

## 음이온성 리포솜이 결합된 키토산 겔의 항암효과

최민수 · 한희동 · 김태우 · 송충길 · 박은석\* · 신병철†

한국화학연구원 나노생체재료팀, \*성균관대학교 제약학과  
(2004년 12월 7일 접수 · 2004년 12월 30일 승인)

### Anti-tumour Efficiency of Chitosan Hydrogel Containing Anionic Liposomes as a Depot System

Min Soo Choi, Hee Dong Han, Tae Woo Kim, Chung Kil Song, Eun Seok Park\* and Byung Cheol Shin†

Advanced Materials Division, Korea Research Institute of Chemical Technology,  
100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea

\*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-467, Korea

(Received December 7, 2004 · Accepted December 30, 2004)

**ABSTRACT**—Depot system for local drug delivery using chitosan hydrogel has been developed to enhance the therapeutic efficacy and to prevent the severe side effect in whole body. Thus, we have prepared an injectable chitosan hydrogel containing liposomes to treat cancers clinically. Anionic liposomes incorporated to improve sustained release efficiency within chitosan hydrogel. The chitosan solution containing liposomes was designed to form a hydrogel complex at body temperature. The released behavior of doxorubicin from liposomes in chitosan hydrogel showed sustained-release caused by diffusion of doxorubicin from temperature responsive liposome into chitosan hydrogel. The chitosan hydrogel containing liposomes enhanced the therapeutic potency for the solid tumor in vivo system. Our results indicate that the liposomes in chitosan hydrogel represent a depot system for local drug delivery.

**Key words**—Chitosan, Liposome, Hydrogel, Doxorubicin, Depot system

약물을 이용한 화학적 항암 치료법에 있어서 가장 효과적인 치료 방법은 파클리탁셀<sup>1,2)</sup>이나 독소루비신<sup>3-5)</sup>과 같은 항암 약물을 종양세포에 선택적으로 전달하여 종양세포를 괴사시키고 정상세포에 부작용을 최소화하는 것이다. 특히, 독소루비신은 가장 널리 사용되는 항암 약물로서 자궁암, 유방암 등에 매우 효과적인 특성을 갖고 있어 그 특징에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.<sup>3,4)</sup> 그러나 독소루비신은 종양세포를 괴사시킬 뿐만 아니라 심부전증을 유발하는 치명적인 부작용을 나타내기 때문에 사용에 주의와 제한이 따른다.<sup>6-8)</sup> 따라서 독소루비신은 나노입자,<sup>9)</sup> 리포솜,<sup>10-13)</sup> 고착성 하이드로 겔<sup>14-15)</sup> 등의 다양한 종류의 제형을 이용하여 종양세포에 선택적, 특이적으로 전달하는 방법이 활발히 연구되고 있다.

독소루비신의 제형으로 가장 활발히 연구되고 있는 리포솜은 체내 부작용이 적고 생체 적합성이 우수하며 이중막 구조로서 수용성 약물에 대한 높은 봉입율을 지니고 있으며 제조방법이 간단하다는 장점을 갖고 있다.<sup>6,10,11)</sup> 또한 리포솜은

지질의 조성에 따라 열,<sup>10,11,16)</sup> 빛<sup>12)</sup> 및 pH<sup>13)</sup> 등의 외부 자극에 의해 선택적인 약물의 방출을 기대할 수 있기 때문에 방사선 치료나 화학치료 등과 병용하여 적용할 수 있다.<sup>17,18)</sup>

한편, Figure 1은 불용성 키토산을 탈 아세틸화하여 얻어지는 키토산의 화학구조식이다. 키토산은 양이온성 염기다당류의 일종으로 일반적으로 자연 상태의 갑각류에서 얻어지는 키토산의 탈 아세틸화 정도에 따라 분류된다.<sup>19)</sup> 키토산은 낮은

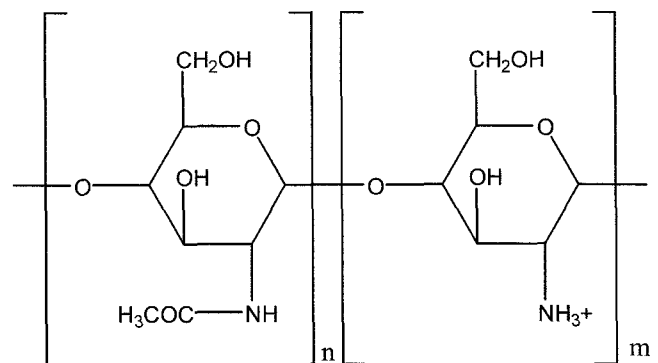


Figure 1—Structure of chitosan (degree of deacetylation is given by  $(m/(m+n))100$ ) and chitin ( $m < n$ ).

