

5-Fluorouracil 전달을 위한 리포산이 결합된 키토산 공중합체

이선영 · 김영진[†]

충남대학교 공과대학 바이오응용화학과

(2011년 6월 24일 접수, 2011년 7월 6일 수정, 2011년 7월 13일 채택)

Lipoic Acid Conjugated Chitosan Copolymer for the Delivery of 5-Fluorouracil

Sun Young Lee and Young Jin Kim[†]

Department of Applied Chemistry and Biological Engineering, Chungnam National University,

220 Gung-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

(Received June 24, 2011; Resived July 6, 2011; Accepted July 13, 2011)

초록: 생체적합성을 가진 키토산과 강력한 항산화제로 알려진 리포산을 합성하여 만든 양친매성 고분자를 이용하여 약물전달시스템으로서의 응용 가능성을 알아보았다. 수용액 상에서 자기조립의 성질을 가지는 양친매성 고분자는 나노입자를 형성하고 이 입자 안에 항암제로 널리 쓰이는 5-fluorouracil을 고체분산법을 이용하여 봉입하였다. 최적의 약물전달체를 얻기 위하여 키토산에 결합된 리포산의 비율을 조절하여 입자크기 및 약물봉입률을 비교하였다. DLS를 이용하여 측정한 나노입자는 약 250 nm 정도의 크기를 가졌고 그 봉입률은 10% 내외로 측정되었다. 42%의 리포산 치환율을 가지는 공중합체가 약물전달체로서 가장 우수한 성능을 보여주었다.

Abstract: The amphiphilic copolymer by the conjugation of biocompatible chitosan and antioxidant lipoic acid was studied as a drug delivery carrier. The amphiphilic copolymer was self-assembled to form nanoparticles in the aqueous solution. 5-Fluorouracil widely used as an anticancer drug was encapsulated inside the nanoparticles by a solid dispersion method. The degree of branching of lipoic acid on chitosan was controlled to obtain the optimal condition for the drug delivery carrier. The sizes of nanoparticles were about 250 nm by the dynamic light scattering. The encapsulation efficiency of nanoparticles were about 10%. The copolymer with 42% degree of branching showed the best performance as a drug delivery carrier.

Keywords: chitosan, lipoic acid, 5-fluorouracil, amphiphilic polymer, drug delivery system.

서 론

약물전달체(drug delivery system, DDS)는 기존 약물에 적용하여 부작용을 최소화하고 필요한 약물을 효과적으로 전달함으로써 그 효능을 최대화시키는 제형을 말한다. 신약 개발에는 오랜 기간과 높은 비용에도 불구하고 연구단계 혹은 임상단계에서 많은 실패를 할 수 있는 한계점을 가지고 있다. 기존 약물의 개량을 통해 약물의 효능을 보다 효과적으로 발현하는 것, 편의성을 증가시키는 등의 연구에 관심이 높아지고 있다. 이러한 연구는 신약개발에 비해 단축된 시간과 비용으로 새로운 제형의 개발이 가능하다는 장점을 가지고 있다.¹

기존의 약물은 불특정 세포에 독성을 지니는 점, 지속

적인 약효를 나타내기 어려운 점, 그리고 약물에 대한 내성 등의 단점을 가지고 있다. 또한 대부분의 약물은 난용성을 가지고 있어 신체 이용률이 매우 낮다. 이러한 단점을 보완하기 위해 다양한 기능을 가진 천연고분자 및 합성고분자를 이용한 약물전달체를 개발하여 위와 같은 기존약물의 부작용을 최소화하고 약물의 인체 내 표적에 대한 이용률을 높임으로 그 효과를 극대화하는 연구가 많이 수행되고 있다.^{2,3} 나노기술을 약물전달에 응용한다면 약물전달 효과가 높으면서도 부작용이 적고, 치료 시 환자의 불편함을 최소한으로 줄인 제형을 만들 수 있다. 나노입자는 넓은 표면적을 가진 콜로이드 상의 불균일 분산 입자의 일종으로 지금까지 수많은 연구에 의해 나노입자의 제조, 특성, 약물 봉입에 관한 연구가 이루어져 약물 전달체로서의 가능성이 입증되었다.^{4,5} 특히 항암제 같은 경우 높은 독성으로 인해 부작용이 심각하게 나타나는데 여기에 나노 스케일의 약물전달체를 응용하면 상대적으로 느슨한 혈관 세포를 가

