

첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼의 in vitro 항암 활성

이진수 · 안태군 · 신필경* · 채강수 · 정제교** · 이봉* · 조선행*** · 강길선 · 이해방***†

전북대학교 유기신물질공학과, *부경대학교 고분자공학과,

삼천당제약 중앙연구소, *한국화학연구원 생체의료고분자팀

(2003년 2월 8일 접수, 2003년 4월 1일 채택)

In Vitro Antitumor Activity of BCNU-Loaded PLGA Wafer Containing Additives

Jin Soo Lee, Tae Kun An, Phil Kyung Shin*, Ghang Soo Chae, Je Kyo Jeong**,
Bong Lee*, Sun Hang Cho***, Gilson Khang, and Hai Bang Lee***†

Department of Advanced Organic Materials Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Duckjin Gu, Jeonju 561-756, Korea

*Department of Polymer Engineering, Pukyong National University,
San 100, Nam Gu, Busan 608-739, Korea

**Research Center, Samchundang Pharm. Co. Ltd., P. O. Box 289,
Youngdeungpo, Seoul, 150-037, Korea

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

†e-mail : hblee@kriict.re.kr

(Received February 8, 2003; accepted April 1, 2003)

초록 : 약물의 방출 경향을 제어할 목적으로 폴리비닐피롤리돈 (PVP) 또는 염화나트륨을 함유한 항암제 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU, carmustine)/poly(L-lactide-co-glycolide) (PLGA) 웨이퍼를 직접 압축성형 방법에 의해 직경 3 mm와 두께 1 mm의 조건으로 제조하였다. 생체의 방출실험에서 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 약물 방출거동은 웨이퍼에 함유된 첨가제에 의해 조절할 수 있었다. BCNU의 초기 방출량과 방출속도 및 기간은 염화나트륨 또는 PVP의 첨가에 의해 변화하였다. 9L gliosarcoma 세포를 이용한 생체의 항암 활성 실험에서 첨가제가 함유된 웨이퍼로부터 방출된 BCNU를 처리한 세포의 생존율을 분석하여 평가했고, 그 결과 지속적으로 9L gliosarcoma 세포의 성장을 억제함을 확인하였다. 9L gliosarcoma 세포에 대한 첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 방출된 BCNU 약효 검사를 통하여 웨이퍼로부터 BCNU가 지속적으로 방출되어 9L gliosarcoma 세포의 생존과 증식을 효과적으로 억제함을 확인하였다. 특히, 첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼의 지속적인 성장 억제는 첨가제를 함유하지 않은 웨이퍼의 것보다 더욱 효과적이었다. 또한 염화나트륨 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼가 PVP 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼보다 세포 증식 억제 효과가 뛰어남을 보였다.

ABSTRACT : We fabricated the 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU, carmustine)-loaded PLGA wafers containing poly(*N*-vinylpyrrolidone) (PVP) or sodium chloride (NaCl) in order to control the release profile of drug in specific shape (3 in diameter, 1 mm in thickness) by direct compression method. In vitro release profiles of BCNU could be controlled by additives contained in the wafers. Initial release amount, release rate and duration of BCNU could be controlled with presence of PVP or NaCl. In vitro antitumor activity accessed using 9L gliosarcoma cell line has been evaluated by assaying the viability of cells treated with BCNU released from the wafers containing additives resulting in continuous growth inhibition of 9L gliosarcoma tumor cells. Specially, the continuous growth inhibition of BCNU-loaded PLGA wafers containing additives was more effective than that of non-additive BCNU-loaded PLGA wafers. The cytotoxic effect of the drug from the wafers containing NaCl as compared to wafers containing PVP was more enhanced.

Keywords : brain tumor, BCNU, PLGA wafer, additives, 9L gliosarcoma cells.

1. 서론

악성뇌종양 세포는 증식력이 매우 높고 주변조직에 침윤성이 높아 수술적 절제나 방사선 치료로 종양을 완전히 제거하기 어려워 재발율이 높다. 또한, 많은 약물이 생체내 혈뇌장막 (blood brain barrier, BBB)을 구성하는 뇌모세상피세포벽을 통과하지 못해 약물이 혈액으로부터 뇌로 전달되지 못하고 배출되기 때문에¹ 전신적 화학요법으로 항암제를 중추신경계에 전달하기 어렵다. 따라서 최근에 뇌종양 치료의 새로운 접근법으로 심혈관계에 의존하지 않고 약물을 중추신경계에 전달하는 기술로서 약물을 함유한 고분자를 뇌종양 부위에 직접 이식하는 방법이 제시되고 있다.^{2,6}

이는 전신화학요법과 비교할 때 약물이 BBB를 통과해야 하는 문제가 없을 뿐 아니라 체순환계에 의한 약물의 분해를 최소화함으로써 생체이용율을 높일 수 있으며 전신부작용을 줄일 수 있는 장점이 있다.⁷⁻¹² 이러한 이식형 항암제는 암조직 부위에 근접하여 약물을 방출시키므로 항암제를 고농도로 전달할 수 있고 BBB 투과에 따른 항암제의 과량투여의 문제점을 피할 수 있다.¹³⁻¹⁷ 실제로 항암제를 함유한 고분자들의 치료효과와 안정성 등이 동물 뇌종양모델에서 평가되어 왔으며, 최근 인간의 재발성 신경교종의 치료에 이용되어 왔다.¹⁸⁻²³

