

리포솜이 함유된 N-이소프로필아크릴아마이드의 공중합체로부터 온도에 따른 약물의 방출

박영심 · 한희동 · 홍성욱* · 김승수 · 신병철†

한국화학연구원 화학소재부, *한밭대학교 화학공학과

(2003년 10월 29일 접수, 2004년 1월 9일 채택)

Temperature-Dependent Release of Drug from Copolymers of N-Isopropylacrylamide Containing Liposome

Young Shim Park, Hee Dong Han, Seong Uk Hong*,

Sung Soo Kim, and Byung Cheol Shin †

Advanced Materials Division, KRICT,

100, Jang Dong, Yusong, Daejeon 305-606, Korea

*Department of Chemical Engineering, Hanbat National University,

San 16-1, Duckmyoung Dong, Yusong, Daejeon 305-764, Korea

†e-mail : bcshin@pado.kRICT.re.kr

(Received October 29, 2003; accepted January 9, 2004)

초록 : 온도에 의존하여 졸-겔 전이를 나타내는 온도민감성 리포솜을 함유하는 폴리 N-이소프로필아크릴아마이드 겔을 제조하였다. 온도민감성 리포솜의 표면은 30 °C에서 하한임계용액온도를 나타내는 N-이소프로필아크릴아마이드와 옥타데실아크릴레이트의 공중합체를 이용하여 변형시켰다. 표면이 변형된 온도민감성 리포솜을 폴리 N-이소프로필아크릴아마이드 수용액에 혼합하였다. 혼합용액을 하한임계용액 온도 이상으로 가열했을 때 물리적으로 가교결합이 이루어진 겔의 형태가 이루어지며, 이때 온도 민감성 리포솜이 함유된 폴리 N-이소프로필아크릴아마이드 겔이 만들어진다. 온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출은 형광강도를 측정하여 결정하였다. 폴리 N-이소프로필아크릴아마이드 겔 내부의 온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출은 온도가 증가할수록 지속적인 방출을 나타내었다.

ABSTRACT : Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) gels containing temperature-sensitive liposomes showing temperature-dependent sol-gel transition were prepared. The surface of temperature-sensitive liposome was modified with copolymers of N-isopropylacrylamide and octadecylacrylate, which exhibited a lower critical solution temperature at around 30 °C. After mixing the modified temperature-sensitive liposomes with poly(N-isopropylacrylamide) solution, the temperature-sensitive liposomes formed physically cross-linked gels through heating the solution above their lower critical solution temperatures. The release of drug from temperature-sensitive liposomes was determined by measuring fluorescence intensity. The drug release from temperature-sensitive liposomes in poly(N-isopropylacrylamide) gel gradually showed sustained-release with increasing temperature.

Keywords : liposome, thermosensitive gel, poly(N-isopropylacrylamide), drug release.

1. 서론

리포솜은 생체적합성이 우수한 인지질로 구성되어 있으며 분해성, 안정성이 우수하고 수용액 상에서 자기조

립에 의해 지질막을 형성하며 내부에 수용성 약물을 봉입할 수 있는 특징을 지니고 있다. 이러한 이유로 효율적인 약물의 체내 전달을 위한 약물전달체로 많은 연구대상이 되어 왔으며 의약, 주사제, 화장품 등의 여러

분야에서 리포솜에 유효약물을 봉입하여 전달체 시스템에 적용하려는 노력이 활발히 시도되고 있다.¹ 한편, 리포솜은 여러 가지 적합한 작용능력에 대하여 설계되어져 왔고 특히, 온도, pH, 그리고 광선에 민감한 리포솜의 개발이 이루어지고 있다.^{1,2} 특히 온도에 민감한 리포솜은 지질의 비율을 조절하여 비교적 쉽게 제조할 수 있으며 독성이 적기 때문에 의약품분야에서 많이 사용되고 있다.¹ 또한 온도에 민감성을 나타내는 리포솜은 방사선이나 화학작용과 병행하여 사용할 수 있을 뿐만 아니라 비교적 안전한 방법으로써 이를 이용하여 항암약물 전달체로 사용하려는 연구가 진행되어지고 있다.³

한편, 온도민감성 리포솜으로부터 약물의 방출 제어와, 온도민감성을 향상시키기 위하여 고분자를 리포솜 표면에 도입하는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{3,5} 특히, poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)는 약 32 °C에서 하한임계용액온도를 지나는 고분자로 알려져 있으며, 하한임계용액온도 이상의 온도에서 리포솜 표면의 고분자가 수축되어 약물의 방출을 향상시킬 수 있는 특징이 있는 것으로 보고되었다.⁶⁻¹⁰ 또한, PNIPAAm은 양친매성 고분자로서 하한임계용액온도 이하에서는 수용성 성질에 의하여 물에 용해되는 성질이 있으나, 하한임계용액온도 이상에서는 소수성 그룹의 작용으로 인하여 젤로 변화되는 특징이 있다.^{11,12} Meyer 그룹은³ *N*-이소프로필아크릴아마이드 (NIPAAm)와 아크릴아마이드의 공중합체를 리포솜의 표면에 도입하여 온도에 의한 약물의 방출제어와 효율증가를 보고하였고, 또한 Kono 그룹과⁶ Hayashi 그룹은¹³ NIPAAm과 옥타데실아크릴레이트 (ODA)의 공중합체를 이용하여 리포솜의 표면에 수소 결합과 소수성 결합을 증가시키는 한편 ODA의 소수성 사슬인 옥타데실 그룹이 리포솜의 표면사이에 침투해 들어가서 고분자와 리포솜 표면의 결합력을 증가시킬 수 있다는 보고를 하였다.