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)860-7223, E-mail : bcsin@pado.kRICT.re.kr

세포독성, 높은 생체 적합성, 두께 조절이 용이한 막으로의 형성 그리고 높은 세포 부착성으로 인하여 약물전달방법의 재료로 관심이 증대되고 있다.<sup>15,21,22</sup> 특히 키토산은 점탄성을 갖는 수화 겔로 변화될 수 있으며, 수화 겔로 변화시키는 방법으로 탈 아세틸화 시킨 단량체를 다시 아세틸화 시켜 키토산 고분자들 사이의 결합력을 증가시켜 겔화를 유도하는 방법이 있다.<sup>19,20,23</sup> 또 다른 방법은 글리세롤 2-포스페이트 디소듐 염 수화물( $\beta$ -GP)를 키토산에 도입하여 일시적인 열경화성 키토산 겔로 유도하는 방법이 있다.<sup>23</sup> 따라서 점성이 낮은 키토산 용액의 온도를 증가시킬 때, 키토산 용액의 성질을 점탄성을 갖는 겔로 바꾸어 환부에 고정시킬 수 있는 고착성 겔의 형태로 응용할 수 있다.<sup>14,15</sup>

본 연구에서는 양이온성인 키토산 겔의 내부에 리포솜을 고정하기 위하여 리포솜의 표면을 음이온성으로 제조하였으며, 음이온성 리포솜 내부에 항암약물인 독소루비신을 봉입하여 리포솜이 결합된 키토산 겔로 제조하였다. 제조한 키토산 겔은 형광주사현미경을 이용하여 키토산 겔에 결합된 리포솜을 확인하였으며, 인산염 완충액(PBS, pH 7.4)에서 약물방출 거동을 자외선 분광광도계를 통하여 측정하였다. 또한 동물실험으로 피부암으로부터 유래된 흑색종 세포를 이식한 쥐에 직접 주사하여 20일 동안 생존율과 종양의 치료 효과를 관찰하였으며, 기존의 독소루비신 정맥주사법과 비교하여 제형에 대한 약물의 안전성과 항암효과를 관찰하였다.

## 실험 방법

### 시약

리포솜 제조를 위하여 사용한 인지질은 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), *L*- $\alpha$ -포스파티딜콜린(쏘이-하이드로겐네이트, HSPC), 콜레스테롤(CHOL), 1- $\alpha$ -포스파티딜콜린-1,2-디스테아로일-*sn*-글리세로-3-포스포에탄올아민-*n*-[메톡시(폴리에틸렌글리콜)-2000] (DSPE-mPEG) 그리고 음이온성 인지질인 1,2-디팔미토일-*sn*-글리세로-3-포스파티드산(DPPA)를 Avanti Polar Lipids사(Alabaster, AL, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 독소루비신은 (주)보령제약에서 공급받았다. 약물의 봉입을 위하여 사용한 암모니움 설페이트와 안정화제로 사용한 백당은 Sigma-Aldrich사(Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 폴리카보네이트 막은 Millipore (County Cork, 아일랜드)에서 구입하여 사용하였다. 제조된 리포솜의 정제를 위하여 사용된 투석 막(M.W. Cut-off 10,000~12,000; Slide-A-Lyzer dialysis cassette)과 겔 투과 크로마토그래피(GPC)의 충전제인 sephacryl S-400-HR는 Bum Han Commercial사(Chicago, Illinois, 미국)와 Sigma-

Aldrich사(Louis, Mo, 미국)에서 각각 구입하여 사용하였다. 키토산(161 kDa, 200,000 cps, 탈 아세틸화 80%)과 글리세롤 2-포스페이트 디소듐 염 수화물( $\beta$ -GP) 그리고 인산염 완충용액(PBS, pH 7.4)은 Sigma-Aldrich사(Louis, Mo, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 그 밖에 실험에 사용한 클로로포름과 메탄올은 일급 및 특급시약을 사용하였다.

### 기기

인지질 필름을 형성하기 위하여 회전 증발 응축기(Buchi Rotavapor R-200, Flawil, 스위스)를 사용하였고, 리포솜을 성형하기 위하여 사출성형기(Extruder, Northern Lipids사, Vancouver, BC, 캐나다)를 사용하였으며, 리포솜의 정제와 건조를 위하여 겔 투과 크로마토그래피(GPC, Retriever 500, Isco사, Hercules, CA., 미국)와 동결건조기(FD5505S, 일신랩, 한국)를 각각 사용하였다. 키토산 겔에 결합된 리포솜의 확인과 약물의 방출을 측정하기 위하여 형광 주사 현미경(Radiance 2000, BIO-RAD Laboratories사, Hercules, CA, 미국)과 자외선분광 광도계(UV mini 1240, Shimadzu사, 일본)를 각각 사용하였다.

### 종양세포 및 실험동물

동물실험에 사용된 종양세포는 피부암 세포주인 B16F10 흑색종 세포를 American Type Culture Collection(ATCC)에서 구입하여 계대배양 후 사용하였다. 흑색종 세포의 배양액으로는 DMEM에 10% FBS, 1% 페니실린-스트렙토마이신(100 U/ml 페니실린, 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신)을 사용하였으며, 37°C에서 5% 이산화탄소 배양기를 사용하여 배양하였다. 한편, 실험용 쥐는 5~6 주령의 C57BL/6 암컷 쥐를 Harlan사(Indiana, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

