

## BCNU 함유 PLGA 웨이퍼의 제조와 생체의 방출거동

성하수 · 문대식\* · 강길선\* · 이정식\*\* · 이해방†

한국화학연구원 생체고분자연구실, \*전북대학교 고분자공학과, \*\*삼천당 제약 중앙연구소  
(2001년 8월 21일 접수, 2001년 11월 12일 채택)

### Preparation of BCNU-loaded PLGA Wafers and In Vitro Release Behavior

Hasoo Seong, Dae Sik Moon\*, Gilson Khang\*, Jung Sik Lee\*\*, and Hai Bang Lee†

Biomaterials Laboratories, Korea Research Institute of Chemical Technology,  
P. O. Box 107, Taejon 305-340, Korea

\*Department of Polymer Science and Technology, Chonbuk National University,  
664-14, Dukjin Dong 1Ga, Dukjin Ku, Chonju 561-756, Korea

\*\*Research Center, Samchundang Pharm. Co. Ltd., P. O. Box 289,  
Youngdeungpo, Seoul 105-037, Korea

†e-mail : hblee@pado.kRICT.re.kr

(Received August 21, 2001; accepted November 12, 2001)

**요약:** 종양부위 또는 종양을 수술로 제거한 부위에 직접 이식하여 항암제를 투여함으로써 종양 또는 종양재발을 억제하는 악성뇌종양치료에 이용하기 위한 국소서방성 항암제제로서 항암제 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU, Carmustine)가 함유된 poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA, 락타이드와 글리콜라이드 몰비 75 : 25) 미분말을 제조하여 웨이퍼로 성형하였다. BCNU가 함유된 PLGA 미분말은 분사건조법에 의해 제조하였으며 주사전자현미경으로 관찰한 결과 제조된 미분말은 미립구의 형태를 나타내었다. XRD와 DSC를 통하여 PLGA에 포접된 BCNU의 결정성이 현저히 감소하였음을 확인하였다. 생체의 방출시험조건에서 BCNU의 방출경향은 PLGA의 분자량 및 농도, BCNU의 함량 등에 의존하였으며 초기 burst effect 이후 거의 0차 방출의 경향으로 8주 이상 지속적인 방출경향을 나타내었다. 방출시험기간 동안 웨이퍼의 형태변화를 관찰하고 방출시험액의 pH 변화를 측정함으로써 BCNU의 함량이 증가할수록 PLGA의 수화와 분해가 촉진됨을 확인하였다.

**ABSTRACT:** 1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU, Carmustine)-loaded poly(D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA, lactide/glycolide mole ratio 75 : 25) microparticles were prepared and fabricated into wafers in an attempt to study the possibility for the treatment of malignant glioma by direct inserting the wafers to the tumor or the cavity remained after surgical resection of the tumor. SEM observation of the microparticles prepared by spray drying method revealed that the microparticles were spherical, i. e. microspheres. Significant reduction of the crystallinity of BCNU encapsulated in PLGA was confirmed by X-ray diffraction and differential scanning calorimetry analyses of the BCNU-loaded PLGA microparticles. Release pattern of BCNU was dependent on several preparation parameters, such as the molecular weight and concentration of PLGA, and initial BCNU loading amount, etc. In vitro release of BCNU was prolonged over 8 weeks with close to zero-order release pattern after initial burst effect. Observations of morphological change of wafers and pH change of release media during release test period confirmed that hydration and degradation of PLGA would be facilitated with an increase of BCNU-loading amount.

**Keywords :** brain tumor, BCNU, spray-drying, PLGA microparticles, wafers.

## 서 론

외과적 수술, 방사선 치료, 전신적 화학요법 등 많은 치료법의 진전에도 불구하고 악성 신경교종 (malignant glioma)은 치료가 매우 어려운 중추신경계 질환으로서 환자들의 평균 생존율이 대략 1년 정도인 치명적 질병이다.<sup>1</sup> 화학요법제를 전신적으로 투여하였을 때 중추신경계에 전달되기 어려운 가장 큰 이유는 화학요법제가 생체내 혈액-뇌장막 (blood brain barrier, BBB)을 구성하는 뇌-모세 상피세포벽을 통과하지 못함으로 인해서 약물이 혈액으로부터 뇌로 전달되지 못하고 배출되기 때문이다. 따라서 BBB를 파괴하거나 우회하는 방법을 통하여 약물을 전달하기 위한 많은 연구들 즉, 삼투압을 이용해 BBB를 파괴,<sup>2</sup> 주입 펌프를 사용하여 뇌척수액에 약물을 전달,<sup>3,4</sup> 계면활성제 피막을 형성시킨 나노입자를 주사 투여,<sup>5</sup> BBB를 통과하는 수송체를 사용하여 세포내 이/출입이 가능한 담체에 약물을 결합,<sup>6</sup> 조직이나 세포를 이식,<sup>7</sup> 그리고 유전자 치료<sup>8</sup> 등의 치료법들이 시도되었다. 그러나 이러한 여러 가지 약물 전달 방법들은 대부분 순환계를 통하여 수송된 약물들의 중추신경계로의 투과를 향상시키는 것을 목적으로 하기 때문에 투여된 약물이 전신으로 전달되거나 수반되는 많은 부작용으로 인해 임상적으로 이용되기에는 많은 한계가 따른다.

심혈관계에 의존하지 않고 약물을 중추신경계에 전달하는 방법으로써 약물을 함유한 고분자를 뇌종양 부위에 직접 이식하는 방법이 뇌종양 치료의 새로운 접근법으로 제시되고 있으며 이는 전통적인 치료법들과 비교할 때 약물이 BBB를 통과해야 하는 문제가 없을 뿐 아니라 주사투여시 체순환계에 의한 약물의 분해를 최소화함으로써 약물의 생체이용율을 높일 수 있으며 전신부작용을 최소화할 수 있다는 장점이 있다. 실제로 Carmustine, Taxol, Cisplatin, 그리고 5-Fluoracil 등의 항종양제를 함유한 고분자들의 치료능과 안정성 등이 동물 뇌종양모델에서 평가되어 왔으며<sup>9-12</sup> 최근 인간의 재발성 신경교종의 치료에 이용되어 왔다.<sup>13-15</sup>

현재까지 가장 주목할 만한 연구성과로는 Carmustine 이라고 불리는 항암제 1, 3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU)를 국소에 적용할 수 있도록 서

