

## 플루페나민산이 담지된 키토산 나노입자의 제조 및 항암 효과

안준혁 · 나재운<sup>†</sup> · 정경원<sup>\*†</sup>

순천대학교 공과대학 고분자공학과, \*조선이공대학교 생명환경화학공과  
(2021년 3월 8일 접수, 2021년 4월 4일 수정, 2021년 5월 9일 채택)

## Preparation and Anticancer Effect of Flufenamic Acid-loaded Chitosan Nanoparticle

Jun-Hyuk Anh, Jae-Woon Nah<sup>†</sup>, and Gyeong-Won Jeong<sup>\*†</sup>

Department of Polymer Science and Engineering, Suncheon National University, 255 Jungang-ro, Suncheon, Jeonnam 57922, Korea

\*Department of Bioenvironmental & Chemical Engineering, Chosun College of Science and Technology, Gwangju 61453, Korea

(Received March 8, 2021; Revised April 4, 2021; Accepted May 9, 2021)

**초록:** 플루페나민산(flufenamic acid, FA)은 방광암 치료 약물로 잘 알려져 있으나, 자체 사용 시 체내의 면역반응과 약물 내성으로 인해 그 치료 효과가 반감하는 문제점을 갖고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 본 연구에서는 core-shell 형태의 구조의 나노입자를 제조하고 소수성 core 내부에 FA를 담지하여 그 치료 효과를 극대화하고자 하였다. 친수성 고분자 low molecular weight water-soluble chitosan(LMWSC)에 소수성 물질 lauric acid(LA)를 화학적 개질을 통해 LMWSC-g-LA(LMLA)를 합성하였고, <sup>1</sup>H NMR 분석을 통해 합성되었음을 확인하였다. 또한, FA가 담지된 LMLA(LMLAF) 나노입자는 투석법에 의해 제조하였으며, 이를 DLS, UV-vis spectrophotometer, fluorophotometer 그리고 TEM를 이용하여 다양한 물리·화학적 특성을 분석함으로써 합성된 LMLA가 FA 약물 전달체로서 사용 가능함을 입증하였다. 또한, LMLA 및 LMLAF의 세포 독성 및 항암 효과를 다양한 세포에서 MTT assay를 이용하여 확인한 결과 독성이 없으며 높은 항암 효과를 확인하였다. 이러한 결과를 통해 LMLAF 나노입자는 체내에 안전함과 동시에 방광암 치료 효율을 극대화할 수 있는 항암 제제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

**Abstract:** Flufenamic acid (FA) is well known as a bladder cancer treatment drug, but when used by itself, its therapeutic effect is halved due to the immune response and drug resistance in the body. To solve this problem, in this study, nanoparticles with a core-shell structure were prepared and FA was encapsulated at the hydrophobic core to maximize the therapeutic effect. LMWSC-g-LA (LMLA) was synthesized by chemical modification of the hydrophobic substance lauric acid (LA) in the hydrophilic polymer low molecular weight water-soluble chitosan (LMWSC), and it was confirmed that the synthesis was successful through <sup>1</sup>H NMR analysis. In addition, FA-encapsulated LMLA (LMLAF) nanoparticles were prepared by dialysis method, and utilization of LMLA as FA drug delivery carrier has proven by various physicochemical properties analysis using DLS, UV-vis spectrophotometer, fluorophotometer, and TEM. Moreover, results of the cytotoxicity and anticancer effects of LMLA and LMLAF using MTT assay in various cells showed non-toxic and high anticancer effects. These results suggest that LMLAF nanoparticles can be used as an anticancer agent because they can maximize bladder cancer treatment efficiency while being safe in the body.

**Keywords:** low molecular weight water-soluble chitosan, flufenamic acid, nanoparticle, drug delivery system, anticancer effect.

## 서 론

현재 인류는 고령화에 따른 건강 및 의료 분야에 관심이 증가하고 있고, 그중 암에 대한 치료와 연구가 현대의학으로

많은 자리매김을 하고 있다.<sup>1-3</sup> 암 치료를 위한 대표적인 항암제는 독소루비신과 파클리탁셀이 있으며, 이를 이용한 암 치료 연구가 많이 수행되고 있다.<sup>4,6</sup> 그러나 현재 사용하고 있는 항암 약물들은 효과는 우수하나 강한 독성과 수많은 부작용을 유발하는 단점을 가지고 있어 이러한 문제점을 해결하기 위한 연구가 활발히 진행 중이다.<sup>7,8</sup> 현재 항암 약물들의 단점을 보완하고 그 효능을 극대화할 수 있는 약물 전달 방법은 고분자 재료에 화학적 결합을 통한 난용성 항암 약물을 수용

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
jwnah@sunchon.ac.kr, ORCID<sup>®</sup>0000-0002-6621-7857  
gwjeong@cst.ac.kr, ORCID<sup>®</sup>0000-0002-7020-6050  
©2021 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

화할 수 있는 prodrug과 polymeric micelle 형태의 고분자 매개체를 이용하는 방법이다. 이중 polymeric micelle 형태의 약물 전달체는 친수성 고분자 기반에 소수성 물질을 화학적 개질을 통해 합성되고, 이를 물에 분산했을 시 core-shell 형태의 나노입자가 형성되며 소수성 core 부분에 약물 담지를 통한 난용성 약물의 수용화가 가능하므로 부작용을 최소화하고 약물 효과를 극대화할 수 있는 장점이 있다.<sup>9-13</sup> 본 연구에서는 친수성 물질로써 천연고분자 키토산(chitosan)에 소수성 물질을 화학적으로 개질하여 polymeric micelle 형태의 나노입자를 제조하고, 이에 방광암 치료 약물로 잘 알려진 플루페나민산(flufenamic acid, FA)을 담지하여 항암제로 사용 가능성을 입증하고자 하였다.

