAm과 AAAm을 녹인다. 메탄올에 NIPAAm과 AAAm이 녹아있는 용액을 질소 가스보 bubbling 시켜 잔류 공기를 제거한다. AIBN(1 mmol)와 개시제인 AIBN(1 mmol)을 첨가한 후, 60 °C에서 20시간동안 중합반응을 진행하였다. 중합반응 후 얻어진 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer를 diethyl ether에 침전 정제하여 사용하였다. Fig. 1에 본 실험에서 합성되어진 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 구조를 나타내었다.

Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 LCST측정

Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 LCST 측정은 Differential Scanning Calorimetry(DSC, TA Instrument DSC2010)를 사용하여 측정하였고 분석온도는 10 °C :50 °C까지 2°C/min의 속도로 승온 시키며 10 mg의 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer를 분석에 사용하였다.

Freeze-thaw에 따른 약물의 봉입

약물의 봉입률을 향상시키기 위한 방법으로서 freeze-thaw 과정은 리포솜내부와 외부의 약물농도의 평형현상에 따라 상태적으로 내부가 비어 있는 리포솜내에 약물을 효과적으로 봉입시킬 수 있는 방법으로 알려져 있다.¹⁶ 그러므로 리포솜 제조 시 약물의 봉입률을 향상시키기 위하여 freeze-thaw 방법을 적용하였다.²⁰ Freeze 과정은 -15 °C에서 실시하였고, thaw과정은 본 실험에서

적용되어진 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 LCST 이하의 온도인 35 °C에서 실시하였으며 각각의 freeze 과정과 thaw과정에 대하여 5분의 시간 간격으로 실시하였다.

리포솜 제조

본 실험에서 제조되어진 control 리포솜과 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜은 다음의 과정에 의하여 제조하였다. Control 리포솜으로서 TSL1과 TSL2는 지질의 양을 10 mmol로 고정하여 각각의 비율을 조절하며 제조하였다. TSL1은 DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-PEG-2000을 100:50:30:6으로 제조하였으며, TSL2는 DPPC:CHOL:DSPE-PEG-2000을 100:30:6으로 제조하였다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜은 TSL1과 TSL2 모두 지질의 양을 control 리포솜과 동일한 조건에서 제조하였으며, 고분자의 농도는 10 mg/ml로 제조하였다. control 리포솜의 경우 지질을 등근바닥 플라스크에 넣고 클로로포름에 녹인 후, 회전증발농축기에서 용매를 증발시켜 지질로 이루어진 얇은 필름을 얻었고 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 경우 지질과 고분자를 각각 클로로포름에 녹여서 혼합한 후, 회전증발농축기에서 용매를 증발시켜 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer와 지질이 혼합되어있는 필름을 얻었다. DOX은 TSL1과 TSL2 모두 0.16 mg/ml의 조건으로서 10 mM Tris-HCl 완충용액에 녹인 후 필름이 형성되어 있는 등근바닥 플라스크에 혼합하고 수화(hydration)를 시켰다. 수화를 마친 후 freeze-thaw과정을 5번 실시하였다. Freeze-thaw과정 후 extrusion을 실시하여 리포솜의 입자의 크기를 성형하였다. Control 리포솜과 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜은 결합되지 않은 잔류 지질성분과 고분자를 각각 GPC를 실시하여 분리하였다. 이때 온도는 4 °C에서 진행하였고, 10 mM Tris-

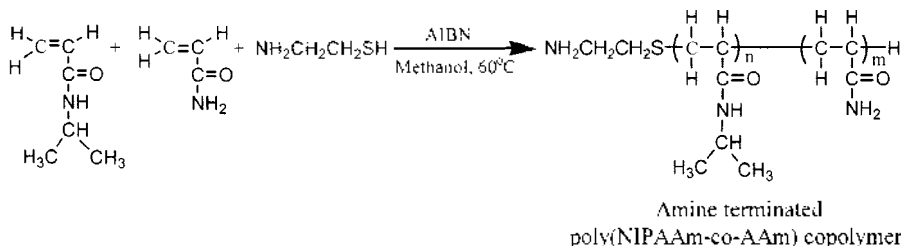


Fig. 1. Synthesis of poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer.