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

지는 암 조직에만 특이적으로 전달시킬 수 있다. 이를 이용하면 다른 정상조직에 나타나는 부작용을 줄이면서 상대적으로 치료효과를 높일 수 있다.⁶

약물 전달체로서 이용이 되기 위한 재료의 가장 중요한 특성은 생체 내에 주입하였을 때 부작용을 일으키지 않아야 한다. 또한 생체 내에서 분해가 가능해야 하는데 이는 분해가 되지 않은 외부물질들이 과도하게 축적된 세포나 조직으로 인한 만성 독성의 위험이 존재하기 때문이다.⁷ 최근에 생체적합하며 생분해가 가능한 재료로 polysaccharide가 큰 주목을 받고 있다. 특히 polysaccharide는 다양한 작용기를 가지고 있어서 나노입자를 설계하는데 이점을 지니고 있다.

대표적인 polysaccharide의 일종인 키토산(chitosan, CH)은 갑각류 등에 존재하는 키틴의 탈아세틸화에 의해 제조되는 천연고분자로 자연에 셀룰로오스 다음으로 가장 풍부하게 존재하며 기본적으로 자연에 존재하는 물질이기 때문에 높은 안전성과 낮은 독성, 생체적합성이 좋고 생분해가 되는 특징을 가지고 있다. 또한 수산화기, 아미노기와 같은 반응기를 가지고 있어서 합성 등을 통해 새로운 특징을 가지는 다양한 키토산 유도체를 만들 수 있어, 의료용 고분자로 활용하려는 연구가 많이 이루어지고 있다.⁸⁻¹⁰ 그러나 고분자량의 키토산은 높은 점도와 중성용매에서의 낮은 용해도를 가지고 있어 그 활용이 제한적이다. 때문에 용해성을 높이는 여러 방법이 연구되고 있는데 탈아세틸화도를 높이거나 키토산의 분자량을 감소시키는 방법이 있다.^{11,12} 강력한 항산화제로 널리 알려진 리포산(lipoic acid, LA)은 미토콘드리아 내의 여러 효소에 대한 보조인자로 작용하며 세포 내에서 호흡할 때 발생하는 유해한 활성산소를 제거하는 역할을 한다. 활성산소는 산소를 이용하는 생물체의 정상적인 대사과정에서 생기는 물질로 적당한 양은 세포 유지에 도움이 되지만 그 양이 축적될 경우 세포의 살상, 돌연변이, 발암, 조직의 노화 등의 원인이 된다.^{13,14} 리포산은 활성산소를 제거하기 때문에 항암 능력을 가지고 있어 암세포의 분화를 억제하고 자기사멸을 유도하는 특성이 있다.¹⁵

본 연구에서는 친수성 키토산에 소수성을 띠는 리포산을 가지 형태로 결합하여 양친매성 고분자를 제조하고 가지의 수를 조절하면서 자기조립으로 형성되는 입자의 크기를 확인하였다. 항암제로 사용되는 5-fluorouracil을 나노입자 안에 봉입한 후 방출거동을 확인하여 약물전달체로서의 응용가능성을 확인하였다.

실 험

재료. 본 연구에 사용된 키토산은 Aldrich Chemical사의 키토산 제품 중에 200000 cps 이상의 점도를 가진 제품을 수용성 키토산으로 제조하여 사용하였다. 1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide(EDC), N-hydroxyl succinimide(NHS), α -lipoic acid는 Aldrich Chemical사의 제품을 사용하였다. 이외에 용매로 이용된 시약들은 HPLC급 용매를 사용하였다.