키토산은 셀룰로오스에 이어 자연에 풍부하게 존재하며, 갑각류에서 얻어지는 키틴을 탈아세틸화하여 제조되는 천연 다당류로  $\beta$ -(1,4)-glucosidic 결합으로 연결된 *D*-glucosamine과 *N*-acetyl-*D*-glucosamine의 두 단위체로 구성된 천연 다당류이다.<sup>14-16</sup> 항암 효과, 콜레스테롤 감소, 면역반응 증진 및 항균성 등 다양한 생체 생리활성을 가지고 있으며, 생체 적합하고, 생분해성이며 독성이 없는 장점이 있어 화장품, 환경 및 의약 등 다양한 분야에서 응용되어지고 있다.<sup>17-19</sup> 많은 연구자들은 키토산을 물에 대한 용해도를 증가시키기 위해 다양한 유기산이 도입된 키토산을 연구에 사용해 왔다. 하지만 유기산이 도입된 키토산을 의약용으로 적용했을 시에 유기산으로 인한 생체에 부작용을 유발할 수 있는 단점을 갖는다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서 사용된 키토산은 salt-removal 방법에 의해 유기산을 제거하여 개발된 free amine 그룹을 갖는 저분자량 수용성 키토산(low molecular weight water-soluble chitosan, LMWSC)을 연구에 사용하였다.<sup>20</sup> LMWSC는 free amine 그룹을 갖고 있어 약물 및 유전자 전달체로 많이 응용되어지고 있으며, 물에 대한 높은 용해성 및 낮은 독성을 가지고 있어 생체 적합성이 매우 우수한 장점이 있다.

방광암 치료목적으로 본 연구에 사용된 FA는 *N*-(3-Trifluoromethylphenyl)anthranilic acid 또는 2-(3-Trifluoromethyl-anilino)benzoic acid 하며, *N*-를 갖는 안트라닐산으로 구성된 방향족 아미노산이다.<sup>21,22</sup> 일반적으로 해열, 항염증, 진통 효과 등 특성을 가지고 있어 근골격계 및 관절장애의 통증 및 염증의 따른 진통제, 소염제 및 감기약에 주로 사용되고 있고 비스테로이드성 항염증제(NSAID)로 많이 사용되고 있다.<sup>23,24</sup> 최근 연구에서 전립선 암의 새로운 치료제로 연구되고 있으며, FA의 알도케토 환원효소1C1(AKR1C1)을 억제한다는 특성으로 인해 특정 암세포인 방광암에서 항암내성 및 전이 억제에 대한 효과가 연구되었다.<sup>25</sup> 하지만 FA 약물 자체는 물에 대한 용해성이 현저히 떨어지고, 면역반응 및 약물 내성에 의한 치료 효과가 반감되는 문제점을 갖는다.<sup>26</sup>

본 연구에서는 FA 자체 문제점을 해결하고자 친수성

LMWSC에 소수성 물질인 라우릭산(lauric acid, LA)을 화학적으로 개질하여 LMWSC-g-LA(LMLA)를 합성하였고, 투석법을 이용하여 LMLA에 FA가 담지된 LMLAF 나노입자를 제조하였다. 다양한 분석장비를 이용하여 LMLAF의 물리화학적 특성을 규명하였고, 정상세포 및 방광암 세포에서 MTT assay를 수행하여 독성 유무 및 항암 활성을 확인함으로써 본 연구에서 개발된 LMLAF 나노입자가 방광암 치료를 극대화할 수 있는 항암 제제임을 제시하고자 한다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 본 연구에서 사용된 저분자량 수용성 키토산(low molecular water-soluble chitosan, LMWSC, Mw: 10 kDa)은 ㈜키토라이프(KITTOLIFE Co, Korea)에서 구매하여 사용하였고, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC), lauric acid(LA) 및 플루페나민산(flufenamic acid, FA)은 Sigma-Aldrich(St, Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에서 세포 독성 및 항암 활성을 확인하기 위해 사용된 human embryonic kidney cells (HEK293) 세포는 american type culture collection(ATCC, Korea) 그리고 Human bladder tumor cells(T24) 세포는 한국 세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 각각 분양받아 실험을 수행하였다. Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)은 Lonza(USA) 그리고 RPMI-1640은 Hyclone(USA)에서 각각 구입하였고, ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)와 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco(USA)에서 구입하여 세포배양에 사용하였다. 또한, dimethylsulfoxide(DMSO) 및 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich(St, Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 시약 및 용매는 GR등급을 구매하여 정제하지 않고 실험에 사용하였다.

**LMWSC-g-LA(LMLA)의 합성.** LMLA는 가교제 EDC를 이용하여 LMWSC의 아민 그룹에 소수성 LA를 도입하여 합성하였다. LMWSC 100 mg을 MES buffer 2 mL에 완전히 용해되도록 상온에서 교반하였다. LA의 카르복실 그룹을 활성화하기 위해 LMWSC 중량 대비 물 비율 20%, 30% 각각의 중량을 DMSO에 용해하고 EDC 가교제를 LA 중량 대비 물 비율로 2배 각각 첨가한 후 30분간 교반하였다. 카르복실 그룹이 활성화된 LA 용액을 LMWSC 용액에 천천히 점적하고 4시간 동안 상온에서 교반하였다. 반응이 종결된 용액을 아세톤에 침전시키고 3회 세척한 후 MWCO 3500 cellulose membrane을 이용하여 증류수 상에서 24시간 동안 투석하였다. 최종물질 LMLA는 동결건조 후에 powder로 얻은 후 실험에 사용하였다.

**LMLA의 구조 분석.** LMLA의 합성 유무는 핵자기 공명장치(<sup>1</sup>H NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)를 이용하여 분석

하였다. LMWSC 및 LMLA는 D<sub>2</sub>O 그리고 LA는 DMSO에 각각 용해하여 0-9 ppm 범위에서 특성피크 및 chemical shift를 분석하여 합성 유무를 확인하였다.

#### FA가 담지된 LMLA(LMLAF)의 제조 및 담지 효율 확인.

FA가 담지된 LMLA(LMLAF)는 evaporation 기법을 이용하여 제조 하였으며, 그 실험방법은 다음과 같다. LMLA 30 mg을 증류수 7 mL에 용해한 후에 tetrahydrofuran(THF) 35 mL를 LMLA 수용액에 첨가하여 10분간 교반한다. FA는 LMLA 양 대비 5% 중량 비율로 THF 1 mL에 용해한 후 LMLA 용액에 천천히 점적하여 1시간 동안 교반하였다. 이 용액을 회전증발기를 이용하여 THF를 제거하고 MWCO 3500 cellulose membrane으로 24시간 동안 투석한 후 동결 건조하여 최종물질 LMLAF를 얻었다.