한편, 온도민감성 고분자나 생체 분해성 고분자 젤을 이용하여 약물의 방출을 일정하고 지속적으로 제어하기 위한 연구가 발표되었다.^{14,15} Paavola 그룹은¹⁴ 약물이 젤 내에 함유되어 있을 때 약물의 방출량은 서서히 증가하는 한편 방출 시간은 더욱 향상된다는 보고를 하였고, Matschke 그룹은¹⁶ 고분자 젤로부터 약물의 방출을 지속적이고 오랜 시간 방출함으로써 장기간 약물의 효과를 얻을 수 있다는 보고를 하였다.

따라서, 본 연구에서는 인지질의 비율을 변화시켜 외부 온열 (~38 °C)에 의하여 약물을 방출할 수 있는 온도민감성 리포솜을 제조하고자 하였고, 이때 리포솜으로부터 약물방출과 안정성을 향상시키기 위하여 poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-octadecylacrylate) [poly(NIPAAm-

co-ODA)]를 도입하여 리포솜의 표면을 변형시켰으며 형광성 물질인 calcein을 모델약물로 사용하였다. 한편 32 °C의 하한임계용액온도를 지니며 솔-젤로 상의 변화를 일으키는 PNIPAAm 수용액을 사용하여 표면이 변형된 리포솜을 함유하는 PNIPAAm 젤을 제조하고자 하였다. 리포솜을 함유하는 PNIPAAm 수용액은 생리적인 온도인 37 °C 이하에서 젤이 형성되며, 이때 PNIPAAm 젤이 수축하더라도 리포솜은 PNIPAAm과 결합하여 젤 내부에 리포솜이 고정된 상태를 유지하게 되며, 약물의 방출은 외부로부터의 온열인 ~38 °C 이상의 온도에 의하여 이루어진다. 리포솜으로부터 약물의 방출은 형광분광광도계를 이용하여 모델약물의 형광 강도를 측정하여 결정하였으며, PNIPAAm 젤 내부에 리포솜이 함유되어 있을 경우와 함유되어 있지 않을 경우의 약물 방출을 비교하여 온도와 시간에 따른 약물 방출 효과와 약물의 방출을 일정하고 지속적으로 제어할 수 있는 조건을 관찰하고자 하였다.

2. 실험

시약. 온도민감성 리포솜을 제조하기 위하여 사용된 시약으로서 지질의 주성분인 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), L- α -phosphatidylcholine (soy-Hydrogenated) (HSPC), 그리고 cholesterol (CHOL)은 Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA)에서 구입하여 사용하였고, 모델 약물로는 calcein을 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. NIPAAm은 Tokyo Kasei Kogyo (Japan)에서 구입하여 사용하였으며 hexane/benzene (60/40)으로 재결정 정제한 후 사용하였다. 개시제인 ammonium persulfate (APS)는 Kanto Chemical Co. (Japan)에서 구입하여 사용하였으며, 가속제인 *N,N,N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)는 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. ODA, 2-aminoethanethiol hydrochloride (AET) 그리고 α,α -azobis(isobutyronitrile) (AIBN)은 Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisconsin, USA)에서 구입하여 사용하였다. 리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-*co*-ODA)의 양을 평가하기 위하여 사용한 NHS-fluorescein (NHS, 5(&6)-carboxyfluorescein *N*-succinimidylyl ester)은 Sigma-Aldrich Co. (Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였고, tetrahydrofuran (THF), chloroform 그리고 diethyl ether 등의 용매는 일급 또는 특급시약을 사용하였다.

기기. 리포솜 제조 시 사용된 기기로는 rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-200, Switzerland), gel permeation chromatography (Isco, Inc. USA)를 사용하였고, 제조되어진 리

포솜의 약물방출 농도는 형광분광광도계 (Barnstead, Apogent Tech, USA)를 사용하여 측정하였다. PNIPAAm과 poly(NIPAAm-co-ODA)의 분자량은 gel permeation chromatography (GPC, KF 804 column, intelligent refractive index detector (RI930), intelligent HPLC pump (PU980), Jasco)를 사용하여 측정하였다.

PNIPAAm과 Poly(NIPAAm-co-ODA)의 합성. Figure 1(a)는 PNIPAAm의 구조를 나타내고 있다. PNIPAAm은 산화환원 중합에 의하여 합성하였으며, 그 합성은 다음의 과정에 의하여 진행되었다. NIPAAm (0.17 mol)을 증류수 100 mL에 용해한 후, 질소 가스로 bubbling하여 잔류 공기 및 중합금지제를 제거하였다. 개시제로서 APS (1.7 mmol)와 가속제로서 TEMED (120 μL)를 첨가한 후 교반하면서 실온에서 중합반응을 진행하였다. 중합반응을 통해 얻어진 고분자는 저온에서 물에 용해시키고 하한임계용액온도 이상의 온도에서 수축시키는 과정을 수회 반복한 후, 수축을 일으킨 고분자를 분리하여 동결 건조하여 사용하였다.

Figure 1(b)는 poly(NIPAAm-co-ODA)의 구조를 나타내고 있다. Poly(NIPAAm-co-ODA)은 NIPAAm과 ODA의 라디칼 중합반응에 의하여 합성하였으며, 그 합성은 다음의 과정에 의하여 진행되었다.¹⁷ NIPAAm (10 mmol)과 ODA (0.2 mmol)를 THF (15 mL)에 용해한 후, 질소 가스로 bubbling하여 잔류 공기 및 중합금지제를 제거하였다. 이 용액에 AET (0.03 mmol)와 AIBN (0.03 mmol)을

첨가한 후, 질소가스 하의 60 °C에서 5시간 동안 교반하면서 중합반응을 진행하였다. 중합반응 후 얻어진 poly(NIPAAm-co-ODA)를 diethyl ether (400 mL)에 넣고 침전시켜 침전된 poly(NIPAAm-co-ODA)를 THF (40 mL)에 다시 용해한 후, diethyl ether (400 mL)에 넣어 재침전을 시켰다. 위의 과정을 수회 반복하여 poly(NIPAAm-co-ODA)을 정제하였다.