1,3-Bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU, 카뮈스틴)는 악성 뇌종양의 치료에 사용되며 지용성이고²⁴ BBB를 투과할 수 있는 저분자량 항암제이나 체내 반감기가 매우 짧아 치료효율이 낮기 때문에 전보에서^{25,28} 이를 종양 조직까지 효과적으로 전달하기 위하여 서방화하고 국소에 적용할 수 있도록 이식제형화한 웨이퍼를 개발하였다. 또한, 생체적합성, 생분해성을 가지며 특히 뇌조직에도 안정한 락타이드-글리콜라이드 공중합체 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)를²⁹⁻³⁷ 약물전달용 매트릭스로 사용하여 장·단기간 약물방출에 부합하는 BCNU/PLGA 웨이퍼로 제형화하고 생체의 방출경향을 조사하였다. 그리고, BCNU/PLGA 웨이퍼부터 방출되는 BCNU의 암세포독성을 확인하기 위하여 9L gliosarcoma 세포를 대상으로 항암 활성을 평가하고 BCNU 용액의 항암 활성과 비교하였으며 BCNU/PLGA 웨이퍼의 장·단기간 약물방출에 의한 항암 활성의 유지 여부를 검토하였다. BCNU를 함유한 웨이퍼는 BCNU 용액보다 장기간 세포독성효과를 나타내며 생체내 실험 또는 임상에 적용할 수 있는 가능성을 보여주어 9L gliosarcoma 암세포주에서 종양 동물모델에 대해 실험을 하였으나 BCNU 함유 PLGA 웨이퍼로부터 방출된 BCNU가 유의할만한 항암 효과를 보여주지 못했다. 따라서, 단기간에 걸쳐 고농도의 약

물을 전달할 수 있는 약물전달기구의 필요성이 부각되었다.

본 연구에서는 폴리비닐피롤리돈 (polyN-vinylpyrrolidone, PVP) 또는 염화나트륨을 함유한 각각의 BCNU/PLGA 웨이퍼를 물리적 혼합에 의해 제조하고 생체의 조건에서의 약물방출 특성을 조사하였을 뿐만 아니라 9L gliosarcoma 세포를 대상으로 하여 *in vitro* 약효를 검색을 통해 웨이퍼 안에서 첨가제의 영향을 조사하였다. 첨가제로 사용된 염화나트륨과 PVP는 서방성 제제에서 다공성과 채널형성에 영향을 주며 삼투압을 유도하는 물질로 사용되고, 따라서 미세캡슐로부터 약물의 방출을 조절할 수 있다. 염화나트륨은 물과 더불어 생명활동에 깊이 관여하여, 삼투압의 조절이라는 생명유지에 없어서는 안될 구실을 한다. 또한, 염화나트륨은 무색 또는 백색의 결정 또는 결정성 가루로 물에 잘 녹고, 에탄올에서는 매우 녹기 어려우며, 에틸에는 거의 녹지 않는다. 또한 PVP는 서방화 약물전달체로 수용액에서 pH에 거의 영향을 받지 않으면서 오랜 시간 동안 안정한 특성으로 인하여 인공혈액 등으로 이용되어온 생체적합성 고분자이며 무정형 고분자로서 고분자 지지체로부터 난용성 약물의 방출을 향상시킬 수 있다고 보고되었다.³⁸⁻⁴⁰

2. 실험

시약 및 재료. BCNU (순도 98%이상, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)는 -20°C 에서 보관하여 사용하였으며 본 실험에서 이용한 생분해성 고분자 재료는 PLGA로서 평균분자량이 8000 g/mole (락타이드/글리콜라이드 몰비, 50/50, Resomer® RG 502 H, Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Germany)인 것을 사용하였다. 첨가제로 사용한 PVP (K-30, ISP Technologies INC., USA)는 평균분자량이 50000 g/mole인 것을 사용하였으며 염화나트륨 (Showa Chem. Co., Japan)과 함께 약물의 방출시간을 조절하기 위한 수용성 첨가제로 사용되었다. 메틸렌클로라이드 (MC, Jin Chem. Pharm. Co. Ltd., Korea), 메틸알콜 (Junsei, Japan) 및 기타 시약들은 HPLC 등급을 사용하였다. 9L gliosarcoma 세포의 배양액은 Dulbecco's Modifide Eagle Medium (DMEM), 영양액인 우태아혈청 (FBS), 인산염완충용액 (PBS), 세포 수확제인 트립신/1,2-에틸렌다이아민테트라초산 (Trypsin/EDTA)과 항생제로 사용한 안티바이오틱-안티마이코틱은 GIBCO BRL® (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였다. 세포독성 측정 실험에 사용한 시약인 설포로다민 B (SRB), 트리스마염 및 삼염화초산 (TCA) 등의 시약은 Sigma Chemical사로부터 구입하였

다. 세포배양을 위해 사용한 T-75 배양용기와 6-well, 96-well plate 및 기타 세포배양에 사용한 일회용 플라스틱은 모두 Falcon사 (Lincoln Park, NJ, USA) 제품을 사용하였다. 세포독성 측정을 위한 microplate reader (ELISA reader)는 Molecular Devices사 (Sunnyvale, CA, USA)의 E-max 기종을 사용하였다.

첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼 제조. 생분해성 고분자인 PLGA와 약물 BCNU 및 첨가제를 vortex mixer를 이용하여 미분말화하였으며, 얻은 미분말을 가지고 제조 조건별로 압축 성형법을 이용하여 웨이퍼를 제조하였다. 각각의 웨이퍼는 프레스 (MH-50Y CAP 50 tons, Japan)를 이용하여 상온에서 20 kg/cm²의 압력에서 5초 동안 가압하여 3.0 mm×1.0 mm의 웨이퍼를 제조하였다 (Table 1).

생체의 방출실험. 생체의 약물 방출실험을 위하여 조건별로 제조한 각각의 웨이퍼를 20 mL의 인산염 완충용액 (PBS, pH 7.4)에 침지하고 37 °C로 유지되는 항온조에서 일정 기간 동안 60 rpm의 속도로 교반하였다. BCNU는 PBS 및 수용액 내에서 반감기가 매우 짧은 약물이므로 방출실험 기간 동안 PBS 내로 방출된 BCNU의 양을 검출하는 것은 불가능하다. 따라서 일정시간 방출이후 웨이퍼를 2 mL의 MC에 넣어 고분자와 약물을 용해시키고 18 mL의 메탄올로 BCNU가 섞여있는 PLGA를 침전시킨 후 상부의 맑은 용액 1 mL를 취하여 원심 분리한 후 상층액 100 µL를 취하여 고성능액체크로마토그래피로 분석함으로써 방출실험 이후 웨이퍼에 잔존하는 BCNU의 양을 조사하여 PBS내로 방출된 BCNU의 양을 산출하였다. 생체의 방출실험에서 BCNU의 포집량 및 방출량은 3회 실험한 평균값으로 하였다. 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 µ-Bondapak C₁₈ (3.9×300 mm, Waters, Milford, MA, USA)을 사용하였고 이동상은 메탄올을 사용하였고 유속은 1.0 mL/min으로 하였다. 컬럼온도는 상온을 유지하였고 검출파장은 237 nm를 선택하였으며 시료 주입량은 20 µm로 하였다.