### 음이온성 리포솜의 제조

음이온성 리포솜의 제조에 사용된 인지질은 DPPA:DPPC:HSPC:CHOL:DSPE-mPEG를 30:70:50:30:6의 몰 비율로 제조하였으며, 총량을 10 mM로 고정하였다. 정량된 모든 인지질은 2:1(v/v) 클로로포름-메탄올 혼합 용매에 녹인 후, 진공 회전 증발 응축기를 이용하여 혼합용매를 제거하여 얇은 인지질 막을 획득하였다. 제조한 얇은 인지질 막은 250 mM의 암모니움 설페이트 용액으로 수화시켜 사출 성형기를 이용하여 100 nm의 폴리카보네이트 막으로 30°C에서 리포솜 입자를 성형하였다. 사출 성형 후 리포솜 입자로 형성되지 못한 인지질과 리포솜 내부에 봉입되지 못한 암모니움 설페이트는 10,000~12,000이하의 분자량을 제거할 수 있는 반투막을 이용하여 4°C에서 10시간동안 제거하였으며 이 과정을

10회 반복하였다. 독소루비신은 2 mg/ml의 농도로 10% w/v의 백당 용액에 용해시켜 사용하였다. 독소루비신 용액과 제조한 리포솜 용액은 1:1의 부피 비로 혼합하여 30°C에서 24 시간동안 암모늄 설페이트의 이온 차이에 의해 리포솜 내부에 독소루비신을 봉입하였다.<sup>24)</sup> 봉입되지 않은 독소루비신을 제거하기 위하여 4°C에서 10% w/v 백당 용액을 사용하여 GPC를 실시하였다. GPC에 의해 정제된 리포솜은 -70°C의 저온 냉각기에 넣어 동결 시킨 후 -55°C, 5 mtorr의 동결건조기를 이용하여 수분을 완전히 제거하여 음이온성 리포솜 분말로 제조하였다. 제조한 리포솜 분말은 동결 건조전과 동량의 인산염 완충액에 재분산하여 자외선 분광장치를 이용하여 490 nm에서 봉입율을 측정하였다.

#### 리포솜이 결합된 키토산 용액 주사제의 제조

키토산 용액은 0.1 M 염산 용액 9 ml에 30 mg의 키토산을 30°C에서 용해하여 제조하였다. 재분산할 때 독소루비신이 1.38 mg/ml로 봉입된 리포솜 분말은 각각 90 mg, 420 mg 그리고 960 mg을 제조된 2 ml의 키토산 용액에 분산시켜 쥐의 체중에 대하여 12 mg/kg, 60 mg/kg 그리고 140 mg/kg의 리포솜이 결합된 키토산 용액으로 제조하였다. 리포솜이 결합된 키토산 용액은 4°C에서 빠르게 교반시켜주면서 10% w/v β-GP를 천천히 혼합시켜주어 키토산 용액 주사제로 제조하였다.

#### 키토산 겔에 결합된 리포솜의 확인

키토산 겔 내부에 결합되어 있는 리포솜을 확인하기 위하여 형광주사 현미경을 사용하였다. 이때, 독소루비신이 봉입된 리포솜을 관찰하기 위하여 흡수파장 487 nm, 방출파장 595 nm에서 관찰하였다.

#### 키토산 겔에서 독소루비신의 방출

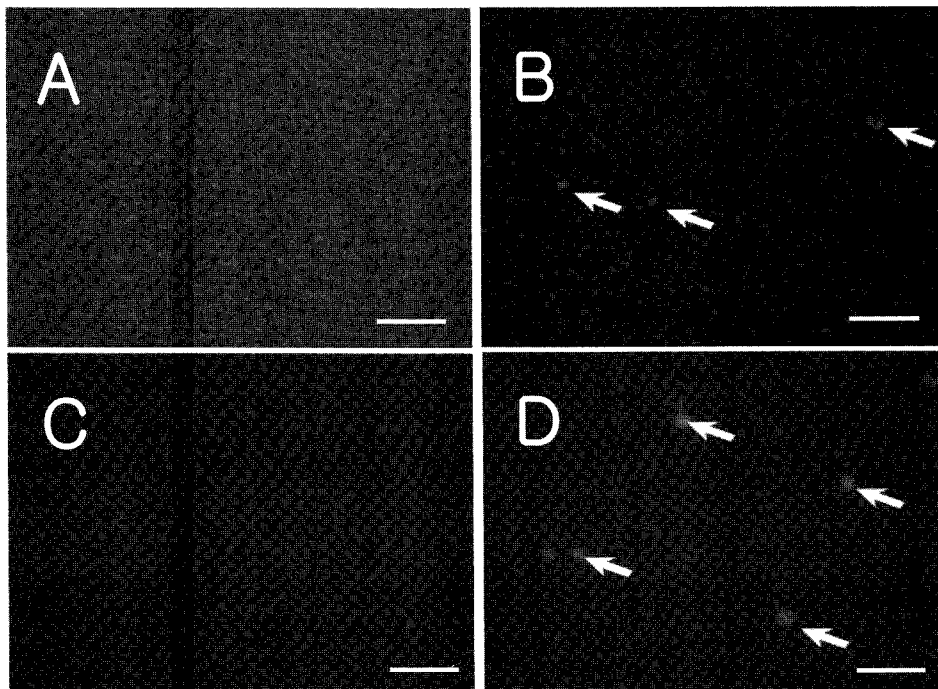
키토산 겔에서 독소루비신의 방출은 자외선 분광광도계를 이용하여 방출된 독소루비신의 흡광도를 측정하여 계산하였다. 방출을 측정하기 위하여 리포솜이 분산된 1 ml 키토산 용액을 주사기 틀에 담아 35°C에서 30분 동안 겔화시켰다.<sup>23)</sup> 키토산 겔은 37°C 인산염 완충용액 1 ml에 혼합한 후 시간에 따라 방출되어 나오는 독소루비신의 흡광도를 490 nm에서 측정하여 다음의 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{방출율}(\%) = I_t/I_f \times 100 \quad (1)$$