PNIPAAm과 Poly(NIPAAm-co-ODA)의 하한임계용액온도 측정. PNIPAAm과 poly(NIPAAm-co-ODA)의 하한임계용액온도 측정은 시차주사열량계 (DSC, TA Instrument DSC2010)를 사용하여 측정하였고 분석온도는 10 ~ 50 °C까지 2 °C/min으로 승온시키며 분석하였다. 각각 10 mg의 PNIPAAm과 poly(NIPAAm-co-ODA)를 분석에 사용하였다.

리포솜 제조. 온도민감성 리포솜의 제조는 다음과 같이 진행하였다. 리포솜을 구성하고 있는 지질 (DPPC: HSPC:CHOL=100:50:30, total 10 mmol)과 poly(NIPAAm-co-ODA) (10 mg/mL)를 각각 클로로포름에 용해시킨 후 혼합하여 둥근바닥 플라스크에 넣고, rotary evaporator를 이용하여 클로로포름을 증발시켜 poly(NIPAAm-co-ODA)와 지질로 이루어진 얇은 필름을 얻었다. Calcein (10 mmol)을 10 mmol Tris-HCl 완충용액에 용해시킨 후 필름이 형성되어 있는 둥근바닥 플라스크에 혼합하고 수화를 시켰다. 수화를 마친 후 약물의 봉입률을 향상시키기 위하여 freeze-thaw 과정을 5회 실시하였으며, freeze와 thaw 과정은 각각 -15 °C, 28 °C에서 5분 간격으로 진행하였다.^{18,19} 잔류 지질성분과 고분자는 4 °C에서 GPC (Sephacryl S-400-HR column)를 실시하여 분리하였다.

온도민감성 리포솜이 함유된 PNIPAAm 젤의 제조. PNIPAAm 수용액은 PNIPAAm을 Tris-HCl 완충용액 2 mL에 용해한 후, 온도민감성 리포솜 2 mL를 혼합하여 제조하였다. 이때 PNIPAAm의 최종농도는 1, 2, 4% w/v 였다. 온도민감성 리포솜을 포함하는 PNIPAAm 수용액은 12시간 동안 4 °C에서 숙성하여 리포솜의 표면에 많은 양의 PNIPAAm이 도입될 수 있도록 하였다.^{4,17}

한편, Figure 2는 온도민감성 리포솜이 함유된 PNIPAAm 젤의 개략도를 나타내고 있다. (a)는 4 °C의 Tris-HCl 완충용액 내에 온도민감성 리포솜과 PNIPAAm이 혼합되어 있는 수용액을 나타내고 있다. 이때 PNIPAAm 수용액을 하한임계용액온도 이상으로 가열하게 되면 온도민감성 리포솜이 함유된 젤이 형성된다 (b). 그리고 계속적으로 온도를 증가시키게 되면 젤 내부에 함유되어 있는 리포솜으로부터 약물의 방출이 시작된다 (c).

리포솜에 결합된 Poly(NIPAAm-co-ODA)의 측정. 온도민감성 리포솜의 외부/내부 표면에 결합된 poly

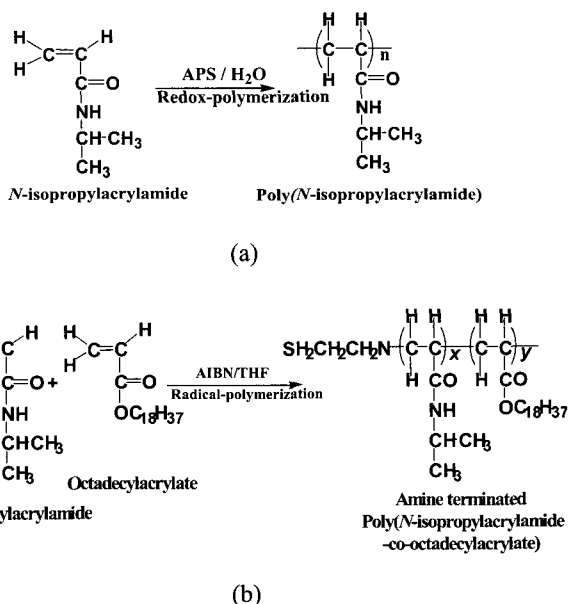


Figure 1. Synthesis of PNIPAAm (a) and amine terminated poly(NIPAAm-co-ODA) copolymers (b).

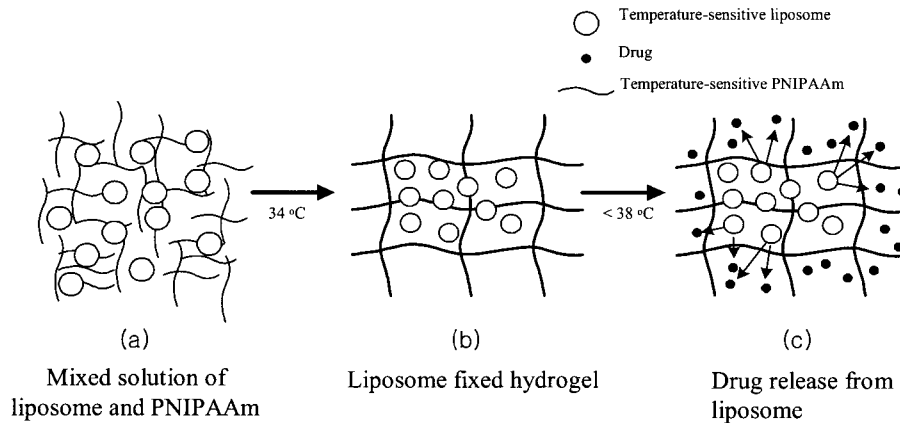


Figure 2. Schematic illustration of deswelling of PNIPAAm gel and calcein release from temperature-sensitive liposomes. (a) is a mixed solution of PNIPAAm and poly(NIPAAm-co-ODA) fixed temperature-sensitive liposomes at 4 °C, (b) is the PNIPAAm gel containing temperature-sensitive liposomes above their lower critical solution temperature, and (c) shows the release of calcein from temperature-sensitive liposomes in PNIPAAm gel at the transition temperature of liposome membrane.

