

HPV-관련성 자궁경부 병변에서 인유두종 바이러스(HPV) 감염에 대한 pH/온도 감응성 분사제제를 이용한 국소 치료법 개발

가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 이화여자대학교 화학과 나노과학부², 고려대학교 의과대학 안산병원
의과학연구소 감염면역학실험실³, 경북대학교 자연과학대학 생명공학부⁴, 관동대학교 의과대학 부속 제일병원 병리과⁵
김찬주¹ · 정병문² · 김태우³ · 강태홍³ · 노경희³ · 김명옥⁴ · 류재웅⁴ · 김희숙⁵ · 박종섭¹

목적 : 고위험 인유두종 바이러스(HPV)는 자궁 경부암, 자궁 경부 상피내 이형증(Cervical Intraepithelial Neoplasia)의 원인으로 확실히 밝혀져 있다. 여러 종류의 HPV 치료백신과 약물들이 이러한 자궁 경부암과 이형증 병변의 치료에 시도되고 있으나, 분사 제제의 방법을 이용하면 자궁 경부에 국소적으로 약물을 쉽게 전달할 수 있기 때문에 임상적 적용에 유리하다. pH-민감성 chitosan/alginate gels (pH=3.8-4.5)과 온도 민감성 PEG/PLA (poly (L-lactic acid)/polyethylene glycol) 다원 공중합체 수용액으로 Paclitaxel (PTX)을 국소적으로 지속적 전달로 *in vivo*에서 HPV양성인 HeLa 세포주의 억제 효과를 일으키는 효과가 있는지 알아보려고 한다.

연구 방법 : Paclitaxel을 Chitosan/Alginate Microspheres에 함유시키는 방법은 “spray-drying method”를 사용하였다. Paclitaxel이 함유된 PEG/PLA 다원 공중합체 젤은 “solvent displacement method”로 만들었다. 만들어진 PEG/PLA multiblock copolymer는 체온 범위가 “sol-gel-sol 전이온도”가 되도록 만들었다. Paclitaxel-Chitosan/Alginate Microsphere와 PEG/PLA (poly (L-lactic acid)/polyethylene glycol) 다원 공중합체의 *in-vivo* 효과는 Balb/c Nu/Nu athymic mice에 대하여 HeLa 세포주를 주입하여 만든 종양에 대한 Paclitaxel (10 mg/kg, 48 hr interval)젤을 투여한 뒤 8일째와 10일째에 종양 크기의 변화를 측정하여 평가하였다.

결과 : Paclitaxel-Chitosan/Alginate Microspheres와 Paclitaxel-PEG/PLA 다원 공중합체를 투여한지 8일째와 10일째에, xenograft tumors (HeLa cells; HPV-18 positive state)를 가진 balb/c nu/nu nude mouse의 종양성장 억제 효과가 관찰이 되었다. Paclitaxel-PEG/PLA 다원 공중합체는 PTX정맥 투여군과 종양 억제 효과가 비슷하였다.

결론 : Paclitaxel-Chitosan/Alginate Microspheres와 Paclitaxel-PEG/PLA 다원 공중합체 nanoparticle은 매우 특이적인 pH-민감성과 온도 민감성을 가지며, 자궁 경부암 세포주(HeLa)를 가진 nude mice에서 매우 효과적인 덜 침습적인 치료방법으로 여겨진다.

중심단어 : 자궁 경부암, pH-민감성, 온도 민감성, 키토산, Paclitaxel

서 론

HPV (Human Papillomavirus, 인유두종 바이러스)는 가장 흔하게 성적으로 전파되는 감염성 질환의 하나이다. 또한 HPV는 피부 사마귀(wart)등의 양성 질환부터 자궁

경부암까지 다양한 질병을 일으킨다. 우리나라 여성에서 아직도 자궁 경부암은 상피내암을 포함할 경우 두번째로 흔한 암이다.¹ 자궁 경부암의 발생은 거의 100% HPV 감염과 연관되어 있으며, 상피이형증(dysplasia)과 상피내암(carcinoma *in situ*)등의 전구암 단계를 거쳐서 발생하는 것으로 알려져 있다. 이런 전구암 단계는 약 5-20년까지 상피내에 병소가 국한된 상태로 존재하는 질환이며, 육안적 또는 질확대경으로 쉽게 진단할 수 있으며, 용이하게 접근할 수 있는 해부학적 장점이 있다. 이런 이유로 전체 여성을 대상으로 하는 세포진 검사

논문접수일 : 2007년 10월 1일 채택일 : 2007년 11월 6일
교신저자 : 박종섭, 137-701 서울특별시 서초구 반포동 505번지
가톨릭대학교 의과대학 산부인과학교실
전화 : (02) 590-2596 · 전송 : (02) 595-8774
E-mail : jspark@catholic.ac.kr

이 논문은 2004년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음 (KRF-2004-042-E00068).

(cytology)를 통하여 전암 단계에서 진단하고 치료하게 됨에 따라 최근 자궁 경부 침윤암의 발생은 현저히 감소되었다.^{2,3} 최근 국내에 시판이 허가된 4가 HPV 예방 백신은 HPV감염과 자궁 경부 이형증(cervical dysplasia) 및 성기 Condyloma의 예방에는 효과가 있는 것으로 보고되고 있으나,⁴ 현재까지 HPV 감염과 자궁 경부 전암 병변에 대한 치료적 백신은 아직까지 만족할 만한 수준에 이르지 못하였다. 자궁 경부 전암 병변인 자궁 경부 이형증 또는 HPV 감염에 대한 약제 연구는 국제적으로도 커다란 발전이 없는 상태로 효과적인 화학예방요법을 위하여 극소량의 항암제를 자궁경부 병변에 효과적으로 전달하는 방법을 연구하고자 한다.

자궁경부암에 사용되는 여러 항암제 중 Paclitaxel이 CaSki, HeLa, C33A 자궁경부암 세포주에서 증식이 의미 있게 억제되는 것이 관찰되었으며, HeLa 세포주에서 Paclitaxel에 의한 항증식 효과는 세포막 및 미토콘드리아에 의해 매개되는 두 종류의 apoptosis경로를 동시에 거쳐서 일어남이 보고되었다.⁵ Paclitaxel투여 후 HPV E6/E7의 발현 감소 및 p53와 Rb의 발현 증가가 관찰되어 항바이러스 효과가 실험에 의하여 확인되어 Paclitaxel을 선정하여 연구하였다. 자궁 경부의 HPV-관련성 병변에 국소적으로 직접 전달하기 위하여 Paclitaxel 주 사용 제제에 포함된 Cremophor EL의 독성을 감소시키면서, 투여에 의한 치료 효과를 올릴 수 있는 안전한 제형을 만들어, 자궁경부의 생리적인 조건 (pH=3.8-4.5, 온도=37°C)에서 수초내에 자궁경부 병변에 점착성을 갖는 수화젤의 상태가 되어 일정 기간에 걸쳐 서서히 약물이 방출될 수 있는 system을 만들어 사용하였다.