HCl 완충용액을 사용하였으며, control 리포솜은 Sephadex G-75 column을 사용하였고, poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜은 Sephaeryl-400 column을 사용하였다.

리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer 측정

온도민감성 리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 정량은 고분자말단기와 NHS-fluorescein을 결합시켜 NHS-fluorescein의 양을 측정하였다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer는 말단기에 아민기를 지니고 있어 NHS-fluorescein과 결합 할 수 있는 구조로 이루어져 있다. 또한 Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer와 NHS-fluorescein의 결합은 형광분광광도계를 이용하여 방출파장 520 nm, 흡수파장 490 nm에서 형광 강도를 측정하여 결정하였다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer와 결합된 NHS-fluorescein의 측정은 제조되어진 수상상태의 온도민감성 리포솜 2 ml를 취하여 NHS-fluorescein(0.1 mg NHS/ml DMSO) 100 μ l를 가한 후 2시간동안 4 °C에서 반응 시키고 24시간동안 막투석(dialysis)을 실시하여 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer와 결합되지 않은 NHS-fluorescein을 제거 하였다. 막투석을 마친 후, 형광분광광도계를 이용하여 NHS-fluorescein의 형광 강도를 측정하여 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 리포솜에 결합된 양을 측정하였다. 이때, 리포솜의 내부에 결합되어 있는 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 양은 NHS-fluorescein과 혼합하기 전에 Triton X-100(10%, v/v) 20 μ l를 리포솜과 혼합하여 리포솜의 형태를 붕괴 시킨 후에²¹ NHS-fluorescein과 결합을 실시하여 측정하였다.

온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출량 측정

온도민감성 리포솜으로부터 약물(DOX)의 방출은 형광강도를 이용하여 측정하였다. 형광강도의 측정은 형광분광광도계를 이용하여 측정하였으며 방출파장 595 nm, 흡수파장 487 nm에서 측정하였다. 한편 온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출은 다음의 식 (1)에 의하여 계산하였다. 이때, F_t 는 리포솜의 형광강도이고 F_0 는 약물의 방출이 일어나지 않는 범위(19 °C)에서의 형광강도이며, F_{∞} 는 Triton X-100(10%, v/v)을 첨가 하였을 때의 형광 강도이다.^{21,18}

$$\text{방출 농도}(\%) = \frac{F_t - F_0}{F_{\infty} - F_0} \times 100 \quad (1)$$

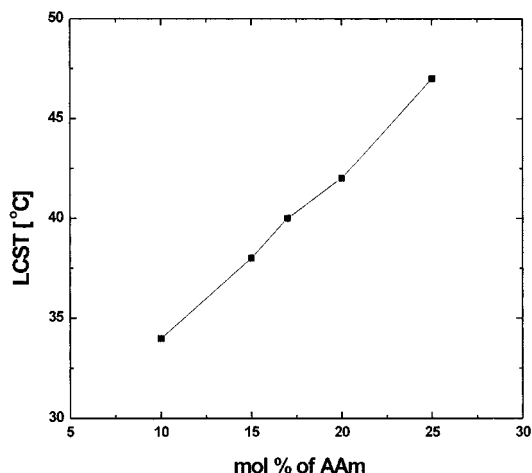


Fig. 2. The relationship of LCST and concentration of AA in poly(NIPAAm-co-AA) copolymers.

결과 및 고찰

Poly(NIPAAm-co-AA) copolymer의 특성

Poly(NIPAAm-co-AA) copolymer의 합성은 NIPAAm과 AA의 라디칼 중합반응에 의하여 제조하였으며, Fig. 2는 poly(NIPAAm-co-AA) copolymer의 LCSTs를 나타내고 있다. Fig. 2의 결과로부터 NIPAAm과 AA의 혼합 비율에 따라서 합성고분자의 LCST가 변화되고 있는 것을 관찰 할 수 있다. 본 실험에서는 외부온열에(-40 °C) 의한 약물의 전이를 이용하기 위해서 LCST가 40 °C인 poly(NIPAAm-co-AA) copolymer를 control 리포솜에 결합하여 사용하였다.