수용성 키토산의 제조. 고분자량의 불용성 키토산을 4N 염산용액에 녹인 뒤 70°C, 질소 분위기하에서 반응시킨다. 반응물을 투석막(MFPL, MWCO = 1000 g/mol)을 사용하여 24시간 동안 증류수에 투석하여 반응 시 사용했던 용매를 제거해준다. 동결건조를 통하여 백갈색을 띠는 솜같은 모양이 수용성 키토산을 얻는다.¹⁶

이렇게 얻어진 수용성 키토산은 오스왈트 점도계를 이용하여 점도를 측정하여 다음의 Mark-Houwink 식을 이용하여 그 분자량을 계산한다.

$$[\eta] = (1.81 \times 10^{-5}) M_p^{0.93} (\text{dL/g})$$

CH-LA 합성. 200 mg의 키토산을 증류수 20 mL에 녹인 뒤 EDC 150 mg, NHS 90 mg 첨가하여 교반한다. 여기에 아세톤 10 mL에 녹인 리포산 용액을 조금씩 가해준 뒤 50°C, 질소 분위기 하에서 반응시킨다. 48시간 뒤, 다량의 아세톤에 침전시켜 얻은 침전물을 투석막을 사용하여 24시간 동안 증류수에 투석하여 용매와 미반응물들을 제거한다. 이를 동결건조를 통하여 흰색의 합성물을 얻는다.

CH-LA 입자형성. 키토산-리포산 공중합체를 DMSO와 증류수의 혼합용액에 녹인다. 이 용액을 투석막을 이용하여 3차 증류수에서 3번 이상 교체해주며 12시간 동안 투석하여 DMSO를 제거하여준 후에 동결건조를 통하여 파우더 형태의 입자를 얻는다. CAC(critical aggregation concentration) 측정은 2~0.0001 mg/mL의 다양한 농도의 수용액을 만든 후 소수성 형광물질인 pyrene을 넣어 UV visible spectrum을 이용하여 형광특성을 측정하였다.

5-FU 봉입 및 방출. 일정량의 CH-LA 합성물을 증류수에 녹이고 서로 다른 양의 약물을 메탄올에 녹여 두 용액을 투명하게 녹을 때까지 잘 혼합한 후에 약 2분간 초음파 분쇄기를 이용하여 혼합용액을 잘 분산시킨다. 50°C 감압하에 회전 증발기로 농축시켜 용매들을 충분히 제거하여 투명한 겔과 같은 상태로 만든 후, 3차 증류수를 넣고 나노입자가 고르게 분산되도록 잘 교반한다. 나노입자에 봉입되지 않은 약물은 투석막을 이용하여 12시간 동안 증류수에 투석하여 제거해 주고 동결건조시켜 분말 형태의 약물봉입체를 얻는다. 약물봉입체의 생체의 방출거동을 알아보기 위해 약물이 봉입된 고분자 용액 10 mL를 투석막에 넣고, pH 7.2 인산완충용액 90 mL에서 36.5°C, 70 rpm의 조건으로 실험을 하였다. 매시간 샘플링하여 방출된 약물 농도를 HPLC를 이용하여 측정하였다.

세포 내 독성실험. 약물이 봉입된 CH-LA의 세포사멸 효과를 알아보기 위해 세포 독성실험을 실시하였다. 독성 평가 방법은 MTT assay를 이용하였다. 봉입된 항암제의 암세포 내에서의 효과를 알아보기 위하여 자궁암세포인 HeLa cell을 이용하여 실험을 진행하였다. 96 well plate에 well당 2×10^4 개의 세포를 분배하여 넣어주었으며, 약물이 봉입된 고분자와 DMSO에 녹인 약물을 처리하여 비교 실험을 하였다.