(NIPAAm-co-ODA)의 양은 고분자 말단기에 NHS를 결합시켜 NHS의 형광강도를 흡수파장 490 nm, 방출파장 520 nm에서 측정하여 결정하였다.^{19,20} Poly(NIPAAm-co-ODA)와 결합된 NHS의 측정은 제조되어진 수상상태의 온도민감성 리포솜 2 mL을 취하여 NHS (0.1 g NHS/mL DMSO) 100 μ L를 가한 후 2시간 동안 4 °C에서 반응시키고 48시간 동안 막투석을 실시하여 poly(NIPAAm-co-ODA)와 결합되지 않은 NHS를 제거하였다. 막투석을 마친 후, 형광분광광도계를 이용하여 NHS의 형광강도를 측정하여 리포솜에 결합된 poly(NIPAAm-co-ODA)의 양을 측정하였다. 이때, 리포솜의 내부에 결합되어 있는 poly(NIPAAm-co-ODA)의 양은 NHS와 혼합하기 전에 Triton X-100 (10%, v/v) 20 μ L를 리포솜과 혼합하여 리포솜의 형태를 붕괴시킨 후, NHS와 결합을 실시하여 측정하였다.²⁰

PNIPAAm의 수축. PNIPAAm의 수축은 1, 2, 4% w/v 농도로 제조된 PNIPAAm 수용액 4 mL에 온도와 시간을 증가시키며 외부로 방출되는 수분의 부피를 측정하였다. 일정한 온도와 시간이 경과되면서 방출되는 수분의 부피를 측정하였으며 더 이상 수분이 방출되지 않을 때까지 측정하여 다음의 식 (1)로 계산하였다.

$$(V_i - V_e)/V_i \times 100(\%) \quad (1)$$

이때 V_e 는 젤 외부로 방출되는 과잉 수분의 부피이고 V_i 는 전체 부피이다.^{21,22}

리포솜으로부터 Calcein의 방출. PNIPAAm 젤 내부의 온도민감성 리포솜으로부터 방출되는 calcein의 농도는

형광강도를 방출파장 490 nm, 흡수파장 515 nm에서 측정하여 결정하였다. 한편, 온도민감성 리포솜으로부터 방출되는 calcein의 농도는 다음의 식 (2)로 계산하였다.

$$F_i/F_f \times 100(\%) \quad (2)$$

이때, F_i 는 PNIPAAm 젤 내부의 온도민감성 리포솜으로부터 방출된 약물의 형광강도이고, F_f 는 Triton X-100을 첨가하여 리포솜을 붕괴시켰을 때의 형광강도이다.

3. 결과 및 토론

PNIPAAm과 Poly(NIPAAm-co-ODA)의 물성 PNIPAAm은 산화환원 중합반응에 의하여 합성하였고, poly(NIPAAm-co-ODA)는 NIPAAm과 ODA의 라디칼 중합반응에 의하여 합성하였다. Table 1은 본 실험에서 제조되어진 PNIPAAm과 poly(NIPAAm-co-ODA)의 특성을 나타내고 있다. PNIPAAm과 poly(NIPAAm-co-ODA)의 하한임계용액온도는 각각 32 °C, 30 °C 이었고, 분자량은 각각 17400과 16600이었다. PNIPAAm은 고분자의 하한임계용액온도 이상에서 젤이 형성되는 특징이 있기 때문에 수용액상에서 리포솜을 함유하는 젤을 제조하기 위하여 사용하였고, poly(NIPAAm-co-ODA)는 NIPAAm의 외부 사슬에 소수성 그룹인 ODA의 결합이 이루어져 리포솜 막 사이에 ODA의 소수성 사슬인 옥타데실 그룹이 인지질과 결합되어 리포솜의 표면에 poly(NIPAAm-co-ODA)의 결합을 견고히 해주기 위해서 사용하였다.^{6,13,23}

리포솜에 결합된 Poly(NIPAAm-co-ODA)의 측정.

Table 1. Physical Properties of PNIPAAm and Amine Terminated Poly(NIPAAm-co-ODA) Copolymers

	poly(NIPAAm)	poly(NIPAAm-co-ODA)
LCST(°C)	32	30
M_w	17400	16600
M_n	5500	10100
polydispersity(D_p)	3.03	1.64

Table 2. Amount of Poly(NIPAAm-co-ODA) on the Inner/Outer Surface of Liposomes

initial concentration of poly(NIPAAm-co-ODA) (mg/mL liposome)	polymer on inner surface (mg/mL liposome)	polymer on outer surface (mg/mL liposome)	*total polymer (mg/mL liposome)
5	1.08	1.75	2.83
10	0.55	2.13	2.68
15	0.76	1.94	2.70

*Total amount of poly(NIPAAm-co-ODA) on the inner/outer surface of liposomes.

Table 2는 리포솜 제조 시 poly(NIPAAm-co-ODA)의 배합 농도 변화에 따른 리포솜 표면에 결합되는 poly(NIPAAm-co-ODA)의 양을 나타내었다. 리포솜 제조 과정에서 poly(NIPAAm-co-ODA)와 리포솜 수용액의 배합 비율을 10 ng/mL liposome의 농도로 혼합하였을 경우, 리포솜의 내부 및 외부 표면에 결합된 고분자의 양은 각각 내부에 0.55 mg/mL liposome 외부에 2.13 mg/mL liposome이었다. 또한 리포솜과 고분자의 배합 비율이 5 mg/mL liposome, 15 mg/mL liposome로 혼합하였을 경우, 외부와 내부의 결합량은 다소 차이가 있으나 리포솜 전체에 결합된 고분자의 양은 각각 2.83 mg/mL liposome, 2.70 mg/mL liposome으로 유사하게 관찰되었다. 한편 Hayashi 그룹의¹³ 보고에 따르면 poly(NIPAAm-co-ODA)를 사용하여 리포솜의 표면을 변형시킨 후, 리포솜의 표면에 결합된 고분자의 양을 측정하여 리포솜에 고분자가 결합된 사실을 보고하였으며, 초기 배합한 고분자의 양이 다름에도 불구하고 리포솜 표면에서 고분자의 밀도는 유사하기 때문에 최종 형성된 리포솜에 결합된 고분자의 양은 서로 유사하게 관찰되었다는 보고를 하였다. 본 실험의 결과로서 poly(NIPAAm-co-ODA)가 리포솜의 표면에 도입되어 있음을 확인하였고 리포솜의 표면에는 동일한 수준의 poly(NIPAAm-co-ODA)가 결합되어 있다는 것을 관찰하였다.

