

파클리탁셀을 함유한 지질나노입자의 제조와 인공 소화액에서의 안정성 평가

김은혜^{1,2} · 이정은¹ · 임덕휘¹ · 정석현¹ · 성하수¹ · 박은석² · 신병철^{1†}

¹한국화학연구원 신약기반기술연구센터, ²성균관대학교 약학대학
(2008년 4월 8일 접수 · 2008년 4월 15일 승인)

Preparation of Lipid Nanoparticles Containing Paclitaxel and their *in vitro* Gastrointestinal Stability

Eun Hye Kim^{1,2}, Jung Eun Lee¹, Deok Hwi Lim¹, Suk Hyun Jung¹, Hasoo Seong¹, Eun Seok Park² and Byung Cheol Shin^{1†}

¹Center for Drug Discovery Technology, Korea Research Institute of Chemical Technology,
100 Jang Dong, Yuseong, Deajeon 305-343, Korea

²College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-476, Korea

(Received April 8, 2008 · Accepted April 15, 2008)

ABSTRACT – Peroral administration is the most convenient one for the administration of pharmaceutically active compounds. Most of poorly water-soluble drugs administered via the oral route, however, remain poorly available due to their precipitation in the gastrointestinal (GI) tract and low permeability through intestinal mucosa. In this study, one of drug delivery carriers, lipid nanoparticles (LNPs) were designed in order to reduce side effects and improve solubility and stability in GI tract of the poorly water soluble drugs. However, plain LNPs are generally unstable in the GI tract and susceptible to the action of acids, bile salts and enzymes. Accordingly, the surface of LNPs was modified with polyethylene glycol (PEG) for the purpose of improving solubility and GI stability of paclitaxel (PTX) *in vitro*. PEG-modified LNPs containing PTX was prepared by spontaneous emulsification and solvent evaporation (SESE) method and characterized for mean particle diameter, entrapping efficiency, zeta potential value and *in vitro* GI stability. Mean particle diameter and zeta potential value of PEG-modified LNP containing PTX showed approximately 86.9 nm and -22.9 mV, respectively. PTX entrapping efficiency was about 70.5% determined by UV/VIS spectrophotometer. Furthermore, change of particle diameter of PTX-loaded PEG-LNPs in simulated GI fluids and bile fluid was evaluated as a criteria of GI stability. Particle diameter of PTX-loaded PEG-LNPs were preserved under 200 nm for 6 hrs in simulated GI fluids and bile fluid at 37°C when DSPE-mPEG2000 was added to formulation of LNPs above 4 mole ratio. As a result, PEG-modified LNPs improved stability of plain LNPs that would aggregate in simulated GI fluids and bile solution. These results indicate that LNPs modified with biocompatible and nontoxic polymer such as PEG might be useful for enhancement of GI stability of poorly water-soluble drugs and they might affect PTX absorption affirmatively in gastrointestinal mucosa.

Key words – Oral administration, Lipid nanoparticles, Paclitaxel, Stability, Polyethylene glycol

난용성 약물의 가용화, 생체 내에서의 약물의 불안정성, 약물의 부작용 그리고 약물의 낮은 체내흡수율 등의 문제를 해결하기 위한 많은 연구가 진행되면서, 기존 의약품의 부작용을 최소화하고, 필요한 양의 약물을 효율적으로 전달할 수 있도록 설계된 약물전달시스템(drug delivery system)에 대한 관심이 높아지고 있다. 그 중에서 지질나노입자는 상온에서 지질을 약물과 혼합하여 균일한 상으로 제조하고, 이를 수용액에 분산시켜 약물이 지질 결정사이에 고체 용액상으로 존재하게 하는 구조체를 말한다.^{1,2)} 지질나노입자는 기존의 약물 전달체에 비해 난용성 약물의 높은 봉입효율을 가지며,

