

소수성 항암제의 전달체로 응용하기 위한 리소콜릭산이 결합된 키토산 나노입자의 제조와 특성

박준규* · 김동곤 · 최창용 · 정영일 · 김명렬 · 장미경[†] · 나재운[†]

순천대학교 공과대학 고분자공학과, * (주)바이오알파
(2008년 1월 21일 접수, 2008년 2월 20일 채택)

Preparation and Characterization of Lithocholic Acid Conjugated Chitosan Oligosaccharide Nanoparticles for Hydrophobic Anticancer Agent Carriers

Jun-Kyu Park, Dong-gon Kim, Changyong Choi, Young-li Jeong,
Myung-Yul Kim, Mi-Kyeong Jang[†], and Jae-Woon Nah[†]

Department of Polymer Science and Engineering, Suncheon National University,
Suncheon, Jeonnam 540-742, Korea

*Bioalpha Co., Seongnam, Gyeonggi-do 462-120, Korea

(Received January 21, 2008; Accepted February 20, 2008)

초록 : 키토산에 기초한 소수성 항암제의 전달체를 개발하기 위하여, 젯산염 키토산을 소수성기로서 담즙산 중의 하나인 리소콜릭산(lithocholic acid, LA)을 이용하여 화학적으로 개질하였다. LA가 결합된 키토산 나노입자(COS-LA)의 물리화학적 특성을 ¹H-NMR, dynamic light scattering(DLS) 그리고 spectrofluorophotometer를 이용하여 조사하였다. 항암제로써 파클리탁셀(paclitaxel)이 봉입된 CLs-Tx(COS-LA-paclitaxel) 나노입자는 투석 방법을 이용하여 제조되었고 HPLC를 통하여 약물의 봉입량을 측정하였다. DLS를 이용하여 측정된 파클리탁셀이 봉입된 나노입자의 크기는 약 300 nm를 나타내었다. 또한 임계미셀형성(CMC) 농도는 LA의 치환도에 의존한다는 것을 확인하였다. 이상의 결과로부터 본 연구에서 제조한 LA가 결합된 젯산염 키토산이 파클리탁셀 전달체로서 매우 높은 응용 가능성을 나타내고 있음을 확인하였다.

Abstract : To develop carriers of hydrophobic anticancer agents based on chitosan, chitosan oligosaccharide lactate (COS) was chemically modified with lithocholic acid (LA) which is one of the bile acids as a hydrophobic group. The physicochemical properties of the lithocholic acid conjugated chitosan nanoparticles (COS-LA) were investigated using ¹H-NMR spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) and spectrofluorophotometer. COS-LA-paclitaxel (CLs-Tx) nanoparticles loading paclitaxel as an anticancer agent were prepared by a dialysis method and its loading efficiency was measured through HPLC. On the basis of DLS results, the estimated particle sizes of CLs-Tx were around 300 nm. Also, the critical micelle concentration (CMC) was proven to be dependent on the degree of substitution of lithocholic acid. It showed that the CLs-Tx has the superior potential for the application as a paclitaxel carrier.

Keywords : chitosan, nanoparticle, anticancer agent, lithocholic acid, paclitaxel.

서 론

키토산(chitin), 키토산(chitosan)은 천연에 존재하는 다당류 고분자 물질로서 최근에 천연 기능성 소재로 주목을 받고 있는 재료이다. 키토산은 게나 새우 등 갑각류의 외피에 존재하는 키토산을 염기성 조건에서 탈-아세틸화시켜 얻어지는 물질로서, 단량체인 글루코사민이 β-1,4로 결합된 천연고분자이다.¹ 이러한 키토산은 그 자체로서 혈중 콜레스테롤 감소 및 지방 흡수 저해 효과, 항암 효과, 면역력 강화 효과, 항 당뇨 효과, 상처 치료 효과, 그리고 항균 활성 등의 다양한 생리활성을 갖고 있다.^{2,3} 특히 구강, 비강, 그리고 장강 등의 점액질 층

에 결합하여 약물의 흡수를 촉진시키는 효과를 나타내기 때문에 단백질 약물이나 난흡수성 약물의 경우 및 여러 제형에 있어서 흡수 촉진제로의 응용이 활발하게 연구되고 있다.⁴ 또한 수용액 하에서 양이온성을 띠기 때문에 음이온성을 띠는 유전자 물질과 복합체를 형성할 수 있고, 이를 이용하는 키토산 또는 키토산 유도체의 유전자 전달체로의 연구가 활발히 진행되고 있다.⁵⁻⁷ 또한 키토산은 매우 우수한 생체 적합성을 갖는 천연고분자로 알려져 있으며, 양이온성 고분자로서 poly(L-lysine), poly(ethylene imine) 등의 고분자에 비하여 매우 낮거나 무시할 수 있는 정도의 세포독성을 나타내는 물질로 알려진다.^{8,9} 그 외에도 생체 내 효소에 의하여 단량체인 glucosamine으로 분해되는 생분해성 고분자이다. 뿐만 아니라 매 고분자의 단위마다 한 개의 1차 아민기(-NH₂)를 갖고 있기 때문에 화학적 수식이 용이한 장

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jwnah@sunchon.ac.kr, jmk8856@sunchon.ac.kr