방화하고 이를 이식형으로 제형화한 poly[bis(*p*-carboxyphenoxy)] propane-sebacic acid copolymer (PCPP-SA) 웨이퍼가 있으며 수많은 전임상 및 임상 시험을 거쳐 1996년 미국 FDA로부터 신경교종 절제술에서 보조적인 치료로서 사용하는 것을 허가받아 현재 Gliadel<sup>®</sup> 이라는 상품명으로 미국 Guilford사가 독점적으로 공급, 임상에서 이용되고 있다. 이 고분자 웨이퍼는 종양을 수술적으로 제거한 후 생긴 공극에 이식하며 BCNU가 주변 조직과 남아있는 종양으로 방출되어 종양의 재발을 억제하도록 한 것이다. 이러한 치료법을 통해 환자의 평균생존율이 8주 이상 증가된 통계학적으로 유의한 치료결과가 보고되었다.<sup>16</sup>

Gliadel<sup>®</sup>에 이용된 poly(CPP-SA)라는 고분자는 폴리안하이드라이드 공중합체의 일종으로서 소수성 단량체인 CPP와 SA가 20:80의 몰비율로 이루어진 방향족/지방족 공중합체이다. 폴리안하이드라이드는 본래 섬유에 응용할 목적으로 개발되었으나 안하이드라이드 결합이 가수분해에 매우 약한 특성을 이용하여 약물전달용 생분해성 고분자로 그 용도가 전환된 고분자이다. 폴리안하이드라이드와 그 분해산물은 조직반응성과 독성연구들을 통해 생체적합성이 우수한 것으로 밝혀졌으며 고분자 주쇄의 조성을 바꾸어서 가수분해속도의 조절이 가능한 것으로 알려져 있다.<sup>17</sup> 특히 폴리안하이드라이드는 생분해성 고분자의 부식 작용기별로 잘 알려진 벌크부식 (bulk erosion) 작용기부와 표면부식 (surface erosion) 작용기부 중에서 후자에 의해서 가수분해가 진행되기 때문에 약물 방출 거동의 예측이 가능하다고 알려져 있어 뇌종양 치료를 위한 약물전달 뿐 아니라 관절염치료를 위한 약물전달 등으로 그 응용이 확대되고 있다.<sup>18</sup>

최근 폴리안하이드라이드의 가수분해 거동에 관한 깊이 있는 연구들을 통하여 폴리안하이드라이드가 전적으로 표면부식에 의해 가수분해가 진행되는 것이 아니라 벌크부식 거동도 나타내고 있음이 보고되었으며 가수분해속도가 상당히 빠르기 때문에 장기간에 걸쳐 약물을 전달해야 할 필요성이 있는 약물전달기구에는 응용이 제한적이라는 연구결과가 보고되고 있다.<sup>19</sup> 실제로 Gliadel<sup>®</sup> 웨이퍼의 경우 BCNU가 약 5일 이전에 모두 방출되며 따라서 보다 장기간 약물을 방출시키기 위해서는 부식속도가 빠른 폴리안하이드라이드로 매트릭스를 제조할 경우 매트릭스의 크기가

매우 커져야 하는 단점이 있다.<sup>20</sup> 따라서, 폴리안하이드라이드보다 부식속도가 느리고 분해기간이 긴 고분자를 사용할 경우 제형의 크기를 변화시키지 않으면서 약물의 농도에 따라 약물의 방출속도를 조절하는 것이 가능할 것으로 예상하였다.

본 연구에서는 뇌종양 치료를 위한 이식형 서방성 제제로서 일반적으로 폴리안하이드라이드에 비해서 부식속도가 느린 것으로 알려진 PLGA를 약물전달용 매트릭스로 사용하여 BCNU 함유 미분말을 제조하고 이를 웨이퍼로 제형화하고 생체외 방출경향을 살펴보고자 하였다. BCNU 함유 PLGA 미분말은 PLGA의 분자량과 농도 및 BCNU의 함량 등의 조건을 달리하여 분사건조법으로 제조하였으며 제조된 미분말을 웨이퍼로 제형화하고 각 제조조건에 따른 생체외 방출경향을 조사하였다. 미분말의 물리화학적 성질을 조사하고 미분말의 형태와 크기, 생체외 방출시험 전후의 웨이퍼의 형태, 방출시험액의 pH 변화 등을 관찰하여 약물방출 거동과 PLGA의 분해거동과의 관계를 고찰하고자 하였다.

## 실 험

**시료 및 시약.** BCNU (순도: 98%이상, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)는 -20 °C에서 보관하여 사용하였으며 생분해성 고분자 재료는 PLGA (lactide/glycolide mole ratio, 75/25) (Boehringer Ingelheim, Germany)로서 평균분자량이 20000과 90000 g/mole인 것을 사용하였다. 메틸렌클로라이드 (MC, Tedia, Japan), 메탄올 (Junsei, Japan) 및 기타 시약들은 특급시약을 그대로 사용하였다.

**BCNU의 안정성 시험.** BCNU의 생체외 방출시험 조건과 용매에서의 안정성을 살펴보기 위해서 4 °C와 37 °C의 온도에서 일정량의 메탄올과 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 BCNU를 침지하고 빛을 차단한 상태로 일정시간 교반한 후 분해하지 않고 남아있는 BCNU의 양을 HPLC로 분석하였다.

**BCNU 함유 PLGA 미분말 제조와 웨이퍼 성형.** MC에 PLGA와 BCNU를 함께 용해시킨 후 분사건조기 (Uniglatt, Glatt Co., Binzen, Germany)를 이용하여 미분말을 제조하였다. PLGA의 농도는 3~30%로 조절하였으며 BCNU의 초기 loading 양은 PLGA의 무

게에 대하여 3~20%가 되도록 조절하여 미분말을 제조하였다. 분사건조의 조건은 유입공기온도 50±2 °C, 분사공기압은 30±4 psi 그리고 분무속도는 7±2 mL/min으로 하였다. 분사건조시 모든 시험조건에서 빛을 차단하여 광에 의한 BCNU의 분해를 최소화하였다. 제조된 미분말을 동결건조기 (35 mtorr, -78 °C)를 사용하여 일정중량이 될 때까지 건조하였으며 사용 전까지 0 °C에 보관하였다. 분사건조법에 의해 제조된 미립구 100 mg을 직경이 10.0 mm인 볼드에 주입하고 Carver press (MH-50Y Cap, 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 20 Kgf/cm<sup>2</sup>의 압력에서 5초 동안 가압하여 웨이퍼를 제조하였으며 분쇄 및 생체외 방출시험 전까지 0 °C에 보관하였다.