한편, Table 1은 본 실험에서 제조되어진 poly(NIPAAm-co-AA) copolymer의 특성에 대하여 나타내고 있다. 리포솜의 결합에 사용되어진 poly(NIPAAm-co-AA) copolymer는 NIPAAm:AA=83:17(100 mmol)의 비율에 의하여 합성하였고, LCST는 40 °C였으며, GPC에

Table 1. Physical properties of poly(NIPAAm-co-AA) copolymers

Poly(NIPAAm-co-AA) copolymer	
AA(mol %)	17
LCST(°C)	40
Molecular weight	3700
Mn	
Mw	7600
Polydispersity(Dp)	2.07

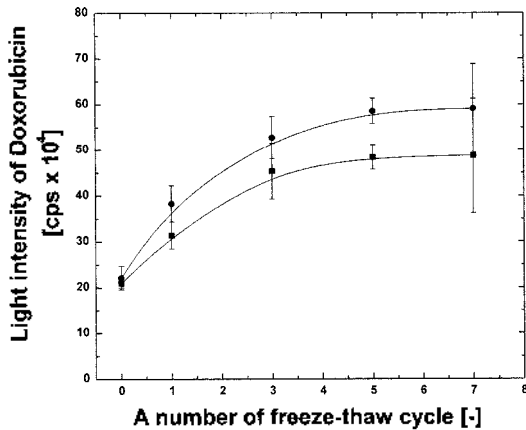


Fig. 3. Influence of the number of freeze-thaw cycles. (■) doxorubicin loaded liposomes, (●) after addition of Triton X-100 (10% v/v) in liposomes).

의한 분자량(Mw)은 7600이었다.

Freeze-thaw에 따른 약물의 봉입

Fig. 3은 freeze-thaw 과정에 따른 약물의 봉입률을 나타내고 있다. 본 결과에서 약물의 봉입은 freeze-thaw 과정을 5회 실시하였을 때 최대로 증가함을 관찰 할 수 있다. 그러므로 본 실험에서는 모든 리포솜 제조시에 freeze-thaw 과정을 5회 실시하여 약물의 봉입률을 증가시켰다.

리포솜의 특성

Table 2는 본 연구에서 제조되어진 온도민감성을 갖는 control 리포솜과 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer

가 결합된 리포솜의 특성에 대하여 나타내고 있다. Control 리포솜의 입자의 크기는 TSL1과 TSL2는 172.2 nm, 139.2 nm였고 전이온도는 각각 37.3°C, 38.0°C이었다. Poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 입자의 크기는 TSL1이 159.1 nm 이었고 TSL2가 125.6 nm였으며, 전이온도는 37.5°C, 37.0°C이었다. 일반적으로 리포솜의 입자크기가 50 nm이하일 경우에는 간으로 분포되고, 200 nm이상의 경우에는 비장으로 포획되며, 50-200 nm의 크기가 혈중에서 안정한 크기라고 알려져 있다.^{22,23} 그러므로 본 실험에서 제조되어진 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 입자 크기는 TSL1이 159.1 nm, TSL2가 125.6 nm로서 혈중에서도 안정한 범위에 든다고 할 수 있다. 또한 Control 리포솜과 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 결과에서 전이온도가 약 37-38°C에서 관찰된 것으로서 외부온열작용에 의하여 약물을 방출시킬 수 있는 리포솜의 조건을 확립하였다.