세포 배양. 9L gliosarcoma 세포는 37 °C, 5% CO₂ 및 100% 습도의 조건을 유지하는 항온기 내에서 세포배양용 T 플라스크에서 계속 배양 분주하였다. 사용된 세포의 배양액으로는 10% (v/v) FBS와 1% 항생제를 첨가한 DMEM을 사용하였다. 0.05% 트립신-EDTA을 이용하여 배양용 플라스크로부터 9L gliosarcoma 세포를 분리하여 3~4일에 한번씩 계대 유지하였다.

세포독성 실험. 배양한 9L gliosarcoma 세포를 0.05% 트립신-EDTA 용액으로 분리하여 1400 rpm에서 3분간 원심 분리한 후 배양액으로 희석하여 헤마사이토메터 (Reichert Co., USA)를 이용하여 세포의 수를 계산하였다. 웨이퍼로부터 방출되는 BCNU의 세포독성평가 시험법을 Figure 1에 제시하였다. 6-well 배양 용기의 각 well에 1×10⁵ cell/mL의 세포를 준비하여 분주하고 세포가 배양 용기의 바닥면에 부착하도록 24시간 동안 배양하였다. 24시간 동안 배양 후 well에 각각 첨가제 함유 BCNU (3.85, 10, 20, 및 30%)/PLGA 웨이퍼를 넣고 3일간 배양하면서 세포의 모폴로지를 역전사현미경으로 관찰하였고, 약물을 함유하지 않은 PLGA 웨이퍼를 넣고 배양한 세포를 대조군으로 사용하였다. 세포의 배양이 끝난 후, 세포독성의 측정은 세포표면 단백질 염색 시약인 SRB를 이용하여 측정하였다.⁴¹ 즉 약물 처리가 끝난 각 well에서 배양액을 제거하고 각 well에 10% TCA 용액 2 mL을 처리하고 4 °C에서 1시간 동안 방치하여 세포를 고정시켰다. 그 후 TCA를 제거하고 실온에서 건조시킨 후, 1% 빙초산 용액에 0.4% SRB를 녹인 염색용액을 가하여 실온에서 30분 동안 방치하여 세포를 염색하였다.

Table 1. List of the Preparation Condition of BCNU-Loaded PLGA Wafers Containing Additives (n=3)

batch	PLGA (g/mole)	drug (%)	weight (mg)	thickness (mm)	diameter (mm)	additives
1	8000	3.85	10	1.0	3	-
2	8000	10	10	1.0	3	-
3	8000	20	10	1.0	3	-
4	8000	30	10	1.0	3	-
5	8000	3.85	10	1.0	3	PVP 40%
6	8000	10	10	1.0	3	PVP 40%
7	8000	20	10	1.0	3	PVP 40%
8	8000	30	10	1.0	3	PVP 40%
9	8000	3.85	10	1.0	3	NaCl 40%
10	8000	10	10	1.0	3	NaCl 40%
11	8000	20	10	1.0	3	NaCl 40%
12	8000	30	10	1.0	3	NaCl 40%

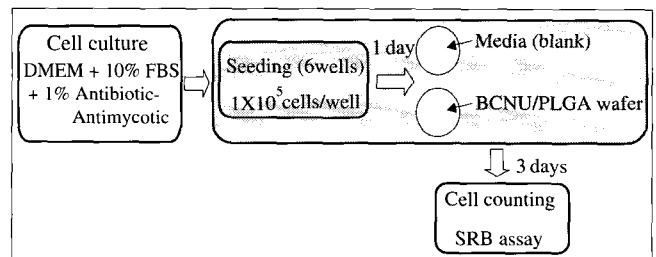


Figure 1. Diagram of methodology and experimental condition used for the cytotoxicity test of BCNU-loaded PLGA wafer.

세포와 결합하지 않은 여분의 SRB를 1% 빙초산 용액으로 세척하여 제거하고, 염색된 세포들에 pH 10.3~10.5의 10 mM Tris base (unbuffered) 용액 2 mL를 가하여 SRB를 용출시켰다. 용출된 SRB 용액을 96-well plate로 옮긴 후 각 well의 흡광도를 microplate reader를 이용하여 520 nm 파장에서 측정하였다. 세포독성의 계산은 약물을 가하지 않은 well의 세포수 (C)와 약물을 가한 각 well의 세포수 (T)를 비교하여, $T/C \times 100$ 의 식에 의해 계산하였다.

3. 결과 및 토론

약물과 고분자 혼합물의 물리화학적 특성. Figure 2에서 본 실험에서 사용한 BCNU, PLGA 및 PVP 구조를 나타내었다. BCNU는 신경종양의 치료를 위해 개발되어 온 나이트로소우레아 유도체의 일종으로 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea 화학구조를 가진 화학요법제이다. 일반적으로 BCNU는 종양 세포의 DNA나 RNA를 알킬화하여 항종양성을 나타내는 것으로 알려져 있으나 다른 알킬화제와 상호작용을 일으키지 않는다.⁴² BCNU는 수용액에서 가수분해되며 강산성이나 pH 7 이상의 수용액에서 반감기가 매우 짧고 pH 4에서 가장 안정하며 생체의 조건 및 체내 혈장에서의 반감기는 각각 20분