이때,  $I_t$ 는 키토산 겔 내부의 리포솜으로부터 방출된 독소루비신의 흡광도이고  $I_f$ 는 Triton X-100을 첨가하여 리포솜의 형태를 파괴 했을 때 흡광도이다.<sup>25)</sup>

#### 리포솜이 결합된 키토산 겔의 항암효과

키토산 겔의 항암효과는 흑색종 세포를 이식한 쥐의 중앙의 성장 부피를 통하여 예측하였다. 인산염 완충용액 20 μl



**Figure 2**—Confocal laser scanning microscopy images of (A) doxorubicin solution, (B) anionic liposomes, (C) chitosan hydrogel and (D) chitosan hydrogel containing anionic liposomes. A scale bar is 1 μm.

에 들어있는  $4 \times 10^5$  흑색종 세포를 쥐의 허벅지 안쪽피부에 이식하였다(n=6). 8일 후 흑색종 세포가 일정부피 이상으로 자라면 독소루비신을 쥐의 체중에 대하여 각각 12 mg/kg, 60 mg/kg 그리고 140 mg/kg인 키토산 겔을 200  $\mu$ l씩 주사한 후 2일 간격으로 흑색종의 부피를 버니어 캘리퍼스(Mitutoyo, 일본)를 사용하여 측정하였다. 측정된 흑색종의 부피는 다음의 식 (2)를 이용하여 부피로 계산하였다.

$$\text{부피}(\text{mm}^3) = \text{길이} \times \text{폭}^2 \times 1/2 \quad (2)$$

### 결과 및 고찰

#### 키토산 겔에 결합된 리포솜의 확인

Figure 2는 독소루비신을 봉입한 리포솜이 키토산 겔에 파괴되지 않고 분산되어 있음을 확인하기 위하여 사용한 형광 주사 현미경 사진이다. 독소루비신 용액의 사진(A)은 독소루비신이 갖는 고유의 빨간색이 고르게 분포되어 있었으며, 독소루비신이 봉입된 음이온성 리포솜 용액(B)은 진한 빨간색을 띄고 있는 구형 반점을 확인하였다. 따라서 독소루비신을 봉입한 리포솜에서 확인된 진한 빨간 반점은 리포솜 내부에 봉입된 독소루비신이 인지질 막에 의해 외부로 방출되지 못하고 내부에 봉입되어 있는 것이다. 한편, 순수한 키토산 겔(C)은 형광을 띄는 물질이 관찰되지 않았으나 음이온성 리포솜을 결합시킨 키토산 겔(D)에서는 독소루비신을 봉입한 리포솜과 동일한 형태의 진한 빨간색 구형 반점이 확인되었다. 이것은 키토산 겔에 결합된 음이온성 리포솜이 독소루비신을 봉입한 상태로 키토산 겔에 결합되어 있기 때문이다. 결과적으로 리포솜은 독소루비신을 봉입한 상태로 키토산 겔에 결합되어 있었으며, 결합된 리포솜은 키토산 겔 내부에서 파괴되지 않고 고르게 분산되어 있음을 확인하였다.

#### 키토산 겔에서 독소루비신의 방출 측정

Figure 3은 37°C에서 키토산 겔 내부의 리포솜으로부터 독소루비신의 방출을 나타내고 있다. 키토산 겔에 분산시킨 순수한 독소루비신은 37°C에서 시간에 따라 10분 동안 38%가 급격히 방출되었으며, 방출 60분 후에는 48%의 방출이 이루어졌다. 반면, 키토산 겔에 결합된 리포솜으로부터 독소루비신의 방출은 10분 동안 7%가 방출되었으며, 방출 60분 후에는 19%의 방출이 이루어졌음을 확인하였다. 독소루비신은 키토산 겔에 분산되어 있는 것 보다 리포솜으로 봉입하여 키토산 겔 안에 결합시켰을 때 초기의 급격한 방출을 막아주고, 시간에 따라 일정한 비율의 독소루비신이 방출되는 것을 관찰하였다. 이것은 순수한 독소루비신을 키토산 겔

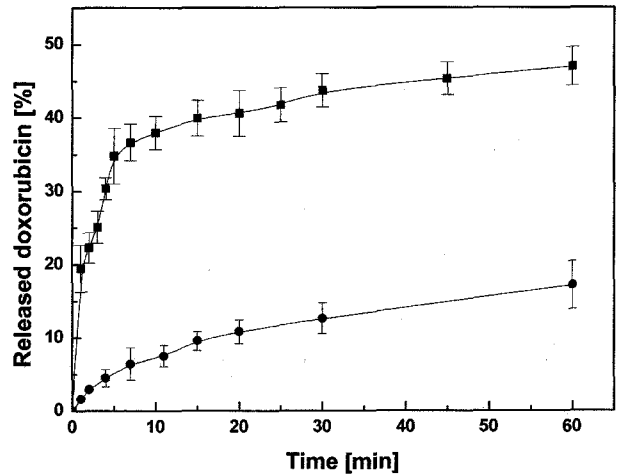


Figure 3—*In vitro* cumulative released doxorubicin from liposomes in chitosan hydrogel at 37°C. Each point represents the mean value±S.D. (n=3) (●- doxorubicin loaded liposomes in chitosan hydrogel and ■ - doxorubicin in chitosan hydrogel).