Table 3은 리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 양을 나타낸다. TSL1과 TSL2에 결합되어 있는 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 양은 NHS-fluorescein을 이용하여 측정하였다. 리포솜 제조시에 두 종류의 TSL1과 TSL2 리포솜에 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer를 10 mg/ml의 조건으로 부여하였다. TSL1의 경우 리포솜의 내부와 외부에는 각각 약 1.72 mg/ml, 1.70 mg/ml의 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합되었고, TSL2의 경우에는 리포솜의 내부와 외부에 각각 약 1.47 mg/ml, 1.89 mg/ml의 poly(NIPAAm-co-

Table 2. Characteristics of control liposomes and poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer modified liposomes for particle size and transition temperature

	Control liposomes		Poly(NIPAAm-co-AAm) modified liposomes	
	Particle diameter (nm)	Transition temperature (°C) ¹	Particle diameter (nm)	Transition temperature (°C) ²
TSL ¹ 1	172.2	37.3	159.1	37.5
TSL2	139.2	38.0	125.6	37.0

¹ TSL: thermosensitive liposome.

¹ Transition temperature was measured by DSC.

² Transition temperature was measured from DOX release result.

Table 3. Amount of poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer

	Outer surface of liposomes ¹ (mg copolymer/ml liposomes)	Inner surface of liposomes ² (mg copolymer/ml liposomes)
TSL1	1.72±0.025	1.70±0.095
TSL2	1.47±0.025	1.89±0.057

¹ Mean ± standard deviation.

AAm) copolymer가 결합되어 있는 것을 확인하였다. 본 결과로부터 control 리포솜의 내부와 외부에 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합 되어있는 것을 확인 할 수 있었으며, TSL1과 TSL2에 각각 약 3.4 mg/ml, 3.2 mg/ml의 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합되어 있는 것을 확인 할 수 있었다.

한편, Leroux 등⁸의 보고에 따르면 NIPAAm과 ODA (ocatdecylacrylate) 등을 사용하여 리포솜의 표면을 변형시켰으며, Hayashi 등⁹과 Kono 등⁷의 보고에 의하면 LCST의 성질을 지니는 NIPAAm 고분자가 소수성 상호작용과 수소결합에 의하여 리포솜의 표면을 변형시킬 수 있다고 보고하였다. 또한 고분자가 결합되어 있는 경우의 리포솜의 개략적인 형태를 제시하였다. 그러

므로 본 실험에서 제조되어진 온도민감성 리포솜에 고분자의 결합된 양을 측정된 결과로부터 control 리포솜과 control 리포솜에 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer를 결합시킨 리포솜의 개략적인 모습을 Fig. 4에 나타내었다. 인지질로 이루어진 control 리포솜은 (a) 이중막 구조로 형성되어 내부에 약물을 봉입하고 있는 형태이고 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜은 (b) 고분자가 control 리포솜에 결합되어 리포솜의 외부와 내부에 고분자가 결합되어 있는 형태이다.

온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출 특성

Fig. 5는 본 실험에서 제조되어진 온도민감성을 지니는 TSL1과 TSL2 리포솜으로부터 온도의 변화에 따른 약물의 방출을 나타내고 있다. 약물의 방출이 두 경우

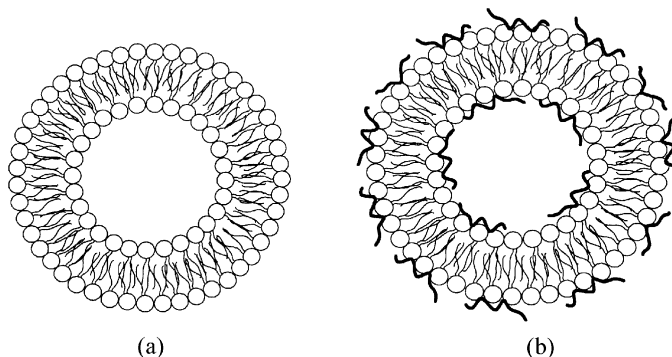


Fig. 4. Schematic illustration of control liposome (a) and poly (NIPAAm-co-AAm) copolymer modified liposome (b).