**미분말과 웨이퍼의 형태와 결정성.** 미분말의 크기와 형태는 주사전자현미경 (SEM, scanning electron microscope, S-2250N, Hitachi, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 양면테이프를 부착한 금속판 위에 샘플을 고정한 후 플라즈마 스퍼터 (SC 500K, Emscope, UK)를 이용하여 아르곤 분위기 하에서 90초 동안 platinum으로 진공 증착하였다. 방출시험전의 미분말과 웨이퍼는 냉동 보관한 시료를 관찰하였고 방출시험이후의 웨이퍼는 수분을 제거하고 동결건조기를 이용하여 건조한 후 관찰하였다. 미분말 제조에 따른 BCNU의 결정 형태의 변화를 관찰하기 위하여 powder X-ray diffractometer (XRD, D/Max-IIIIB, Rigaku, Japan)를 사용하여 5°/min의 속도로 2θ의 값 0~80°의 범위에서 미분말의 결정성을 측정하였으며 미분말의 열특성은 differential scanning calorimetry (DSC, TA Instrument DSC 3100, Dupont, USA)를 이용하여 10 °C/min의 승온속도로 0~80 °C의 범위에서 측정하였다.

**포집율 및 생체외 방출 시험.** 제조된 미분말의 BCNU 포집율을 조사하기 위하여 조건을 달리하여 제조된 무게 100 mg의 미분말을 2 mL의 MC에 넣어 고분자와 약물을 녹이고 18 mL의 메탄올을 첨가하여 PLGA를 침전시키고 상부의 맑은 용액 1 mL를 취하여 원심분리한 후 상층액 100 μL를 취하여 HPLC분석하였다. HPLC 분석은 UV 검출기 (UV-1000, Thermo Separation Products, Fermont, CA, USA), 펌프 (P-2000, Thermo Separation Products), 자동시료주입기 (AS-3000, Thermo Separation

Products)로 구성된 HPLC를 사용하였다. 컬럼은  $\mu$ -Bondapak™ C<sub>18</sub> (3.9×300 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고 이동상은 메탄올을 사용하였으며 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 컬럼온도는 상온을 유지하였고 검출파장은 237 nm, 시료주입량은 20  $\mu$ L로 하였다. 생체외 방출 시험을 위하여 조건별로 제조된 무게 100 mg의 웨이퍼를 20 mL의 PBS 용액에 침지하고 37 °C로 유지되는 항온조에서 일정기간 동안 60 rpm의 속도로 교반하였다. 일정시간 이후 미분말의 BCNU 포집율 조사에서와 같은 방식으로 웨이퍼를 MC에 녹이고 메탄올로 BCNU를 포집하고 있는 PLGA를 침전시켜 제거함으로써 방출 시험 이후 웨이퍼에 잔존하는 BCNU의 양을 조사하여 방출시험액으로 방출된 BCNU의 양을 산출하였다. 생체외 방출시험에서 BCNU의 포집량 및 방출량은 3회 시험한 평균값을 자료로 사용하였다.

웨이퍼의 생분해성. 생체외 방출시험기간 동안 일정시간이 지난 후 PBS로부터 웨이퍼를 추출하고 일정중량이 될 때까지 건조하여 웨이퍼의 형태변화를 SEM으로 관찰하고 방출시험액의 pH변화를 측정하여 PLGA의 분해거동을 살펴보았다.

결과 및 고찰

BCNU의 안정성. BCNU는 신경종양의 치료를 위해 개발되어온 nitrosourea 유도체의 일종으로 Figure 1에

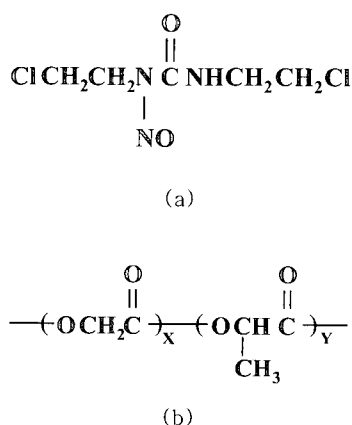


Figure 1. Chemical structure of (a) BCNU and (b) PLGA.

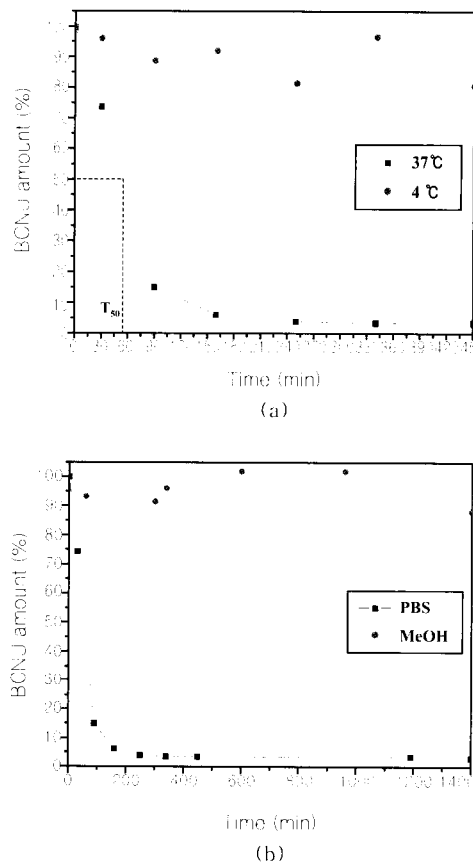


Figure 2. Degradation behavior of BCNU. (a) BCNU in PBS (pH 7.4) at 37 °C (●) and 4 °C (■), (b) BCNU in MeOH (●) and PBS (pH 7.4; ■) at 37 °C.