키토산은 생체 적합성 다당류(polysaccharide)로서 독성이 없고 점착성이 큰 생분해성 natural polymer이기 때문에 의학적으로 많이 사용되고 있다.⁶ 키토산은 젤은 의약 물질의 코팅이나 biochemicals, plant embryo, whole cells, microorganism and algae의 gel entrapment 등으로 응용되고 있다.⁷ Alginate는 in vitro와 in vivo에서 연골 세포의 분열을 지지하는 생체 적합성 다당류이다.⁸ 이러한 키토산과 polyanion complex는 의약과 단백질 전달, 세포 이식 등에 널리 사용되어 왔으며,⁹ 그 중에서도 키토산과 alginate complex는 의약 전달 시스템으로 사용하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.¹⁰⁻¹² 본 논문에서 Paclitaxel을 효과적으로 키토산-alginic acid 제제로 loa-

ding하는 방법을 연구하여, pH민감성 젤로서 HeLa자궁 경부암 세포주를 가진 nude mice에서 국소적 투여에 의한 항종양효과를 관찰하고자 하였다.

온도 민감성 젤인 poly (L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) 수용액(>15 wt. %) 다원 공중합체(PEG/PLLA multiblock-copolymer)는 온도 증가에 따라 응집이 되며, PEG PLGA nanoparticle은 nanoparticle의 크기와 nanoparticle에서 PEG가 떨어져 나가는 속도에 의하여 생체에 분포가 일어난다.^{13,14} 본 연구에서는 온도 민감성 젤인 Paclitaxel 을 함유한 PEG/PLA multiblock-copolymer체가 생체 온도범위인 30-45°C에서 역 온도 젤 형성을 보이도록 제조하여 HeLa자궁 경부암 세포주를 가진 nude mice에 국소적으로 투여하여 전신적으로 투여된 Paclitaxel에 의한 항종양효과와 비교 관찰하여 Paclitaxel을 이용한 HPV-관련성 자궁경부 병변의 국소 치료의 가능성을 알아보하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 온도에 민감하게 젤이 되는 PEG/PLLA (poly ethylene glycol/ poly L-lactic acid) 수용액 다원 공중합체 수용액의 준비

체온 (37°C)에서 최대의 점도를 보이는 PEG/PLLA는 PEG (polyethylene glycol) (Mn-600 Da)과 poly (L-lactic acid) (Mn-1300 Da)으로부터 얻어진 다원 공중합체(Mn-6700 Da) 수용액을 만들어 사용하였다.

L-lactide, stannous octoate, 1,6-hexane diol, poly (ethylene glycol) (MW=600) (PEG), 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, methylene blue, succinic anhydride, succinic acid, dicyclohexylcarbodiimide, 4-N,N-dimethyl aminopyridine, tetrahydrofura, 무수 톨루엔(SIGMA-ALDRICH, Korea), 디에틸이써와 n-헥센(대정, 한국)이 사용되었다.

PLLA (poly L-lactic acid)는 L-lactide를 stannous octoate를 촉매로하여 전형적인 링 오프닝 중합으로 합성하였다.¹⁵ α, ω -Dicarboxylic acid로 중결된 PLLA (PLLA-DA)를 만들기위해 succinic anhydride를 PLLA와 반응시켰다. PLLA/PEG 다원 공중합체에 사용된 PLLA-DA를 합성하기 위해서 PLLA (8.0 g), succinic anhydride (1.6 g), succinic acid (0.04 g)을 톨루엔(80 ml)에 녹인 뒤, 반응 혼합물은 100°C에서 6시간동안 교반하

였다. 생성물은 디에틸이썬/n-헥센으로 재침전하여 정제하였다.

PEG/PLLA 다원 공중합체의 합성은 PEG와 α, ω -dicarboxylic acid로 중결된 PLLA의 /디카르복실산 말단기를 dicyclohexylcarbodiimide를 사용하여 커플링시켜 합성하였다(Fig. 1).¹⁶ 굴절 지수 검출기(Waters 410)를 사용하는 젤 투과 크로마토그래피(GPC) 시스템(Waters 515)을 이용해 고분자의 분자량과 분자량 분포를 측정하였다. In situ 젤 형성을 알아보기 위하여 상온에서 PEG/PLLA 다원 공중합체(PIII)수용액(20 wt. %; 0.3 ml)을 37°C 중류수가 담긴 바이알에 5초 동안 주사하였다. 젤을 정확하게 관찰하기 위해 고분자 용액에 블루 염료(0.01 mg 메틸렌 블루)를 첨가하여 주사하는 동안 젤이 형성되는 모습을 관찰하였다. 졸-젤 전이는 시험관을 뒤집는 방법으로 측정하였다. PEG/PLLA 다원 공중합체 수용액 0.5 ml를 담은 4 ml 바이알(직경 1.1 cm)을 10°C에서 20분 동안 중탕냄비에 담근 뒤 전이 온도는 온도를 1°C씩 올리면서 유리병을 뒤집었을 때, 흐름(졸) - 안 흐름(젤) 척도에 의하여 결정하였다. 전이 온도는 각지점에서 세 가지 측정의 평균으로 Fig. 2와 같이 낮은 온도

에서 고분자 수용액은 투명한 졸 상태이다. 온도가 증가함에 따라 그것은 고분자의 농도에 의존하여 30-37°C 사이에서 졸-젤 전이를 나타낸다. 젤 상태는 초기의 고분자의 농도에 의존하여 42-47°C의 더 높은 온도에서 불투명한 졸로 다시 바뀐다. PEG/PLLA 다원 공중합체(Mn-6700 Da) 수용액에 acetonitrile을 사용하여 solvent evaporation method로 Paclitaxel을 1 mM이 되도록 loading하였다.