과 15분으로 매우 짧다. 또한 30~32 °C의 비교적 낮은 용융점을 가지고 있으며 열이나 빛에 매우 불안정하다고 알려져 있다.⁴³ 또한, 염화나트륨은 무색 또는 백색의 결정 또는 결정성 가루로 물에 잘 녹고, 에탄올에서는 매우 녹기 어려우며, 에텔에는 거의 녹지 않는다.⁴⁴

Figure 3에서는 고분자 매트릭스인 PLGA와 약물의 물리적 혼합에 따른 결정성의 변화와 염화나트륨의 효과를 알아보기 위하여 XRD를 이용하여 시료를 분석하였다. 그 결과, 그림에서와 같이 BCNU는 결정성이 매우 높은 약물로 10~30° 영역에서 결정피크가 나타났고, 여기에 결정성이 매우 낮아 결정영역이 거의 없는 무정형 고분자인 PLGA와 물리적 혼합의 결과로써 결정성이 감소하는 현상을 관찰하였다. 또한 결정성이 매우 높은 염화나트륨이 첨가된 웨이퍼의 경우 첨가제의 결정피크가 30~35°에서 나타났다. 일반적으로 생분해성 고분자를 이용하여 제조한 제형에서 약물 방출거동은 고분자 지지체 내에서 약물의 확산과 물로 인한 고분자의 침식에 의한 분해의 두 가지 공정에 의해 영향을 받는다.

첨가제에 따른 방출 경향. Figure 4는 초기 약물 함유량의 변화에 따른 약물 방출거동을 나타낸 그림이다. 각각의 웨이퍼들은 초기 약간의 burst를 보이고, 이후 거의 영차에 가까운 방출 경향을 나타내며 총 방출기간은 약 3~7일 정도였다 (Table 1, batch 1, 2, 3 및 4). 생체의 방출실험 3일째에서 30% BCNU/PLGA 웨이퍼는 98.2%의 방출을 보인 반면 3.85% BCNU/PLGA 웨이퍼는 약 62.8%만이 방출되었다. 약물의 초기 함유량이

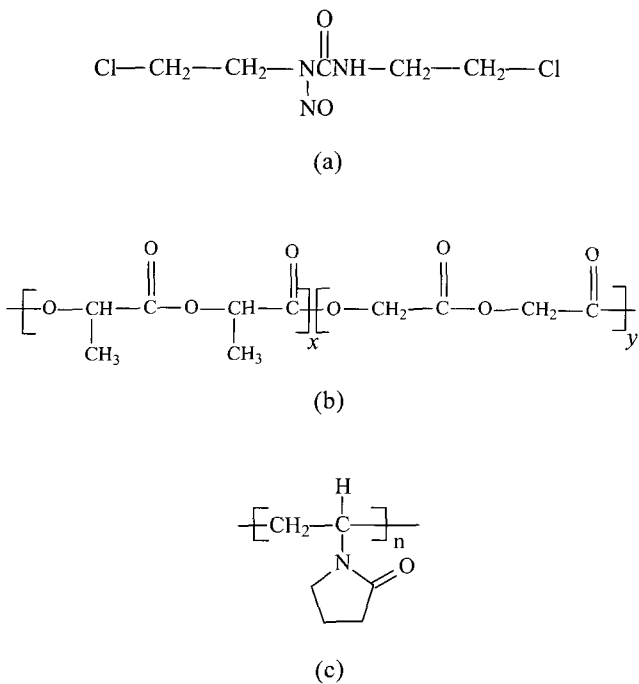


Figure 2. Chemical structures of (a) BCNU, (b) PLGA, and (c) PVP.

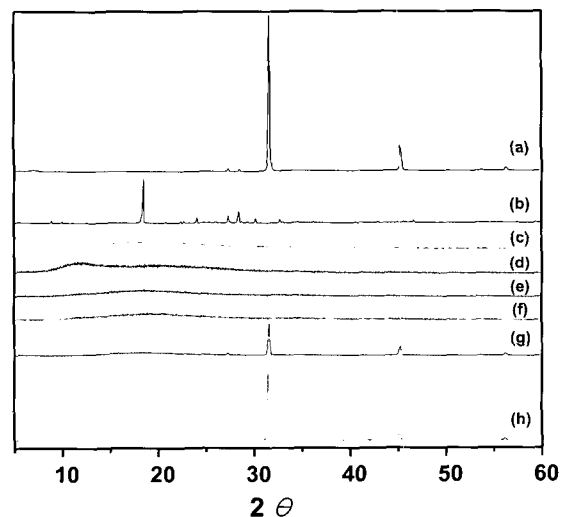


Figure 3. XRD of BCNU, PLGA, and BCNU-loaded PLGA particles. (a) NaCl, (b) BCNU, (c) PLGA, (d) PVP, (e) BCNU 3.85%, (f) BCNU 10%, (g) BCNU 3.85% with NaCl 40%, and (h) BCNU 10% with NaCl 40%.

3.85%에서 30%로 증가할수록 약물의 방출기간이 짧아지고 방출량이 증가함을 알 수 있었다. 난용성 약물인 BCNU는 물에 의한 침식과 채널을 통한 확산에 의해 약물이 방출되기 때문에 초기 burst의 감소와 선형에 가까운 방출거동은 약물 함유량의 조절과 약물을 고분자 지지체 내에 균일하게 분산시킴으로써 얻을 수 있다고 사료된다.