결과 및 토론

제조된 수용성 키토산 분석. 측정된 점도는 절대점으로 환산한 뒤 Mark-Houwink 식에 대입하여 분자량을 계산하였다. 분자량을 조절하기 전의 키토산(3.195×10^6 Da)에 비교하여 저분자량 수용성 키토산의 분자량은 3.096×10^5 Da로 약 1/10로 줄어들었다. 분자량이 조절된 후의 키토산은 수용성이 높아졌다. 키토산의 탈아세틸화도 측정은 toluidine blue-O를 이용한 콜로이드 적정법으로 구하였고 87.1%로 나타났다.¹⁷

CH-LA 합성 분석. 수용성 키토산에 리포산을 결합시켜 양친성 그래프트 공중합체를 제조하였다. Figure 1에 키토산과 리포산의 반응과정을 나타내었다. 본 합성은 키토산의 아민 그룹과 리포산의 카르복실 그룹의 아마이드 결합에 의해 형성된다. ¹H NMR 분석을 통해 CH-LA의 결합 확인과 초기 합성 몰비에 따른 키토산과 리포산의 결합 비율을 계산하였다(Table 1). Figure 2의 ¹H NMR 그래프에서 나타난 바와 같이 약 5.4 ppm에서 리포산의 dithiol ring에 포함된 양성자의 피크를 확인할 수 있다. 또한 3가지 샘플의 그래프를 비교해보면 초기에 첨가한 리포산의 양이 많아짐에 따라 그

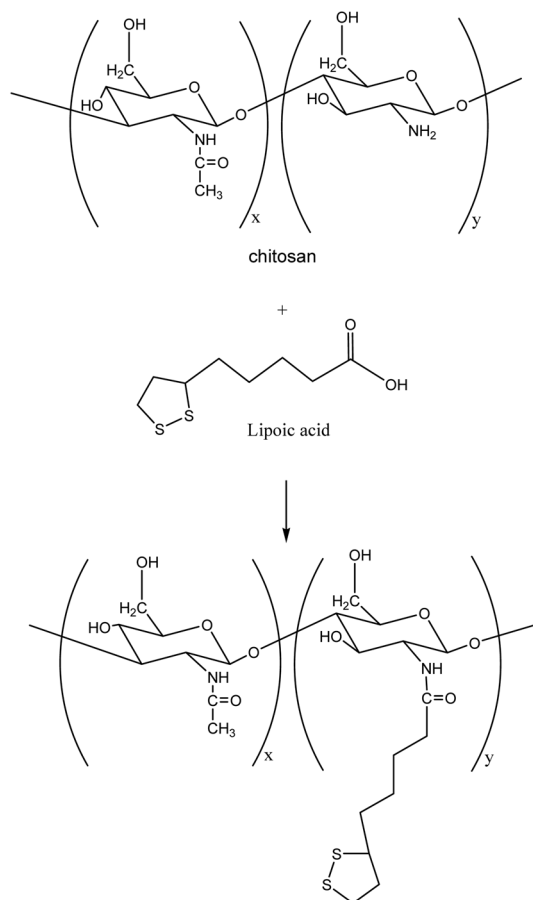


Figure 1. Synthetic scheme of CH-LA.

Table 1. Characterization of CH-LA Nanoparticles

Sample	Initial mole ratio(%) ^a	Degree of branching(%) ^b	Diameter (nm)	CAC (g/L)
A	25	15	235.6	5×10^{-1}
B	50	21	209.7	1×10^{-1}
C	75	42	187.1	5×10^{-2}

^aBased on mole rate of LA to CH. ^bCalculated based on ¹H NMR results.

특성피크도 크게 나타남을 알 수 있다.