2. pH 민감성 젤이 되는 항암 물질 함유 Chitosan-alginic acid

Paclitaxel (신풍제약, 한국)이 함유된 키토산 제제는 스프레이 건조기를 사용하여 마이크로구를 만드는 방법을 사용하였다. 키토산 제제를 만들 때 넣어준 tween 80 (SIGMA-ALDRICH, Korea)은 질(vagina)쪽으로 미국 식품 의약청(FDA) 승인이 난 물질이기 때문에 선택하였다(Fig. 3). 스프레이 건조 방법을 이용한 키토산 마이크로구는 Spray Dryer (SD-1000, EYELA)를 사용하여 만들었다. 저분자량의 키토산을 0.05 M 염산 수용액에 1 w/v%가 되게 완전히 녹인 후(최종 부피; 468.8 ml), tween 80 0.4688 g을 포함한 에탄올을 725.2 ml를 넣고 최종 pH가 6이 되게 했다. Paclitaxel이 들어있는 키토산 마이크로구를 만들 때에는 에탄올에 paclitaxel 0.22 g이 포함되도록 하였다. 이렇게 준비한 용액을 inlet 온도는 140°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), outlet 온도는 90°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), blower 0.5 m³/min, speed 6 rpm으로 스프레이 건조하였다. 만들어진 키토산 제제는 pH 7.4 완충 용액, pH 13 완충 용액, 에탄올에 각각 분산

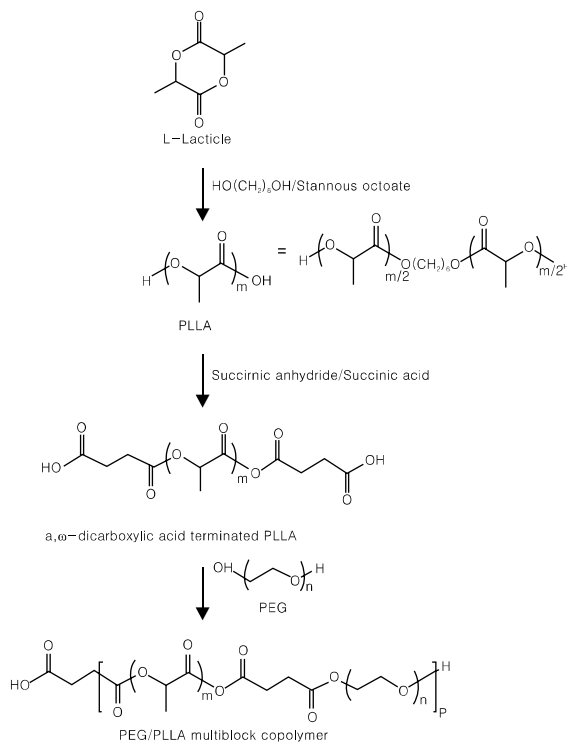


Fig. 1. Synthesis of PEG/PLLA multiblock-copolymer.

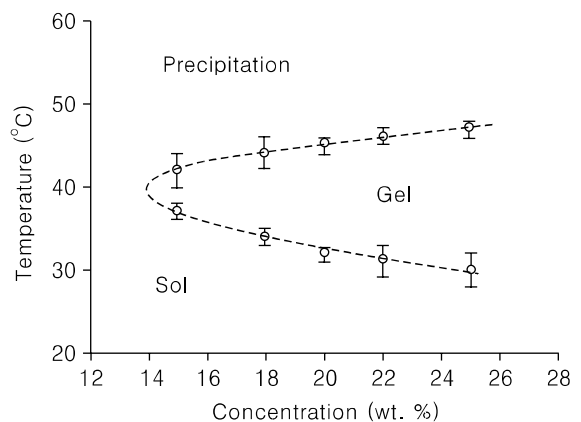


Fig. 2. The states of PEG/PLLA multiblock-copolymer (PIII) in distilled water.

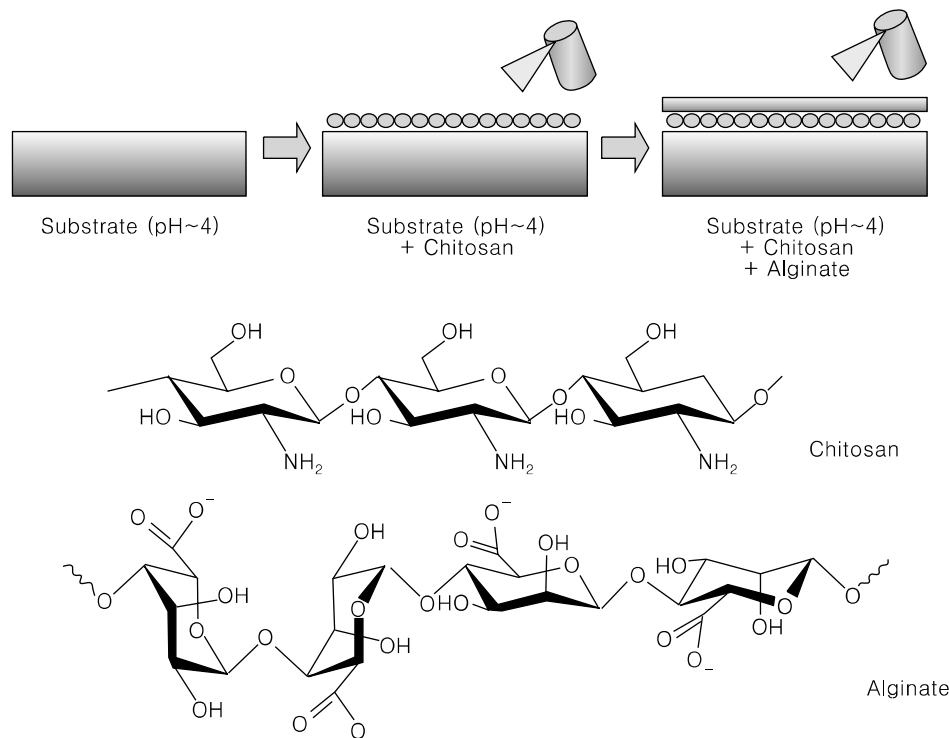


Fig. 3. The process of Chitosan-Alginate gel. After loading of Chitosan-microspher in the substrate of pH 4, alginate was sprayed (upper). The structure of chitosan and alginate (bottom).

시킴 SEM (scanning electronic microscopy) 을 찍어 모양을 확인하여 각 용액 내에서의 안정성을 알아보았다.

