

Poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles 제조와 약물방출 거동 및 생분해도

유정준, 정영일, 오동석, 임균택

전남대학교 고분자공학과

전화 (062)530-1883, 팩스 (062)530-1879

Abstract

The polymeric matrices made with poly(D,L-lactide-co-glycolide) were prepared using copolymer of poly(D,L-lactide) and poly(ethylene glycol) for application of drug delivery systems. Catalyst made use of stannous octoate. Particle size were differ greatly($435.3 \pm 11.2 \sim 2284.1 \pm 188.5$) that nanoparticle made use of according to solvent of various kinds. Polymer could a sharp distinction with copolymerized among LE-1, LE-2 and LE-3 of PLA and PEG of content that to examine $^1\text{H-NMR}$ of copolymer make refine and reprecipitation.

Drug delivery effect at PLGA nanoparticle : PLA amount more then proved highly drug delivery amount that each LE-1, LE-2, LE-3, drug and solvent was 40mg, 20mg and 10 mg. Drug delivery effect proved higher 20mg that change(10mg, 20mg, 40mg) at drug feeding amount with LE-2. The first a lot of drug proved delivery. LE-3 most lactide content proved much delivery since biodegradable on PLGA copolymer result from lactide. Also biodegradable rate was highest at LE-3 much of lactide content, because influence at biodegradable effect of lactide by inclusive of soft PEG.

서론

약물 투여 후 시간이 경과하면서 혈중 약물농도가 약효를 발휘하지 못하고 급격히 배출·소실되어 치료유효농도이하로 감소하기 때문에 투여농도를 높일 경우 부작용을 나타낼 우려가 있어 1950년대부터 고분자 재료에 약물을 물리적·화학적으로 도입하여 약물방출기작을 조절하고 부작용을 최소화하려는 노력과 고분자 재료를 이용하여 체내축적이 생기거나 또다른 부작용의 최소화를 위한 연구가 이어져왔고, 특정부위에서 약물의 방출을 유도하기 위한 표적지향형 약물전달계(targeting drug delivery system)에 응용할 수 있는 생분해성 고분자 재료에 대한 연구가 있었다. 특히 생체내에서 자연적으로 분해되어 제거되는 생분해성 합성 고분자로 주로 이용하고 있는 poly(D,L-lactide-co-glycolide)는 생체내에서 쉽게 분해되어 첫산으로 분해·제거되고 인체에 부작용이나 독성이 없으며 투여가 용이한 형태로 쉽게 가공할 수 있다는데 미국식품의약국(FDA)으로부터 인정되어 널리 사용되고 있다. 예전에는 고분자 매트릭스형태로 주로 가공하여 약물방출에 응용했으나 근래에는 microsphere, microcapsule, emulsion, nanoparticle등을 이용하는 연구가 주로 진행되고 있으며, 그 중에서 10~1000nm에 해당하는 크기의 입자로 다른 system에 비해 특정부위에 집중화시킬

수 있는 가능성이 높고, 표면적이 넓으며, 수분산성과 분리가 쉬운 특징이 있기 때문에[2] 많은 약물을 함유할 수 있고 약물방출속도를 지연할 수 있어 약물운반체로서 가장 널리 연구되고 있다[1-3,7,8]. 표적지향성 약물수송은 수많은 장점을 가지고 있다[4-6]. 수십 μ m일 경우 폐 모세관에 축적된다는 보고가 있고[9,10], μ m이하일 경우는 Kupffer cell 같은 상피세포계에 주로 축적되어 약물운반에 주요장애가 되는 것으로 알려져 있다[11-13].

그래서 본 연구에서는 생분해성 고분자로서 많이 사용되고 있는 poly(D,L-lactide-co-glycolide)를 이용하여 투석에 의한 random copolymer제조 방법[14]으로, 크기가 작고 분포가 균일한 입자를 만드는 간단하고 효율적인 제조공정으로 받아들여지고 있다[15-16]. 지금까지는 이러한 방법으로 양친매성고분자인 block이나 graft copolymer인 경우에만 알려져 왔으며 양친매성이 아닌 poly (D,L-lactide-co-glycolide)와 같은 공중합체를 이용하여 nanoparticle제조한 예는 보고되고 있지 않다. 그래서 미국 FDA에서 인체에 사용이 허가된 poly(D,L-lactide-co-glycolide)를 이용하여 nanoparticle을 만들고, 공중합체의 생분해도를 연구하였다.