LMLAF로부터 FA의 담지 효율은 자외선 분광계(UV-vis spectrometer, UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 계산하였으며, 그 실험 방법은 다음과 같다. LMLAF를 2 mg를 0.1% trifluoroacetic acid(TFA) 200  $\mu$ L에 완전히 용해한 후 DMSO 1.8 mL를 첨가하여 24시간 동안 shaking하였다. 이 용액을 ultra filtration membrane를 이용하여 FA 용액을 얻었으며, 이를 자외선 분광계를 통해 최대 흡수 파장인 289 nm에서 흡광도를 확인하여 담지 효율을 다음 식 (1), (2)에 의해 계산하였다.

$$\text{Drug content(DC)\%} = \frac{\text{Total weight of the FA from LMLAF}}{\text{Weight of the feeding LMLA and FA}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Encapsulation efficiency(EE)\%} = \frac{\text{Total weight of the FA from LMLAF}}{\text{Weight of the feeding FA}} \times 100 \quad (2)$$

**LMLA 및 LMLAF 나노입자 제조 및 특성 분석.** LMLA 및 LMLAF 나노입자는 MWCO 3500 cellulose membrane을 이용한 투석법에 의해 제조하였으며, 제조된 LMLA 또는 LMLAF 나노입자의 입자 크기, 임계응집농도(critical aggregation concentration, CAC) 및 형태학적 이미지 특성 분석은 아래와 같이 수행하였다.

LMLA는 LA에 의한 소수성 특성과 LMWSC에 의한 친수성 특성을 갖고 있어 수용액에서 자가 응집에 의한 core-shell 입자를 형성하게 된다. 따라서 입자형성이 가능한 최소 농도 CAC를 다음의 방법으로 측정하였다. Pyrene을 아세톤에  $6 \times 10^{-5}$  M이 되도록 용해시킨 후 증류수를 첨가하여 최종농도가  $1.2 \times 10^{-6}$  M이 되도록 한다. 이 용액을 40 °C에서 2시간 동안 감압 하에서 아세톤을 제거한 후에 pyrene 용액과 다양한 농도의 나노입자의 용액( $3.0 \times 10^{-5}$ -2 mg/mL)을 혼합하여 pyrene의 최종 농도가  $6.0 \times 10^{-7}$  M이 되도록 하였다. 이 용액을 60 °C에서 3시간 동안 암실에서 교반 후 광학적 거동을

형광광도계(RF-5301PC, Shimadzu, Japan)를 이용하여 파장 350-460 nm 범위에서 발광 특성을 관찰하였다. 농도에 따른 특정 파장(I<sub>1</sub>과 I<sub>3</sub>)에서 강도의 비(I<sub>1</sub>/I<sub>3</sub>)를 이용하여 CAC를 결정하였다.

LMLA 및 LMLAF의 입자크기는 동적광산란(dynamic light scattering, DLS) 장비를 이용해서 측정하였고, DLS는 ELS-8000 electro phoretic LS spectrophotometer(Otsuka Electronics Co., Japan)를 사용했다. 동적광산란장치를 이용하여 입자의 크기 및 분포를 측정하였으며, 이때 제조되어진 LMLA 및 LMLAF를 각각 2 mg/mL의 농도의 수용액으로 제조하였다. 또한, LMLA와 LMLAF의 제타전위는 1.5 mg/mL의 농도의 수용액으로 제조하여 입자크기 측정에 사용된 위의 동일한 장비를 이용하여 측정하여 확인하였다.

LMLA 및 LMLAF의 형태학적 분석은 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM, Hitachi, H-7500, Japan)을 이용하여 다음과 같이 확인하였다. LMLA 및 LMLAF 각각 10 mg/mL의 농도로 제조한 후에 이를 copper carbon grid에 올리고 상온에서 완전히 건조하였다. 이를 3% uranyl acetate에 15분간 염색한 후 24시간 동안 건조하여 TEM를 통해 입자 이미지를 관찰하였다.

**LMLAF로부터 FA의 방출 거동 확인.** LMLAF로부터 FA의 방출 거동은 자외선 분광계(UV-Vis spectrometer, UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 확인하였다. LMLAF 4 mg을 2 mL의 pH 5.5 및 7.4 PBS buffer에 각각 용해하여 MWCO 1000 cellulose membrane에 넣은 후 37 °C에서 140 rpm으로 교반하였다. 시간에 따른(0.5-96시간) 방출된 용액 각각 2 mL를 취하여 자외선 분광계를 통해 289 nm에서 흡광도를 측정하여 누적 방출량을 백분율로 계산하였다.

**LMLA 및 LMLAF의 세포 독성 및 항암 활성 확인.** 제조된 LMLA와 LMLAF의 독성 및 항암 활성 효과는 HEK293 정상 세포와 방광암 세포 T24에서 MTT assay를 수행하여 확인하였다. HEK293 세포는 FBS 10%가 함유된 DMEM 배지 그리고 T24 세포는 10% 함유된 RPMI 배지 상태에서 CO<sub>2</sub> 농도가 5%이며 온도가 37 °C incubator에서 각각 배양하였다. 세포 seeding은 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cell/well 농도로 하여, 하루 동안 incubator에서 배양하였으며, 배양된 HEK293 세포에는 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.063, 0.031 mg/mL 농도로 제조된 LMLA 용액을 첨가하였고, T24세포에는 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016, 0.008 mg/mL 농도로 제조된 LMLAF 용액을 각각 첨가하여 48시간 동안 incubator에서 암실 배양하였다. 48시간이 지난 후에 MTT를 처리하고 4시간 암실 배양하였으며, 최종적으로 MTT를 제거한 후 DMSO 200  $\mu$ L를 처리하여 560 nm와 670 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 이용하여 세포 생존율은 다음 식 (3), (4)에 의해 계산되었다.

$$\text{OD value} = (\text{OD } 560 \text{ nm} - \text{OD } 670 \text{ nm}) \quad (3)$$