PNIPAAm의 수축. Figure 3은 37 °C에서 시간의 변화에 따른 PNIPAAm 젤의 수축비율을 나타내고 있다. PNIPAAm (1, 2, 4% w/v) 젤의 수축은 모든 농도에 대하여 60분 이후에 완료되었지만 고분자의 농도에 따라

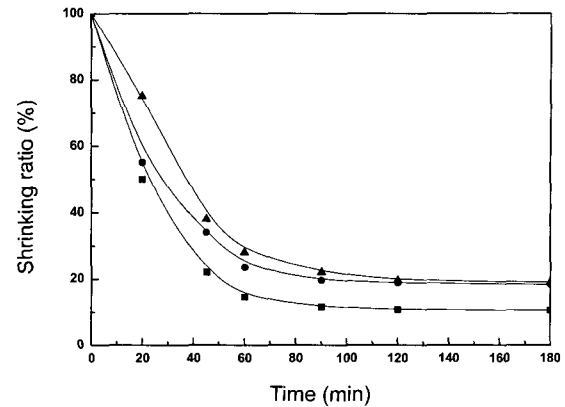


Figure 3. Deswelling kinetics of PNIPAAm gel in 10 mmol Tris-HCl buffered solution as a function of time at various concentrations: 1% w/v (■), 2% w/v (●), and 4% w/v (▲). The temperature was 37 °C.

수축비율은 다소 차이가 있었다. 그러나 시간에 대한 PNIPAAm 젤의 수축률은 유사한 거동을 보이는 것을 관찰하였다. 또한 PNIPAAm 수용액은 37 °C에서 약 20분이 지난 후에 젤의 형성이 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다. Xuc 그룹의¹¹ 보고에 따르면 하한임계용액은 10 이상의 동일한 온도에서 시간이 경과됨에 따라 고분자가 수축되는 이유는 고분자 젤이 형성될 때 젤 내부에서 물분자들의 확산이 쉽게 일어나고 이때 팽창되는 고분자 젤의 내부 기공 구조를 통하여 물이 젤 밖으로 빠르게 배출되기 때문에 젤이 형성된다고 보고하였다. 또한 Yoshida는 PNIPAAm 그물구조는 온도의 증가에 의하여 소수성 그룹의 가교결합에 의한 응집이 강화되어 젤이 형성된다고 보고하였다.²⁴ 그러므로 PNIPAAm의 하한임계용액온도 이상의 온도 범위인 37 °C에서 모든 고분자의 수축은 60분 정도에 완료가 되었다. 그러나 4% w/v PNIPAAm의 경우, 동일 온도와 부피 하에서 상대적으로 고분자의 양이 많기 때문에 수분이 배출되는 데 시간이 지연되어 수축되는 시간이 낮은 농도의 고분자에 비하여 다소 느리게 관찰되었다.

Figure 4는 PNIPAAm 수용액의 농도를 2% w/v로 고정하고 여러 가지 온도에 따라서 고분자가 수축되는 결과를 나타내었다. PNIPAAm 젤의 수축은 34, 37, 43 °C에서 각각 120, 60, 43분 이후에 고분자의 수축이 완료되는 것을 관찰하였다. Kaneko은 동일한 부피와 농도의 고분자에 대하여 온도가 높을수록 젤 내부의 압력이 증가하고 압력의 증가로 인하여 젤 내부의 물을 빠르게 배출함으로써 고분자의 수축력이 증가되고 이때, 젤의 형성이 빨라진다고 보고하였다.²² 또한 동일한 농도의 고분자가 온도가 높을수록 수축이 빨라지는 이유

는 온도가 높을수록 젤이 형성될 때 고분자의 수소성 그룹 주위의 구조화된 물 분자들이 열에너지를 흡수하여 수소 결합이 약화되고 이로 인하여 고분자 사슬이 수소성 결합 작용에 의해 응집을 하기 때문에, 동일한 부피와 농도에서 고분자의 수축력이 강해지므로 온도가 높을수록 일정량의 물을 빠르게 방출하게 된다.²⁵ 따라서 온도가 높은 상태의 43 °C의 PNIPAAm 젤의 수축 시간이 가장 빠르게 나타났다.

Figure 5는 PNIPAAm 수용액을 하한임계용액온도인 32 °C에서 20분간 젤의 형성을 유도한 뒤, 1 °C/min으로 온도를 증가시킬 때 온도에 따른 고분자 젤의 수축 변화를 나타내고 있다. PNIPAAm 수용액에서 고분자 젤의 수축은 1, 2% w/v 농도의 고분자의 경우 약 38 °C

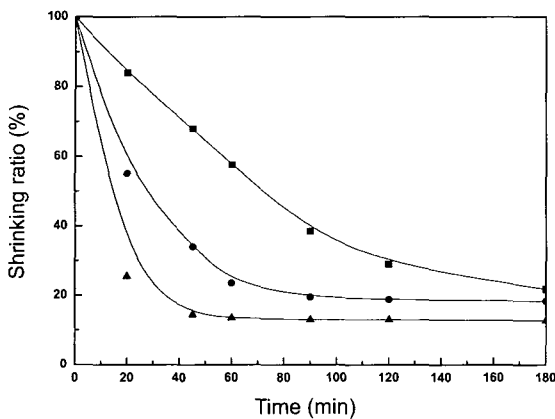


Figure 4. Deswelling kinetics of PNIPAAm gel in 10 mmol Tris-HCl buffered solution as a function of time at various temperatures: 34 °C (■), 37 °C (●), and 43 °C (▲). The concentration of PNIPAAm gel was 2% w/v.