Figure 5는 BCNU의 함량에 따른 PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼의 약물 방출거동을 나타낸 그림이다. PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼는 총 방출기간이 약 3일 정도였다 (Table 1, batch 5, 6, 7 및 8). 친수성 고분자인 PVP의 영향으로 인해 초기 약간의 lag time을 없앨 수 있었고 거의 영차에 가까운 방출 경향을 나타냈으며 약물 방출속도가 BCNU와 PLGA만으로 제조된 웨이퍼 경우보다 방출속도가 더 빠르고 따라서 방출기

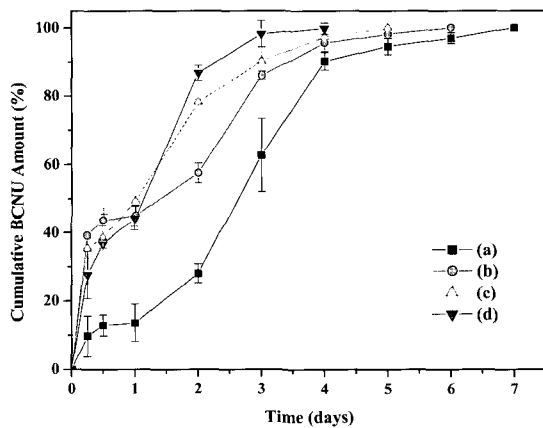


Figure 4. BCNU release profiles from PLGA wafers. (a) 3.85, (b) 10, (c) 20, and (d) 30%.

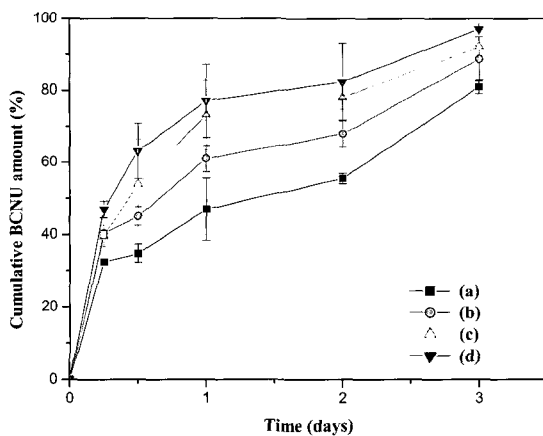


Figure 5. BCNU release profiles from PLGA wafers containing PVP 40%. (a) 3.85, (b) 10, (c) 20, and (d) 30%.

간도 4일 더 단축되었음을 알 수 있었다. 첨가된 PVP는 친수성 고분자로서 방출시험액에 의해 신속히 용해되며 이는 약물이 방출될 수 있는 채널을 빨리 형성하고 미세채널을 통해 매트릭스 내부로 침투하는 물의 양을 증가시켜 PLGA의 분해를 촉진시키고, 궁극적으로 약물의 방출속도가 증가하여 약물 방출기간이 단축되었다고 사료된다. 웨이퍼의 모양을 변형시키지 않은 채 방출속도를 증가시킬 수 있는 방법은 웨이퍼에 미세채널을 형성시켜 방출속도를 증가시키는 것이다.

Figure 6은 BCNU의 함량에 따른 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼 웨이퍼의 약물 방출거동을 나타낸 그림이다. 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼는 초기 약간의 burst를 보이고 이후 거의 영차에 가까운 방출 경향을 보이며 총 방출기간은 약 3일 정도였다 (Table 1, batch 9, 10, 11 및 12). 염화나트륨이 첨가된 웨이퍼의 방출 경향은 PVP가 첨가된 웨이퍼보다 방출속도가 더 빠르고 따라서 방출기간도 다른 웨이퍼에 비해 더 짧았다. 염화나트륨은 PVP보다 물에 대한 용해속도가 더 빠르고 약물에 영향을 미치지 않는 것으로 판단하였다. 염화나트륨을 함유하고 있는 웨이퍼에 물이 접촉되면 염화나트륨의 경우 쉽게 물에 용해되어 PBS내로 방출된다. 이후 물은 웨이퍼 안으로 확산되고, 따라서 약물은 확산에 의한 방출이 이루어진다. 위의 결과를 통해 첨가제의 선택과 이의 함유량을 조절함으로써 BCNU/PLGA 웨이퍼에서 약물의 방출을 원하는 형태로 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다.⁴⁵⁻⁴⁹

세포독성 실험. Figure 7은 세포독성 실험 3일에서의 약물 함유량이 다른 각각의 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 방출된 BCNU의 9L gliosarcoma 세포에 대한 세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림이다. BCNU를 함유하지

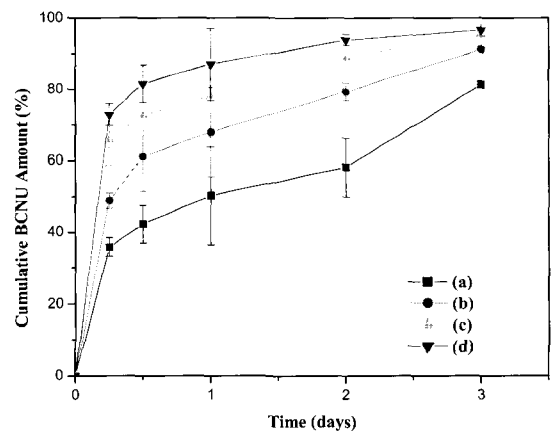


Figure 6. BCNU release profiles from PLGA wafers containing NaCl 40%. (a) 3.85, (b) 10, (c) 20, and (d) 30%.

않은 PLGA 웨이퍼는 세포 증식 억제 효과를 나타내지 않은 반면 BCNU/PLGA 웨이퍼를 첨가한 군은 모두 50% 이상의 세포 증식 억제 효과를 나타내었으며 특히, BCNU의 함량이 10% 이상인 웨이퍼는 3일 동안 지속적으로 96% 이상의 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. BCNU/PLGA 웨이퍼의 3일까지의 세포독성시험 결과 세포 증식 억제 효과가 유지되는 것으로부터 웨이퍼로부터 BCNU가 지속적으로 방출되어 세포의 생존과 증식에 영향을 주고 있음을 확인하였다. 이 결과는 배양액 안에서 3일 동안 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 방출되는 BCNU의 이론적 하루방출량 (Table 2)의 값과 일치하는 결과로 해석된다. BCNU의 초기 함유량이 높아질수록 세포수가 감소하

였음을 확인하였으며, 이는 약물 함유량이 높은 웨이퍼를 처리한 군일수록 처리한 웨이퍼로부터 지속적으로 고농도의 BCNU가 일정하게 방출되어 세포 증식을 억제 시킨 것으로 사료된다.