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{\text{OD sample} - \text{OD blank}}{\text{OD control} - \text{OD blank}} \times 100 \quad (4)$$

### 결과 및 토론

**LMLA의 합성 및 구조적 특성 분석.** 방광암 치료제로 잘 알려진 FA 약물의 자체 사용은 면역반응과 약물 내성으로 인해 치료 효과가 반감되는 문제점을 갖는다. 본 연구에서는 이러한 문제점을 해결하기 위해 core-shell 형태의 자가 조립 나노입자를 형성할 수 있는 약물 전달체를 개발하여 FA의 방광암 치료 효과를 극대화하고자 하였다. core-shell 형태의 나

노입자를 제조하기 위해 친수성 LMWSC에 소수성 물질인 LA를 가교제 EDC를 이용하여 화학적 개질을 통해 합성하였다. LA의 carboxyl group(-COOH)을 가교제 EDC를 이용하여 활성화하고, 이를 LMWSC의 amine group(-NH<sub>2</sub>)에 도입하여 최종적으로 LMWSC-g-LA(LMLA)를 합성하였다 (Figure 1).

LMLA의 합성 유무를 규명하기 위해 핵자기 공명 장치(<sup>1</sup>H NMR, 400 MHz, Bruker, Germany)를 이용하여 구조적 특성을 분석하였다. LA는 0.7-0.9 ppm에서 -CH<sub>3</sub>의 수소 피크 및 1.5-2.3 ppm에서 -CH<sub>2</sub>의 수소 피크들을 각각 확인할 수 있으며, LMWSC는 1번 탄소 위치의 수소 피크는 4.9 ppm, 2번 탄소 위치의 수소 피크는 2.9 ppm, 3번-6번 탄소 위치의 수소 피크는 3.5-3.9 ppm, 그리고 키토산 구조 내의 키틴의 아

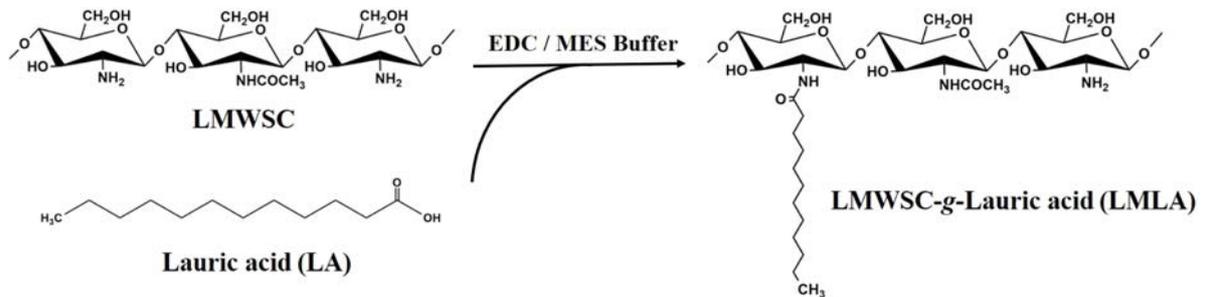


Figure 1. Synthetic scheme of LMWSC-g-LA (LMLA) using coupling agent EDC.

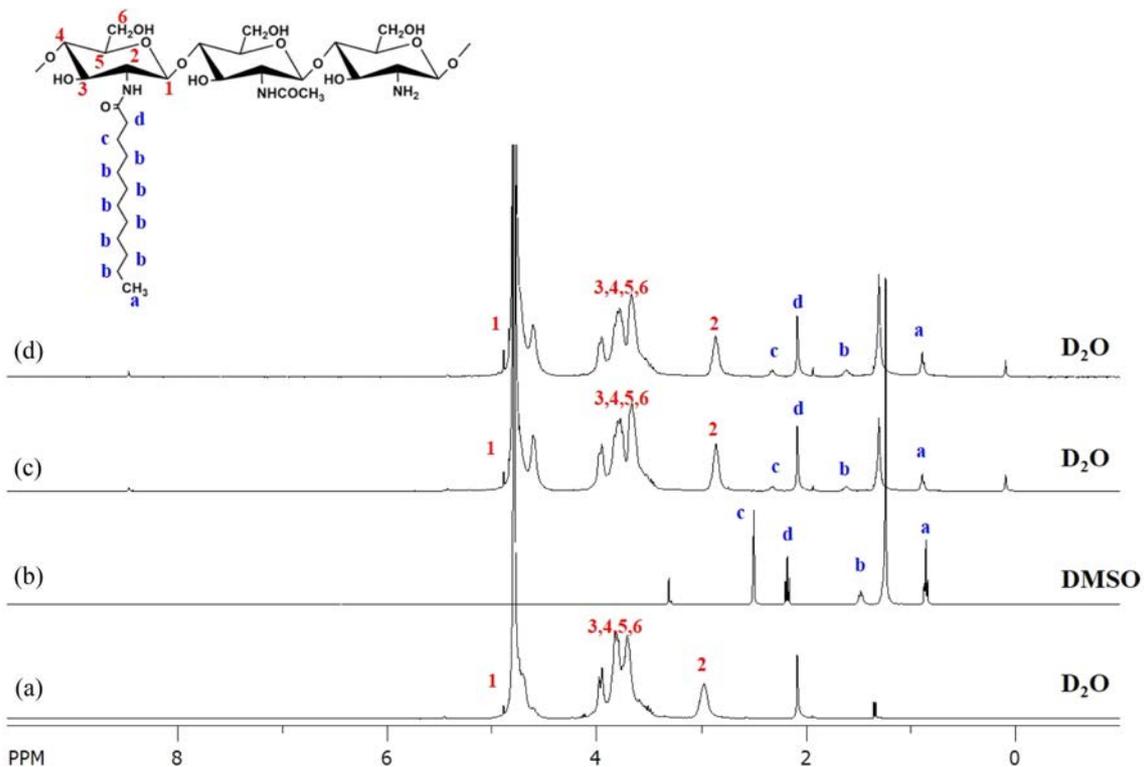
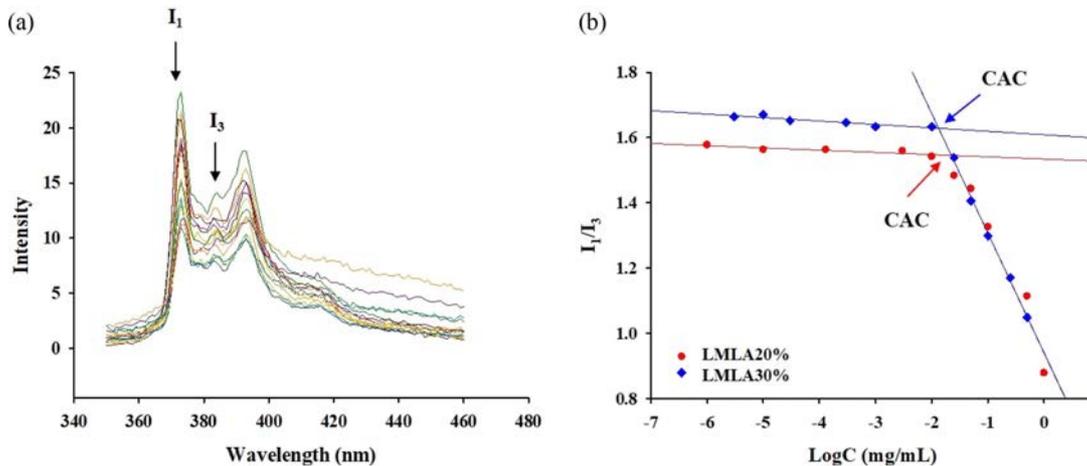