나타낸 것과 같이 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea 화학구조를 가진 화학요법제이다. 일반적으로 BCNU는 중앙 세포의 DNA나 RNA를 알킬화하여 항종양성을 나타내는 약물이며 다른 알킬화제와 상호작용을 일으키지는 않는다.<sup>21</sup> BCNU는 수용액에서 가수분해되며 가수분해의 정도는 pH에 의존하고 강산성이나 pH 7 이상의 수용액에서의 반감기는 매우 짧고 pH 4 에서 가장 안정하며 생체외 조건 및 체내 현장에서의 반감기는 각각 20분과 15분으로 매우 짧다. 또한 30~32 °C의 낮은 녹는점을 가지고 있어 열이나 빛에 매우 불안정하다고 알려져 있다.<sup>22</sup> 따라서 본 연구에서 이용되는 방출시험액인 PBS와 방출약물의 HPLC 분석에서 전개액으로 사용되는 메탄올에서의 온도에 따른 안정성을 검토하였다. 각 시

형조에서 분해되지 않고 남아있는 BCNU의 양을 조사하였으며 이를 Figure 2에 시간의 함수로 나타내었다.

방출시험 온도인 37 °C (PBS, pH 7.4) 조건에서 BCNU의 분해는 매우 빨리 진행되어 반감기가 약 55분이었으며 약 4시간 이후 약물의 잔존량은 10% 이하로 매우 불안정하였다. 4 °C (PBS, pH 7.4) 조건에서는 약 7시간 후에도 85% 이상의 BCNU가 검출되었으며 따라서 BCNU의 분해는 매우 온도의존적임을 알 수 있었다. 한편 BCNU의 메탄올에서의 분해속도는 매우 느려서 37 °C의 온도조건에서 24시간 이후에도 90% 이상의 BCNU가 검출되어 PBS에 비해 상당히 안정함을 알 수 있었다. 이상의 BCNU 안정성 시험결과를 통하여 37 °C, PBS에서 BCNU의 가수분해속도는 매우 빠르기 때문에 방출시험기간 동안 제형으로부터 BCNU가 방출된 PBS를 채취하여 BCNU의 방출량을 분석하는 방법으로는 재현성있는 결과를 얻을 수 없으므로 본 연구에서는 일정 방출시험기간 후 웨이퍼에 잔존하는 BCNU의 양을 측정함으로써 방출된 BCNU의 양을 결정하였다.

미분말의 형태와 특성. BCNU를 함유한 PLGA 미분말은 분사건조법을 이용하여 제조하였으며 미분말의 제조에 이용된 PLGA 분자량, PLGA 농도 및 BCNU 농도 등을 변화시켜 제조한 미분말의 약물 포

집율을 Table 1에 나타내었다. PLGA 용액의 점도가 너무 높거나 너무 낮은 경우 분사건조법에 의해 일정 수득률 이상의 분말을 얻는 것이 어렵기 때문에 최소 수득률 40% 이상의 미분말을 제조하기 위하여 분자량이 2만인 경우는 10% 이상의 농도에서 그리고 9만인 경우는 3% 이상의 조건에서 제조된 미분말의 BCNU 포집율을 조사하였다.

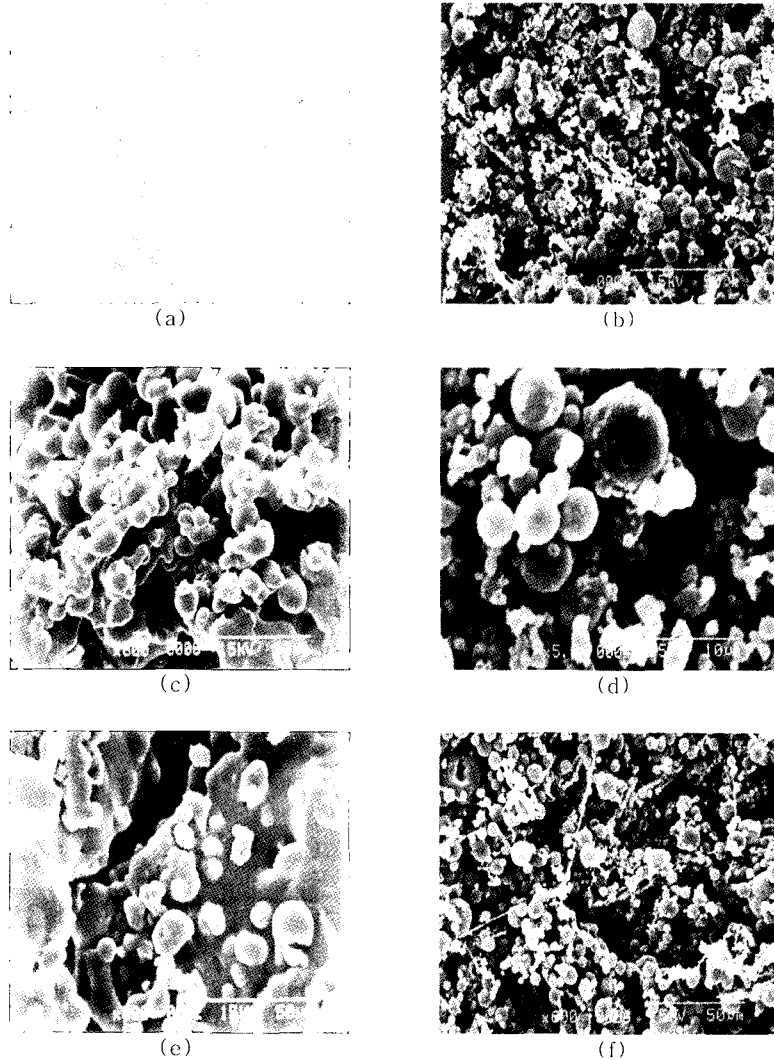
BCNU 포집율은 PLGA의 분자량이 2만인 경우 같은 PLGA 농도에서 BCNU의 농도가 높을수록 (Batch 2, 4, 6 과 Batch 3, 5, 7) 감소하였다. 이는 BCNU의 초기함량이 높을수록 BCNU를 포집할 수 있는 고분자의 상대적인 양이 감소함을 의미하고 따라서 미분말에 완전히 포집되지 못하거나 외부에 노출된 BCNU가 분사건조시 열에 의해 분해되었기 때문으로 생각하였다. 또한, PLGA의 농도가 높을수록 (Batch 2와 3, Batch 4와 5 그리고 Batch 6과 7) 포집율이 다소 감소하는 경향을 나타내었다. 하지만 고분자의 농도가 포집율에 미치는 영향은 초기 BCNU함량이 포집율에 미치는 영향에 비하여 적었다. 한편, 분자량 9만인 PLGA로 제조된 미분말의 경우 BCNU 함량증가에 따른 BCNU 포집율은 분자량 2만의 경우와 같이 일정한 경향을 나타내지 않았으며 약 5~10% 정도의 BCNU 초기함량에서 95~99%의 포집율을 나타내어 고분자의 농도에 크게 의존하지 않음을 알 수 있었다 (Batch 10, 11, 12, 13).