점을 갖고 있다. 따라서 이러한 특성을 이용한 약물 전달체, 조직공학용 세포 외 기질 등 활발한 생의학적인 응용이 시도되고 있다.¹⁰

생분해성과 생체적합성 등의 특성을 가진 락타이드-글리콜라이드 공중합체(PLGA) 등이 약물 전달체로서 다양한 분야에 이용되고 있으며,¹¹ 또한 천연고분자 물질인 키토산의 화학적 개질에 있어서의 이러한 특성을 이용하여 여러 가지 기능을 도입함으로써 약물전달체로 그 응용 가능성을 확대시킬 수 있다는 장점을 가지고 있다. 특히 소수성 약물을 담지하기 위한 소수성 기능성기로서의 담즙산은 생체 물질로서 간에서 만들어지며, 인체 내에서 콜레스테롤 및 지방을 유화시켜 소화시키기 좋게 만들어 주는 일종의 세정제와 같은 역할을 한다. 또한 물과 같은 수용액에서 자가적으로 이루어져 소수성 중심을 가진 미셀을 형성함으로써 소수성 약물을 효율적으로 담지할 수 있는 전달체로 응용할 수 있다. 이러한 목적을 가진 담즙산의 종류는 담즙산의 구조 중에 포함되어 있는 히드록시기의 위치, 입체적 배위 수, 결사슬 구조 등의 차이에 따라 나누어진다. 결사슬 구조의 히드록시기수에 따라 리소콜릭산(lithocholic acid), 데옥시콜릭산(deoxycholic acid), 콜릭산(cholic acid) 등으로 나누어지며 약리작용이 우수하다는 장점을 가지고 있다. 히드록시기의 수가 적을수록 더 소수성을 가지며, 본 연구에서는 이 중의 가장 소수성이 강한 리소콜릭산을 가지고 실험을 진행하였다. 또한 소수성 중심에 봉입하기 위한 소수성 약물로 사용할 수 있는 대표적 항암제인 파클리탁셀은 1960년대 미국 국립암연구소에서 주목나무 껍질로부터 추출한 물질로서 난소암, 유방암, 폐암 등에 효과가 우수한 약물로 알려져 있다. 그러나 파클리탁셀은 물에 대한 용해도가 0.1 µg/mL로 매우 낮아서 주사제로 사용 시 cremophor EL과 에탄올에 녹여 사용해야만 한다.¹² 이러한 형태의 처방은 사용되는 용매에 의한 혈관확장, 호흡곤란, 신장 및 신경 독성 등과 같은 심각한 부작용을 유발하게 된다.¹³⁻¹⁵

본 연구에서는 천연고분자로서 생분해성, 생체적합성, 무독성을 가진 키토산과 소수성을 갖는 담즙산 중의 하나인 리소콜릭산을 이용하여 친수성과 소수성을 갖는 양친성 키토산 유도체를 합성하여 약물을 봉입할 수 있는 담체를 제조하고, 이 담체에 소수성 약물인 파클리탁셀을 유기용제의 사용 없이 입자 내에 봉입시킴으로써 파클리탁셀의 증류수에 대한 용해성을 향상시키고 인체 내 부작용을 줄인 새로운 약물전달체의 제조 및 항암 활성을 향상시키고자 하였다.

실 험

재료. 젯산염 키토산(chitosan oligosaccharide lactate, COS)은 키토라이프(Kittolife Co. Korea)에서 공급받아 환외여과법을 이용하여 분자량 별로 분리한 다음 평균분자량 9 kDa의 젯산염 키토산을 사용하였다. 담즙산의 일종인 리소콜릭산(lithocholic acid, LA)과 3-dicyclohexyl carbodiimide(DCC), *N*-hydroxy succinimide(NHS), *L*-lactic acid, *D*-mannitol, 그리고 pyrene 등은 Sigma사(USA)에서 구입하여 사용하였으며, 반응용매인 tetrahydrofuran(THF)는 lithium aluminium hydride를 이용하여 48시간 동안 건조시킨 후 증류하여 사용하였다. 그 외에 실험에 사용된 용매인 *n*-hexane, benzene, diethyl ether 등은 일급 및 특급시약을 이용하여 정제 없이 사용하였다.

리소콜릭산의 활성화(LA-NHS). LA가 결합된 키토산 올리고당

(COS)의 제조는 LA의 카복시산과 COS의 1차 아민과의 반응을 통하여 이루어졌다. 이 반응의 효율을 증가시키기 위하여 LA 내의 카복시산을 NHS를 이용하여 활성화한 후 반응에 사용하였으며 LA의 활성화 반응은 다음과 같이 수행하였다. 계산된 양의 LA와 NHS(2.1 배 과량) 그리고 DCC(2배 과량)를 무수 THF 100 mL에 녹인 후, 이 용액을 질소 기류 하에서 24시간 동안에 충분히 교반시키며 반응시켰다. 반응 후 생성된 dicyclohexylurea(DCU)는 종이필터를 이용하여 제거하고 반응액을 감압 하에서 농축한 후 과량의 핵산(10배 이상, v/v)에 침전시켜 활성화된 LA-NHS를 얻었다. 얻어진 생성물을 진공건조한 후 벤젠에 녹여 핵산에 침전시키는 과정을 추가로 수행하여 생성물의 순도향상 및 불순물을 제거하였다. 최종 생성물은 진공상태에서 48시간 동안 건조하여 분말형태로 얻었고, 반응도 및 순도를 확인하였다.