경구투여 시 위장관에서 석출 및 장관막 투과가 어려운 생리활성물질의 흡수를 증대시키며, 체내에서 대사 및 대식세포에 의해 급속히 소실되는 생리활성물질의 혈중 체류성을 증대시키는 장점이 있다.^{3,4)} 그러나, 지질나노입자는 중성의 pH에서는 안정하지만 중양 세포내에서의 산성 조건이나 위장액 그리고 담즙액과 같은 소화액에 노출되면 지질 구조체가 불안정해져 약물이 신속히 방출되는 단점을 가지고 있다. 약물이 흡수되기 전 지질 구조체의 분해에 의한 약물의 소실과 짧은 위장관 체류시간 등을 개선하기 위하여 키토산, 폴루란 그리고 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등과 같은 고분자를 지질나노입자의 표면에 코팅하여 약물의 독성을 줄이고 입자의 안정성을 증가시키는 연구가 시도되고 있다.⁵⁻⁷⁾

소화액내에서의 안정성이 증가된 지질나노입자를 제조하

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7223, E-mail : bcshin@pado.kRICT.re.kr

기 위한 모델약물로서 파클리탁셀을 사용하였다. 파클리탁셀은 악성종양의 증식을 억제하는 물질로서 특히 난소암, 유방암, 폐암 그리고 위암 등에 대한 항암작용을 가지고 있는 대표적인 난용성 약물이다. 파클리탁셀은 간기능 장애, 탈모, 골수억제 및 근육통과 같은 독성을 가지고 있어 투여 용법과 용량에 많은 제약이 따른다.⁸⁻¹⁰⁾ 또한, 파클리탁셀의 경구 투여 시 소장과 대장 점막에 풍부하게 존재하는 p-glycoprotein과의 높은 친화력 때문에 약물의 소장막 투과가 억제되며, 대부분의 약물이 간에 있는 cytochrome P450 효소에 의해 대사되어 빠르게 소실되기 때문에 생체이용률이 1% 미만인 약물로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구에서는 난용성 약물을 가용화시키고, 소화액내에서의 약물의 안정성을 향상시키기 위하여 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지질 그리고 인지질-PEG 복합체로 구성된 지질나노입자를 자발 유화 용매확산법(self emulsification and solvent evaporation)으로 제조하였다.^{1,2)} 지질나노입자를 구성하는 이온성 지질의 종류와 함량에 따른 입자크기, 표면전하 그리고 봉입효율 등과 같은 물리적 특성을 고찰하였으며, 또한 콜레스테롤, 인지질-PEG 복합체 그리고 PTX의 함량에 따른 물리적 특성과 인공 소화액에서의 입자 안정성을 평가하였다.

실험 방법

시약

지질나노입자 제조를 위해 사용된 지질인 L- α -phosphatidylcholine (Soyhydrogenated) (HSPC), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-rac-(1-glycerol)] (DSPG), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-[phospho-L-serine] (DPPS), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphate (DPPA), 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (Polyethyleneglycol)-2000] (DSPE-mPEG2000) 그리고 cholesterol (CHOL)은 Avanti Polar Lipids사(Alabaster, AL, USA)에서 구입하였다. 모델약물로는 파클리탁셀(Genexol, Lot. G191)을 삼양제넥스(Daejeon, South Korea)로부터 구입하였고, 인공 담즙액 제조에 필요한 bile extract porcine은 Sigma Aldrich사(Louis, MO, USA)로부터 구매하였으며, 그 밖에 실험에 사용한 클로르포름과 메탄올 등은 일급 및 특급시약을 그대로 사용하였다.

기기

지질나노입자 제조에는 고강도 초음파 발생기(Ultrasonicator, 500, Fisher scientific, USA), 회전응축증발기

(Buchi Rotavapor R-200, Switzerland)와 진공펌프(YEFO-KRPM, Hitachi, Japan)를 사용하였다. 제조된 지질나노입자의 크기와 표면전하 측정은 전기영동 광산란 측정기 및 제타전위 측정기(ELS-Z, OTUSKA Electronics Co., Japan)를 사용하여 측정하였으며, 지질나노입자 내의 약물 봉입효율은 자외선-가시광선 분광광도계(UV mini 1240, Shimadzu Scientific Inc., Japan)를 사용하여 측정하였다. 37°C의 인공 위장액과 인공 담즙액내에서 지질나노입자의 안정성 평가 시 자석식 교반기(Multipoint HP15, Variomag, Germany)와 진탕배양기(SI-600R, JEIO TECH, Korea)를 사용하였다.