에 분산시켰을 때 키토산 겔에 형성된 기공 사이로 분자량이 작은 독소루비신이 확산에 의하여 키토산 겔 밖으로 방출되었기 때문이다. 그러나 리포솜이 결합된 키토산 겔은 독소루비신의 확산이 이루어지지 않는 리포솜의 인지질로 봉입하였으며, 봉입된 음이온성 리포솜을 양이온성인 키토산에 결합시켜 고정하였다. 따라서 리포솜이 분산된 키토산 겔은 41°C에서 상전이 온도를 갖고 있는 DPPC로 인해 상전이 온도 근처인 37°C에서 불안정해진 인지질 막을 통하여 서서히 방출이 이루어지게 하여 급격한 초기 방출을 조절하고 키토산 겔에 고정할 수 있음을 확인하였다.<sup>26)</sup>

#### 독소루비신의 농도에 따른 생존율

Figure 4는 흑색종 세포를 이식한 쥐의 독소루비신의 농도에 따른 생존율에 대한 결과이다. 순수한 키토산 겔을 주사한 쥐는 흑색종 세포 이식 후 20일 후에 100%의 생존율을 나타내었으나, Figure 5의 결과에서 가장 크게 종양이 성장하였다. 반면, 독소루비신을 용액으로 주사한 쥐는 주사 직후부터 체중이 감소하고 털에 윤기가 사라지기 시작하였으나, Figure 5의 결과에서 보는 것처럼 종양의 크기가 감소하였다. 키토산 겔에 결합된 리포솜의 독소루비신은 독소루비신의 농도가 쥐의 체중에 대해 12 mg/kg일 때 20일 동안 100%의 생존율이었으며, 60 mg/kg과 140 mg/kg으로 주사하였을 때에는 흑색종 세포이식 14일 후부터 서서히 사망개체 수가 늘어나기 시작하여 독소루비신의 농도가 60 mg/kg은 이식 19일 후, 140 mg/kg은 16일 만에 모두 사망하였고, 독소루비신의 농도가 12 mg/kg인 독소루비신 용액을 정맥 주사한 쥐도 털의 윤기가 사라졌으며 흑색종 세포 이식 후 18

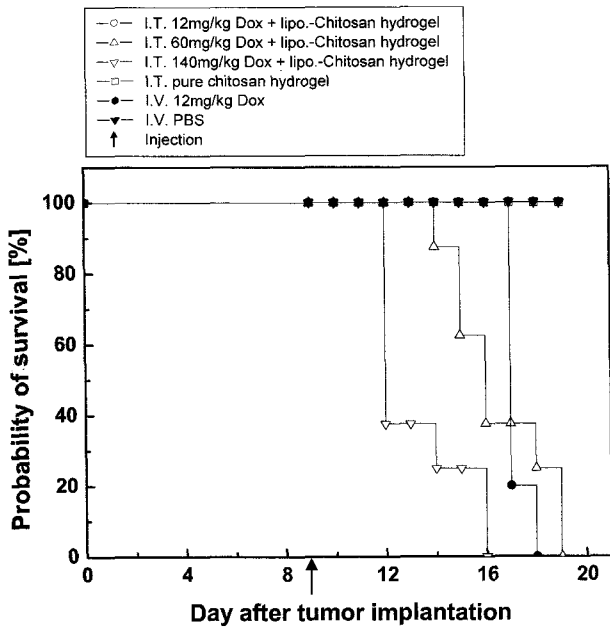


Figure 4-Survival time of the mice with B16F10 melanoma.

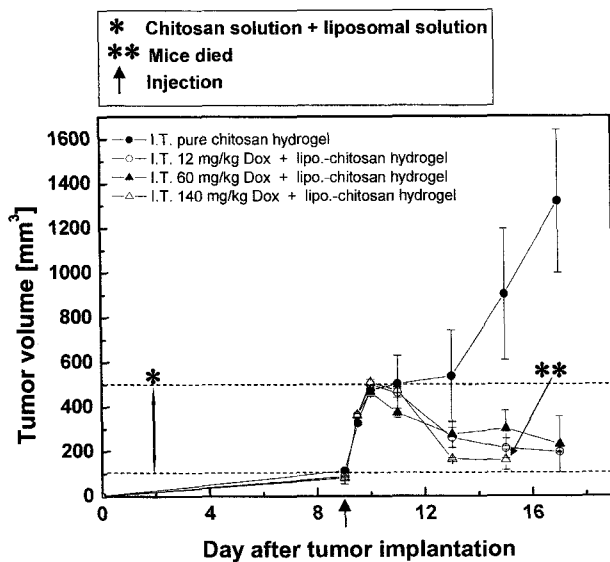


Figure 5-Tumor volume of 12 mg/kg, 60 mg/kg and 140 mg/kg doxorubicin liposome entrapped chitosan gel. The data is shown as mean $\pm$ S.D. (n=6).

일 내에는 모두 사망하였다.