CH-LA의 나노입자 형성. 결합된 키토산-리포산 공중합체는 각각의 친수성과 소수성 특징에 의하여 수용액 상에서 자기조립을 통해 키토산을 외부(shell)로 하고 리포산을 내부(core)로 하는 입자를 형성하게 된다. 고분자의 자기조립 현상은 일정농도 이상에서 입자형성을 하게 되는데 이 농도를 임계 응집 농도(CAC)라 한다. Figure 3에서는 UV-spectrum을 이용하여 측정된 나노입자의 농도에 따른 pyrene의 형광 광도 그래프와 I_{375}/I_{395} 값의 농도에 따른 변화를 나타내었다. I_{375}/I_{395} 값의 농도에 따른 그래프에서 특정 농도 이상에서 그래프의 기울기가 갑자기 증가하는 것을 볼 수 있는데, 이 지점의 농도가 임계 응집 농도가 된다. Sample A, B, C의 임계 응집 농도는 각각 5×10^{-1} , 1×10^{-1} , 5×10^{-2} g/L로 측정되었다. 키토산에 대한 리포산의 결합 비율이 높을수록 즉, 소수성 그룹의 비율이 높아질수록 더 낮은 농도에서 응집체가 형성되는 것을 알 수 있다. 입자형성 후 dynamic light scattering(Otsuka ELS-Z) 장비를 이용하여 측정된 CH-LA 공중합체 나노입자의 크기를 Table 1에서 비교하였다. 리포산의 치환율이 제일 높은 샘플 C의 나노입자 크기가 190 nm 정도로 가장 작게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 소수성인 리포산의 치환율이 높을수록 나노입자의 응집력이 높아지고 이로 인해 입자의 크기에 영향을 준 것으로 생각된다.

5-FU 봉입 및 방출. 약물봉입 후 나노입자의 특성을 Table 2에 나타내었다. 동결건조하여 얻은 약물봉입체를 HPLC를 이용하여 봉입된 약물의 농도를 측정하였으며 봉입 효율은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Drug loaded(\%)} = \frac{\text{Amount of drug loaded}}{\text{Amount of initial drug}} \times 100$$

약물봉입률은 10% 전후로 측정되었으며 리포산의 치환율이 높을수록 더 높은 봉입률을 보였다. 또한 약물봉입 후의 입자크기도 변화를 보였는데, 봉입 전에 비해 약 50 nm 정도 커지는 것을 확인할 수 있었다. 생체와 비슷한 조건하에 수행된 방출실험을 Figure 4에 나타내었다. 샘플 A에서는 80% 이상의 약물방출을 보이는 시간이 약 6시간으로 관찰되었으며 샘플 B와 C는 각각 9시간, 13시간에서 80%의 약물방출거동을 보였다. 이 실험을 통해서 키토산에 치환된 리포산의 함량이 높아질수록 소수성 가지가 많아지게 되고

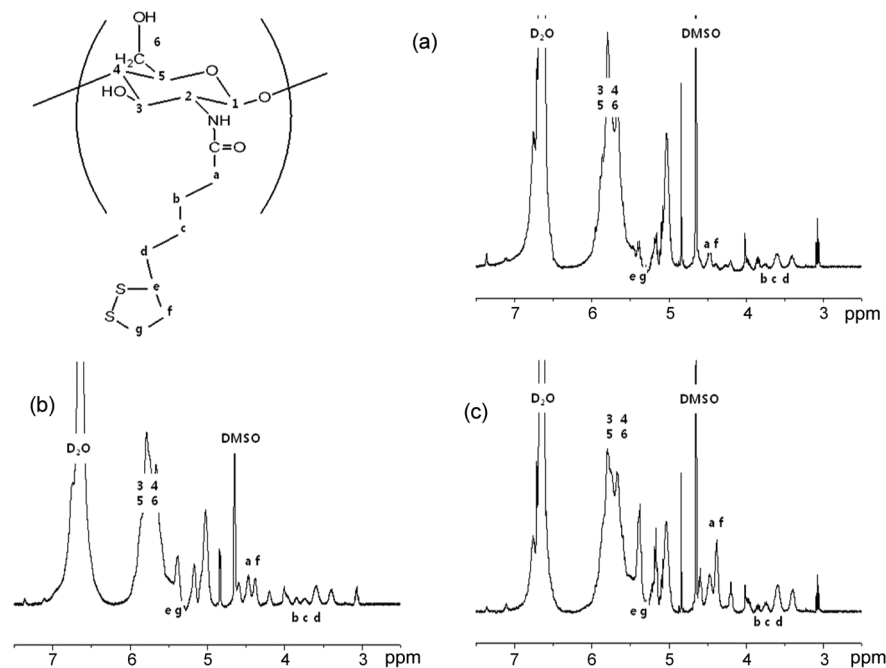


Figure 2. ^1H NMR spectra of CH-LA (a) sample A; (b) sample B; (c) sample C.