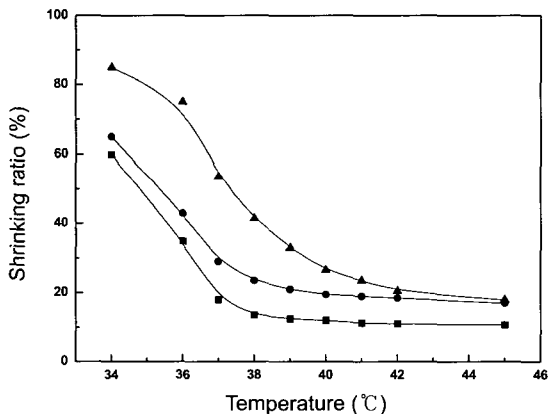


Figure 5. Deswelling kinetics of PNIPAAm gel in 10 mmol Tris-HCl buffered solution as a function of temperature at various concentrations: 1% w/v (■), 2% w/v (●), and 4% w/v (▲).

부근에서 완료되었고, 4% w/v 농도의 경우 약 40 °C 부근에서 완료되었다. 동일한 부피 (4 mL)에서 고분자의 농도가 증가함에 따라서 방출된 물의 부피는 상대적으로 감소하게 된다. 상대적으로 물이 많은 1, 2% w/v 농도의 고분자는 온도의 증가에 따라 고분자의 수축률에 대하여 물의 배출이 증가하였으며, 따라서 38 °C 부근에서 수축이 완료되어 젤이 형성되었다. 그러나 상대적으로 고분자의 양이 많고 수분의 양이 적은 4% w/v 농도의 PNIPAAm 수용액은 고분자의 양이 많기 때문에 수분의 배출이 상대적으로 쉽지 않고 오랜 시간에 걸쳐서 이루어지며 수축되는 온도가 상승한다는 것을 관찰할 수 있다. 그러므로 동일한 부피에서는 온도가 같을 때 고분자의 양이 증가될수록 수축은 느리게 진행되는 한편, 고분자의 농도가 같을 때는 온도가 증가될수록 수축이 빨라진다.²²

리포솜으로부터 Calcein의 방출. Figure 6은 PNIPAAm 젤 내부의 리포솜으로부터 calcein의 방출을 37 °C에서 시간의 변화에 따라 나타내었다. 1, 2%, 그리고 4% w/v 농도의 PNIPAAm 젤 내부의 온도민감성 리포솜으로부터 calcein의 방출은 60분까지 증가하였고 60분 이후에도 calcein의 방출이 서서히 증가하는 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 고분자의 농도가 높은 경우에 calcein의 방출률이 낮았으며 서서히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그 이유는 동일한 부피와 온도에서 시간이 경과되면서 고분자의 양이 많은 젤로부터 calcein이 방출되는 것은 고분자의 양에 의존하여 약물의 확산이 느려지기 때문이다. 또한 Figure 3의 결과로부터 PNIPAAm 젤은 약 60분 후에 수축이 거의 완료되는 것을 관찰할 수 있다. 그러므로 calcein의 방출이 약 60분까지 증가하다

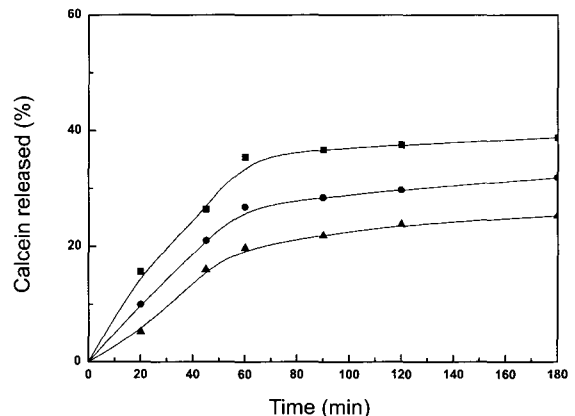


Figure 6. Release profiles of calcein from temperature sensitive liposomes in PNIPAAm gel at various concentration 1% w/v (■), 2% w/v (●), and 4% w/v (▲). The constant temperature was 37 °C.

이후, 미약한 calcein의 방출을 나타내게 되는 것이다. 한편, PNIPAAm 젤은 리포솜의 이동을 고정시키는 지지체의 역할만을 수행할 뿐 약물의 방출에 직접적인 영향을 미치지 않는다. 따라서 약물의 방출이 서로 다르게 나타나는 것은 리포솜으로부터 방출된 calcein이 고농도의 PNIPAAm 젤을 투과하면서 확산되는 시간이 지연되기 때문이다. 결과적으로 리포솜의 온도민감성에 의한 calcein의 방출은 고분자 젤의 약물방출 방해 작용에 의하여 서서히 방출되며, calcein의 방출시간이 지연되는 이유는 동일한 부피와 온도에서 고분자의 농도에 의존한다. 그러므로 리포솜이 함유된 PNIPAAm은 고분자의 농도가 증가될수록 약물의 방출시간을 더욱 연장시킬 수 있다는 것을 관찰할 수 있었다.