독소루비신은 항암효과가 매우 우수한 약물이지만 투여할 때 약물의 독성이 체내에 축적되게 된다. 따라서 독소루비신은 2 mg/kg 이상의 농도로 주사했을 때 항암효과를 나타내지만 5 mg/kg 이상으로 주사했을 때에는 심장 세포에 쌓이게 되어 심장 질환을 유발할 수 있다고 보고되어 있다.<sup>4,6)</sup> 따라서 독소루비신 용액을 허용농도의 2배 이상인 12 mg/kg의 농도로 정맥 주사한 쥐는 심장세포에 독소루비신이 쌓여

심장질환으로 인해 사망한 것으로 사료된다. 반면, 같은 농도의 독소루비신을 키토산 겔에 결합된 리포솜에 봉입하여 주사한 경우에는 약물방출 조절효과가 있는 리포솜이 독소루비신의 방출을 조절함으로써 과량의 독소루비신이 방출되는 것을 막아주었기 때문에 높은 생존율을 나타내었다. 그러나 데이터로 보여주진 않았지만 리포솜을 사용하더라도 독소루비신의 농도가 30 mg/kg 이상일 경우 독소루비신의 농도가 너무 높아 리포솜의 방출 제어능력 이상의 약물이 방출되어 쥐가 사망한 것으로 사료된다. 따라서 리포솜의 방출제어효과를 기대할 수 있는 농도범위는 12 mg/kg 이하이며, 12 mg/kg 이상의 독소루비신이 주사될 경우 생존율에 큰 위험이 초래될 수 있다. 또한 본 실험은 일반적인 정맥주사에 비하여 동일한 농도를 한번에 주사하여 여러번 주사해야 하는 단점을 제거하고, 약물이 지속적으로 환부에서 방출되게 하는 장점이 있다.

#### 독소루비신의 농도에 따른 종양치료 효과

Figure 5는 독소루비신의 농도에 따른 종양의 부피변화를 나타낸 결과이다. 흑색종 세포를 이식한 모든 그룹의 쥐는 이식 9일 후 종양의 부피가 100 mm<sup>3</sup>로 성장하였다. 흑색종 세포 이식 9일째에 키토산 용액을 피하로 주사한 후 키토산 용액이 겔화되면서 키토산 겔의 부피로 인하여 이식 10일 후 모두 500  $\pm$  10 mm<sup>3</sup>로 성장하였다. 이식 10일 후 순수한 키토산 겔을 주사한 쥐는 종양의 부피가 계속해서 증가하기 시작하여 이식 17일 후에는 1320 mm<sup>3</sup>로 증가하였다. 반면, 리포솜을 결합시킨 키토산 겔은 독소루비신의 농도가 12 mg/kg, 60 mg/kg 그리고 140 mg/kg인 것 모두 감소하기 시작하였으며, 이식 17일 후에 독소루비신의 농도가 12 mg/kg와 60 mg/kg로 피하 주사한 쥐는 종양의 부피가 194 mm<sup>3</sup>와 230 mm<sup>3</sup>로 각각 감소하였다. 그러나 독소루비신의 농도가 140 mg/kg로 주사한 쥐는 이식 15일째에 모두 사망하여 더 이상의 측정이 불가능 하였다.

리포솜을 결합시킨 키토산 겔을 독소루비신의 농도가 12 mg/kg, 60 mg/kg 그리고 140 mg/kg로 주사한 쥐가 모두 이식 11일 후부터 종양의 부피가 감소되기 시작하는 것은 키토산 겔로부터 방출된 독소루비신의 농도가 주사 2일 후부터 항암효과를 갖게 된다는 것을 알 수 있었다. 그러나 140 mg/kg으로 투입하면 과량의 독소루비신이 방출되어 이식 15일 후에 쥐가 모두 사망한 것으로 사료된다. 또한 12 mg/kg, 60 mg/kg의 독소루비신이 투여된 쥐는 모두 흑색종의 부피가 이식 17일 후에 비슷한 부피로 감소되어 12~60 mg/kg의 독소루비신이 투여될 때 항암효과가 비슷해 보이지만 Figure 4에서와 같이 60 mg/kg의 농도에서는 4일 후에 쥐가 죽기 시

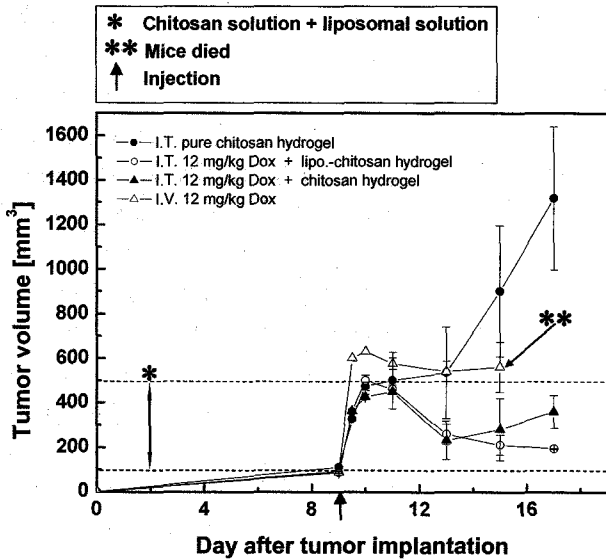


Figure 6—Tumor volume of intratumoral injection and intravenously of 12 mg/kg doxorubicin loaded liposome, chitosan gel and liposome entrapped chitosan gel. The data is shown as mean±S.D. (n=6).