실험

Poly ethylene glycol(Av. mol wt% 5000)은 정제하여, D,L-lactic acid는 Aldrich chemical co의 제품을, Stannous octoate는 Sigma chemical co의 제품을 사용하였다.

D,L-lactide 일정량(7.2g)과 PEG 5, 2.5, 1.25g을 각각 100 $^{\circ}$ C로 2시간 감압 후 질소기류하에서 1시간동안 탈수반응 시켜 stannous octoate를 PEG의 0.03wt%넣고 180 $^{\circ}$ C에서 12시간동안 반응시켰다. 암갈색의 부산물을 포함하고 있는 PLGA를 얻었다. 생성물은 클로로포름과 아세트산 에틸로 재결정한 다음 증발기에서 solvent를 제거하고 진공 건조시켜 순수한 PLGA를 얻었다.

1 H-NMR을 측정하여 합성된 PLGA copolymer의 분자량을 분석하였다.

PLA 7.2g과 PEG 5g으로 합성된 copolymer를 여러 종류(1,4-Dioxane, DMF, THF, DMAc, Aceton, DMSO)의 solvent로 nanoparticle을 제조하였다. 제조방법은 polymer와 drug을 solvent에 1시간동안 같이 녹여 dialysis tube에 넣고 tube내에 있는 solvent를 dialysis로 제거하였다. 증류수를 12시간에 걸쳐 8회 교환하였다. 5~10ml를 채취하여 particle size를 측정하고 나머지는 동결 건조시켰다. Copolymer의 composition에 따른 nanoparticle과 Drug feeding content(사용된 공중합체는 PLA 7.2 : PEG 2.5)에 따른 nanoparticle역시 같은 방법으로 제조하였다.

약물방출실험은 in vitro에서 37.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C의 pH 7.4 PBS buffer에 대한 약물의 방출속도를 측정하였으며 교반속도는 100rpm(united states pharmacopoeia, USP)을 유지하였다. 약물방출 용액은 매회 10ml를 교환해 주었으며 1시간 간격으로 측정하여 약물의 농도를 측정하였다. 방출된 약물의 농도는 파장 240nm에서 UV-spectrophotometer를 사용하여 측정하였다. 200mg의 PLGA copolymer를 nanoparticle제조과정과 같은 방법으로 만들고 10ml씩 dialysis tube에 각각 나눠 넣고 37 $^{\circ}$ C 100rpm으로 incubation시켰다. 2일마다 PBS 전부를 교환했고 3, 5, 7, 10, 12, 15, 17, 20, 25, 30일에 각각 sampling하여 잔여 PBS를 제거하기 위해 증류수에 3회 이상 dialysis시켜 동결 건조시켰다. 1 H-NMR 분석을 통해 줄어든 PLA분자량을

측정하였다.

결과 및 고찰

PLGA copolymer를 사용하여 nanoparticle을 제조시 적용한 solvent의 종류에 따라 particle size가 ($435.3 \pm 11.2 \sim 2284.1 \pm 188.4$) 큰 차이를 나타내었다. LE-1(PLA 7.2 : PEG 5), LE-2(PLA 7.2 : PEG 2.5), LE-3(PLA 7.2 : PEG 1.25), MePEG를 FT-IR로 관찰했을 때 MePEG의 simple하게 나타나는 peak들이 PLA의 함량이 높아질수록 broad하게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

반응 종료 후 정제 및 재침전시킨 polymer의 $^1\text{H-NMR}$ 을 관찰하였을 때 polymer가 공중합 되어 LE-1, LE-2, LE-3의 PLA와 PEG의 함량비가 분명하게 구별되는 것을 확인할 수 있었다. PLGA nanoparticle에서 방출되는 약물 방출 속도는 LE-1, 2, 3를 각각 같은 양의 polymer, drug와 solvent를 40mg : 20mg : 10ml로 하였을 때 PLA의 함량이 많을수록 방출된 drug의 양이 많았으며, LE-2로 drug양의 변화(10mg, 20mg, 40mg)를 주었을 때는 20mg일 때가 가장 높게 나타났다. 초기에 많은 양의 약물이 나타났다.