LA와 COS 유도체(COS-LAs)의 합성 및 나노입자의 제조. LA와 COS의 반응은 LA-NHS와 COS의 1차 아민(-NH₂ in C2 position) 간의 결합을 통하여 이루어졌다. 간략한 반응과정은 다음과 같다. COS 9 300 mg을 15 mL의 증류수/DMSO 혼합 용매(10/ 90, v/v)에 녹인 후, 이 용액에 LA-NHS를 각각 COS9의 단량체에 대해서 5, 10, 20%의 몰비가 되도록 첨가하여 상온에서 24시간 동안 반응을 진행하였다. 반응물은 10배 과량의 diethyl ether와 아세톤의 혼합용매(2 : 1, v/v)에 침전시킨 후 원심분리를 통하여 회수하였다. 회수된 침전물을 순수한 아세톤에 분산시켜 반응물 내의 미반응 LA 및 불순물을 용해시킨 후 순수한 반응물을 원심분리를 통하여 회수하였다. 회수된 반응물을 물에 용해시킨 후 투석(MWCO 3500)을 통하여 LA가 결합된 COS-LAs 나노입자를 제조하였다. 나노입자의 제조 후 용액을 1.2 µm의 공극을 갖는 필터를 통과시켜 크기가 큰 입자를 제거한 후 동결건조를 통하여 고체 형태의 COS-LAs 나노입자를 얻었다.

¹H-NMR 스펙트럼 분석. ¹H-NMR spectrometer(Bruker, 400 MHz)를 이용하여 LA와 COS 유도체의 구조 및 LA의 치환도(degree of substitution, DS)를 구하였다. 이때 사용된 NMR 용매로는 D₂O/DMSO의 혼합용매(1 : 3, v/v)를 사용하였다.

나노입자 크기 및 분포 측정. LA가 결합된 COS-LA 나노입자의 입자크기와 분포는 광산란법(dynamic light scattering, DLS, OTSUKA ELS-8000)을 이용하여 측정하였다. 측정을 위하여 제조된 나노입자를 1 mg/mL의 농도로 증류수에 분산시킨 후 산란 각도는 90°로 고정하고 He-Ne 레이저로 632.8 nm에서 측정하였다.

입체미셀형성농도(CAC) 측정. LA가 결합된 COS-LA의 경우 한 분자에 친수성 및 소수성을 갖는 양친성 물질로서 수용액 하에서 자가 응집에 의한 나노입자를 형성하게 된다. 이러한 자가 응집 경향은 pyrene을 형광 염료로 사용하여 농도에 따른 pyrene의 광학적 거동의 관찰을 통하여 조사하였다. 실험을 위하여 pyrene를 아세톤에 6 × 10⁻⁵ M이 되도록 제조하고 이를 증류수를 첨가하여 최종농도가 1.2 × 10⁻⁶ M이 되도록 하였다. 이 용액을 40 °C에서 2시간 동안 감압 하에서 아세톤을 제거하였다. 이 pyrene 용액과 다양한 농도의 나노입자의 용액 (1.0 × 10⁻⁵ ~ 1 mg/mL)을 1 : 1의 비율로 혼합하여 pyrene의 최종 농도가 6.0 × 10⁻⁷ M이 되도록 하였다. 이 용액을 60 °C에서 약 3시간 방치한 후 형광광도계를 이용하여 형광특성을 관찰하였다. 형광 발광 분석은 흡수과장 390 nm에서 측정하였다. 측

정된 형광 스펙트럼과 발광 파장의 이동을 이용하여 임계미셀형성 농도(critical aggregation concentration, CAC)를 측정하였다.

파클리탁셀이 봉입된 나노입자의 제조. COS-LA 나노입자는 소수성 중심 및 친수성 껍질의 구조를 띠게 되며, 이 나노입자의 소수성 중심에 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)을 이용하여 소수성 항암제인 파클리탁셀을 봉입하였다. 약물 봉입 실험은 다음과 같이 수행하였다. COS-LAs 20 mg을 증류수와 DMSO의 혼합용매(2 : 8.5, v/v)에 용해시킨 후 파클리탁셀 4 mg을 DMSO 0.5 mL에 녹여 첨가한다. 이 혼합용액을 증류수 200 mL에 초음파를 조사하며 천천히 적하시킨 후 봉입에 사용된 유기용매인 DMSO는 투석(투석막 MWCO : 3500 Da)을 통하여 24시간 동안 제거하였다. 투석방법을 통하여 유기용매를 제거한 후 용액을 한외 여과막 장치를 이용하여 농축(대략 10 mL, 한외 여과막 MWCO : 10 kDa)하고 동결건조를 통하여 파클리탁셀이 봉입된 키토산 나노입자(COS-LAs-paclitaxel, CLs-Tx)를 얻었다. 동결건조 후 얻어진 나노입자를 1 mg/mL이 되도록 증류수에 분산시킨 후 0.8 µm 주사기 필터를 이용하여 거대 응집 입자들을 제거하였다. 거대입자 제거 후 이 용액을 이용하여 파클리탁셀의 봉입효율 및 나노입자의 크기 및 분포를 측정하였다. 최종적으로 이 용액의 동결건조를 통하여 최종 산물을 얻었다. 동결건조 시 재분산을 용이하게 위해서 용액 내 파클리탁셀 2 mg 당 50~100 mg의 D-mannitol를 혼합한 후 동결건조를 하였다.