3. *In vivo* studies

1) Mouse model of pH-sensitive paclitaxel-gel treatment

Paclitaxel을 함유한 Chitosan Microsphere의 효과를 보기 위하여 약 20 g 무게의 생후 6-8주된 C57BL/6 mice 5마리를 대상으로 등부분 피부에 표피에 젤을 형성시킨 후 차이를 지켜보았다. 3마리에는 Paclitaxel을 함유한 키토산 마이크로구 용액(에탄올에 2 w/v %로 분산시킨 용액)과 alginate 용액(포스페이트 버퍼에 1 wt. %로 녹인 용액)으로 젤을 형성시켰고 나머지 두 마리에는 아무 물질도 발라주지 않았다. 쥐를 마취시킨 뒤, 가로, 세로 약 2×5 cm 정도로 쥐의 털을 깨끗하게 밀어내었다. 20분 후 붓으로 1 v/v % acetic acid를 키토산 용액을 뿌릴 부분에 발랐다. 키토산 마이크로구 용액 75 μ l를 뿌린 뒤 바로 alginate 용액 75 μ l를 뿌려서 젤을 형성시켰다. 자궁 경부는 수분이 충분한 상태이지만 실험 조건인 쥐의 등은 수분이 쉽게 증발될 수 있는 조건이므로 2분 뒤 tegaderm으로 고정시켜 주었다.

2) Human cancer xenograft model and pH-sensitive and temperature sensitive paclitaxel-gel treatment

/Balb/c nu/nu nude mouse (8-10 wks old, mean body weight 20 gram) 20마리에 1×10^6 HeLa tumor cell을 복부 피하에 주사하여 tumor nodule이 평균 직경 4 mm에 도달한 4일째에 6군으로 나누어 실험하였다(Table 1). Paclitaxel 함유 상태의 Chitosan-Alginate microsphere (1 mM)와 PEG/PLLA mutiblock copolymer micelle (1 mM)을 사용하였으며(G3, G6; n=4), 각각의 음성대조군으로는 Paclitaxel이 없는 상태의 gel (G2, G5; n=3)과 PBS만을 바른 군을(group 1, n=3) 사용하였다. 양성 대조군으로 Paclitaxel수용액을 희석하여(1 mM)상태로 복강내 주사하였다(G4; n=3). Chitosan-Alginate microsphere를 이용한 실험은 주의 피부에 항상 1 v/v % acetic acid를 Chitosan 용액을 뿌릴 부분에 먼저 발라 산성 상태를 유도한 뒤, Chitosan Microsphere 용액을 뿌린 뒤 바로 alginate 용액을 뿌려서 Gel을 형성시켰다. 이를 간격으로 175 microliter씩 각각 도포한 뒤(0.15 mg/each mouse, each time), 복부 표면에 생긴 nodule의 크기를 측정하여 평균을 관찰하였다.

Table 1. Design of *in vivo* experiment of nude mouse

Kinds of drug	Name of experimental group	Mouse number	Methods
Group of Chitosan-Alginate	G1: (-) control group	3	Treated with only PBS
	G2: CA only group	3	Spray with Chitosan-Alginate only
	G3: CA-Taxol group	4	Spray with Taxol (1 mM) containing Chitosan-Alginate
	G4: Taxol iv group	3	Intraperitoneal Injection of Cremophor EL-based Paclitaxel
Group of PEG/PLLA mutiblock copolymer micelle	G5: (-) control group	3	Spray with PEG/PLLA polymer only
	G6: 1 mM group	4	Spray with Taxol (1mM) containing PEG/PLLA polymer (1 mM)

결 과

1. PEG/PLLA (poly ethylene glycol/ poly L-lactic acid) 다원 공중합체의 특징

PEG/PLLA (poly ethylene glycol/ poly L-lactic acid) 다원 공중합체 고분자는 친수성인 PEG와 소수성인 poly L-lactic acid 블록이 물에서 코어-셸 구조를 형성하였는데, 다원 공중합체 마이셀의 크기는 Dynamic Light Scattering에 의하면 낮은 농도 (0.1%)의 PEG/ PEG/ PLLA 공중합체(PIII)의 마이셀의 평균반지름은 15°C-35°C에서 20-22 nm, 45°C에서 26 nm로 증가하고 55°C에서 32 nm로 증가하여 존재하였다. 그러나, 높은 농도에서(1.0%) 마이셀의 평균반지름은 증가하여 15-25°C에서 21 nm 35°C에서 31 nm가 되었다.

줄-젤 전이온도, 젤 창, 임계 젤 농도의 조절로 *in situ* 젤 형성 시스템을 여러가지로 디자인할 수 있다. 전체 분자량이 4,500에서 6,700으로 증가함에 따라 상태도는 2-4°C 이동하는데, 다원 공중합체(25 wt. % 수용액)의 높은 강도가 35-40°C의 온도 범위 내에서 관찰되었다. PEG/PLLA 다원 공중합체의 분자량이 4,500에서 6,700으로 증가하면서 37°C에서 강도도 100 Pa에서 300 Pa로 증가했다. 분자량이 큰 PEG/PLLA 다원 공중합체(PIV; M_n -7,800)는 물에 녹지 않았다.

주사 또는 분사 가능한 온도민감성 생체물질은 상온 또는 더 낮은 온도에서는 점도가 낮은 수용액이면서, 체온 범위인 30-45°C의 젤 창과 젤 강도(>100 Pa)를 가지는 PEG/PLLA 다원 공중합체(PIII)는 블록 길이가

600/1,300이고 전체 분자량이 6,700 Da인 경우로 판정되어 본 실험에서 사용되었다.

2. Paclitaxel-함유 키토산 마이크로구의 합성

Paclitaxel을 함유하는 키토산 제제를 스프레이 건조 방법으로 만든 경우, paclitaxel을 함유하는 키토산(저분자량 키토산) 마이크로구의 수득률은(Drug loading efficiency)는 35% 였다. Paclitaxel을 함유하는 키토산(저분자량 키토산) 마이크로구에는 paclitaxel이 마이크로구 1 mg 당 4.3×10^{-2} mg paclitaxel이 있었고 encapsulation efficiency는 98% 였다. 이 키토산 마이크로구를 2 w/v %로 에탄올에 녹여서 용액 내의 paclitaxel 농도를 1 mM로 만들었다. spray dryer (SD-1000, EYELA)를 사용하여 만든 키토산 마이크로구와 Sonication 방법으로 만든 키토산 마이크로구를 scanning electronic microscope (SEM)으로 관찰하였다.