PLGA copolymer에서 생분해가 일어나는 부위는 lactide이므로 lactide 함량이 많은 LE-3에서 제일 많이 방출된 것으로, 생분해도 또한 lactide 함량이 많은 LE-3에서 생분해도가 가장 높ی 나타났다고 사려된다. 그러나 soft한 PEG가 함유되어 있기 때문에 lactide의 생분해도에 영향을 주었다고 생각된다.

참고문헌

- (1) J. Kreuter, "Nanoparticle-based drug delivery systems"(1993), *J. Control. Release*, 16, 169-176
- (2) E. Alleman, R. Gurny, E. Doelker, "Drug-loaded nanoparticles-preparation methods and drug targeting issues"(1993), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 39, 173-191
- (3) S. S. Davis, L. Illum, S. M. Moghimi, M. C. Davies, C. J. H. Porter, I. S. Muir, A. Brindley, N. M. Christy, M. E. Norman, P. Williams, S. E. Dunn, "Microspheres for targeting drugs to specific body sites" (1993), *J. Control. Release*, 24,157-163
- (4) J. C. Leroux, E. Allemann, F. D. Jaeghere, E. Doelker, R. Gurny, "Biodegradable nanoparticles-From sustained release formulations to improved site specific drug delivery"(1996), *J. Control. Release*, 39, 339-350
- (5) P. Couvreur, E. Fattal, A. Andremon, "Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections"(1991). *Pharm. Res.*, 8, 1079-1086
- (6) P. Couvreur, E. Fattal, H. Alphandary, F.Puisieux, A. Andremon, "Intracellular targeting of antibiotics by means of biodegradable nanoparticles"(1992), *J. Control. Release*, 19, 259-268
- (7) S. S. Davis, "Colloids as drug-delivery systems"(1981), *Pharmaceut. Technol.*, 5, 71-88

- (8) B. Seijo, E. Fattal, L. Roblot-Treupel, P. Couvreur, "Design of nanoparticles of less than 50nm diameter : Preparation, characterization and drug loading"(1990), *Int. J. Pharm.*, 62, 1-7
- (9) L. Illum, S. S. Davis, C. G. Wilson, M. Frier, J. G. Hardy, N. W. Thomas, "Blood clearance and organ deposition of intravenously administered colloidal particles: The effects of particle size, nature and shape"(1982) *Int. J. Pharm.*, 12, 135-146
- (10) T. Yoshioka, M. Hashida, S. Muranishi, H. Sezaki, "Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung: nano- and microspherical carriers of gelatin"(1981), *Int. J. Pharm.*, 81, 131-141
- (11) L. Illum, I. M. Hunneyball, S. S. Davis, "The effect of hydrophilic coating on the uptake of colloidal particles by the liver and by peritoneal macrophages"(1986), *Int. J. Pharm.*, 29, 53-65
- (12) R. H. Muller, K. H. Wallis, S. D. Troster, J. Kreuter, "In vitro characterization of poly(methacrylate) nanoparticles and correlation to their in vivo fate"(1992), *J. Control. Release*, 20, 237-246
- (13) S. E. Dunn, A. Brindley, S. S. Davis, M. C. Davies, L. Illum, "Polystyrene-poly(ethylene glycol)(PSPEG 2000)particles as model systems for site specific drug delivery. 2. The effect of PEG surface density on the in vitro cell characterization and in vivo biodistribution"(1994), *Pharm. Res.*, 11, 1016-1022
- (14) J. W. Nah, W. Y. W. Baek, Y. I. Jeong, D. W. Kim, C. S. Cho, S. H. Kim, M. Y. Kim, "Clonazepam release from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles prepared by dialysis method"(1998), *Arch. Pharm. Res.*, 21, 418-422
- (15) D. D. Lasic, "Mixed micelles in drug delivery"(1992), *Nature*, 355, 279-280
- (16) G. S. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, K. Kataoka, "Physical entrapment of adriamycin in AB block copolymer micelles"(1995), *Pharm. Res.*, 12, 192-195