입자크기 및 분포 측정. 파클리탁셀이 봉입된 CLs-Tx 나노입자의 입자크기와 크기 분포는 제조되어진 나노입자를 1 mg/mL의 농도로 잘 분산시킨 후 OTSUKA ELS-8000을 이용하여 동적 광산란법으로 측정하였다. 측정 시 산란 각도는 90°로 고정하고 He-Ne 레이저로 632.8 nm에서 측정하였다.

액체크로마토그래피(High Performance Liquid Chromatography) 측정. CLs-Tx 나노입자 내에 있는 파클리탁셀 봉입량과 봉입효율은 HPLC(Shimadzu, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석을 위하여 시료 내 용매의 조성은 40% acetonitrile/60% H₂O로 맞춘 후 동일 조건 하에서 적절한 희석을 통하여 제조하였다. 분석은 1 mL/min의

유속으로 25 °C에서 진행하였고, 약물의 검출은 UV 검출기를 이용하여 227 nm 파장에서 측정하였다. 이때 사용된 컬럼은 C₁₈ 컬럼(4.6 × 250 mm)으로 입자 크기가 5 µm인 것을 사용하였다. 이동상은 조성을 다음과 같이 변화시키며 분석하였으며 과정은 다음과 같다: 34% acetonitrile/66% H₂O(5분)→34~58% acetonitrile(linear gradient, 추가 16분간)→58~70% acetonitrile(linear gradient, 추가 2분간)→70~34% acetonitrile(linear gradient, 추가 4분간)→34% acetonitrile(추가 5분간). 봉입량의 정량화는 파클리탁셀의 농도와 그에 따른 특성 피크의 면적 변화를 이용하여 검량선(standard curve)을 작성한 후 이를 이용하여 시료 내 파클리탁셀의 농도를 계산하였다. 또한 약물 봉입효율 및 약물함량은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

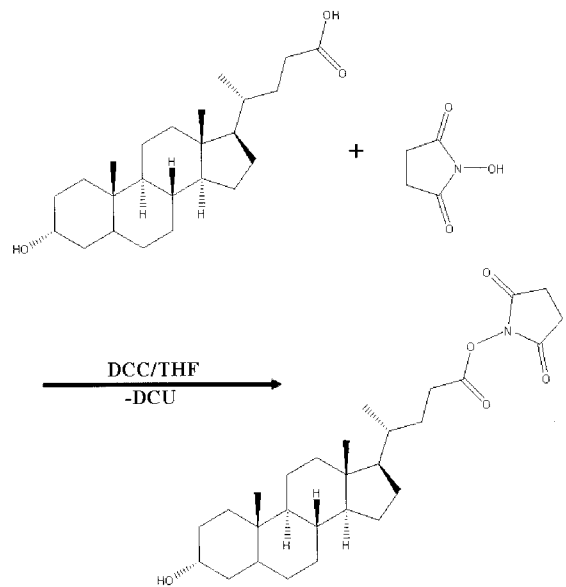


Figure 1. Scheme of lithocholic acid (LA) activation.

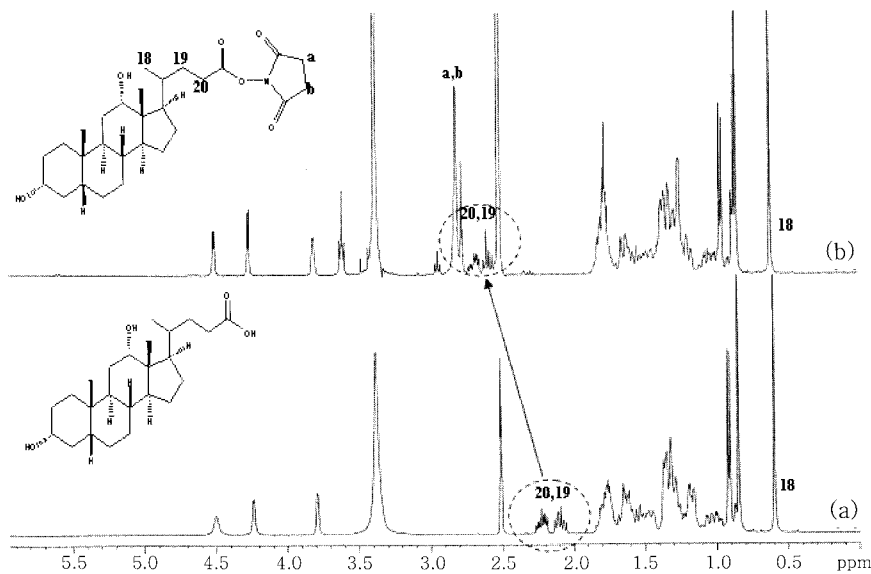


Figure 2. ¹H-NMR spectra of activated LA with LA (a) and NHS (b).