작하여 개체수가 줄어든 상태의 결과를 나타내었다. 따라서 60 mg/kg은 쥐에게 있어 안전한 범위가 아니라고 사료된다.

#### 제형에 따른 종양의 치료효과

Figure 6은 제형에 따른 종양의 부피변화를 나타낸 결과이다. 흑색종을 이식한 쥐는 이식 후 9일간  $96 \pm 5 \text{ mm}^3$ 로 비슷한 부피로 성장하였으며, 9일 이후 독소루비신의 주사 제형에 따라 부피가 변화되었다. 특히, 키토산 겔로 독소루비신을 주사하기 위한 제형으로 사용하였을 때 키토산 겔의 부피로 인하여  $500 \text{ mm}^3$ 로 부피가 급격히 증가되었다. 주사 후 순수한 키토산 겔을 피하 주사한 쥐는 종양의 부피가 계속해서 증가하였고, 12 mg/kg 독소루비신을 분산한 키토산 겔은 피하 주사한 후 부피가 감소하였으나 13일 후부터 흑색종의 부피가 다시 증가하기 시작하였다. 그러나 12 mg/kg의 독소루비신을 키토산에 결합된 리포솜으로 주사하였을 때에는 감소한 종양의 부피가 다시 증가하지 않았다. 한편, 독소루비신을 정맥 주사한 쥐는 키토산 겔의 부피를 더하여 종양의 부피를 보정한 후 계산하였으며, 독소루비신의 농도가 12 mg/kg으로 주사했을 때 주사 후 감소된 부피가 다시 증가하지 않았으나 감소율이 크지 않았고, 이식 15일 후에 모두 사망하여 측정이 불가능하였다.

독소루비신은 특별한 종양 표적화 기전이 없어 용해하여 정맥 주사한 경우에는 흑색종 세포에 표적화하지 못하고 대부분의 독소루비신이 흑색종 세포가 아닌 다른 정상세포에 작용하여 항암효과가 감소된다.<sup>9)</sup> 반면, 독소루비신을 키토산

겔에 결합시켜 종양내부에 주사하였을 경우에는 독소루비신이 종양내부에서 직접 방출됨으로써 정상세포에 작용하는 부작용을 최소화하였기 때문에 우수한 항암효과를 나타내었다. 그러나 키토산 겔은 이식 13일 이후 다시 종양의 부피가 증가하였다. 이것은 키토산 겔이 독소루비신을 봉입할 수 있는 능력이 없기 때문에 방출이 모두 일어나 항암효과가 사라졌기 때문이다. 한편, 리포솜이 결합된 키토산 겔은 종양의 부피가 일정한 비율로 감소하였고, 이식 13일 후에도 부피가 다시 증가하지 않았다. 이것은 독소루비신이 방출 제어 효과를 갖는 리포솜에 봉입하여 지속적인 방출이 일어났기 때문이다. 결과적으로 종양 내부에 주사한 리포솜을 결합시킨 키토산 겔은 독소루비신의 방출을 제어하여 지속적인 항암효율을 향상시키고 있음을 관찰하였다.

## 결론

본 연구에서는 약물의 지속적 방출효과와 항암 효과를 증가시키기 위하여 음이온성 리포솜을 키토산 겔에 결합시켰다. 리포솜이 결합된 키토산 겔은 형광 주사 현미경을 통하여 리포솜이 파괴되지 않고 키토산 겔에 결합되어 있음을 확인하였다. 리포솜이 결합된 키토산 겔은 흑색종이 이식된 쥐에 종양내부로 피하 주사하여 독소루비신의 항암 효율을 증가시켰으며, 독소루비신이 외부로 급격히 방출되는 것을 막기 위해 음이온성 리포솜에 봉입하여 지속적인 항암효과를 확인하였다. 따라서 리포솜에 분산시킨 키토산 겔은 일반적으로 2~5 mg/kg의 농도로 주사하는 독소루비신의 농도를 12 mg/kg으로 주사하여도 생존율과 부작용이 최소화되었고 항암효과를 지속시킬 수 있음을 관찰하였다. 따라서 리포솜이 결합된 키토산 겔은 지속적이고 높은 항암효과를 갖고 있는 지속-고착성 항암제제로 활용할 수 있음을 확인하였다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부 기능성 화합물질 개발 사업으로 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 문헌

- 1) J.M. Koziara, P.R. Lockman, D.D. Allen and R.J. Mumper, Paclitaxel nanoparticles for the potential treatment of brain tumors, *J. Control. Release*, **99**, 259-269 (2004).
- 2) R.T. Liggins and H.M. Burt, Paclitaxel-loaded poly(L-lactic acid) microspheres 3: blending low and high molecular weight polymers to control morphology and drug release,