지질나노입자의 제조 및 약물봉입

파클리탁셀이 봉입된 지질나노입자는 다음과 같은 과정으로 자발 유화 용매확산법을 이용하여 제조하였다. 인지질, 콜레스테롤 그리고 음이온성 지질을 이용하여 각각의 함량을 변화시켜 지질나노입자를 제조하였다. 또한, 소화액내에서의 입자의 안정성을 증가시키기 위하여 인지질-PEG 복합체를 이용하여 지질나노입자의 표면을 개질하였다. 먼저 파클리탁셀 10 mg을 7 mL의 메탄올에 용해시켜 파클리탁셀 용액을 제조하고 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지질 그리고 인지질-PEG 복합체를 3 mL의 클로르포름에 용해시킨 용액과 혼합하였다. 지질-약물 혼합액을 증류수에 균질하게 분산시키기 위하여 고강도 초음파 발생기를 사용해 20 mL의 3차 증류수에 지질-약물 혼합액을 26계이지 주사기를 이용하여 5 mL/min의 속도로 가하면서 초음파를 조사하여 분산시켰다. 이때 용액의 온도는 ice bath를 이용하여 10°C 이하가 되도록 유지하였다. 고강도 초음파 발생기의 출력조건은 50 W로 1분간 용액을 초음파 처리한 후 30초간 약물을 방치하는 작업을 5회 반복하였다. 이렇게 제조된 30 mL의 분산용액을 회전 응축 증발기를 이용하여 유기용매를 제거하였고, 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 용액의 부피가 10 mL가 될 때까지 증발, 농축하여 파클리탁셀이 봉입된 지질나노입자 수용액을 제조하였다. 상기 제조된 지질나노입자 수용액은 0.2 μ m의 공극을 갖는 주사기용 필터(syringe filter, ADVANTEC, Japan)로 여과하여 지질나노입자 형성에 참여하지 못한 지질, 콜레스테롤 및 파클리탁셀을 제거하였다.

지질나노입자의 입자 크기와 표면전하 측정

제조한 지질나노입자의 크기는 전기영동 광산란 측정기를 사용하여 측정 하였으며, 지질나노입자의 표면전하는 제타전위 측정기를 사용하여 측정하였다. 입자의 크기는 제조한 지질나노입자 용액 0.2 mL를 3차 증류수로 10배 희석하여 전기영동 광산란 측정기에서 측정하였으며, 측정온도는 25°C

Table I—Physical Properties of Paclitaxel-loaded Lipid Nanoparticles Prepared with Different Kind of Anionic Lipids

¹⁾ Anionic lipid	Mean particle diameter (nm)	Entrapping efficiency (%)	Zeta potential (mV)
DSPG	99.0±8.0	63.0±3.7	-21.9±5.0
DPPS	96.1±4.1	66.6±2.1	-32.4±1.9
DPPA	67.0±4.7	72.4±3.2	-64.0±0.8

¹⁾Mole ratio of HSPC:CHOL:anionic lipid for lipid nanoparticles was set to 7:3:5. Amount of paclitaxel was 10 mg. All data were expressed as a mean±S.D. (n=3).

를 유지하였다. 표면전하는 지질나노입자 용액 2.5 mL를 분취한 후 25°C, pH 7에서 측정하였다.