약물함량 = (나노입자 내 약물량) / (전체 나노입자 중량) × 100
 봉입효율 = (나노입자 내 약물 총량) / (초기 약물 사용량) × 100

결과 및 토론

리소콜릭산(LA)의 활성화. 리소콜릭산(LA)과 키토산올리고당(COS) 간 반응의 효율성을 높이기 위한 LA의 활성화 과정은 Figure 1에 도식화하여 나타내었다. 또한 활성화 전, 후 LA의 대표적 ¹H-NMR 스펙트럼(LA 및 LA-NHS)은 Figure 2(a)와 (b)에 나타내었다. Figure 1에 나타낸 바와 같이 LA의 활성화 과정은 DCC를 반응 촉매로 이

용하여 LA의 카복시산을 NHS ester의 형태로 변화시키는 과정으로써, 이 반응의 전하율 및 최종 산물의 순도는 ¹H-NMR 스펙트럼을 통하여 확인할 수 있었다. Figure 2(a)로부터 반응의 전하율을 계산하기 위하여 사용한 LA의 특성 피크로는 2.0~2.3 ppm 부위에 나타나는 LA 내에 있는 19 및 20번 메틸(CH₃, 카복시산 옆 두 개)기에 의한 피크를 사용하였으며, Figure 2(b)에 나타낸 바와 같이 활성화 과정 후 2.0~2.3 ppm 부근의 19 및 20번 메틸기에 의한 수소 피크가 2.65~2.85 ppm 부근으로 이동하였음을 확인함으로써 LA 내의 카복시산이 NHS-ester로 전환되었음을 확인하였다. 또한 활성화 과정에서 과량의 NHS를 사용하였으며 이때 사용된 NHS의 일부가

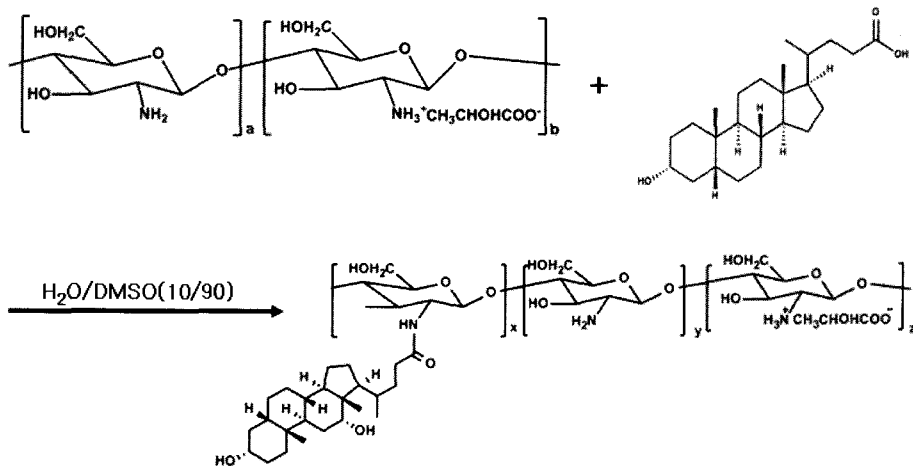


Figure 3. Scheme of bile acid graft COS.

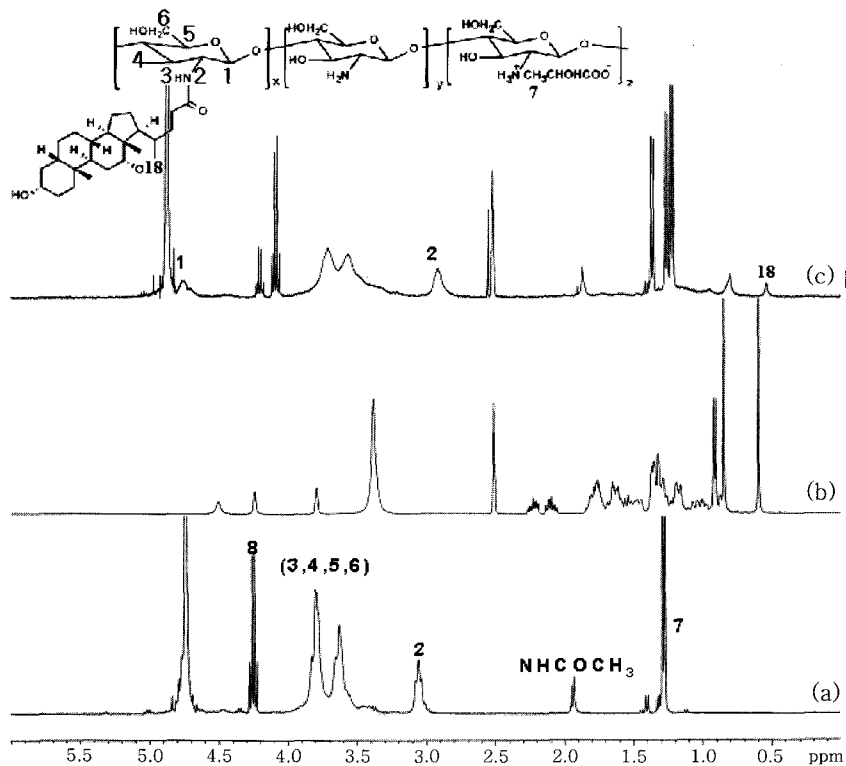


Figure 4. ¹H-NMR spectra of COS (a), LA (b), and COS-LA (c).