Sonication 방법으로 만든 키토산 제제는 불규칙 방사형이으나(Fig. 4A), 스프레이 건조 방법으로 만든 키토산 마이크로구는 크기는 작은 것은 1 μ m부터 큰 것은 15 μ m 까지 균일하지 않았으나 동글동글한 모양 이었다(Fig. 4B). 키토산 마이크로구의 용액 내 안정성을 보기 위하여 pH 7.4 완충 용액, pH 13 완충 용액, 에탄올에 각각 분산시켜서 SEM을 찍어보았다. 그 결과 pH 7.4와 pH 13 완충 용액에서는 키토산 마이크로구가 녹아서 뭉친 것 같은 형상을 하고 있었고(Fig. 4C, 4D), 에탄올에서는 처음의 동글동글한 모양을 잃지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4E).

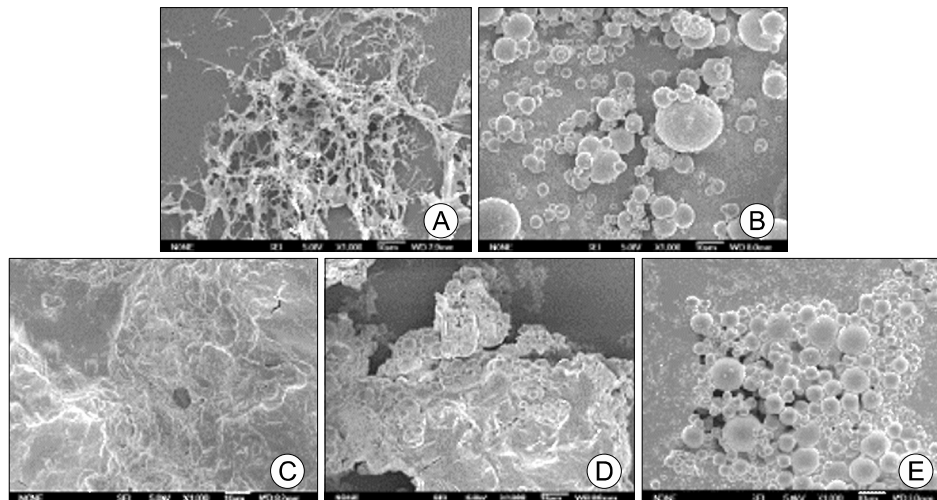


Fig. 4. Transmission electron microscope micrograph of Chitosan-microspher by sonication methods (A), spray-drying methods (B), dispersed state of chitosan microsphere in pH 7.4 buffer (C), in pH 13 buffer (D), in ethanol (E). Magnification pose : $\times 1,000$, scale bar; $10\ \mu\text{m}$.

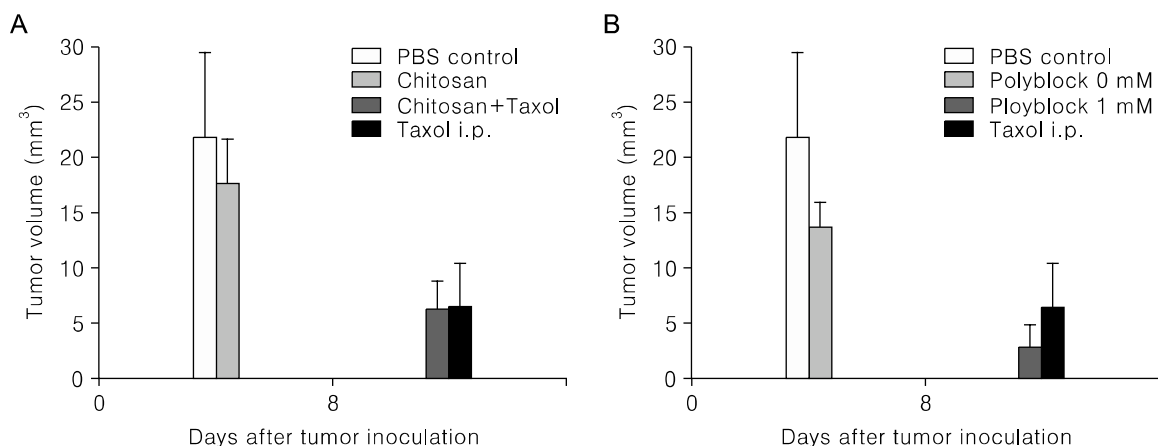


Fig. 5. In vivo tumor protection experiments using HeLa tumor cells at day 8. (A) Chitosan microsphere/Alginate experiment : intraperitoneal injection of 1mM Paclitaxel was used as a positive control and PBS treated group was a negative control. 1 mM Paclitaxel containing Chitosan microsphere/Alginate group showed similar suppression of tumor growth in positive control group (ip injection group). (B) PEG/PLLA mutiblock copolymer experiment.

3. 온도에 민감하게 젤이 되는 Paclitaxel-PEG/PLLA (poly ethylene glycol/ poly L-lactic acid) 다원 공중합체 수용액과 pH 민감성 젤이 되는 Paclitaxel-Chitosan-Alginic acid의 치료 효과

1 mM Paclitaxel이 포함된 Chitosan microsphere/ Alginate를 사용한 군(G3)과 PEG/PLLA mutiblock copolymer micelle 사용군(G6)에서 Balb/c nu/nu nude mouse (8-10 wks old, mean body weight 20 gram)에 주사된 HeLa tumor cell의 tumor nodule의 평균 크기가 8일째와 10일째에 음성대조군으로 PBS만 사용한 군(G1) 보다 현저히

감소한 것이 관찰되었다(Fig. 5, Fig. 6). 또한, 양성 대조군으로 복강내 Paclitaxel 직접 주사군(G4)에서의 종양크기와 별 차이가 없는 것이 관찰되었다(Fig. 5, Fig. 6).