Figure 7은 PNIPAAm의 농도를 2% w/v로 고정하고 PNIPAAm 젤 내부의 리포솜으로부터 시간의 변화에 따른 calcein의 방출을 여러 가지 온도 조건에서 관찰한 결과를 나타내었다. Calcein의 방출시간은 34, 37, 43 °C에서 각각 120, 60, 40분까지 방출이 지연되는 것을 관찰하였다. 리포솜으로부터 calcein의 방출은 젤의 농도와 외부의 온도에 의존하였다. 동일한 농도인 PNIPAAm 젤 내부에서 온도가 증가할수록 calcein의 방출은 증가하였다. 그 이유는 동일한 농도에서 리포솜의 방출은 리포솜을 구성하는 인지질의 전이온도 이상의 온도 범위에 의존하기 때문에 약물의 방출이 빠르게 증가하였고, 인지질의 전이온도 이하인 34, 37 °C에서는 약물의 방출이 일정하게 오랜 시간 방출되는 것을 관찰할 수 있었기 때문이다. 따라서 리포솜이 함유된 동일한 농도의 PNIPAAm 젤에서 리포솜으로부터 calcein의 방출은 리포솜의 전이온도 이상의 온도에서 빠르게 증가하는 것을 관찰할

수 있었다.

Figure 8은 PNIPAAm 젤 내의 리포솜으로부터 온도변화에 따른 calcein의 방출거동을 두 개의 대조시료와 비교한 결과를 나타내고 있다. 첫 번째 대조시료는 PNIPAAm 젤이 존재하지 않는 리포솜이고 두 번째는 PNIPAAm 젤의 내부에 리포솜이 없는 시료를 사용하였다. Calcein의 방출은 32 °C에서 20분간 PNIPAAm 젤의 형성을 유도한 후, 1 °C/min으로 승온시키며 측정하였다. PNIPAAm 젤이 존재하지 않는 대조군 리포솜의 경우, 38 °C 이하의 온도에서 calcein의 방출이 20% 미만으로 서서히 증가하는 한편, 38 °C 부근에서 calcein의 방출이 급격히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 대조군 리포솜의 경우 calcein의 방출이 급격히 증가하는 이유는 리포솜의 지질 성분의 구조가 온도에 의하여 불안정해지고 지질막 구조가 균열이 발생하거나 유리화되기 때문이다.¹ 또한 리포솜의 표면에 poly(NIPAAm-co-ODA)의 결합에 의하여 그들의 하한임계용액온도 이상의 온도에서 고분자의 수축과 coil-globule 전이에 의하여 리포솜 표면을 자극하여 38 °C 이후에서는 약물의 방출이 급격히 증가하게 된다.^{13,27} 본 결과로서 대조군 리포솜은 약 38 °C에서 온도민감성이 부여되어 있는 것을 확인하였다. 한편, 리포솜을 함유하지 않은 2% w/v 농도의 PNIPAAm 젤로부터 calcein의 방출은 34~38 °C의 범위에서 일정하게 증가하였다. 그러나 38 °C 이상 calcein의 방출이 일정하게 유지되었다. 이것은 calcein의 방출이 PNIPAAm 젤에서 단지 고분자의 양에 의존하여 발생하였기 때문이다. 한편, 리포솜을 함유하고 있는 2% w/v 농도의 PNIPAAm 젤 내부의 리포솜으로부터 방출되는 calcein

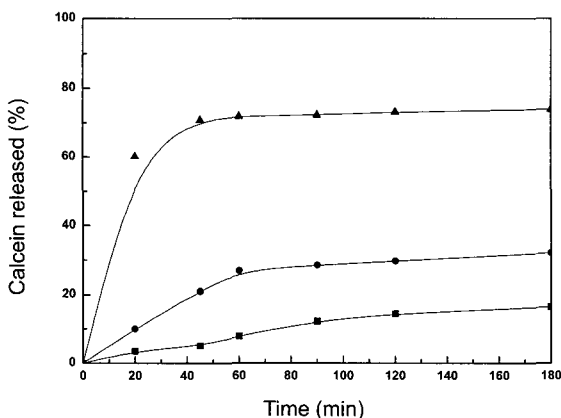


Figure 7. Release profiles of calcein from temperature-sensitive liposomes in PNIPAAm gel at various temperatures: 34 °C (■), 37 °C (●), and 43 °C (▲). The concentration of PNIPAAm gel was 2% w/v.

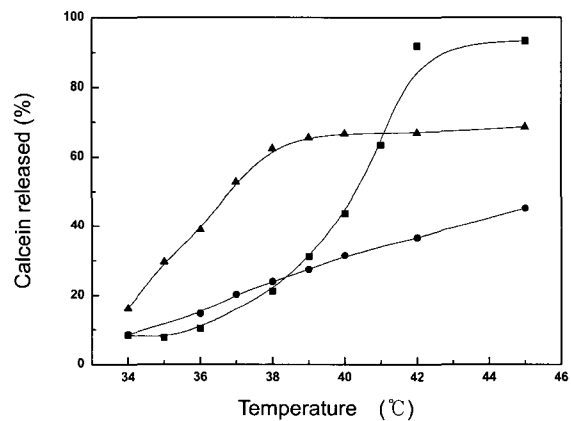


Figure 8. Temperature-dependent calcein release from PNIPAAm gel; liposome without PNIPAAm gel (■), PNIPAAm gel with liposome (●), and PNIPAAm gel without liposome (▲). The concentration of PNIPAAm gel was 2% w/v.

은 온도가 증가함에 따라 일정하고 지속적으로 방출되는 것을 관찰하였다. 이것은 온도가 증가할수록 리포솜의 온도민감성에 의하여 calcein이 방출되기 때문이다. 그러나 calcein의 방출률이 대조군에 비하여 낮게 나타나는 이유는 리포솜으로부터 방출되는 calcein의 배출을 고분자 젤이 방해하기 때문이다. 한편, Paavola 그룹은¹⁴ poloxamer 젤을 이용하여 고분자가 없는 대조군 리포솜과 리포솜이 함유된 고분자 젤 그리고 리포솜이 함유되지 않은 고분자 젤로부터 약물의 방출특성을 보고하였다. 또한 리포솜을 함유하고 있는 고분자 젤에서 약물의 방출이 서서히 지속적으로 증가되는 이유는 poloxamer의 소수성 polyoxypropylene 그룹이 인지질 리포솜 이중막 사이에 결합되어 젤의 형성이 완료되었을 때, 리포솜으로부터 방출되는 수용성 약물이 젤 밖으로 배출되는 체류시간을 증가시키기 때문이라고 보고하였다. 따라서 리포솜이 함유되어 있는 고분자 젤에서 약물의 방출이 지속적이고 일정하게 발생하는 것을 확인하였다.