정제과정을 통하여 완벽히 제거되지 않고 남아있는 것을 2.85~2.95 ppm 부근에서 NHS 특성 피크(a), (b)가 나타남으로써 확인할 수 있었다. 따라서 4.6 ppm의 3-OH의 -CH 피크 또는 0.64 ppm의 18-CH₃ 피크의 적분값을 이용하여 최종 산물의 순도를 계산할 수 있었다(Figure 2(b)). 최종 활성화된 LA-NHS의 순도는 중량 기준으로 85~90%를 나타내었음을 확인하였다.

LA가 결합된 COS의 합성 및 분석. 활성화된 LA와 COS의 반응은 Figure 3에 나타난 바와 같이 중류수/DMSO(1/9, v/v)의 혼합 용매를 이용하여 진행하였다. 초기 반응물인 COS(Figure 4(a)) 및 LA(Figure 4(b)) 그리고 반응 후 얻어진 생성물의 화학 구조 및 LA 치환도는 ¹H-NMR 스펙트럼(Figure 4(c))을 이용하여 COS의 특성 피크인 2번 위치의 -CH를 사용하였고, LA의 특성 피크로는 18-CH₃ 피크의 각 적분값을 이용하여 LA의 치환도를 구하였으며, 결과는 Table 1에 나타내었다. Table 1에 나타난 바와 같이 LA의 치환도는 초기반응물의 투여량에 의존한다는 것을 알 수 있었다. LA를 단량체 대비 5% 반응시킨 CL05의 경우 각각 4.5의 치환도를 나타내었다. 또한 초기 반응비 20%인 CL20의 경우 15.9%의 치환도를 나타내었다. 따라서 LA의 활성화를 이용한 COS의 화학적 수식 과정이 성공적으로 진행되었음을 확인할 수 있었다.

LA 결합된 COS-LAs 나노입자의 분석. LA를 이용하여 화학적으로 수식된 COS9의 경우 분자 내에 친수성을 나타내는 COS와 소수성을 나타내는 LA가 함께 공존하는 양친성 물질의 특성을 나타내게 된다. 이러한 양친성 물질의 경우 수용액 하에서 소수성 LA간의 소수성 상호작용을 통하여 자가 응집 형태의 나노입자를 형성하게 된다. COS-LA 나노입자의 크기 및 분포는 동적 광산란을 이용하여 측정하였고 그 결과를 Table 1 및 Figure 5에 나타내었다. Figure 5에 나타난 바와 같이 제조된 나노입자의 경우 매우 좁은 입자크기 분포를 나타내었으며, CL05의 경우 약 300 nm의 크기를 나타내었다. 그

외의 LA 결합 COS-LA 나노입자의 경우 대략적으로 295~292 nm 정도의 입자 크기를 보였다.

LA가 결합된 COS의 경우 양친성 특성으로 인하여 수용액 하에서 농도에 의존하는 자가 응집 경향을 나타낸다. 이러한 농도 의존 자가 응집 특성은 pyrene을 형광 표지로 이용한 형광특성 분석을 이용하여 조사할 수 있다. Pyrene의 형광분석은 소수성을 나타내는 pyrene 분자가 수용액 하에서 선택적으로 소수성 미세 환경(microenvironment)에 침투하여 수용액 하에서 보다 매우 강한 형광특성을 나타내는 원리를 이용하는 분석법이다. 또한 이러한 pyrene의 형광특성 변화는 양친성 물질의 농도에 매우 밀접하게 반응한다. 이는 임계미셀 형성 농도(CAC) 이상의 농도에서 양친성 물질이 자가 응집을 통하여 소수성 미세 환경을 구성하기 때문으로 생각된다. 따라서 CAC 이하의 농도에서는 특별한 pyrene의 형광특성을 나타내지 않는 반면, CAC 이상의 농도에서는 매우 강한 형광특성 및 pyrene의 특성 피크의 이동을 수반한다. 본 실험에서 COS-LAs의 경우 CAC 이하의 농도에서는 335 nm에서 가장 강한 특성 피크를 그리고 이러한 특성 피크는 농도의 증가와 더불어 고농도에서는 339 nm로 이동하였다.

Table 1. Characterization of CLs Nanoparticles

Samples	Feed ratio (%)	DS(%) ^a	d(nm) ^b	CAC(g/L) ^c
CL05	Lithocholic acid (LA)	5	4.5	300.9
CL10		10	8.2	295.7
CL20		20	15.9	292.6

^aCalculated based on ¹H-NMR results. ^bParticle size measured by DLS at 25 °C (Concentration of 1 mg/mL). ^cCAC measured by spectrofluorophotometer (pyrene).

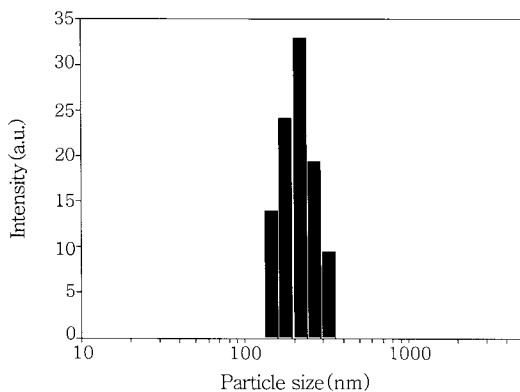


Figure 5. Particle size and distribution of CL10 nanoparticle.