지질나노입자에 함유된 파클리탁셀의 봉입효율 측정

지질나노입자에 봉입된 파클리탁셀의 봉입효율은 자외선-가시광선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 먼저 일정량의 파클리탁셀을 클로르포름과 메탄올 혼합액(1:4, v/v)에 완전히 용해시킨 후 227 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였다. 지질나노입자에 봉입된 파클리탁셀의 봉입효율은 0.1 mL의 지질나노입자 용액을 분취하여 클로르포름과 메탄올 혼합용액에 20배 희석하여 용해시킨 후 227 nm의 UV 파장에서 흡광도를 측정하고, 미리 작성한 검량선과 비교하여 파클리탁셀의 농도를 환산하였다. 봉입효율은 다음 식(1)에 의하여 봉입효율을 계산하였다.

$$\text{약물봉입효율(\%)} = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad (1)$$

여기서 C_f는 파클리탁셀이 봉입된 지질나노입자를 용매에 완전히 용해시킨 후 측정된 파클리탁셀의 농도이며, C_i는 지질나노입자에 봉입하기 위해 초기에 첨가한 파클리탁셀의 농도이다.

인공 소화액에서의 안정성 평가

파클리탁셀이 봉입된 지질나노입자의 안정성을 조사하기 위하여 각각의 인공 위액(simulated gastric fluid, pH 1.2), 인공 장액(simulated intestinal fluid, pH 6.8) 그리고 인공 담즙액(simulated bile fluid, pH 6.3)에 지질나노입자용액을 1:1 (v/v)로 혼합하여 25°C와 37°C의 배양기내에서 6시간동안 교반하면서 입자의 크기변화를 전기영동 광산란 측정기를 이용하여 측정하였다.⁷⁾

결과 및 고찰

음이온성 지질의 종류와 함량에 따른 지질나노입자의 물리적 특성

지질나노입자 제조 시 인지질과 콜레스테롤만을 사용한

경우, 입자간의 반데르발스 인력에 의해 서로 회합하여 거대 입자가 형성되었다. 그러므로 지질나노입자 제조 시 입자간의 반발력을 유도하고자 여러 가지 음이온성 지질을 사용하여 지질나노입자를 제조하였다. 음이온성 지질의 종류에 따른 지질나노입자의 물리적 특성을 알아보기 위하여 인지질, 콜레스테롤 그리고 음이온성 지질의 몰 비율을 7:3:5로 일정하게 유지하고, 음이온성 지질의 종류를 변화시켜 제조한 지질나노입자의 물리적 특성을 Table I에 나타내었다. 지질나노입자의 제조에 사용된 음이온성 지질은 DSPG, DPPS 그리고 DPPA였으며, 그 화학구조를 Fig. 1에 나타내었다. 지질과 약물의 중량비는 각각 9.8:1, 10:1 그리고 9.8:1이었다. DSPG와 DPPS를 사용해 제조한 지질나노입자의 크기는 각각 99.0±8.0 nm와 96.1±4.1 nm였고, DPPA를 사용한 경우 67.0±4.7 nm로 지질나노입자 제조 시 음이온성 지질로 DPPA가 함유 되었을 때 가장 작은 지질나노입자가 제조되었다. 이는 친수성 head group의 인산기 주변에 dihydroxy propyl기와 ammoniopropionate기를 가지고 있는 DSPG 그리고 DPPS와는 달리 DPPA는 인산기에 잔기가 없어 입자내