분자량 2만과 9만의 PLGA를 사용하고 BCNU의 초기 함량을 변화시켜 제조한 미분말을 SEM으로 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다. 분자량 2만의 PLGA를 사용하여 제조된 분말(a, b, c)은 BCNU 결정이 관찰되지 않았으며 제조된 분말은 미립구의 형태를 나타내고 있었으나 BCNU의 함량이 증가할수록 입자들이 점차 회합하는 경향을 보였다. 분자량 9만의 PLGA를 사용하여 제조한 분말(d, e, f)의 경우도 제조된 분말이 대부분 미립구의 형태를 나타내었으며 일부 섬유상의 분말이 존재하였으나 BCNU결정은 관찰되지 않았다. 이상의 결과에서 PLGA의 분자량이나 BCNU의 함량에 관계없이 BCNU의 결정은 발견되지 않았으며 따라서 BCNU가 PLGA의 내부에 포집된 형태의 미분말이 제조되었음을 확인할 수 있었다.

Figure 4는 BCNU, PLGA 그리고 BCNU/PLGA

**Table 1. Spray-drying Conditions and Encapsulation Efficiency (EE) of BCNU-loaded PLGA Microparticles**

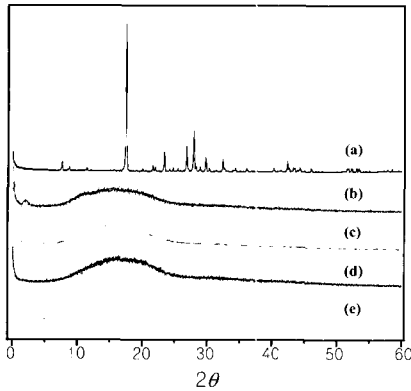
batch no.	PLGA Mw (kg/mole)	initial BCNU loading (%)	PLGA conc. (%)	EE (%)
1	20	3.85	10	92
2	20	5	10	93
3	20	5	30	86
4	20	10	10	85
5	20	10	30	80
6	20	20	10	60
7	20	20	30	57
8	90	3.85	3	79
9	90	3.85	5	80
10	90	5	3	99
11	90	5	5	99
12	90	10	3	95
13	90	10	5	99
14	90	20	3	70
15	90	20	5	50



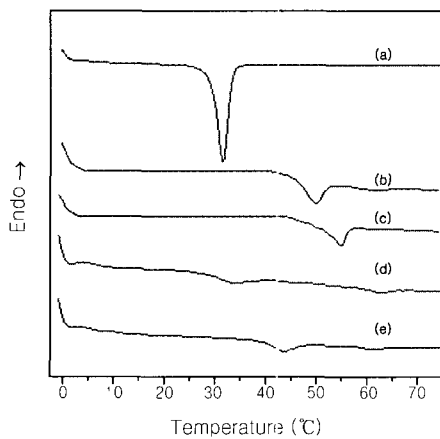
**Figure 3.** Scanning electron microscopy of BCNU-loaded PLGA microparticles. (a) PLGA 20 k / BCNU 5%, (b) PLGA 20 k / BCNU 10%, (c) PLGA 20 k / BCNU 20%, (d) PLGA 90 k / BCNU 5%, (e) PLGA 90 k / BCNU 10%, and (f) PLGA 90 k / BCNU 20%.

미립구의 XRD 분석결과를 나타낸 그림이다. 그림에 나타낸 바와 같이 BCNU는 결정성이 매우 높은 약물이며 PLGA는 결정성이 매우 낮은 고분자이다. 분사 건조에 의해 BCNU를 PLGA에 포접시킨 미분말의 XRD 곡선에서 BCNU의 결정성피크가 나타나지 않았으며 따라서 BCNU가 PLGA와 대부분 균일한 고체용액상태를 이루고 있음을 알 수 있었다. Figure 5는 BCNU, PLGA, 그리고 BCNU/PLGA 미분말의

DSC 분석결과를 나타낸 그림이다. BCNU의 용융피크 그리고 분자량 2만과 9만의 PLGA의 유리전이에 의한 피크가 관찰되었으며 이는 분회에 보고된 것과 일치하였으며<sup>23</sup> 특히 BCNU는 높은 결정성으로 인해 용융온도부근에서 매우 강한 흡열피크를 나타내었다. BCNU함유 PLGA미분말을 XRD분석한 결과 BCNU의 용융에 의한 피크와 PLGA의 유리전이에 의한 피크가 관찰되지 않았다. 그러나, 확대된 XRD 곡선은



**Figure 4.** X-ray diffraction patterns of BCNU, PLGA, and BCNU-loaded PLGA microparticles. (a) BCNU, (b) PLGA 20 k, (c) PLGA 90 k, (d) PLGA 20 k / BCNU 10%, and (e) PLGA 90 k / BCNU 10%.

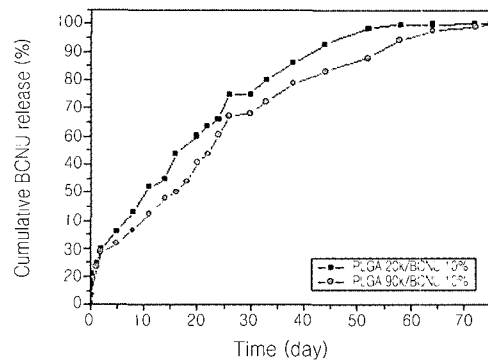


**Figure 5.** DSC thermograms of BCNU, PLGA, and BCNU-loaded PLGA microparticles. (a) BCNU, (b) PLGA 20 k, (c) PLGA 90 k, (d) PLGA 20 k / BCNU 10%, and (e) PLGA 90 k / BCNU 10%.