고 찰

HPV 감염에 의한 자궁 경부암 전암 병변인 자궁 경부 이형증등의 병변에 대한 치료적 목적의 항암, 항바이러스 물질 극소량을 자궁경부 병변에 효과적으로 전달하는 방법을 연구하는 것은 아직도 국내 여성암의 호발 암

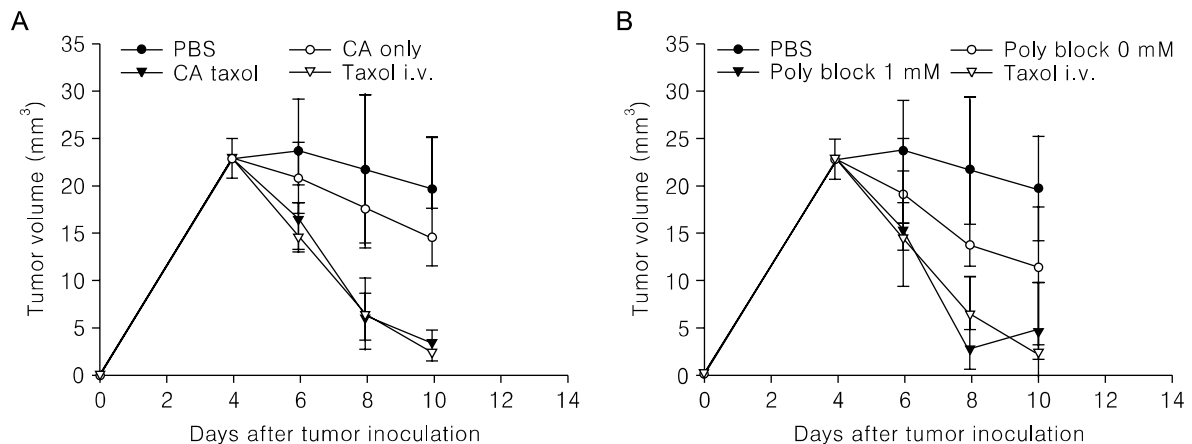


Fig. 6. Effect of Paclitaxel-Chitosan microsphere/Alginate (A) and PEG/PLLA mutiblock copolymer containing Paclitaxel (B) on tumor volume in mice with HeLa tumors. (A) *Filled diamonds* PBS alone, *unfilled diamonds* Chitosan microsphere/Alginate (no paclitaxel), *Filled triangles* Chitosan microsphere/Alginate containing 1 mM Paclitaxel, *Unfilled triangles* iv treatment of 1 mM Paclitaxel. (B) *Filled diamonds* PBS alone, *unfilled diamonds* Poly Block only (no paclitaxel), *Filled triangles* Chitosan microsphere/Alginate containing 1 mM Paclitaxel, *Unfilled triangles* iv treatment of 1 mM Paclitaxel. Data points and error bars represent the means \pm SD.

종인 자궁 경부암의 예방에 매우 중요하다.

자궁 경부암에 대한 항암 효과와 HPV에 대한 항바이러스 효과가 있는 물질 중 Paclitaxel은 세포 분열 주기의 G2 mitotic phase에서 tubulin dimer와 상호 작용을 일으켜, microtubule의 polymerization을 촉진시켜, 매우 안정적인 microtubules을 만들어서 세포 분열을 억제한다.^{17,18} Paclitaxel 투여에 의하여 CaSki, HeLa (HPV-18 양성), C33A등의 자궁경부암 세포주에서 증식이 의미 있게 억제되었으며 ($p < 0.05$), 이 중 가장 민감한 반응을 보였던 HeLa 세포주에서 Paclitaxel노출 전에 비하여 유의한 발현 차이를 보인 단백질 중 이러한 항증식 효과과 세포막 및 미토콘드리아에 의해 매개되는 두 종류의 apoptosis경로를 동시에 거쳐서 일어남이 밝혀져 있다. 또한 Paclitaxel투여에 의한 발현 증가 단백질 중 BUB3 (세포 분열 조절부위 단백질) siRNA처리를 통하여 Paclitaxel에 의한 세포주기 억제가 소실되면서, HPV E6/E7의 발현 감소와 p53/Rb의 발현 증가가 관찰되어 HPV에 대한 항바이러스 효과가 증명 되고 있다.⁵ 그러나, Paclitaxel은 매우 hydrophobic molecule로서 물에 잘 녹지 않으며, 실제 임상에서 사용되는 치료용 Paclitaxel (TaxolR; Bristol Pharmaceuticals K. K., Tokyo, Japan)은 ethanol과 Cremophor EL (basf Chemicals, Ludwigshafen, Germany) is 이 50:50 (v/v) 비율로 된 용매에 6 mg/ml 농도로 녹아 있는 상태이다 이러한 주사용 제제에 포함된 Cremophor

EL은 심각한 Hypersensitivity reaction을 종종 일으키기도 한다.^{19,20} Paclitaxel과 함께 투여되는 Cremophor의 독성을 감소시키면서, 투여에 의한 치료 효과는 올리는 안전한 제형을 위한 시도가 있어 왔다. Paclitaxel을 국소적 치료용으로 사용하기 위하여는 Microsphere나, Surgical Paste, Implants등의 형태로 시도를 하여 왔다. 본 연구에서 사용한 Paclitaxel을 사용한 pH/온도 민감성 졸-겔 전이 물질 및 분사제제는 국소적 약물전달이 용이하고, 경구/정맥 주사에 비해 조직 및 세포의 수득률을 극대화시킬 수 있기 때문에 임상적 적용에 매우 유리하다. 또한 인체에 유해한 유기용매를 사용하지 않기 때문에 잔여 유기용매로 인한 부작용을 우려하지 않아도 되는 장점이 있다. 또한 자궁경부의 생리적인 조건(pH=3.8-4.5, 온도=37°C)에서 수초내에 sol-to-gel 전이를 일으키면서, 자궁경부 병변에 점착성을 갖는 수화젤의 형태로, 일정한 기간에 걸쳐 서서히 약물을 방출될 수 있기 때문에 매우 이상적이다.

pH민감성 젤인 키토산-alginate acid 제제에 포함된 키토산은 키토산은 물에 잘 녹지 않는 약물의 용해도를 증가시키며, polyphosphates, sulphates와 같은 저분자량 counterion과 결합하거나 glutaraldehyde와 가교되면 젤이 형성된다. 키토산 마이크로구를 만드는 방법에는 음이온과 반응시키는 방법,^{21,22} 다른 화학 물질과 가교시키는 방법,^{23,24} 스프레이 건조 방법^{25,26} 등 여러 가지가 있다.

저자들은 본 실험에서 키토산 마이크로구를 만들 때, 스프레이 건조 법을 사용하였는데, 마이크로구의 수득률이 sonication방법보다 80% 낮았지만, Paclitaxel 함유 키토산(저분자량 키토산) 마이크로구가 35%, encapsulation efficiency는 98%라는 좋은 성적을 보였다.