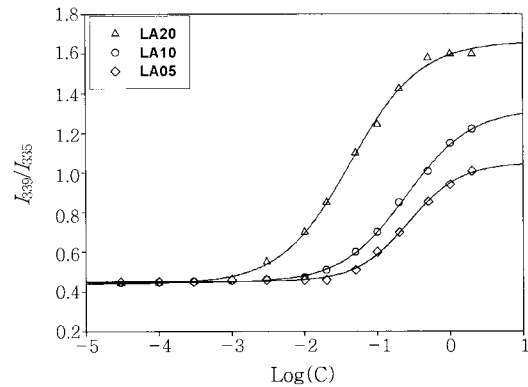


Figure 6. CAC of CLs nanoparticles by spectrofluorophotometer (pyrene).

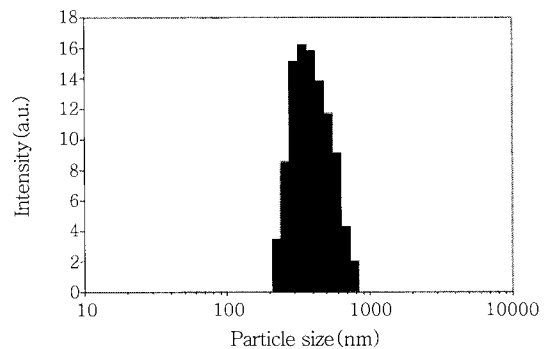


Figure 7. Particle size and distribution of CL10-Tx.

Table 2. Characterization of Paclitaxel Loaded CLs Nanoparticles

Samples	Carrier Wt(mg)	Paclitaxel (mg)	NP size (nm)	Loading efficiency (%)	Drug content (%)
CL05-Tx	20	4	355	67.0	13.4
CL10-Tx	20	4	330	68.5	13.7
CL20-Tx	20	4	319	58.5	11.7

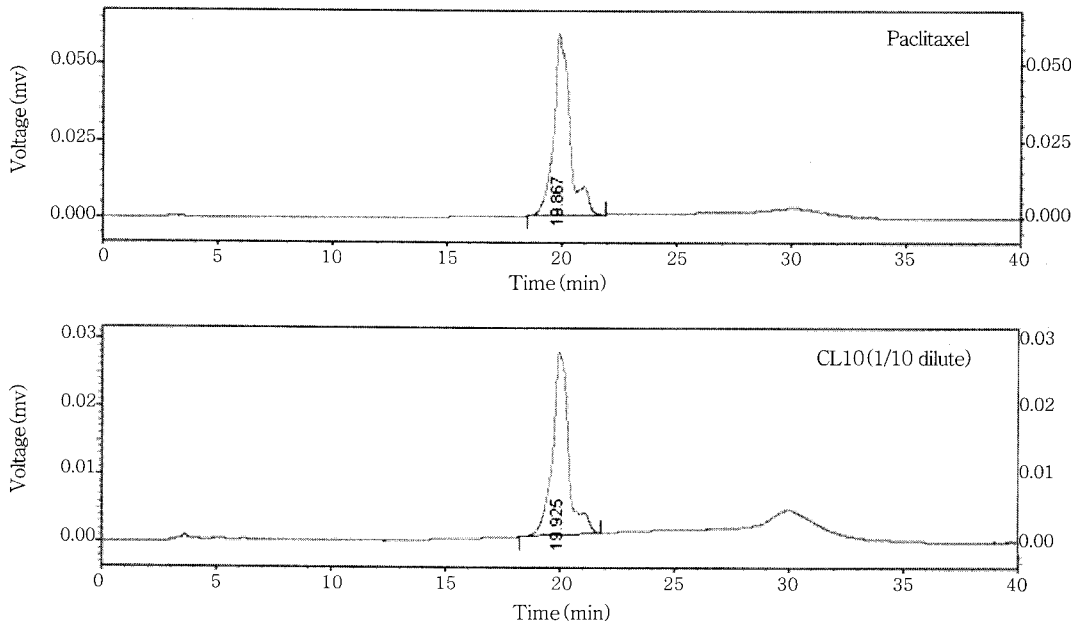


Figure 8. HPLC chromatograms.

이러한 특성 피크의 강도비를 이용하여 COS-LAs의 CAC 값을 구하였다. Figure 6에 나타낸 바와 같이 특성 피크의 intensity ratio인 I_{339}/I_{335} 의 경우 저농도에서는 일정한 값을 보이나 농도의 증가와 더불어 급격한 증가 현상을 보이게 된다. 일반적으로 intensity ratio의 급격한 증가가 일어나는 지점을 CAC 값으로 설정한다(Figure 6). 따라서 Figure 6의 결과를 이용하여 측정된 COS-LAs의 CAC 값을 Table 1에 나타내었다. COS-LAs의 경우 0.0018~0.0385 g/L의 CAC 값을 구할 수 있었다. 또한 LA의 치환도 증가에 따른 소수성의 증가에 의하여 CAC 값이 감소함을 확인할 수 있었다.