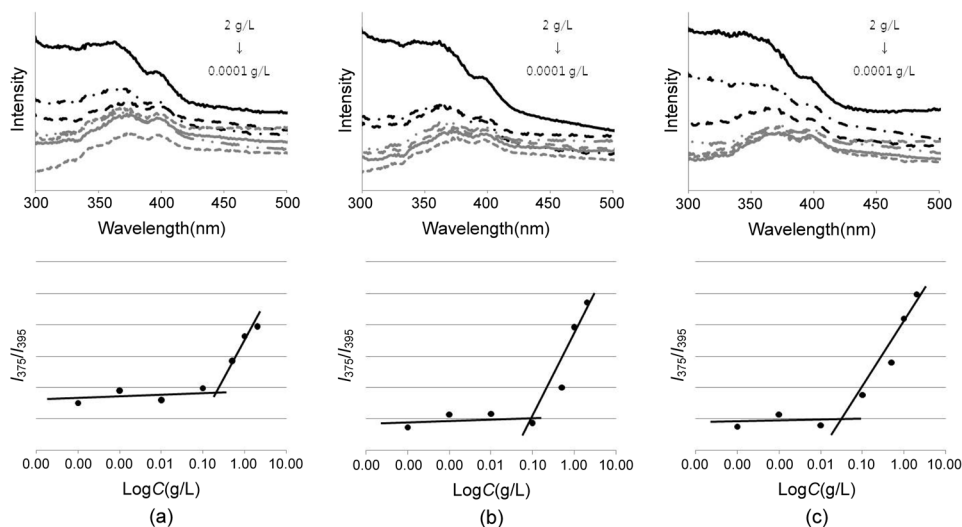


Figure 3. UV-spectra of pyrene with increasing concentrations of the CH-LA particles in water (a) sample A; (b) sample B; (c) sample C.

Table 2. Characterization of Drug Loaded CH-LA Nanoparticles

Sample	Initial loading ratio ^a	Initial amount of drug (mg)	NP diameter (nm)	Encapsulation efficiency (%)	Loading efficiency (%)
A			293.2	7.5	1.5
B	5:1	5	261.3	9.0	1.8
C			235.8	13.5	2.7

^a $w_{\text{CH-LA}}/w_{\text{5-FU}}$.

안정한 입자가 형성되므로 높은 약물봉입률과 지연된 약물방출거동을 보임을 확인하였다.

세포독성 평가. 항암제인 5-FU를 봉입한 CH-LA의 암세포 사멸효과를 알아보기 위하여 자궁경부암 세포주인 HeLa cell을 이용하여 생체의 세포독성 평가를 실시하였다. 약물들의 농도는 0.6 g/L로 동일하게 맞춰 주었으며, 8시간과 20시간 후 HeLa cell의 생존도를 Figure 5에 나타내었다. 앞선 실험을 통해 sample들의 방출 속도는 각각 6, 9, 13시간에 80% 이상 방출되는 것을 확인하였다. Sample을 넣어준 뒤 8시간 후 세포의 생존도는 Figure 5(a)에서 확인할

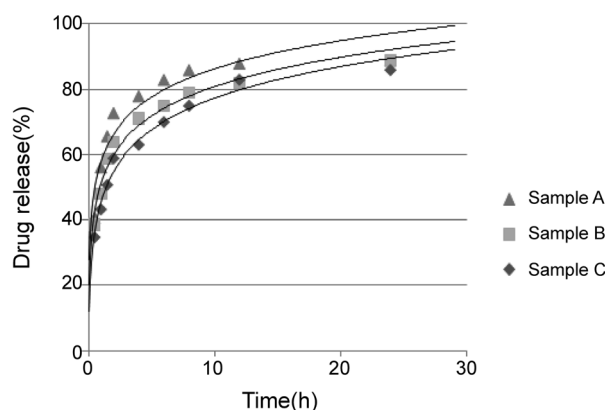


Figure 4. *In vitro* drug release profiles of 5-FU loaded CH-LA nanoparticles.