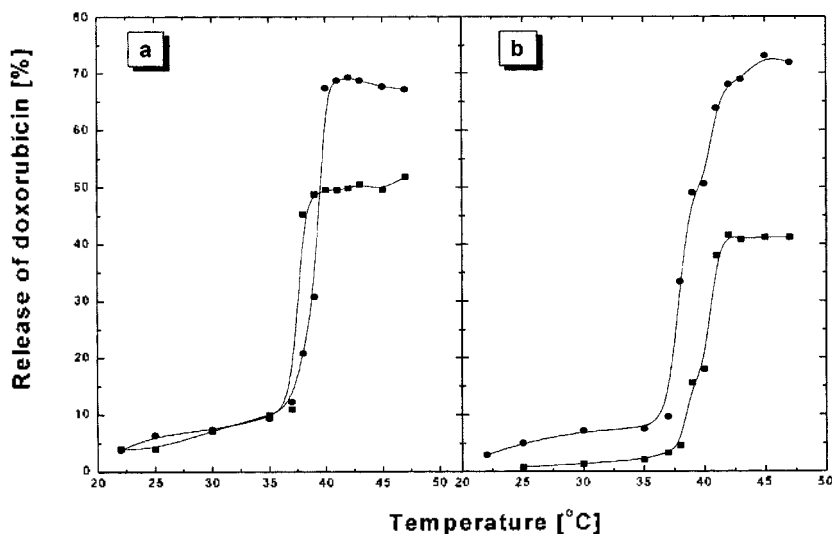


Fig. 5. Release of doxorubicin from TSL1(a) and TSL2(b) liposomes with a variation of temperature in Tris-HCl buffered solution. (■ - control liposomes, ● - poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer modified liposomes).

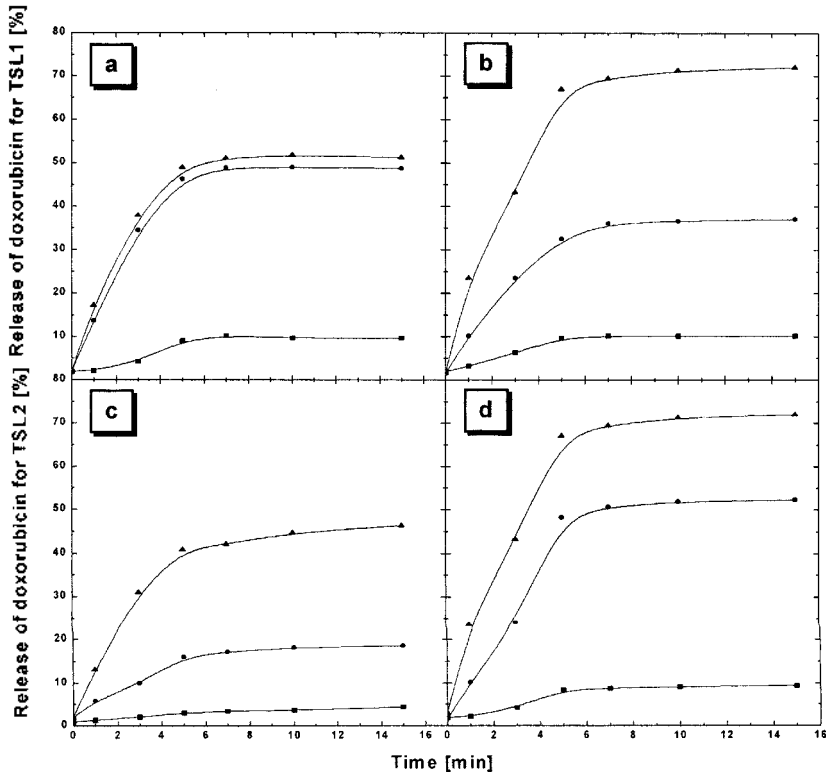


Fig. 6. Release of doxorubicin from TSL1(a,b) and TSL2(c,d) liposomes with a variations of time in Tris-HCl buffered solution: control liposomes(a,c) and poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer modified liposomes(b,d)(temperature: ■- 33 °C, ● - 39 °C, ▲- 43 °C).