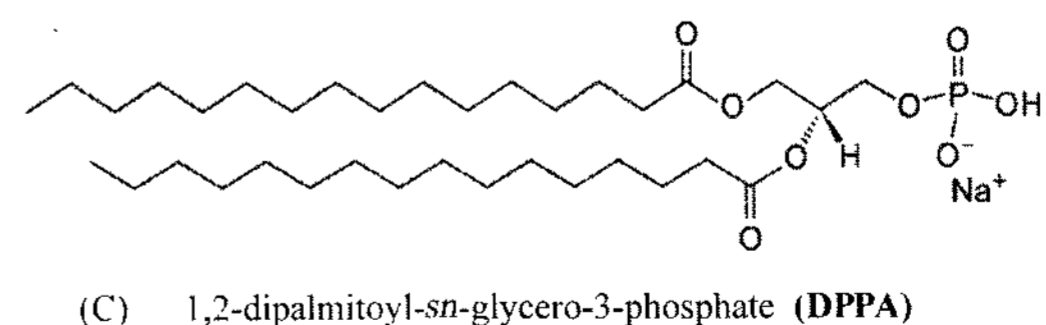
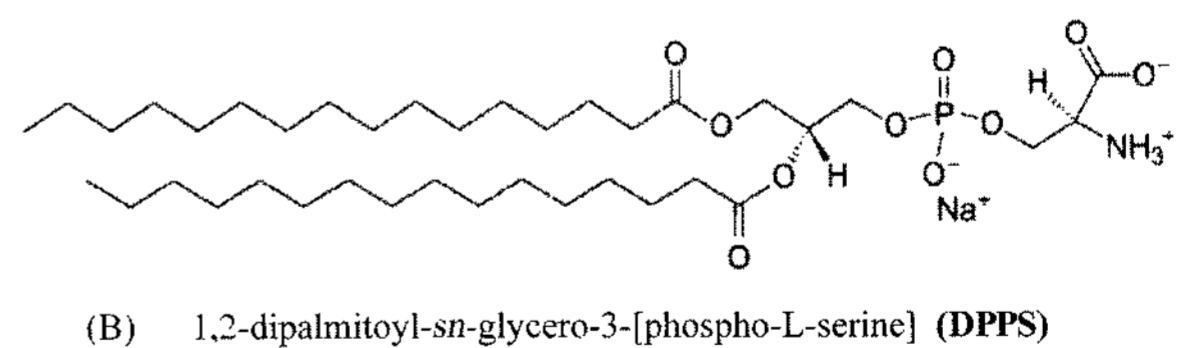
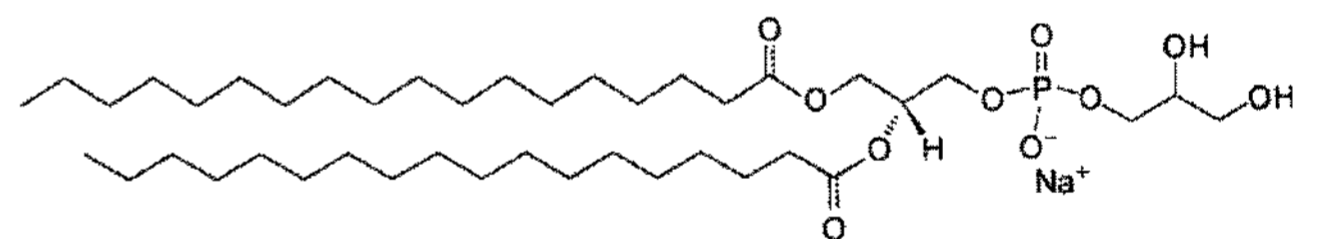


Figure 1—Chemical structure of various anionic lipids; (A) DSPG, (B) DPPS, (C) DPPA.