Figure 8은 세포독성 실험 3일에서의 약물 함유량에 따른 PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 방출된 BCNU의 9L gliosarcoma 세포에 대한 세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림이다. 첨가제를 함유하고 있지 않은 웨이퍼의 세포독성 실험과 거의 일치하는 결과로 BCNU의 함량이 10% 이상인 웨이퍼는 3일 동안 지속적으로 97% 이상의 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 반면에 BCNU의 함량이 3.85%인 웨이퍼의 경우, 첨가제를 함유하고 있지 않은 웨이퍼는 62%의 세포 증식 억제 효과를 보인 반면 PVP 40% 첨가된 웨이퍼는 93.6%의 높은 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. 이 결과는 배양액 안에서 3일 동안 첨가제를 함유하고 있지 않은 또는 PVP 40% 첨가된 BCNU 3.85% 함유 PLGA 웨이퍼로부터 방출되는 BCNU의 이론적 하루방출량 (Table 2)의 값과 일치하는 결과로 해석된다. 이는 PVP 40% 첨가된 웨이퍼로부터 지속적으로 고농도의 BCNU가 일정하게 방출되어 세포증식을 더 많이 억제시킨 것으로 사료된다.

Figure 9는 세포독성 실험 3일에서의 약물 함유량에 따른 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼로부터 방출된 BCNU의 9L gliosarcoma 세포에 대한 세포 증식 억제 효과를 나타낸 그림이다. 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 첨가한 군은 모두 3일 동안 지속적으로 96.3% 이상의 세포 증식 억제 효과를 나타내었다. PVP 40% 함유 또는 염화나트륨 40% 함유 BCNU 3.85%/PLGA 웨이퍼로부터 방출되는 BCNU의 이론적 하루방출량 (Table 2)의 값을 비교해 보면, Table 2에서 보여주는 것

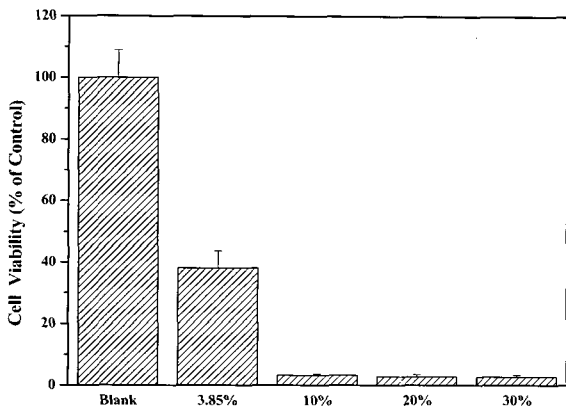


Figure 7. Cytotoxicity of BCNU-loaded PLGA wafers against 9L gliosarcoma cells during 3 days.

Table 2. Daily Released Amount (Theoretical) of BCNU from BCNU- loaded PLGA Wafer Containing Additives Treated in Medium

No.	PLGA (g/mole)	initial BCNU loading (%)	additives	daily released amount during 3 days (µg/mL) (theoretical)	cell viability (%)
					3 days
a	8000	-	-	-	99.9
b	8000	3.85	-	80	38.0
c	8000	10	-	286	3.20
d	8000	20	-	601	2.74
e	8000	30	-	982	2.60
f	8000	3.85	PVP 40%	103	6.4
g	8000	10	PVP 40%	295	2.9
h	8000	20	PVP 40%	613	2.79
i	8000	30	PVP 40%	970	2.65
j	8000	3.85	NaCl 40%	104	3.7
k	8000	10	NaCl 40%	303	2.86
l	8000	20	NaCl 40%	635	2.78
m	8000	30	NaCl 40%	966	2.7

* see Figures 4 and 9.

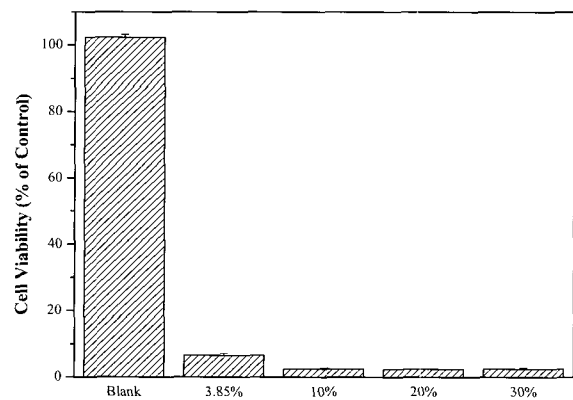


Figure 8. Cytotoxicity of BCNU-loaded PLGA wafers containing PVP 40% against 9L gliosarcoma cells during 3 days.

처럼 이론적인 하루방출량은 각각 103과 104 $\mu\text{g/mL}$ 로 거의 같았다. 이와 비교하여 3일 동안의 세포 생존율은 각각 6.4%와 3.7%였다. 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 첨가한 군의 세포수가 감소하였음을 확인하였으며, 이는 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼가 PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼보

다 세포 증식 억제 효과가 뛰어남을 보여주는 것이다.

Figure 10은 BCNU 3.85%/PLGA 웨이퍼군과 약물을 함유하지 않은 PLGA 웨이퍼군 (blank)에 대한 9L gliosarcoma 세포를 관찰한 결과이다. BCNU/PLGA 웨이퍼를 세포에 처리하고 3일이 경과한 세포의 수를 blank와 비교한 결과 모두 blank보다 세포수가 적었다. 특히 첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 처리한 군의 경우, 같은 기간 동안 고농도의 BCNU가 지속적으로 충분히 방출되기 때문에 배양액 안에서 대부분의 세포증식 억제 효과는 약물의 방출량에 의존하여 첨가제가 없는 웨이퍼군보다 세포 증식 억제 효과가 뛰어남을 알 수 있었다. 또한, PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 처리한 군과 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 처리한 군의 세포 수를 관찰한 결과 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 처리한 군의 세포수는 PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼를 처리한 군보다 적었다. 이는 염화나트륨 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼가 PVP 40% 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼보다 세포 증식 억제 효과가 뛰어남을 보여주는 것이다.