파클리탁셀이 봉입된 CLs-Tx 나노입자의 분석. 양친성 물질 또는 양친성 나노입자를 이용하여 소수성 약물을 담지하는 경우 소수성 약물의 선택적인 소수성 나노입자 내부로의 침투를 통하여 이루어진다. 이러한 약물담지 나노입자의 제조에는 다양한 방법들이 사용될 수 있다. 본 실험에서는 용매증발법(solvent evaporation method)을 변형시킨 방법을 사용하였다. 이는 사용된 유기용매인 DMSO가 매우 낮은 휘발성 및 높은 비점을 갖기 때문에 유기용매의 제거를 위하여 투석을 이용하였다.

제조된 파클리탁셀 담지 나노입자의 입자크기 및 분포는 동적 광산란법을 이용하여 측정하였고, 결과는 Figure 7과 Table 2에 나타내었다. Figure 7에서 나타낸 바와 같이 약물담지 나노입자의 경우, 단분포(unimodal) 형태의 분포를 나타내었다. 또한 약물담지에 따라 나노입자의 크기가 증가하여 300~350 nm의 크기를 갖는 나노입자가 형성됨을 확인할 수 있었다. 약물담지 나노입자의 경우 약물의 봉입효율 및 그 봉입량이 매우 중요한 요인으로 사료된다. 따라서 파클리탁셀이 담지된 CLs-Tx를 HPLC를 이용한 분석을 통하여 약물의 봉입효율 및 봉입량을 측정하였다. Figure 8에 나타낸 바와 같이 파클리탁셀 및 CL10-Tx 나노입자에 봉입된 파클리탁셀이 동일한 HPLC 분석 조건하에서 동일한 머무름 시간 및 피크의 형태를 보이는 것을 확인할 수 있었으며, 이를 이용하여 측정된 파클리탁셀 담

지 CLs-Tx 나노입자의 봉입효율 및 약물 봉입량은 Table 2에 나타내었다. 따라서 LA가 결합된 COS-LA 나노입자의 경우 그 우수한 약물 봉입효율 및 약물담지 능력에 기인하여 매우 유용한 파클리탁셀 전달체로 사용할 수 있음을 약물담지 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

결론

본 연구에서는 평균 분자량 9000을 나타내는 COS와 소수성 담즙산인 리소콜릭산(LA)을 이용하여 화학적으로 수식한 후 이를 이용하여 파클리탁셀 전달체로서의 가능성을 조사하였다. LA가 결합된 COS-LA 나노입자의 경우 분자 자체의 양친성 특성에 의하여 수용액 하에서 자기조립형 나노입자를 형성하는 것을 확인하였고 그 크기는 약 300 nm 정도인 것을 확인할 수 있었다. 또한 임계미셀형성 농도의 경우 LA의 치환도에 의존한다는 것을 pyrene을 이용한 형광분석을 통하여 확인하였다. 이러한 COS-LA 나노입자를 이용하여 변형된 용매증발법을 통해 항암제인 파클리탁셀이 담지된 CLs-Tx 나노입자를 제조하였고 제조된 나노입자의 분석을 통하여 CLs-Tx 나노입자가 매우 우수한 약물담지 효능 및 봉입량을 갖는다는 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 CLs-Tx 나노입자가 항암제의 부작용 및 항암활성을 향상시키기 위한 파클리탁셀의 전달체로 사용될 수 있음을 확인할 수 있었다.

참고 문헌

1. J. Nah and M. Jang, *J. Polym. Sci.; Part A: Polym. Chem.*, **40**, 3796 (2002).
2. I. Ikeda, M. Sugano, K. Yoshida, E. Sasaki, Y. Iwamoto, and K. Hatano, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 431 (1993).
3. R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Cabohydr.*

- Res.*, **8**, 433 (1987).
4. Y. Sawayanagi, N. Nambu, and T. Nagai, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 2507 (1983).
 5. W. Paul and C. P. Sharma, *S. T. P. Pharma Science*, **10**, 5 (2000).
 6. M. Lee, J. Nah, Y. Kwon, J. Koh, K. Ko, and S. W. Kim, *Pharmaceut. Res.*, **18**, 427 (2001).
 7. M. Jang, D. Kim, Y. Jeong, M. Jang, and J. Nah, *Polymer (Korea)*, **31**, 555 (2007).
 8. J. P. Behr, *Acc. Chem. Res.*, **26**, 274 (1993).
 9. E. Wagner and M. Cotton, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 705 (1993).
 10. T. Chandy and C. P. Sharma, *Art Cells Art. Org.*, **18**, 1 (1990).
 11. J. S. Park, J. C. Yang, S. H. Yuk, H. S. Shin, J. M. Rhee, M. S. Kim, H. B. Lee, and G. Khang, *Polymer (Korea)*, **31**, 189 (2007).
 12. V. Martin, *Semin. Oncol. Nurs.*, **9**, 2 (1993).
 13. N. Onetto, R. Canett, B. Winograd, R. Catane, M. Cougan, and J. Grechko, *J. Natl. Cancer Inst. Monographs*, **15**, 131 (1993).
 14. D. Mazzo, J. J. Nguyen Huu, S. Pagniez, and P. Denis, *Am. J. Health-Syst. Pham.*, **54**, 566 (1997).
 15. R. Gregory and A. F. Delisa, *Clin. Pharm.*, **12**, 401 (1993).