Figure 2. <sup>1</sup>H NMR spectra of LMLA: (a) LMWSC; (b) LA; (c) LMLA 20%; (d) LMLA 30%.

**Table 1. Physicochemical Characteristic Analysis of LMLA and LMLAF**

Sample	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	CAC (mg/mL)	DC <sup>a</sup>	EE <sup>b</sup>
LMLA 20%	320.1±10.8	-	0.22	-	-
LMLA 30%	279.6±12.8	-	0.13	-	-
LMLAF 20%	273.9±9.1	32.8±0.5	-	3.8%	66.12%
LMLAF 30%	247.8±4.2	27.8±0.7	-	4.5%	80.46%

<sup>a</sup>DC: Drug content. <sup>b</sup>EE: Encapsulaion efficiency.

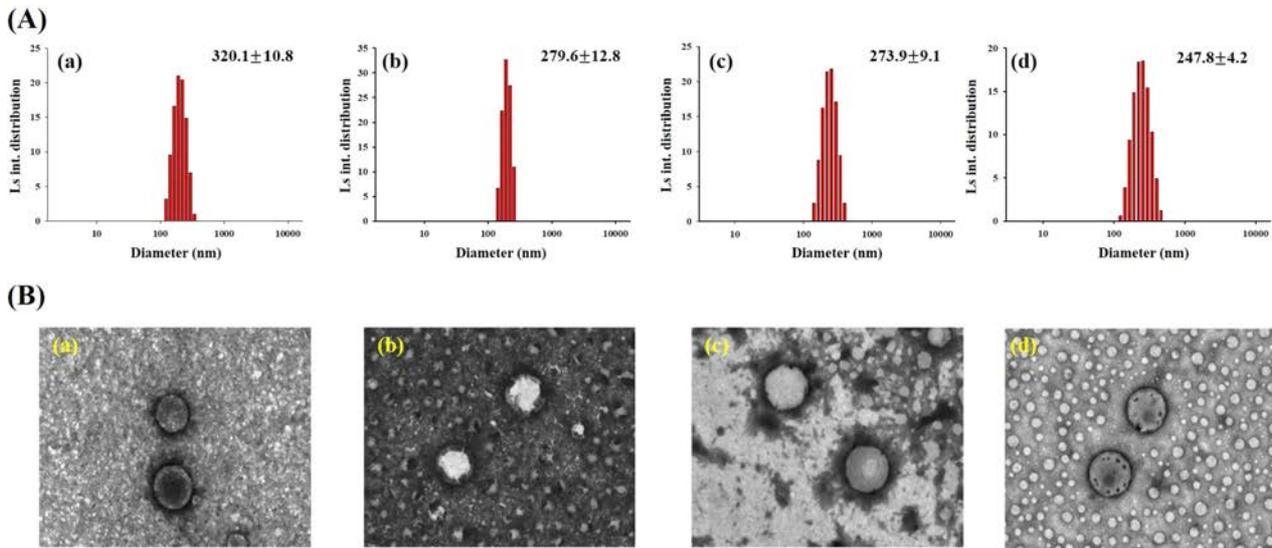


**Figure 3.** (a) Pyrene emission ( $[Py]=6.0 \times 10^{-7}$  M) spectra in aqueous solutions (excitation wavelength 339 nm) of LMLA 30%; (b) intensity ratio ( $I_1/I_3$ ) from pyrene emission spectra as a function of LMLA concentration in distilled water (DW).

세틸 그룹에 의한 특성 피크를 2.1 ppm에서 각각 확인할 수 있었다(Figure 2). 최종 합성 물질인 LMLA에서 LMWSC와 LA의 특성 피크를 모두 확인함과 동시에 피크의 chemical shift에 의해 성공적으로 합성되었음을 확인하였다.