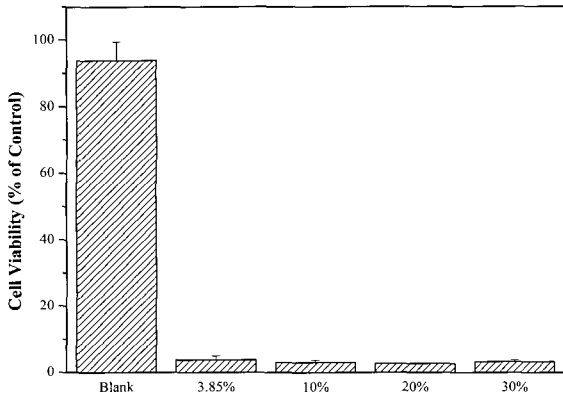
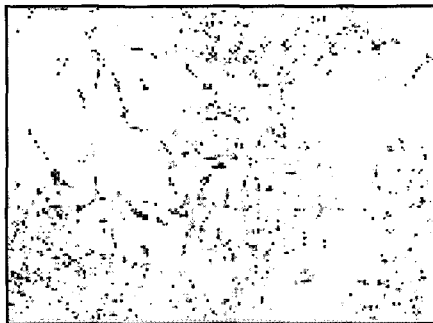
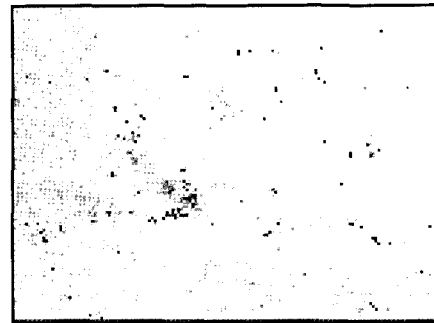


Figure 9. Cytotoxicity of BCNU-loaded PLGA wafers containing NaCl 40% against 9L gliosarcoma cells during 3 days.

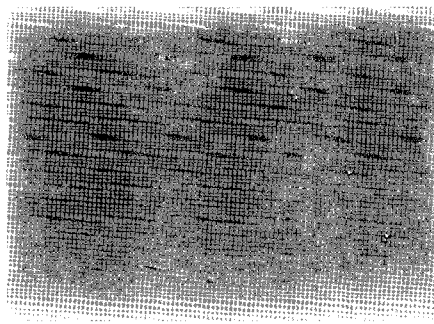
4. 결론



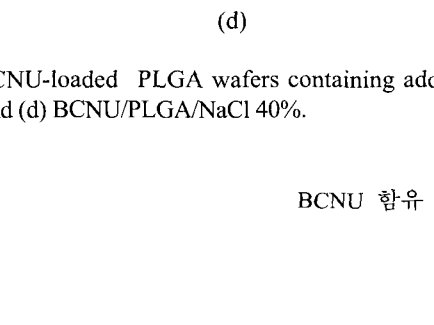
(a)



(b)



(c)



(d)

Figure 10. Cell morphology of 9L gliosarcoma treated 3.85% BCNU-loaded PLGA wafers containing additives during 3 days; (a) PLGA (blank), (b) BCNU/PLGA, (c) BCNU/PLGA/PVP 40%, and (d) BCNU/PLGA/NaCl 40%.

본 연구에서는 첨가제를 사용하여 뇌종양 치료용 항암제인 BCNU를 3일 이내에 방출할 수 있는 생분해성 이식형 제제를 개발하고 생체의 방출 경향과 종양세포에 대한 항암 활성을 조사하였다.

1) 첨가제를 사용하여 균일하게 혼합된 미분말을 웨이퍼로 성형하고, 생체의 방출거동을 살펴본 결과 첨가제를 함유하지 않은 웨이퍼보다 더욱 빠른 방출속도와 방출기간을 보였다.

2) 염화나트륨 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼의 방출 경향은 PVP 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼보다 방출속도가 더 빠르고 따라서 방출기간도 BCNU/PLGA 웨이퍼에 비해 더 짧았다.

3) 종양세포를 이용한 세포독성 실험 결과 BCNU를 함유하지 않은 웨이퍼는 세포의 증식을 억제하지 못한 반면 첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼는 약물 방출기간 동안 지속적으로 세포의 증식을 억제하였다.

4) BCNU의 함량이 3.85%인 웨이퍼의 경우, 첨가제를 함유하고 있지 않은 BCNU/PLGA 웨이퍼보다 첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼가 더 높은 종양세포 증식 억제 효과를 나타내었고, 이는 충분한 양의 약물이 웨이퍼로부터 단기간 지속적으로 방출되어 약물의 처리기간 동안 세포증식을 효과적으로 억제하였다.

5) 염화나트륨 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼가 PVP 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼보다 세포 증식 억제 효과가 뛰어난 것을 보였다.

첨가제 함유 BCNU/PLGA 웨이퍼는 동물실험 및 임상에 적용할 수 있는 가능성을 보여준다. 현재 이 결과를 바탕으로 9L gliosarcoma 종양동물 모델을 이용한 *in vivo* 항암 활성에 관한 연구를 수행중이다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부의 중기거점 사업(B49-990-5411-05-1-3)에 의해 지원되었으며 이에 감사드립니다.