키토산-alginate acid 제제는 자궁 경부의 pH (약 3.7-5.5)에 가까운 pH 4로 맞추어진 상태의 쥐의 피부에 Paclitaxel을 함유한 키토산을 뿌리면 키토산의 pK_a 보다 pH가 낮기 때문에 키토산 마이크로구의 표면이 녹으면서 점착성이 생긴다. 이 위에 alginate 1 wt. %를 뿌리면 이온 결합이 형성되면서 젤이 약 15시간정도 유지가 되어(data not shown) 항암, 항바이러스 작용의 Paclitaxel을 효과적으로 HPV관련성 병변에 전달 할 수 있었다.

Balb/c nu/nu nude mouse (8-10 wks old, mean body weight 20 gram)에 주사된 HeLa tumor cell의 tumor nodule의 평균 크기가 1 mM Paclitaxel이 포함된 Chitosan microsphere/Alginate를 사용한 경우에 8일째와 10일째에 음성대조군으로 PBS만 사용한 군(G1)보다 현저히 감소하였으며, 양성 대조군으로 복강내 Paclitaxel 직접 주사군한 경우(G4)보다 종양크기가 큰 차이가 없는 것이 관찰되어 국소적 도포법으로 HPV-관련성 병변의 치료에 부작용이 적은 매우 우수한 물질로서의 가능성을 보여주었다.

PEG (poly ethylene glycol)로 구성된 amphiphilic multiblock copolymer와 생분해성이 있는 polymers (PEGn-Rm)는 생체내에서 분해가되는 소수성 중심(hydrophobic core)과 친수성 표면(hydrophilic surface)을 가지는 생체적합성 물질의 형태(biocompatible nanospheres)를 가지는데, 이러한 형태는 약물 전달 체계에서 매우 유용하다. 친수성 표면이 소수성 중심을 보호하고 있으므로, 체내 망상계에서의 흡수(Reticuloendothelial uptake)를 막을 수 있으며, 소수성 중심에는 약물을 지니게 할 수가 있다. 실제로, PEG poly [lactic-co-(glycolic acid)] (PEG PLGA) nanospheres와²⁷ PEG PLA nanoparticle은 동물의 혈중에서 비교적 오랜기간 유지가되는 결과를 보였다.²⁸ 또한 PLA-PEG nanoparticle은 경구 투여시에도 위장관액에서 비교적 안정적으로 존재함이 관찰되었으며, 비강을 통한 투여시 전신 혈류에도 존재함을 관찰되어 점막으로 투여한 경우에도 “mucoadhesion promoting effect”가 있음이 알려져 있다.^{29,30} 이러한 PEG

PLA nanoparticle은 자궁 경부의 국소적 약물 전달에 적합할 것으로 생각되어 연구하였다.^{31,32}

온도 민감성 젤인 poly (L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) 수용액 (>15 wt. %) 다원 공중합체(PEG/PLLA multiblock-copolymer)는 낮은 온도에서 20 nm의 반지름이지만, 온도 증가에 따라 큰 크기로 응집이 되어 효과적으로 졸-젤 전이를 보였는데, 본 실험에 사용된 PEG/PLLA Polymer (6,700 Da) 다원 공중합체(PIII)는 체온 범위인 30-45°C에서 역 온도 젤 형성과 젤 강도(>100 Pa)를 보였다.

동물실험에서도 1 mM Paclitaxel이 포함된 PEG/PLLA multiblock copolymer micelle 사용군에서의 종양의 평균 크기가 음성대조군보다 현저히 감소한 것이 관찰되면서, 국소적 도포법으로 HPV-관련성 병변의 치료에 부작용이 적은 매우 우수한 물질로서의 가능성을 보여주었다.

참고문헌

- Shin HR, Jung KW, Won YJ, Park JG, 139 KCCR-affiliated Hospitals. 2002 Annual Report of the Korea Central Cancer Registry: based on registered data from 139 hospitals. *Cancer Res Treat* 2004; 36: 103-14.
- Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL. Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer *Vaccine* 24S3 (2006) S3/42 S3/51.
- Chung HH, Jang MJ, Jung KW, Won YJ, Shin HR, Kim JW, et al; Members for Gynecologic Oncology Committee of Korean Society of Obstetrics and Gynecology. Cervical cancer incidence and survival in Korea: 1993-2002. *Intl J Gynecol Cancer* 2006; 16: 1833-8.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, et al. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer* 2006; 95: 1459-66.
- Lee KH, Yim EK, Kim CJ, Namkoong SE, Um SJ, Park JS. Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 2005; 98: 45-53.
- Illum L, Jabbal-Gill I, Hinchcliffe M, Fisher AN, Davis SS. Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv Drug Deliv Rev* 2001; 51: 81-96.
- Sinha VR, Singla AK, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm* 2004; 274: 1-33.
- Vacanti CA, Langer R, Schloo B, Vacanti JP. Synthetic polymers seeded with chondrocytes provide a template for