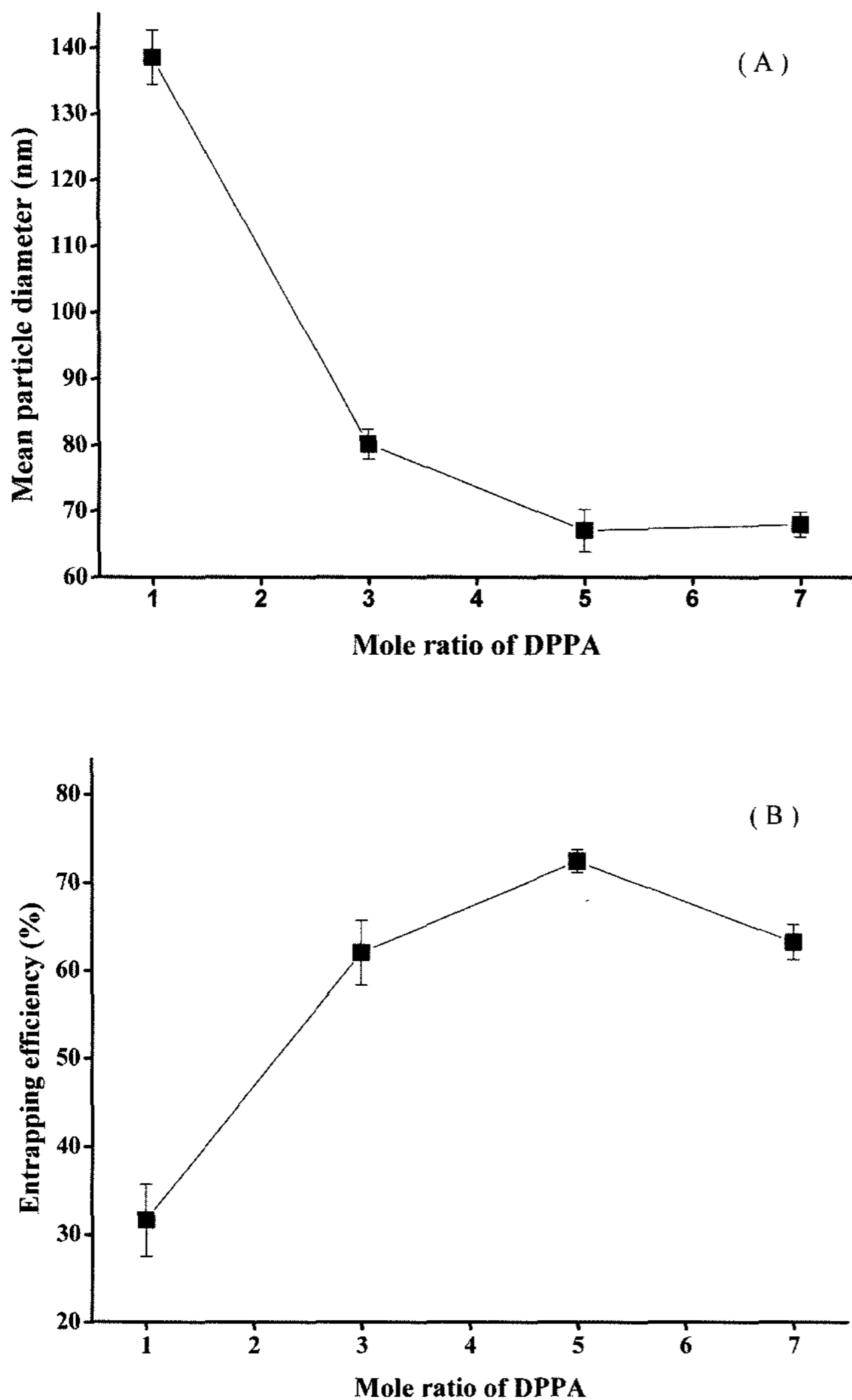


Figure 2—Physical properties of lipid nanoparticles (A) Mean particle diameter according to mole ratio of DPPA. (B) Entrapping efficiency of lipid nanoparticles according to mole ratio of DPPA. Mole ratio of HSPC:CHOL was set to 7:3. amount of paclitaxel was 10 mg, respectively. All data were expressed as a mean±S.D. (n=3).

음이온성 지질 head group의 비공유 전자쌍간의 반발력이 더 적기 때문에 더 작은 입자가 형성된 것으로 사료된다. 제조된 지질나노입자의 파클리탁셀 봉입효율은 DPPA를 사용한 경우 72%로 가장 높았다. 또한 지질나노입자의 표면전하는 DSPG를 사용한 경우 -21.9 ± 5.0 mV, DPPS는 -32.4 ± 1.9 mV 그리고 DPPA는 -64.0 ± 0.8 mV로서 지질나노입자의 이온 강도가 가장 큰 DPPA가 함유될 때 가장 작은 입자가 형성되었다.