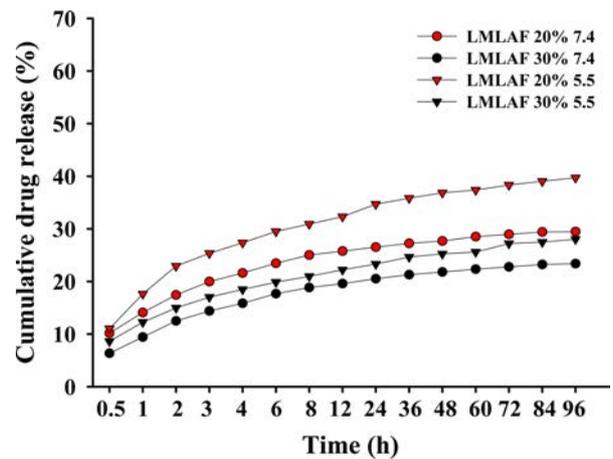
**LMLA 및 LMLAF 나노입자의 특성 분석.** LMLA 및 LMLAF 나노입자는 투석법에 의해 제조되었으며, 입자크기, 제타전위, CAC 및 형태학적 분석을 통해 그 나노입자의 특성을 규명하였다. LMLA 나노입자는 친수성인 LMWSC에 소수성인 LA가 결합되어 있는 양친매성 구조를 나타내며, 이는 수용액 상에서 자가 조립에 의한 core-shell 형태의 나노입자를 형성하게 된다. 본 연구에서는 이러한 LA결합 비율에 따라서 LMLA 20%, 30% 각각 두 종류의 약물 담지체를 합성하여 형광 분광계를 통해 CAC를 확인하였다. 그 결과 LMWSC에 LA의 결합 비율이 20%일 경우에는 0.22 mg/mL, 30%일 경우에는 0.13 mg/mL의 CAC 값을 나타냈으며, 이는 LA의 결합 비율이 30%의 경우에 더 적은 농도의 CAC 값을 확인할 수 있었다(Table 1, Figure 3). 또한, LMLA 및 LMLAF의 입자형성 시 그 형태와 크기를 확인하기 위해 TEM과 DLS을 수행한 결과 LMLA 및 LMLAF 모두 구형의 나노입자(Figure 4(B))와 단분산 입자 분포를 확인할 수 있었으며, LMLA 20%의 경우 320.1±10.8 nm, LMLA 30%의 경우

279.6±12.8 nm로 LA가 30% 결합되어 있을 경우에 입자크기가 더 작은 것을 확인할 수 있었다(Table 1, Figure 4(A)). 이러한 CAC와 입자크기 결과를 보여주는 이유는 LMLA 30%인 경우에 LA가 더 많이 결합되어 있어 core 내부에 강한 소수성 작용으로 인해 소수성 밀도가 증가했기 때문인 것으로 사료된다. 또한, LMLAF의 경우에 LMLA보다 입자크기가 상대적으로 감소하는 것을 확인할 수 있는데(Table 1, Figure 4(A)) 이는 FA 약물이 LMLA의 core 부분에 담지됨에 따라 LMLA 내부 core와 소수성 약물 FA 사이의 소수성 상호작용이 증가하여 보다 작은 입자를 형성한 것으로 사료된다. 또한, LMLAF 20%와 LMLAF 30%의 제타전위는 각각 32.8±0.5 mV 및 27.8±0.7 mV로 강한 양전하를 나타냈으며(Table 1), 이는 암세포의 표면 전하가 음전하인 것을 고려했을 때 높은 전하 상호작용이 유발되어 효율적으로 세포 내로 입자 유입을 유도할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, LMLAF 30%가 LMLAF 20%보다 낮은 제타전위를 보이는 이유는 LMWSC의 아민(-NH<sub>2</sub>) 그룹에 LA가 더 많이 도입되어 아민 그룹이 상대적으로 감소했기 때문인 것으로 사료된다. 이러한 LMLA 나노입자의 다양한 특성 분석을 통해 FA의 담지체로 활용 가능할 뿐만 아니라 더 나아가 의약학 분야의 약물 전달체로 응용 가능성을 확인하였다.



**Figure 4.** (A) Particle size distribution; (B) morphological image of LMLA and LMLAF: (a) LMLA 20%; (b) LMLA 30%; (c) LMLAF 20%; (d) LMLAF 30%.

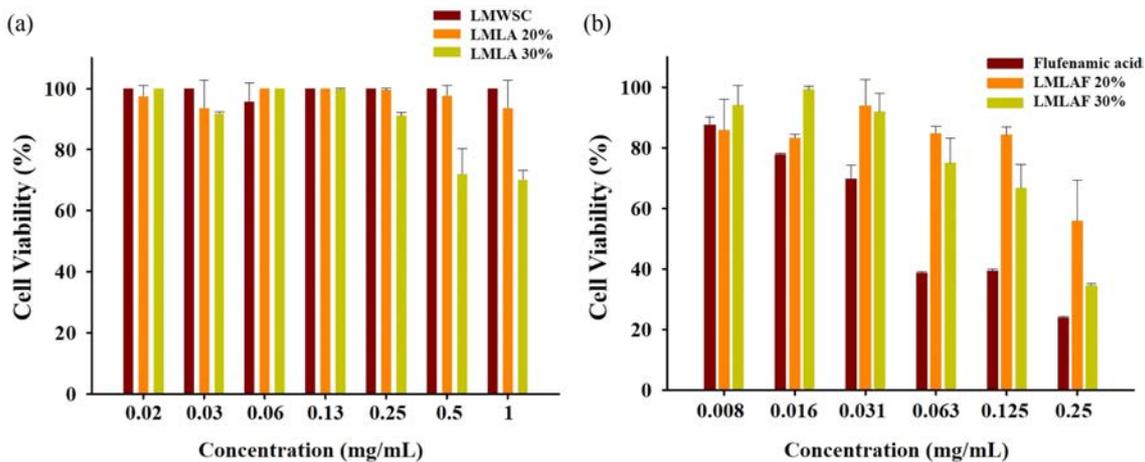
LMLAF로부터 FA의 담지 효율 및 방출 거동 분석. 방광암 치료제로 사용되는 FA의 단점을 개선하고 그 치료 효율을 극대화하기 위해 LMLA 나노입자 core 내부에 FA를 투석법에 의해 담지하였다. 소수성 LA의 결합 비율에 따라 FA 담지 효율은 Table 1에 요약하였다. 그 결과 LMLAF 1 mg당 FA의 담지 효율인 DC는 3.8%(LMLAF 20%)와 4.5%(LMLAF 30%)로 각각 나타났으며, 총 FA 담지 효율인 EE는 66.12%(LMLAF 20%), 80.46%(LMLAF 30%)로 높은 담지 효율을 확인하였다. LMLA 20% 보다 LMLA 30%가 FA의 담지 효율이 높은 이유는 소수성 LA가 더 많이 결합된 LMLA 30%의 경우 core 내부에 강한 소수성 작용으로 인한 높은 소수성 밀도가 형성되어 소수성 FA 약물과 상호작용이 증가했기 때문인 것으로 사료된다. 또한, LMLAF로부터 FA의 약물 방출 거동을 pH 변화에 따라 확인한 결과 pH 7.4의 경우 LMLAF 20%는 약 96시간 동안 FA 총 누적 방출량이 29.5%, LMLAF 30%는 23.4%의 방출량을 각각 보여줬다. pH 5.5의 경우 LMLAF 20%의 FA 총 누적 방출량은 39.7%, LMLAF 30%는 28.0%의 방출량을 각각 나타냈다(Figure 5). LMLAF 30%의 경우에 LMLAF 20% 보다 방출량이 상대적으로 더 적은 것을 확인할 수 있는데, 이는 소수성 LA가 LMLAF 30%에 더 많이 결합되어 있어 core 내부의 강한 소수성 밀도로 인해 FA 약물이 좀 더 천천히 방출되는 것으로 사료된다. 또한, pH 7.4 보다 pH 5.5에서 FA 방출량이 더 많은 것을 확인할 수 있는데, 이는 LMWSC의 pKa가 5.5-6.4로 약산성 환경일 경우 키토산 아민(-NH<sub>2</sub>) 그룹에 수소가 protonation되어 -NH<sub>3</sub><sup>+</sup>로 전환되면서 전하 반발력이 유도되어 더 많은 양의 FA가 방출된 것으로 사료된다. 이러한 담지효율과 방출 거동 결과를 통해 LMLAF를 방광암 치료제