통하여 매우 작은 특성 피크들이 관찰되었고 발견된 피크로부터의 열특성 자료를 Table 2에 정리하여 나타내었다. BCNU가 PLGA에 포접됨으로써 BCNU의 용융온도는 증가하였으며 분자량 9만의 PLGA를 사용하였을 때 용융온도는 더욱 증가하였다. 또한 BCNU가 함유된 PLGA 미분말의 용융엔탈피 ( $\Delta H_m$ )는 BCNU 자체의 용융엔탈피에 비하여 현저히 감소하였으며 따라서 BCNU의 결정성이 감소하였음을 알

**Table 2. Thermal Properties of BCNU, PLGA and BCNU-loaded PLGA Microparticles**

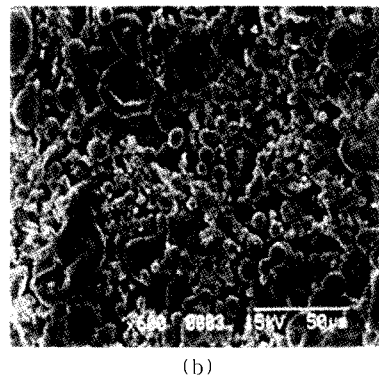
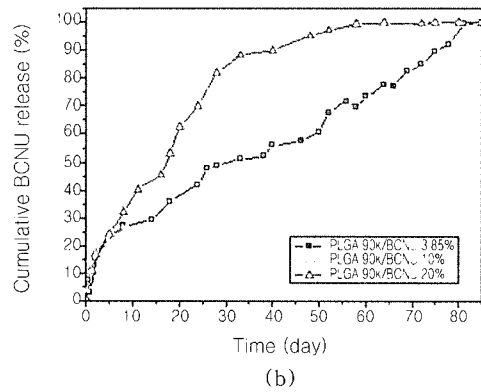
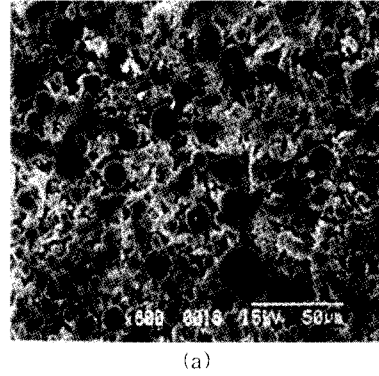
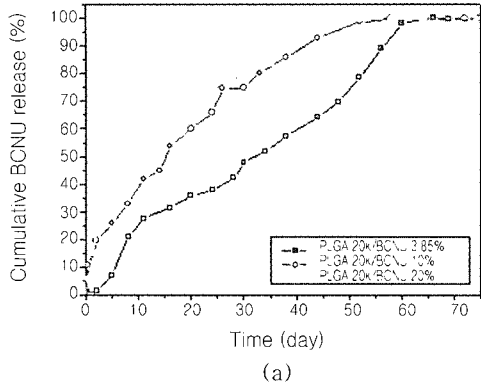
	$T_m$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H_m$ (J/g)	$T_g$ ( $^{\circ}C$ )	$\Delta H_g$ (J/g)
BCNU	30.58	114.5	-	-
PLGA 20K	-	-	50.55	8.285
PLGA 90K	-	-	55.39	6.945
BCNU/PLGA20K	33.23	21.63	62.85	1.352
BCNU/PLGA90K	43.97	21.31	61.21	2.216



**Figure 6.** Effect of PLGA molecular weight on BCNU release from PLGA wafers.

수 있었다. 한편, 미분말의 경우 PLGA의 유리전이온도는 PLGA 자체의 유리전이온도에 비해 상승하였으며 유리엔탈피( $\Delta H_g$ )는 감소하는 경향을 나타내어 PLGA의 결정성도 감소하였음을 알 수 있었다. 이상의 XRD 및 DSC 결과들로부터 BCNU와 PLGA는 고체용액 상태로 존재하면서 각각의 전이온도를 변화시키고 결정성을 감소시키는 작용을 한다고 생각할 수 있다.

**생체의 방출거동.** Figure 6은 BCNU의 농도를 10%로 고정하고 분자량이 다른 PLGA를 사용하여 분사건조한 미분말을 웨이퍼로 성형한 후 PBS (pH 7.4)에 침지하고 시간에 따른 BCNU의 방출량을 조사한 결과를 나타낸 그림이다. 분자량 2만의 웨이퍼는 초기 약 20% 정도의 burst를 보이고 이후 거의 0차에 가까운 방출경향을 나타내며 총 방출기간은 약 8주 정도였다. 분자량 9만의 경우는 초기 약 20%의 burst를 보이고 이후 거의 0차에 가까운 방출경향을 나타내며 총 방출기간은 약 10주 정도였다. 일반적으로 고분자 매트릭스로부터의 약물방출은 고분자의 분



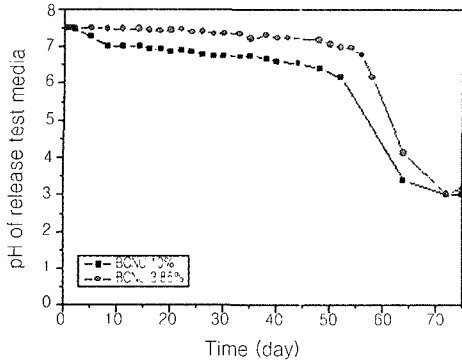
**Figure 7.** Effect of BCNU loading amount on BCNU release from PLGA wafers. (a) PLGA 20 k and (b) PLGA 90 k.

**Figure 8.** Scanning electron microscopy of surface of 3.85% BCNU-loaded PLGA 90 k wafer. (a) before release test and (b) after 10 days of release test.