음이온성 지질의 함량에 따른 지질나노입자의 물리적 특성을 알아보기 위하여 세 가지 음이온성 지질 중 가장 작은 입자를 형성한 DPPA를 이용하여 지질나노입자를 제조하였

다. 인지질과 콜레스테롤의 몰 비율을 7:3으로 일정하게 유지하고, DPPA의 함량을 0, 1, 3, 5 그리고 7몰 비율로 변화시켜 제조한 지질나노입자의 크기와 파클리탁셀의 봉입효율을 Fig. 2에 나타내었다. DPPA의 함량이 1, 3, 5 그리고 7몰 비율일 때 각각 138.5 ± 4.1 , 80.1 ± 0.3 , 67.0 ± 3.2 그리고 67.9 ± 0.9 nm로 DPPA의 함량이 증가할수록 지질나노입자의 크기가 감소하다가 일정비율 이상으로 첨가될 때 입자의 크기가 일정해 지는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 음이온성 지질인 DPPA의 함량이 증가할수록 입자간의 전기적 반발력이 커져 지질나노입자간의 응집이나 회합하는 현상이 억제되었으나 일정비율부터는 전기적 반발력을 증가시키지 못하여 입자의 크기에 영향을 주지 않는 것으로 보여 진다.^{8,14)} 한편, DPPA를 함유하지 않은 비이온성 지질로만 이루어진 지질나노입자의 경우 반데르발스 인력에 의해 회합하여 수십 마이크로미터 크기를 갖는 거대입자를 형성하여 침전된 것으로 사료된다.¹⁵⁾ 지질나노입자의 봉입효율은 DPPA의 함량이 증가함에 따라 비례적으로 증가하다가 5몰 비율 이상으로 함유될 때 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이처럼 음이온성 지질이 일정농도 이상으로 첨가되었을 때 오히려 지질나노입자의 약물봉입효율이 감소하는 것은 음이온성 지질이 인지질 및 콜레스테롤과 파클리탁셀 간의 소수성 인력을 저해하였기 때문이라 생각된다.¹⁶⁾

PEG로 개질된 지질나노입자의 물리적 특성과 안정성 평가

지질나노입자의 소화관내 안정성에 관한 예비시험 결과 인지질과 콜레스테롤만으로 구성된 지질나노입자는 인공 위액(SGF; Simulated Gastric Fluid), 인공 장액(SIF; Simulated Intestinal Fluid) 및 인공 담즙액(SBF; Simulated Bile Fluid) 내에서 불안정하였다. 이는 SGF, SIF 및 SBF내에 있는 염과 산의 이온흡착에 의해 지질구조체가 분해되거나 서로 응집하여 침전되었기 때문이라 사료된다. SGF, SIF 및 SBF내에서의 지질나노입자의 안정성을 증가시키기 위하여 친수성 고분자로서 산, 염기 및 단백질의 흡착을 억제하는 특성을 갖는 PEG를 이용하여 지질나노입자의 표면을 개질하였다. 인지질, 콜레스테롤 그리고 음이온성 지질의 몰 비율을 7:3:5로 고정 한 후 DSPE-mPEG2000의 몰 비율을 1, 2, 3, 4 그리고 5로 변화시켜 제조한 지질나노입자의 물리적 특성을 Table II에 나타내었다. DSPE-mPEG2000의 함량이 증가할수록 67.0 ± 2.8 nm, 70.2 ± 4.3 nm, 76.0 ± 2.0 nm, 82.5 ± 1.1 nm 그리고 98.4 ± 6.7 nm로 지질나노입자의 평균 입자 크기도 증가하였으며, 지질나노입자의 파클리탁셀 봉입효율도 비례적으로 증가하였다. 이러한 현상은 지질나노입자 형

Table II—Physical Properties of Paclitaxel-loaded Lipid Nanoparticles Prepared with Different Mole Ratio of DSPE-mPEG2000