**Figure 5.** Cumulative release profile of FA from LMLAF according to pH at each time point (0.5-96 h).

로 사용했을 시 산성 환경의 특성을 갖는 암세포 내에서 서방성 약물 방출을 유도하여 약물의 내성에 대한 문제를 해결함과 동시에 그 치료 효과를 극대화할 수 있을 것으로 사료된다.

**LMLA 및 LMLAF의 독성 및 항암 효과 규명.** LMLAF를 방광암 치료제로 사용 가능성을 규명하기 위해서 LMLA 나노입자의 생체 내 세포 독성 여부를 HEK293 정상세포 그리고 LMLAF의 항암 효과를 T24 방광암 세포에서 각각 MTT assay를 이용하여 확인하였다. 그 결과 LMWSC, LMLA 20% 및 LMLA 30% 모두 가장 높은 농도인 1 mg/mL에서 70% 이상의 세포 생존율을 나타냄에 따라 독성이 거의 없음을 확인하였다(Figure 6(a)). 또한, T24 방광암 세포에서 항암 효과



**Figure 6.** Evaluation of cytotoxicity and anticancer activity of LMLA and LMLAF using MTT assay: (a) HEK293 cell line; (b) T24 cell line.

를 확인한 결과 0.25 mg/mL 농도에서 FA 약물 자체는 23%의 세포 생존율을 보여주는 반면에 LMLAF 30%의 경우 38%의 세포 생존율이 나타나는 것을 확인하였다(Figure 6(b)). LMLAF 30%가 0.25 mg/mL 농도에서 담지된 FA 약물의 함량을 DC를 통해 계산해 봤을 때, 약 0.0113 mg/mL인 것을 확인하였고, 이는 약물 자체 FA의 양과 비교해봤을 때 약 1/22배 적은 양이며, 적은 약물량으로도 제조된 LMLA 약물전달체 내부에 담지되었을 시 항암 효과를 극대화할 수 있음을 규명하였다. 이러한 결과를 통해 세포 독성 및 항암 효과를 규명함으로써 제조된 LMLA와 LMLAF 나노입자가 체내 안전함과 동시에 방광암에 높은 치료 효율 기대할 수 있는 항암 제제로 사용이 가능할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구는 방광암 치료제로 사용되는 FA 약물의 문제점을 개선하기 위해 core-shell 형태의 LMLA 약물전달체를 가교제 EDC를 이용하여 합성하였고, 이에 FA를 소수성 core 내부에 담지하여 치료 효과를 극대화하고자 하였다. LMLA의 합성 유무는 <sup>1</sup>H NMR을 통해 합성되었음을 확인하였다. 또한, LMLA 및 LMLAF 나노입자의 입자크기, 제타전위, CAC 및 형태학적 이미지를 통한 물리·화학적 특성과 LMLAF로부터 FA의 담지 효율 및 방출 거동을 분석함으로써 LMLA가 FA의 담지체로 활용 가능성을 입증하였다. 더 나아가 LMLA 및 LMLAF의 세포 독성 및 항암 효과를 MTT assay를 통해 확인한 결과 세포 독성이 전혀 없음과 동시에 적은 약물로도 높은 항암 효과를 나타냈다. 이러한 결과를 통해 본 연구에서 개발한 LMLAF는 인체 내에서 높은 안전성을 갖을 뿐만 아니라 암치료 효율을 극대화할 수 있는 항암 제제로 사용이 가능함을 제시한다.

## 참 고 문 헌

1. Michel, L.; Rassaf, T.; Totzeck, M. Biomarkers for the Detection of Apparent and Subclinical Cancer Therapy-related Cardiotoxicity. *J. Thora. Dis.* **2018**, *10*, S4282-S4295.
2. Wang, J.; Zheng, Y.; Zhao, M. Exosome-Based Cancer Therapy: Implication for Targeting Cancer Stem Cells. *Front. Pharmacol.* **2016**, *7*, 533.
3. Allahyari, H.; Heidari, S.; Ghamgosha, M.; Saffarian, P.; Amani, J. Immunotoxin: A New Tool for Cancer Therapy. *Tumour Biology.* **2017**, *39*, 1010428317692226.
4. Kundranda, M. N.; Niu, J. Albumin-Bound Paclitaxel in Solid Tumors: Clinical Development and Future Directions. *Drug Des. Devel. Ther.* **2015**, *9*, 3767-3777.
5. Silva, E. F.; Bazoni, R. F.; Ramos, E. B.; Rocha, M. S. DNA-Doxorubicin Interaction: New Insights and Peculiarities. *Biopolymers.* **2017**, *107*, e22998.
6. Behnam, B.; Rezazadehkermani, M.; Ahmadzadeh, S.; Mokhtarzadeh, A.; Nematollahi-Mahani, S. N.; Pardakhty, A. Microniosomes for Concurrent Doxorubicin and Iron Oxide Nanoparticles Loading; Preparation, Characterization and Cytotoxicity Studies. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* **2018**, *46*, 118-125.
7. Aboian, M. S.; Yu, J. F.; Gautam, A.; Sze, C. H.; Yang, J. K.; Chan, J.; Lillaney, P. V.; Jordan, C. D.; Oh, H. J.; Wilson, D. M.; Patel, A. S.; Wilson, M. W.; Hetts, S. W. *In vitro* Clearance of Doxorubicin with a DNA-Based Filtration Device Designed for Intravascular Use with Intra-Arterial Chemotherapy. *Biomed. Microdevices* **2016**, *18*, 98.
8. Meredith, A. M.; Dass, C. R. Increasing Role of the Cancer Chemotherapeutic Doxorubicin in Cellular Metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *68*, 729-741.
9. Saraiva, C. R.; Praca, C.; Ferreira, R.; Santos, T.; Ferreira, L.; Bernardino, L. Nanoparticle-Mediated Brain Drug Delivery: Overcoming Blood-Brain Barrier to Treat Neurodegenerative