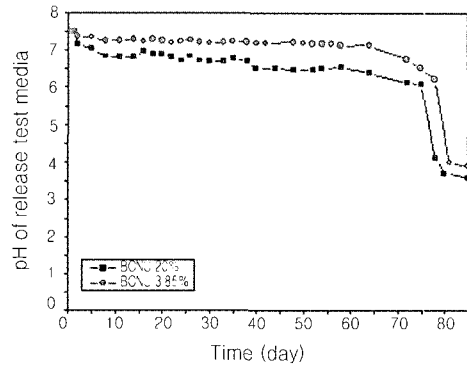
자량이 클수록 방출속도가 느린 것으로 알려져 있으며<sup>24</sup> 분자량 2만을 사용한 경우에 비해 분자량 9만의 PLGA를 사용한 웨이퍼로부터의 약물 방출속도가 느리고 따라서 방출기간도 연장됨을 알 수 있었다. BCNU 함량에 따른 약물방출의 경향을 조사하기 위하여 분자량 2만과 9만인 PLGA를 사용하고 BCNU의 농도를 달리하여 제조한 웨이퍼로부터의 BCNU 방출을 각각 Figure 7의 (a)와 (b)에 나타내었다. 분자량 2만의 PLGA의 경우 약물의 함량이 증가할수록 방출속도는 빨라지고 방출기간도 단축됨을 알 수 있으며 100% 약물 방출기간은 약 55~60일이었다. 분자량 9만인 PLGA를 사용하고 BCNU의 함량을 달리하여 제조한 웨이퍼로부터의 BCNU 방출은 BCNU의 함량에 관계없이 약 10일까지 유사한 방출거동을 나타낸 후 BCNU의 함량이 증가할수록 방출속도가 증

가하는 경향을 나타내었으며 100% 약물 방출기간은 약 8~12주 정도였다. PLGA 매트릭스로부터 약물 방출의 속도와 경향은 주로 약물의 고분자 매트릭스를 통한 확산과 약물을 포접한 PLGA의 분해거동에 의존하는 것으로 알려져 있으며 따라서 약물의 함량, 고분자의 분자량 그리고 PLGA를 구성하는 단량체의 비율 등에 의해 지배를 받는다.<sup>25-27</sup> 분자량이 작은 2만의 PLGA로 제조된 웨이퍼의 BCNU 방출경향을 분자량이 큰 9만의 PLGA로 제조된 웨이퍼의 BCNU 방출경향과 비교할 때, 분자량 2만의 PLGA를 사용한 경우 방출시험액에 의한 수화 및 분자사슬의 절단이 분자량 9만의 PLGA에 비해 빠르기 때문에 약물 방출 초기에 BCNU함량에 따른 약물 방출속도가 차이를 보이는 것으로 생각되며 분자량 9만의 경우는 PLGA의 수화 및 분자사슬 절단이 분자량 2만의 경





**Figure 9.** pH of release test media of BCNU-loaded PLGA 20 k wafers.



**Figure 10.** pH of release test media of BCNU-loaded PLGA 90 k wafers.

우에 비하여 상대적으로 느리기 때문에 초기의 방출 경향이 단순 약물 확산에만 의존하고 따라서 BCNU의 함량에 관계없이 유사한 초기 방출경향을 갖는 것으로 생각된다. 이상의 결과로부터 PLGA를 사용한 본 연구의 제형은 폴리안하이드라이드를 사용하여 BCNU를 포접한 제형이 약 3~5일에 BCNU가 모두 방출되는 연구결과와 비교할 때 방출기간이 10배 이상 증가한 55~80일로 BCNU의 장기간 방출에 적합하고 따라서 뇌종양 환자의 치료와 생존율 증가에 매우 효과적인 약물전달 시스템을 확인하였다.

**분해거동.** 방출시험기간 동안 방출시험액내에서 BCNU 함유 PLGA 웨이퍼의 형태변화를 살펴보기 위하여 분자량 2만의 PLGA를 사용하고 BCNU의 함량을 10%로 하여 제조한 웨이퍼의 방출시험 이전과 일정 방출 시험기간 경과 후 웨이퍼의 표면을 SEM으로 관찰하여 Figure 8에 나타내었다. 방출시험 이전의 웨이퍼는 가압된 미분말이 미립구의 형태를 유지하고 있었으며 일정기간이 지난 웨이퍼에서는 수화에 의해 팽윤된 상태로 존재하는 미립구와 미립구 내부에 포접되어 있던 약물이 방출되어 함몰된 것으로 간주되는 미립구 등이 관찰되었으며 미립구들 사이에 수분의 침투와 약물의 방출통로로 이용될 수 있는 미세채널이 형성되어 있음을 알 수 있었다.

Figure 9는 분자량 2만인 PLGA를 사용하고 BCNU의 함량을 달리하여 제조한 웨이퍼의 방출시험액 pH변화를 관찰하여 나타낸 그림이다. 방출시험액인 PBS (pH 7.4)의 약물방출에 따른 pH의 변화는 크게 두 영역으로 나누어지며 시간의 경과에 따라 완

만한 pH 감소를 보이는 영역과 일정기간이 경과한 후 급격하게 감소하는 영역이 존재함을 알 수 있다. 완만한 pH의 감소를 보이는 영역은 고분자 매트릭스의 수화, 매트릭스 내부로의 수분침투, 침투된 수분에 의한 고분자사슬의 절단과 저분자량 PLGA의 생성 등의 다양한 현상이 일어나는 영역으로 해석할 수 있으며 이후 급격한 pH 감소영역은 저분자량 PLGA의 분해가 더욱 진행되어 분해최종산물인 글리콜산이나 락티드산과 같은 단량체가 생성되는 영역으로 생각된다. 또한 BCNU의 함량이 높은 경우 방출액의 pH가 감소하는 정도가 커짐을 알 수 있는데 이는 BCNU의 함량이 높을수록 매트릭스 표면 및 내부에 존재하는 BCNU의 양이 많고 따라서 고분자의 수화가 빨리 일어날 뿐만 아니라 매트릭스 내부로의 수분침투 속도와 양이 증가함으로써 고분자의 분해거동이 촉진되었기 때문으로 생각된다. Figure 10은 분자량 9만의 PLGA를 사용하고 BCNU의 양을 달리하여 제조한 웨이퍼의 방출시험액 pH변화를 나타낸 그림이다. 분자량이 2만인 경우에서와 같이 pH 감소가 완만히 진행되는 영역과 급격히 진행되는 영역이 존재하며 BCNU의 함량이 높을수록 pH 감소의 정도가 커지는 경향을 나타내었다. BCNU의 함량이 3.85%인 경우와 20%인 경우를 비교할 때 방출시험액의 pH가 급격히 감소하는 시점이 약 76일에서 약 58일로 짧아지는 것으로부터 BCNU의 함량이 증가할수록 고분자의 수화가 빨라지고 매트릭스 내부로의 수분침투 속도와 양이 증가하여 고분자의 분해속도가 증가하여 약물의 방출속도도 빨라짐을 확인할 수 있었다.