4. 결론

리포솜은 지질합성비율의 조절과 poly(NIPAAm-co-ODA)를 도입하여 온도민감성을 부여하였으며, 외부의 온열 온도인 ~38 °C에서 calcein의 방출이 극대화될 수 있도록 제조하였다. 한편, 제조된 온도민감성 리포솜을 PNIPAAm 수용액에 혼합한 후, 이 혼합용액을 PNIPAAm의 하한임계용액온도 이상인 37 °C에서 젤이 형성되도록 하였다. 대조군 리포솜은 38 °C에서 calcein의 방출을 극대화시킬 수 있는 한편, 리포솜이 함유되지 않은 PNIPAAm 젤로부터 calcein의 방출은 단지 고분자 젤의 농도에 기인하여 방출이 완료되었고, 리포솜이 함유된 PNIPAAm 젤의 경우 calcein의 방출량이 일정하며 지속적으로 발생하는 것을 확인하였다. 또한 온도민감성 리포솜을 함유하는 PNIPAAm 젤은 동일한 온도 조건에서는 고농도의 고분자일 때 calcein의 방출시간을 가장 오래 지속시킬 수 있었으며, 동일한 농도의 고분자일 때는 외부의 온도가 높을수록 calcein의 방출이 빠르게 일어난다는 사실을 관찰할 수 있었다. 본 실험은 수용성 약물을 봉입할 수 있는 온도민감성 리포솜이 함유된 PNIPAAm 젤에 관한 것으로써, 특정인체부위에서 오래도록 체류하며 약물의 효과를 극대화시킬 수 있는 약물전달 시스템에 적용될 수 있을 것이다.

감사의 글 : 본 연구는 과학기술부 기능성 화합물질 개발사업과 정보통신연구진흥원 IMT-2000 출연금 기술개발지원사업으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

References

1. D. Needham and M. W. Dewhirst, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **53**, 285 (2001).
2. P. F. Kiser, G. Wilson, and D. Needham, *Nature*, **394**, 455 (1998).
3. D. E. Meyer, B. C. Shin, G. A. Kong, M. W. Dewhirst, and A. Chilkoti, *J. Control. Rel.*, **74**, 213 (2001).
4. K. Kono, R. Nakai, K. Morimoto, and T. Takagishi, *Biochim Biophys. Acta.*, **1416**, 239 (1999).
5. J. C. Leroux, E. Roux, D. L. Garrec, K. Hong, and D. C. Drummond, *J. Control. Rel.*, **72**, 71 (2001).
6. K. Kono, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **53**, 307 (2001).
7. J. C. Kim, K. S. Bae, and J. D. Kim, *J. Biochem.*, **121**, 1 (1997).
8. B. M. Jeong, Y. H. Bae, D. S. Lee, and S. W. Kim, *Nature*, **388**, 860 (1997).
9. D. K. Pyun, Y. H. Lim, J. H. Ahn, D. J. Kim, and D. S. Lee, *Polymer(Korea)*, **20**, 335 (1996).
10. K. H. Kim and Y. J. Shin, *Polymer(Korea)*, **18**, 412 (1994).
11. W. Xue, I. W. Hamley, and M. B. Huglin, *Polymer*, **43**, 518 (2002).
12. Y. K. Sung, J. H. Jung, and I. J. Choi, *Polymer(Korea)*, **22**, 8 (1998).
13. H. Hayashi, K. Kono, and T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.*, **10**, 412 (1999).
14. A. Paavola, I. Kilpelainen, J. Yliruusi, and P. Rosenberg, *Int J. Pharm.*, **199**, 85 (2000).
15. B. Jeong, Y. K. Choi, Y. H. Bae, G. Zentner, and S. W. Kim, *J. Control. Rel.*, **62**, 109 (1999).
16. C. Matschke, U. Isele, P. V. Hoogevest, and A. Fahr, *J. Control. Rel.*, **85**, 1 (2000).
17. X. Y. Shi, J. B. Li, C. M. Sun, and S. K. Wu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **75**, 247 (2000).
18. L. D. Mayer, M. J. Hope, P. R. Cullis, and A. S. Janoff, *Biochim. Biophys. Acta.*, **817**, 193 (1985).
19. H. D. Han, S. S. Kim, H. S. Choi, and B. C. Shin, *J. Kor. Chem. Soc.*, **47**, 257 (2003).
20. O. Lopez, A. D. L. Maza, L. Coderch, C. Lopez-Iglesias, E. Wehrli, and J. L. Parra, *FEBS Letters*, **426**, 314 (1998).
21. T. K. Jung, S. S. Kim, and B. C. Shin, *J. Kor. Chem. Soc.*, **47**, 59 (2002).
22. Y. Kaneko, R. Yoshida, K. Sakai, Y. Sakurai, and T. Okano, *J. Membr. Sci.*, **101**, 13 (1995).
23. H. Hayashi, K. Kono, and T. Takagishi, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1280**, 127 (1996).
24. R. Yoshida, K. Uchida, Y. Kaneko, K. Sakai, A. Kikuchi, Y. Sakurai, and T. Okano, *Nature*, **374**, 240 (1995).
25. K. Makino, J. Hiyoshi, and H. Ohshima, *Colloids Surface B*, **19**, 197 (2000).
26. A. Hatefi and B. Amsden, *J. Control. Rel.*, **80**, 9 (2002).
27. E. I. Tiktopulo, V. E. Bychkova, J. Ricka, and O. B. Ptitsyn, *Macromolecules*, **27**, 2879 (1994).