- Diseases. *J. Controlled Release*. **2016**, 235, 34-47.
10. Matoba, T.; Koga, J. I.; Nakano, K.; Egashira, K.; Tsutsui, H. Nanoparticle-Mediated Drug Delivery System for Atherosclerotic Cardiovascular Disease. *J. Cardiology*. **2017**, 70, 206-211.
  11. Mangal, S.; Gao, W.; Li, T.; Zhou, Q. T. Pulmonary Delivery of Nanoparticle Chemotherapy for the Treatment of Lung Cancers: Challenges and Opportunities. *Acta Pharmacol. Sin.* **2017**, 38, 782-797.
  12. Park, J.; Choi, Y.; Chang, H.; Um, W.; Ryu, J. H.; Kwon, I. C. Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment. *Theranostics*. **2019**, 9, 8073-8090.
  13. Baetke, S. C.; Lammers, T.; Kiessling, F. Applications of Nanoparticles for Diagnosis and Therapy of Cancer. *Brit. J. Radiol.* **2015**, 88, 20150207.
  14. Jeong, G. W.; Park, S. C.; Choi, C.; Nam, J. P.; Kim, T. H.; Choi, S. K.; Park, J. K.; Nah, J. W. Anticancer Effect of Gene/Peptide Co-Delivery System Using Transferrin-Grafted LMWSC. *Int. J. Pharm.* **2015**, 488, 165-173.
  15. Mammeri, M.; Chevillot, A.; Thomas, M.; Polack, B.; Julien, C.; Marden, J. P.; Auclair, E.; Vallee, I.; Adjou, K. T. Efficacy of Chitosan, a Natural Polysaccharide, Against *Cryptosporidium Parvum* *in vitro* and *in vivo* in Neonatal Mice. *Exp. Parasitol.* **2018**, 194, 1-8.
  16. Ribeiro, J. C. V.; Vieira, R. S.; Melo, I. M.; Araujo, V. M. A.; Lima, V. Versatility of Chitosan-Based Biomaterials and Their Use as Scaffolds for Tissue Regeneration. *Sci. World J.* **2017**, 8639898.
  17. Matica, M. A.; Aachmann, F. L.; Tondervik, A.; Sletta, H.; Ostafe, V. Chitosan as a Wound Dressing Starting Material: Antimicrobial Properties and Mode of Action. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 5889.
  18. Cheung, R. C.; Ng, T. B.; Wong, J. H.; Chan, W. Y. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar. Drugs*. **2015**, 13, 5156-5186.
  19. Shahid Ul, I.; Butola, B. S. Recent Advances in Chitosan Polysaccharide and its Derivatives in Antimicrobial Modification of Textile Materials. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 121, 905-912.
  20. Jang, M. J.; Kim, D. G.; Jeong, Y. I.; Jang, M. K.; Nah, J. W. Preparation and Characterization of Low Molecular Weight Water Soluble Chitosan Gene Carrier Fractioned according to Molecular Weight. *Polym. Korea* **2007**, 31, 555-561.
  21. Guinamard, R.; Simard, C.; Del Negro, C. Flufenamic Acid as an Ion Channel Modulator. *Pharmacol. Ther.* **2013**, 138, 272-284.
  22. Sun, H.; Wei, Y.; Deng, H.; Xiong, Q.; Li, M.; Lahiri, J.; Fang, Y. Label-Free Cell Phenotypic Profiling Decodes the Composition and Signaling of an Endogenous ATP-Sensitive Potassium Channel. *Sci. Rep.* **2014**, 4, 4934.
  23. Smolkova, R.; Zelenak, V.; Smolko, L.; Sabolova, D.; Kuchar, J.; Gyepes, R. Novel Zn(II) Complexes with Non-Steroidal Anti-Inflammatory Ligand, Flufenamic Acid: Characterization, topoisomerase I inhibition activity, DNA and HSA Binding Studies. *J. Inorg. Biochem.* **2017**, 177, 143-158.
  24. Malinovskaja-Gomez, K.; Labouta, H. I.; Schneider, M.; Hirvonen, J.; Laaksonen, T. Transdermal Iontophoresis of Flufenamic Acid Loaded PLGA Nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2016**, 89, 154-162.
  25. Matsumoto, R.; Tsuda, M.; Yoshida, K.; Tanino, M.; Kimura, T.; Nishihara, H.; Abe, T.; Shinohara, N.; Nonomura, K.; Tanaka, S. Aldo-keto Reductase IC1 Induced by Interleukin-1beta Mediates the Invasive Potential and Drug Resistance of Metastatic Bladder Cancer Cells. *Sci. Rep.* **2016**, 6, 34625.
  26. Hendriks, C. M.; Penning, T. M.; Zang, T.; Wiemuth, D.; Grunder, S.; Sanhueza, I. A.; Schoenebeck, F.; Bolm, C. Pentafluorosulfanyl-Containing Flufenamic Acid Analogs: Syntheses Properties and Biological Activities. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 4437-4440.

**출판자 공지사항:** 한국고분자화학회는 게재된 논문 및 기관 소속의 관할권 주장과 관련하여 중립을 유지합니다.