References

- D. S. Moon, G. Khang, H. S. Seong, J. M. Rhee, J. S. Lee, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**, 107 (2000).
- P. L. Kornblith and M. Walker, *J. Neurosurg.*, **68**, 1 (1998).
- P. Paoletti, *J. Neurosurg. Sci.*, **28**, 51 (1984).
- M. Chasin, G. Hollenbeck, H. Brem, S. Grossman, M. Colvin, and R. Langer, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **16**, 2579 (1990).
- C. S. Reinhard, M. L. Radomsky, W. M. Saltzman, J. Hilton, and H. Brem, *J. Control. Rel.*, **16**, 331 (1991).
- P. L. Kornblith and M. Walker, *J. Neurosurg.*, **68**, 1 (1998).
- M. B. Yang, R. J. Tarmargo, and H. Brem, *Cancer Res.*, **49**, 5103 (1989).
- W. Dang, T. Daviau, P. Ying, Y. Zhao, D. Nowotnik, C. S. Clow, B. Tyler, and H. Brem, *J. Control. Rel.*, **42**, 83 (1996).
- P. Sampath and H. Brem, *Cancer Control*, **5**, 130 (1998).
- J. C. Cho, G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **24**(5), 728 (2000).
- G. Khang, H. S. Choi, J. M. Rhee, S. C. Yoon, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **8**(6), 253 (2000).
- W. I. Son, D. I. Yun, G. Khang, B. S. Kim, and H. B. Lee, *Biomater. Res.*, **4**(3), 92 (2000).
- H. Brem, S. Piantadosi, P. Burger, M. Walker, R. Selker, N. Vick, K. Black, M. Sisti, S. Brem, G. Mohr, P. Muller, R. Morawetz, and S. Schold, *Lancet*, **345**, 1008 (1995).
- E. P. Sipos, B. Tyler, S. Piantadosi, P. C. Burger, and H. Brem, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **39**, 383 (1997).
- H. S. Choi, S. W. Kim, D. I. Yun, G. Khang, J. M. Rhee, Y. S. Kim, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 334 (2001).
- S. A. Seo, H. S. Choi, D. H. Lee, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **25**, 884 (2001).
- S. A. Seo, H. S. Choi, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Int. J. Pharm.*, **239**(1-2), 93 (2002).
- H. H. Engelhard, *Surg. Neurol.*, **53**, 458 (2000).
- T. K. An, H. J. Kang, D. S. Moon, J. S. Lee, H. S. Seong, J. K. Jeong, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 670 (2002).
- H. J. Kim, I. S. Park, and H. J. Lim, *Korean J. Otolaryngol.*, **41**, 307 (1998).
- G. Khang and H. B. Lee, "Cell-synthetic Surface Interaction: Physicochemical Surface Modification, Section II. Methods for Cell Delivery Vehicles", in *Methods of Tissue Engineering*, A. Atala and R. Lanza, Editors, Academic Press, Vol **67**, p 771 (2001).
- G. Khang, I. Jo, J. H. Lee, I. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**(5), 640 (1999).
- G. Khang, J. H. Lee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **10**(6), 732 (1999).
- T. L. Loo, R. L. Dixon, R. L. Dixon, and D. P. Rall, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 492 (1966).
- H. S. Seong, D. S. Moon, G. Khang, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **14**(3), 95 (2001).
- H. S. Seong, D. S. Moon, G. Khang, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 128 (2002).
- T. K. An, H. J. Kang, J. S. Lee, H. S. Seong, J. K. Jeong, G. Khang, Y. K. Hong, and H. B. Lee, *Polymer(Korea)*, **26**, 691 (2002).
- T. K. An, J. S. Lee, S. H. Cho, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Macromol. Chem. Symp.*, **15**(4), 339 (2002).
- X. S. Wu, "Synthesis and Properties of Biodegradable Lactic/Glycolic Acid Polymers", *Encyclopedic Handbook of*

- Biomaterials and Bioengineering*, Wise et al., Editors, Marcel Dekker, New York, p 1015 (1995).
30. D. F. Emerich, S. R. Winn, Y. Hu, J. Marsh, P. Snodgrass, D. LaFreniere, T. Wiens, B. P. Hasler, and R. T. Bartus, *Pharm. Res.*, **17**, 767 (2000).
 31. G. Khang, J. C. Cho, J. W. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Bio-Med. Mater. Eng.*, **9**, 49 (1999).
 32. H. B. Lee, G. Khang, J. C. Cho, J. M. Rhee, and J. S. Lee, *Polymer Preprints*, **40**, 288 (1999).
 33. G. Khang, J. H. Lee, J. W. Lee, J. C. Cho, and H. B. Lee, *Korea Polymer J.*, **8**(2), 80 (2000).
 34. H. S. Choi, G. Khang, H. Shin, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Int. J. Pharm.*, **234**, 195 (2002).
 35. S. A. Seo, H. S. Choi, G. Khang, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Macromol. Res.*, **10**, 246 (2002).
 36. S. J. Lee, G. Khang, Y. M. Lee, and H. B. Lee, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **13**, 197 (2002).
 37. G. Khang, I. Lee, J. M. Rhee, and H. B. Lee, *Polymer Sci. Tech.*, **12**, 527 (2001)
 38. M. Iwata and H. Ueda, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **22**, 1161 (1996).
 39. W. G. Lu, Y. Zhang, Q. M. Xiong, Y. C. Bao, and Q. H. Chen, *Chin. Pharm. J.*, **30**, 24 (1995).
 40. K. P. Chowdary and K. V. Ramesh, *Indian Drugs*, **32**, 477 (1995).
 41. P. Skehan, R. Stern, D. Scudiero, A. Monks, J. McMahon, D. Vistica, J. T. Warren, H. Bikesch, S. Denney, and M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1107 (1990).
 42. T. L. Loo, R. L. Dion, R. L. Dixon, and D. P. Rall, *J. Pharm. Sci.*, **55**, 492 (1966).
 43. K. Fredrikson and P. Lundgren, *Acta Pharm. Scand.*, **23**, 115 (1986).
 44. S. Leigh, J. E. Carless, and B. W. Burt, *J. Pharm. Sci.*, **56**, 888 (1967).
 45. I. S. Moussa and L. H. Cartilier, *Int. J. Pharm.*, **149**, 139 (1997).
 46. P. Shivanand and O. L. Sprockel, *Int. J. Pharm.*, **158**, 83 (1997).
 47. S. Trikkonen and P. Paronen, *Int. J. Pharm.*, **88**, 39 (1992).
 48. S. Trikkonen and P. Paronen, *Int. J. Pharm.*, **92**, 55 (1993).
 49. C. McDonald and C. Richardson, *J. Pharmacol.*, **33**, 38 (1981).