- Int. J. Pharmaceutics*, **282**, 61-71 (2004).
- 3) R.E. Durand and N.E. LePard, Tumour blood flow influences combined radiation and doxorubicin, *Radiother. Oncol.*, **42**, 171-179 (1997).
  - 4) Y. Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Curr. Opin. Colloid. In.*, **6**, 66-77 (2001).
  - 5) W.M. Awara, A.E. El-Sisi, M.E. El-Sayad and A.E. Goda, The potential role of cyclooxygenase-2 inhibitors in the treatment of experimentally-induced mammary tumour: does celecoxib enhance the anti-tumour activity of doxorubicin?, *Pharm. Res.*, **50**, 487-498 (2004).
  - 6) W.L. Lu, X.R. Qi, Q. Zang, R.U. Li, G.L. Wang, R.J. Zhang and S.L. Wei, A Pegylated Liposomal Platform: Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Toxicity in Mice Using Doxorubicin as a Model Drug, *J. Pharmacol. Sci.*, **95**, 381-389 (2004).
  - 7) R. Krishna, M.S. Webb, G.ST. Onge and L.D. Mayer, Liposomal and Nonliposomal Drug Pharmacokinetics after Administration of Liposome-Encapsulation Vincristine and Their Contribution to Drug Tissue Distribution Properties, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **298**, 1206-1212 (2001).
  - 8) R.E. Eliaz and F.C. Szoka, Liposome-encapsulated Doxorubicin Targeted to CD44: A Strategy to Kill CD44-overexpressing Tumor Cells, *Cancer Res.*, **15**, 2592-2601 (2001).
  - 9) Z. Liu, R. Cheung, X.Y. Wu and J.R. Ballinger, A study doxorubicin loading onto and release from sulfopropyl dextran ion-exchange microspheres, *J. Control. Release*, **77**, 213-224 (2001).
  - 10) D. Needham, G. Anyarambhatla, G. Kong and M. W. Dewhirst, A New Temperature-sensitive Liposome for Use With Mild Hyperthermia: Characterization and Testing in a Human Tumor Xenograft Model, *Cancer Res.*, **60**, 1197-1201 (2000).
  - 11) Y.J. Park, D.E. Nam, D.H. SEO, H.D. Han, T.W. Kim, M.S. Kim and B.C. Shin, Surface Properties of Liposomes Modified with Poly(ethylenimine), *Polymer(Korea)*, **28**, 502-508 (2004).
  - 12) A.S. Derycke and P.A. de Witte, Adv. Liposome for photo. therapy, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **56**, 17-30 (2004).
  - 13) S. Simoes, J.N. Moreira, C. Fonseca, N. Duzgunes and M.C.P. de Lima, On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **56**, 947-965 (2004).
  - 14) C.A. Lorenzo, A. Concheiro, A.S. Dubovik, N.V. Grinberg, T.V. Burova and V.Y. Grinberg, Temperature-sensitive chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) interpenetrated networks with enhanced loading capacity and controlled release properties, *J. Control. Release*, In press, 13 (2004).
  - 15) E.R. Garipey, M. Shive, A. Bichara, M. Berrada, D.L. Garrec, A. Chenite and J.C. Leroux, Eroup. A thermosensitive chitosan-based hydrogel for the local delivery of paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 53-63 (2004).
  - 16) Y. Yuyama, M. Tsujimoto, Y. Fujimoto and N. Oku, Potential usage of thermosensitive liposomes for site-specific delivery of cytokines, *Cancer Lett.*, **155**, 71-77 (2000).
  - 17) D. Needlhan and M.W. Dewhirst, The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors, *Adv. Drug. Deliver. Rev.*, **53**, 285-305 (2001).
  - 18) M. Rodolfo, M. Daniotti and V. Vallacchi, Genetic progression of metastatic melanoma, *Cancer Lett.*, **214**, 133-147 (2004).
  - 19) J. Berger, M. Reist, A. Chenite, O.F. Baeyens, J.M. Mayer and R. Gurny, Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application, *Int. J. Pharmaceutics*, In press, (2004).
  - 20) E.R. Garipey, G. Leclair, P. Hildgen, A. Gupta and J.C. Leroux, Thermosensitive chitosan based hydrogel containing liposomes for the delivery of hydrophilic molecules, *J. Control. Release*, **82**, 373-383 (2002).
  - 21) Y.S. Choi, S.B. Lee, S.R. Hong, Y.M. Lee, K.W. Song and M.H. Park, Studies on gelatin-based sponges. Part : A comparative study of cross-linked gelatin/alginate, gelatin/hyaluronate and chitosan/hyaluronate sponges and their application as a wound dressing in full-thickness skin defect of rat, *J. Mater. Sci.*, **12**, 67-73 (2001).
  - 22) M.G. Jeong, D.S. Kim, Y.H. Choi, T.W. Son, O.K. Kwon and H.S. Lim, Preparation and Properties of Poly(vinyl alcohol)/Chitosan Blend Films, *Polymer(Korea)*, **28**, 253-262 (2004).
  - 23) H.D. Han, D.E. Nam, D.H. Seo, T.W. Kim and B.C. Shin, Preparation and Biodegradation of Thermosensitive Chitosan Hydrogel as a Function of pH and Temperature, *Macromol Res.*, **12**, 507-511 (2004).
  - 24) Y. Barenholz, Liposome application: problems and prospects, *Curr. Opin. Colloid In.*, **6**, 66-77 (2001).
  - 25) Y.S. Park, H.D. Han, S.U. Hong, S.S. Kim and B.C. Shin, Temperature-Dependent Release of Drug from Copolymers of N-Isopropylacrylamide Containing Liposome, *Polymer(Korea)*, **28**, 59-66 (2004).
  - 26) D.E. Nam, H.D. Han, Y.J. Park, Y.A. Kim and B.C. Shin, Release Profile and Stability of Anionic Liposome, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **34**, 305-310 (2004).