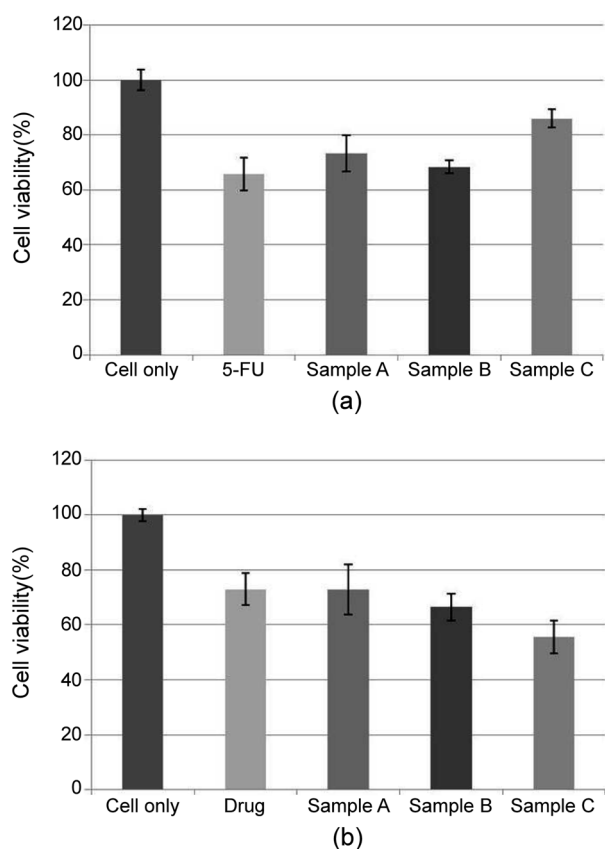


Figure 5. Cytotoxicity test of 5-FU loaded CH-LA nanoparticles after (a) 8 hr; (b) 20 hr.

수 있는 바와 같이 약물만 처리한 세포는 66% 정도로 나타났으며 약물 봉입된 고분자 sample들의 세포생존도는 각각 73, 68, 86%로 나타났다. 20시간 후의 세포들을 관찰한 결과 각각 73, 66, 56%의 생존도를 나타내었다. 8시간 경과 후 약물방출을 거의 마친 sample A와 B는 약물과 비슷한

사멸효과를 보였으며, 20시간 후의 세포 생존도 역시 크게 달라지지 않았다. 8시간에서 약 70%의 약물방출을 보이는 sample C는 다른 샘플에 비해 다소 약한 세포사멸효과를 나타내었으나 20시간 경과 후에는 세포생존도가 56%까지 감소함을 보여 3개의 샘플 중 가장 높은 세포사멸도를 나타내었다. 이러한 결과를 미루어 봤을 때 sample C에 봉입된 약물이 8시간 이후에도 계속해서 방출되어 세포사멸효과가 가장 높게 나타난 것을 알 수 있다. 이로써 보다 높은 소수성기의 치환율을 보인 고분자에 봉입된 약물이 오랜 시간 암세포사멸효과를 보이는 것을 확인하였다.

결론

본 연구를 통하여 리포산이 결합된 키토산 공중합체의 약물전달체로서의 응용 가능성에 대해 알아보았다.

키토산과 리포산은 아마이드 결합에 의해 합성되며 그 합성 여부와 정도를 ^1H NMR을 통하여 확인하였다. 그 결과 합성 시 첨가된 리포산의 양에 따라 15%(sample A), 21%(sample B), 42%(sample C)의 치환율을 보였다. 이렇게 얻어진 키토산-리포산 공중합체는 수용액상에서 나노입자를 형성하였고 입자를 형성하기 시작하는 농도인 임계 응집 농도(CAC) 값은 각각 5×10^{-1} , 1×10^{-1} , $5 \times 10^{-2} \text{ g/L}$ 으로 측정되어 치환율이 높을수록 낮은 농도에서 입자를 형성할 수 있음을 확인하였다. 또한 나노입자의 크기와 그 형태를 알아보기 위해 dynamic light scattering(DLS)을 통해 확인하였고 그 결과 235 nm(sample A), 210 nm(sample B), 190 nm(sample C)의 값을 나타냄을 확인하였다. 약물의 봉입정도과 봉입된 나노입자의 방출특성을 확인한 결과 리포산의 치환율이 높은 sample C가 가장 높은 봉입률과 13시간 동안 80%가 방출되는 거동을 보였다.