## 결 론

뇌종양치료제인 BCNU를 생분해성 고분자인 PLGA에 포접시키기 위하여 분사건조법에 의해 미분말을 제조하였으며 웨이퍼로 성형하고 *in vitro* 방출시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 분사건조에 의해 제조된 미분말은 미립구의 형태를 나타내었으며 BCNU의 포접율은 사용한 PLGA의 분자량과 BCNU의 함량에 의존하였다. 분자량 2만의 PLGA를 사용한 경우 BCNU의 함량이 높을수록 포접율은 감소하였으며 분자량 9만의 PLGA를 사용한 경우 최대의 포접율을 나타내는 최적의 BCNU 함량이 존재하였다.

2. BCNU 함유 PLGA 미분말의 XRD 분석 결과를 통하여 결정성 약물인 BCNU가 PLGA에 포접되어 결정성이 감소하였음을 확인하였고 DSC 분석 결과 각각의 열적특성을 나타내는 피크들의 이동과 전이엔탈피의 감소로부터 약물과 고분자의 결정성에 서로 영향을 미치고 있음을 확인하였다.

3. 미분말을 웨이퍼로 성형하고 생체외 방출거동을 살펴본 결과 PLGA의 분자량이 증가할수록 BCNU의 방출속도는 감소하였으며 BCNU의 함량이 증가할수록 방출속도는 증가하였다. BCNU의 함량이 증가할수록 방출시험 초기 burst effect가 증가하는 경향을 나타내었으나 이후 일정기간 동안 거의 0차에 가까운 약물방출 거동을 보였다.

4. 방출시험기간 동안 웨이퍼의 형태변화와 방출시험액의 pH 변화를 관찰한 결과 BCNU의 방출은 고분자 매트릭스를 통한 BCNU의 확산과 PLGA의 분해에 의해 이루어짐을 확인하였으며 BCNU의 함량이 증가할수록 PLGA의 수화와 분해가 촉진됨을 알 수 있었다.

현재 약성뇌종양 세포들에 대한 BCNU/PLGA 웨이퍼의 약물감수성시험과 종양동물모델에 관한 연구를 수행중이다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부의 중기거점 연구과제지원에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. P. M. Black, *N. Engl. J. Med.*, **324**, 1471 (1991).
2. E. A. Neuweit, F. P. Frenkel, J. Diehl, L. H. Vu, S. Rapoport, and S. Hill, *Neurosurgery*, **7**, 44 (1980).
3. R. E. Harbaugh, R. L. Sanders, and R. F. Reeder, *Neurosurgery*, **23**, 693 (1988).
4. R. D. Penn, M. M. York, and J. A. Paice, *J. Neurosurg.*, **83**, 215 (1995).
5. J. Kreuter, R. N. Alyautdin, D. A. Kharkevich, and A. A. Ivanov, *Brain Res.*, **674**, 171 (1995).
6. U. Bickel, T. Yoshikawa, and W. M. Pardridge, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **10**, 205 (1993).
7. O. Lindvall and A. Bjorklund, *Acta Neurol. Scand.*, **126**, 197 (1989).
8. F. H. Gage, J. A. Wolff, M. B. Rosenberg, L. Xu, J. K. Yee, C. Shults, and T. Friedmann, *Neuroscience*, **23**, 795 (1987).
9. R. J. Tamargo, J. S. Myseros, J. I. Epstein, M. B. Jang, M. Chasin, and H. Brem, *Cancer Res.*, **53**, 329 (1993).
10. K. A. Walter, M. A. Cahan, A. Gur, B. Tyler, J. Hilton, O. M. Colvin, P. C. Burger, A. Domb, and H. Brem, *Cancer Res.*, **54**, 2207 (1994).
11. K. O. Lillehei, Q. Kong, S. J. Withrow, and B. KleinschmidtDeMasters, *Neurosurgery*, **39**, 1191 (1996).
12. P. Minie, M. Boisdrion-Cler, A. Croue, G. Guy, and J. P. Benoit, *Neurosurgery*, **39**, 117 (1996).
13. H. Brem, M. S. Mahaley, N. A. Vick, K. L. Black, S. C. Schold, T. W. Ellier, J. W. Cozzens, and J. N. Kenealy, *J. Neurosurg.*, **74**, 441 (1991).
14. H. Brem, M. G. Ewend, S. Piantadosi, J. Greehoot, P. C. Burger, and M. Sisti, *J. Neuro-oncol.*, **26**, 111 (1995).
15. H. Brem, S. Piantadosi, P. C. Burger, M. Walker, R. Selker, N. A. Vick, and R. Schold, *Lancet*, **345**, 1008 (1995).
16. K. A. Walter, R. J. Tarmargo, A. Olivi, P. C. Burger, and H. Brem, *Neurosurgery*, **37**, 1129 (1995).
17. K. W. Leong, P. D'Amore, M. Marletta, and R. Langer, *J. Biomed. Mat. Res.*, **20**, 51 (1986).
18. D. Stephens, L. Li, D. Robinson, S. Chen, H. Chang, R. M. Liu, Y. Tian, E. J. Ginsburg, X. Gao, and T. Stultz, *J. Control. Release*, **63**, 305 (2000).

19. H. Akbari, A. D'Emanuele, and D. Attwood, *Int. J. Pharm.*, **160**, 83 (1998).
20. A. J. Domb, Z. H. Israel, O. Elmalak, D. Teomim, and A. Bentolia, *Pharm. Research*, **16**(5), 762 (1999).
21. T. L. Loo, R. L. Dion, R. L. Dixon, and D. P. Rall, *J. Pharm. Sci.*, **55**(5), 492 (1966).
22. K. Fredrikson and P. Lundgren, *Acta Pharm. Suec.*, **23**, 115 (1986).
23. T. Painbeni, M. C. Venier-Julienne, and J. P. Benoit, *European J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 31 (1998)
24. J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer (Korea)*, **24**(5), 728 (2000).
25. N. Wakiyama, K. Juni, and M. Nakano, *Chem. Pharm. Bull.*, **30**(7), 2621 (1982).
26. T. Kosima, M. Nakano, K. Juni, S. Inoue, and Y. Yoshida, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**(7), 2795 (1994).
27. M. Kelli, J. P. Montheard, and J. M. Vergnaud, *Int. J. Pharm.*, **81**, 103 (1992).