모두 약 37~40 °C의 온도범위에서 급격하게 증가하는 것을 발견할 수 있다. TSL1의 경우 control 리포솜의 약물 방출이 약 48%인 것에 비하여 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer로 변형된 리포솜의 경우는 약 70%까지 약물의 방출이 증가하는 것을 발견 할 수 있었다. TSL2의 경우 control 리포솜의 약물 방출이 40% 정도인 것에 비하여 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer를 합성한 리포솜의 경우 약 72% 정도까지 약물의 방출이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 본 결과로부터 약물의 방출이 미량으로 일어나는 37 °C 이하에서는 리포솜이 온도에 대하여 비교적 안정하다는 것을 알 수 있다. 그러나 온도가 37 °C 이상이 되었을 때 리포솜을 형성하고 있는 지질성분과 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 상호작용에 의하여 약물의 방출이 급격하게 증가하는 것을 발견 할 수 있다. Control 리포솜의 경우, 온열 지표에 지질성분의 녹는점(melting point) 이상에서의 온도에 의하여 약물의 방출이 일어나고, 또한 poly

(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 경우, 외부온열에 의하여 고분자의 LCST이상의 온도에서 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer의 응축작용에 의하여 리포솜내의 약물의 방출이 더욱 증가되었음을 관찰 할 수 있다.

Fig. 6은 온도민감성을 지니는 TSL1과 TSL2 리포솜으로부터 시간에 따른 약물의 방출량을 나타내고 있다. a, c는 인지질만으로 이루어진 control 리포솜의 방출 결과이고 b, d는 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜에 대한 약물의 방출 결과 이다. 본 결과로부터 모든 리포솜에 대하여 약물의 방출이 대략 5분 이내에 최대가 되는 것을 발견 할 수 있고 인체내에서 약물이 방출되는 시간을 예상 할 수 있다. 그러나 낮은 온도(33 °C)에서는 시간이 경과함에 따라 약물의 방출이 미비하게 일어나는 것을 관찰 할 수 있다. 이러한 이유는 제조되어진 리포솜으로부터 약물의 방출이 온열 지표 이하의 온도(40 °C)에서는 비교적 안정한 상태로

유지되며 온도에 의하여 큰 영향을 받지 않음을 나타낸다. 또한 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합되어 있는 TSL1의 경우 약물의 방출이 39 °C에서 약 35% 정도로 관찰되었다. 그 이유는 TSL1이 39 °C에서도 비교적 약물의 방출이 일어나지 않으며 외부열원으로부터 약물의 방출에 대하여 안정하다는 것을 알 수 있다. 한편 poly(NIPAAm-co-AAm) copolymer가 결합된 리포솜의 경우 약물의 방출이 40 °C 이상에서 인지질로 이루어진 control 리포솜에 비하여 뚜렷하게 증가하는 것을 관찰 할 수 있다.

결 론

본 실험은 종양을 표적화하는 방법중 온열치료를 이용하여 약물이 외부온열 온도에서 방출 될 수 있는 온도민감성 리포솜에 관한 것이다. 온도민감성의 부여는 지질의 함성비율을 미세하게 조절하여 제조하였으며, 제조된 지질 리포솜에 온도민감성 고분자(PNIPAAm)를 도입하여 리포솜내의 약물 방출을 향상시켰다. 온도민감성 고분자를 결합하였을 경우, 일반적인 인지질 리포솜에 비하여 약 30% 정도의 약물의 방출이 증가하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 리포솜 입자의 크기는 혈중에서 안정한 범위(50-200 nm)에 적합한 120-170 nm의 결과를 얻을 수 있었으며, 약물방출의 결과로부터 약물의 방출이 약 37 °C 이상에서 현저하게 증가하는 결과와 모든 경우에 약물의 방출이 약 5분 이내에 완료됨을 발견 할 수 있었다. 한편, 본 실험의 결과로서 종양을 표적화 하기 위한 약물 운반체인 온도민감성 리포솜을 제조하기 위한 기초 자료를 제시하였다.