- new cartilage formation. *Plast Reconstr Surg* 1991; 88: 753-9.
9. Matthew HW, Salley SO, Peterson WD, Klein MD. Complex coacervate microcapsules for mammalian cell culture and artificial organ development. *Biotechnol Prog* 1993; 9: 510-9.
10. Hari PR, Chandy T, Sharma CP. Chitosan/calcium alginate microcapsules for intestinal delivery of nitrofurantoin. *J Microencapsul* 1996; 13: 319-29.
11. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrød O, Soon-Shiong P, Skjåk-Braek G. Alginate polycation microcapsules. II. Some functional properties. *Biomaterials* 1996; 17: 1069-79.
12. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrød O, Soon-Shiong P, Skjåk-Braek G. Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation. *Biomaterials* 1996; 17: 1031-40.
13. Beletsi A, Panagi Z, Avgoustakis K. Biodistribution properties of nanoparticles based on mixtures of PLGA with PLGA-PEG diblock copolymers *Int J Pharm* 2005; 298: 233-41.
14. Stivaktakis N, Nikou K, Panagi Z, Beletsi A, Leondiadis L, Avgoustakis K. Immune responses in mice of beta-galactosidase adsorbed or encapsulated in poly (lactic acid) and poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2005; 73: 332-8.
15. Schartel B, Volland C, Li YX, Wendorff JW, Kissel T. Dielectric and thermodynamic properties of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) and the effect on the microencapsulation and release of captopril. *J Microencapsul* 1997; 14: 475-88.
16. Bae YH, Huh KM, Kim Y, Park K. Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications. *J Control Release* 2000; 64: 3-13.
17. Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J Cell Biol* 1981; 91: 479-87.
18. Manfredi JJ, Parness J, Horwitz SB. Taxol binds to cellular microtubules. *J Cell Biol* 1982; 94: 688-96.
19. Gelderblom H, Verweij J, Nooter K, Sparreboom A. Cremophor EL: the drawbacks and advantages of vehicle selection for drug formulation. *Eur J Cancer* 2001; 37: 1590-8.
20. Kloer JS, den Bakker MA, Gelderblom H, van Meerbeeck JP. Fatal outcome of a hypersensitivity reactions to paclitaxel: a critical review of premedication regimens. *Br J Cancer* 2004; 90: 304-5.
21. Mi FL, Shyu SS, Chen CT, Schoung JY. Porous chitosan microsphere for controlling the antigen release of Newcastle disease vaccine: preparation of antigen-adsorbed microsphere and in vitro release. *Biomaterials* 1999; 20: 1603-12.
22. Shu XZ, Zhu KJ. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. *J Microencapsul* 2001; 18: 237-45.
23. Jameela SR, Kumary TV, Lal AV, Jayakrishnan A. Progesterone-loaded chitosan microspheres: a long acting biodegradable controlled delivery system. *J Control Release* 1998; 52: 17-24.
24. Denkbaş EB, Seyyal M, Pişkin E. 5-fluorouracil loaded chitosan microspheres for chemoembolization. *J Microencapsul* 1999; 16: 741-9.
25. He P, Davis SS, Illum L. Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods. *J Microencapsul* 1999; 16: 343-55.
26. Filipović-Grcić J, Perissutti B, Moneghini M, Voinovich D, Martinac A, Jalsenjak I. Spray-dried carbamazepine-loaded chitosan and HPMC microspheres: preparation and characterisation. *J Pharm Pharmacol* 2003; 55: 921-31.
27. Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 1994; 263: 1600-3.
28. Verrecchia T, Huve P, Bazile D, Veillard M, Spenlehauer G, Couvreur P. Adsorption/desorption of human serum albumin at the surface of poly (lactic acid) nanoparticles prepared by a solvent evaporation process. *J Biomed Mater Res* 1993; 27: 1019-28.
29. Peppas NA, De Ascentiis A, Bauerle JM. Mucoadhesive PEG-tethered microparticulate systems for gastrointestinal and vaginal drug delivery, *Proceed Int Symp Control Release Bioact Mater*. 1996; 214-5.
30. Martini L, Attwood D, Collet JH, D'Emanuele A. The bioadhesive properties of a triblock copolymer of ϵ -caprolactone and ethylene oxide. *Int J Pharm* 1995; 113: 223-9.
31. Tobio M, Gref R, Sanchez A, Langer R, Alonso MJ. Stealth PEG-PLA nanoparticles as protein carriers for nasal administration. *Pharm Res* 1998; 1: 270-5.
32. Tobio M, Sanchez A, Vila A, Soriano I, Evora C, Vila-Jato JL, et al. The role of PEG on the stability in digestive fluids and in vivo fate of PEG-PLA nanoparticles following oral administration. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2000; 18: 315-23.

Development of a therapeutic method in the HPV-related cervical lesion using pH/temperature sensitive polymer spray formulation

Chan-Joo Kim¹, Byeong Moon Jeong², Tae Woo Kim³, Tae Heung Kang³, Kyung Hee Noh³, Myoung Ok Kim⁴,
Zae Young Ryoo⁴, Hy Sook Kim⁵, Jong-Sup Park¹

Department of Obstetrics and Gynecology, Catholic University Medical College¹, Division of Nano Sciences, Department of Chemistry, Ewha Womans University², Laboratory of Infection and Immunology Graduate, School of Medicine, Korea University³, School of Life Sciences and Biotechnology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University⁴, Department of Pathology, Samsung Cheil Hospital, Kwandong University College of Medicine⁵, Seoul, Korea

Objective : The causal link between oncogenic HPV(Human Papilloma Viruses) and the development of CIN (cervical intraepithelial neoplasia) and cervical cancer are now well established. Several medical therapeutic candidates aimed at the treatment of precancerous lesions and invasive carcinoma of the cervix. The objective of this study was to develop the pH-sensitive chitosan/alginate gels (pH=3.8-4.5) and temperature sensitive multiblock copolymers of PEG/PLA (poly (L-lactic acid)/polyethylene glycol) gels (temperature=37°C) for controlled delivery of the paclitaxel (PTX). We had also evaluated whether PTX entrapped in chitosan/alginate gels or multiblock copolymers of PEG/PLA 1 could inhibit tumor growth *in vivo*.

Methods : PTX entrapped as microsphere in Chitosan/Alginate Microspheres were obtained using a spray-drying method. PTX-entrapped PEG/PLA gels were prepared by the solvent displacement method. We had prepared the multiblock copolymers of PEG/PLA which has the sol-gel-sol transition temperature at body temperature. The *in-vivo* efficacy of PTX in chitosan microsphere or PTX in PEG/PLA multiblock copolymer micelle were conducted in HeLa-tumor bearing Balb/c Nu/Nu athymic mice at an equivalent paclitaxel dose of 10 mg/kg with 48 hr interval. The inhibition of tumor growth was evaluated after 8 days of treatment.

Results : On 8 days after the transcutaneous treatment of PTX-containing chitosan microsphere or PTX in PEG/PLA multiblock copolymer micelle, significant inhibition in tumor growth was observed in balb/c nu/nu nude mouse carrying xenograft tumors (HeLa cells; HPV-18 positive state). Among these formulations, PTX in PEG/PLA multiblock copolymer have shown improved therapeutic efficacy as compared to PTX-ivgroup.

Conclusion : PTX-containing chitosan microsphere or PTX in PEG/PLA multiblock copolymer nanoparticles are a unique pH-sensitive and temperature sensitive drug delivery system. These formulations elicits enhanced efficacy as an effective and minimally invasive treatment in mice bearing human cervical cancer (HeLa Cells) xenograft.

Key Words : Cervical cancer, pH sensitive, Temperature sensitive, Chitosan, Paclitaxel