HeLa cell을 이용하여 생체의 세포독성 평가를 실시한 결과 sample C의 8시간 후 세포생존도는 86%로 다른 sample들에 비해 다소 낮은 세포사멸효과를 보였으나 20시간 후에는 56%까지 감소하여 약물방출이 서서히 더 오랫동안 지속되었음을 확인할 수 있었다.

리포산에 의해 소수성이 부여된 키토산은 그 치환율에 따라 응집력이 다르게 나타났다. 응집력이 클수록 나노입자의 크기는 작았으며 보다 높은 약물봉입률과 안정된 방출 거동을 보였다. 생체 적합하고 생분해 가능한 키토산-리포산 나노입자는 작은 입자크기로 인해 암세포에 수동 표적 지향성을 가지므로 항암제용 약물전달체로 사용이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글: 세포실험에 도움을 주신 충남대 분석과학기술타학원의 임용택 교수님과 김지현님께 감사드립니다.

참고문헌

1. J. H. Park, G. Saravanakumar, K. Kim, and I. C. Kwon, *Adv.*

- Drug Deliv. Rev.*, **62**, 28 (2010).
2. I. C. Kwon, K. M. Kim, S. W. Kim, H. S. Jeong, and S. Y. Jeong, *Polym. Sci. Tech.*, **15**, 396 (2004).
3. J. H. Kim, Y. S. Kim, K. Park, S. Lee, H. Y. Nam, K. H. Min, H. G. Jo, J. H. Park, K. Choi, S. Y. Jeong, R. W. Park, I. S. Kim, K. Kim, and I. C. Kwon, *J. Control. Release*, **127**, 41 (2008).
4. T. C. Yih and M. Al-Fandi, *J. Cell. Biochem.*, **97**, 1184 (2006).
5. L. Mu and S. S. Feng, *J. Control. Release*, **86**, 33 (2003).
6. H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *J. Control. Release*, **65**, 271 (2000).
7. G. Winzenburg, C. Schmidt, S. Fuchs, and T. Kissel, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 1453 (2004).
8. Y. S. Wang, L. R. Liu, Q. Jiang, and Q. Q. Zhang, *Eur. Polym. J.*, **43**, 43 (2007).
9. S. A. Agnihotri, N. N. Mallikarjuna, and T. M. Aminabhavi, *J. Control. Release*, **100**, 5 (2004).
10. Z. H. Liu, Y. P. Jiao, Y. F. Wang, C. R. Zhou, and Z. Y. Zhang, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1650 (2008).
11. W. Yue, P. J. Yao, Y. N. Wei, S. Q. Li, F. Lai, and X. M. Liu, *Food Chem.*, **108**, 1082 (2008).
12. Y. Zhang, M. R. Huo, J. P. Zhou, D. Yu, and Y. P. Wu, *Carbohydr. Polym.*, **77**, 231 (2009).
13. J. Bustamante, J. K. Lodge, L. Marcocci, H. J. Tritschler, L. Packer, and B. H. Rihn, *Free Radical Biol. Med.*, **24**, 1023 (1998).
14. G. P. Biewenga, G. R. M. M. Haenen, and A. Bast, *Gen. Pharmacol.*, **29**, 315 (1997).
15. E. Dozio, M. Ruscica, L. Passaparo, G. Dogliotti, L. Steffani, P. Marthyn, A. Pagani, G. Demartini, D. Esposti, F. Fraschini, and P. Magni, *Eur. J. Pharmacol.*, **641**, 29 (2010).
16. E. J. Park and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 544 (2008).
17. S. K. Kwon, S. W. Kim, and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **34**, 501 (2010).