본 연구는 정보통신연구진흥원 IMT-2000 출연금 기술개발지원사업(01-PJ11-PG9-01NF00-0003)으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. David, N.; Mark, W. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *53*, 285.
2. Vassilios, E.; Costas, E.; John, R.; Costas, S.; Aris, K.;

- Helen, J.; Panafiotis, H.; Nikolaos, K.; Elias, G.; Lambros, J. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 374.
3. Papahadjopoulos, D.; Allen, T. M.; Gabizon, A.; Mayhew, E.; Matthay, K.; Huang, S. K.; Lee, K. D.; Woodle, M. C.; Lasic, D. D.; Redemann, C.; Martin, F. J. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1991**, *88*, 11460.
4. Engin, K.; Leeper, D. B.; Tупehong, L.; Waterman, F. M. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 1139.
5. Engin, K. *Control. Clin. Trials.* **1996**, *17*, 316.
6. Meyer, D. E.; Shin, B. C.; Kong, G. A.; Dewhirst, M. W.; Chilkoti, A. *J. Control. Rel.* **2001**, *74*, 213.
7. Kono, K.; Nakai, R.; Morimoto, K.; Takagishi, T. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1416*, 239.
8. Leroux, J. C.; Roux, F.; Garco, D. L.; Hong, K.; Drummond, D. C. *J. Control. Rel.* **2001**, *72*, 71.
9. Choi, H. S.; Lee, G. W.; Baek, M. G.; Cho, I. S.; Kim, D. C.; Jee, U. K. *J. Kor. Pharm. Sci.* **2000**, *30*, 13.
10. Daemen, T.; Regts, J.; Meesters, M.; Kate, T.; Irma, A. J. M.; Bakker, W.; Gerrit, L. *J. Control. Rel.* **1997**, *44*, 1.
11. Mercadal, M.; Domingo, J. C.; Petriz, J.; Garcia, J.; Madariaga, M. A. *Biochim. Biophys. Acta.* **1999**, *1418*, 232.
12. Han, I. S.; Jun, M. S.; Lee, K. Y. *J. Kor. Chem. Sci.* **1999**, *43*, 2.
13. Katono, H.; Sanui, K.; Ogata, N.; Olano, T.; Sakurai, Y. *J. Polym.* **1991**, *23*, 1179.
14. Tanaka, T.; Nishio, I.; Sung, S. T.; Nishio, S. U. *science* **1982**, *218*, 467.
15. Bae, Y. H.; Okano, T.; Kim, S. W. *J. Polym. Sci. Polym. Phys.* **1990**, *28*, 923.
16. Akiyama, S.; Kawashima, K.; Fujishi, H. *Polymer* **1991**, *32*(9), 1637.
17. Kono, K. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2001**, *53*, 307.
18. Kim, J. C.; Bae, S. K.; Kim, J. D. *J. Biochem.* **1997**, *121*, 15.
19. Mayer, I. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R.; Janoff, A. S. *Biochim. Biophys. Acta.* **1985**, *817*, 193.
20. Jonathan, D.; Kevin, M. G. *Int. J. Pharm.* **1999**, *188*, 87.
21. Lopez, O.; Maza, A. D. L.; Codereh, I.; Lopez-Iglesias, C.; Wehrli, F.; Parra, J. L. *FEBS Letters* **1998**, *426*, 314.
22. Jeon, H. S.; Lee, S. K.; Choi, Y. W. *J. Kor. Pharm. Sci.* **2001**, *31*, 43.
23. Suzuki, T.; Komatsu, H.; Miyajima, K. *Biochim. Biophys. Acta.* **1996**, *1278*, 176.
24. Hayashi, H.; Kono, K.; Takagishi, T. *Bioconjugate chem.* **1999**, *10*, 412.