¹⁾ Mole ratio of DSPE-mPEG2000	Mean particle diameter (nm)	Entrapping efficiency (%)	Zeta potential (mV)
0	67.0±4.7	72.4±3.2	-64.0±0.8
1	68.3±2.8	35.0±2.4	-28.0±1.2
2	70.2±4.3	52.0±1.3	-25.2±1.5
3	76.0±2.0	64.2±3.6	-23.1±0.9
4	82.5±1.1	66.5±2.1	-21.6±1.7
5	98.4±6.7	70.7±2.8	-18.7±1.1

¹⁾Mole ratio of HSPC:CHOL:DPPA for lipid nanoparticles was set to 7:3:5. Amount of paclitaxel was 3 mg. All data were expressed as a mean±S.D. (n=3).

Table III—Physical Properties of Paclitaxel-loaded PEG-lipid Nanoparticles Prepared with Different Mole Ratio of CHOL

¹⁾ Mole ratio of CHOL	Mean particle diameter (nm)	Entrapping efficiency (%)	Zeta potential (mV)
1	62.4±0.8	19.7±1.3	-20.3±0.6
3	82.5±1.1	38.7±1.3	-21.6±1.7
5	86.9±6.8	70.5±3.1	-22.9±1.2
7	105.3±4.6	49.2±2.4	-23.4±0.8

¹⁾Mole ratio of HSPC:DPPA:DSPE-mPEG2000 was set to 7:5:4. Amount of paclitaxel was 3 mg. All data were expressed as a mean±S.D.(n=3).

성 시 DSPE-mPEG2000의 인지질 부분인 DSPE의 함량이 증가되면서 난용성 약물이 봉입되는 소수성 영역의 증가로 인해 약물의 봉입효율이 증가되었으며, 지질나노입자의 표면에 코팅된 PEG 함량의 증가와 입자 형성에 참여한 DSPE의 증가로 인하여 지질나노입자의 크기가 증가된 것으로 생각된다.¹⁴⁾ 상온(25°C) 조건의 SGF, SIF 및 SBF내에서 지질나노입자의 크기변화를 통한 안정성 평가 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 지질나노입자 제조 시 DSPE-mPEG2000을 첨가하지 않은 대조 지질나노입자는 SGF, SIF 및 SBF에 혼합됨과 동시에 침전이 생겼고, DSPE-mPEG2000을 3몰 비율 이하로 첨가한 지질나노입자는 1시간 후 입자의 크기가 급격히 증가하였으나, 4몰 비율 이상으로 첨가되었을 때는 6시간 이상 200 nm 이하의 입자크기를 유지하는 것을 관찰할 수 있었다. 이와 같이 PEG로 개질된 지질나노입자의 안정성이 대조 지질나노입자에 비해 현저히 증가한 이유는 PEG가 지질나노입자의 수용성 부분에 코팅되어 SGF, SIF 및 SBF내에 있는 염과 산의 이온흡착으로 발생 될 수 있는 입자의 불안정성과 입자간의 응집현상을 억제하기 때문으로 생각된다.^{7,17,18)} 한편, 6시간동안 37°C의 SGF, SIF 및 SBF내에서 안정성 평가를 실시한 결과 모든 제형의 평균 입자 크기가 마이크로미터 단위로 증가하여 지질나노입자를 구성하는 성분의 함량을 변화시킬 필요가 있음을 알게 되었다. 이처럼 상온보다 높은 온도에서 안정성이 떨어지는 이유는 온도가 증가함에 따라 염과 산 이온의 엔트로피가 증가하고 이로 인해 지질나노입자에 이온흡착이 증가하고, 입자가 불

안정해져 서로 응집, 회합한 것으로 사료된다.^{19,20)}

콜레스테롤의 함량에 따른 지질나노입자의 물리적 특성과 안정성 평가

체내에서 보다 안정한 제형을 제조하기 위해 지질나노입자를 구성하는 인지질의 소수성 부분에 포함되어 인지질 분자들 간의 소수성 인력을 강화하여 그 구조를 안정화하는 것

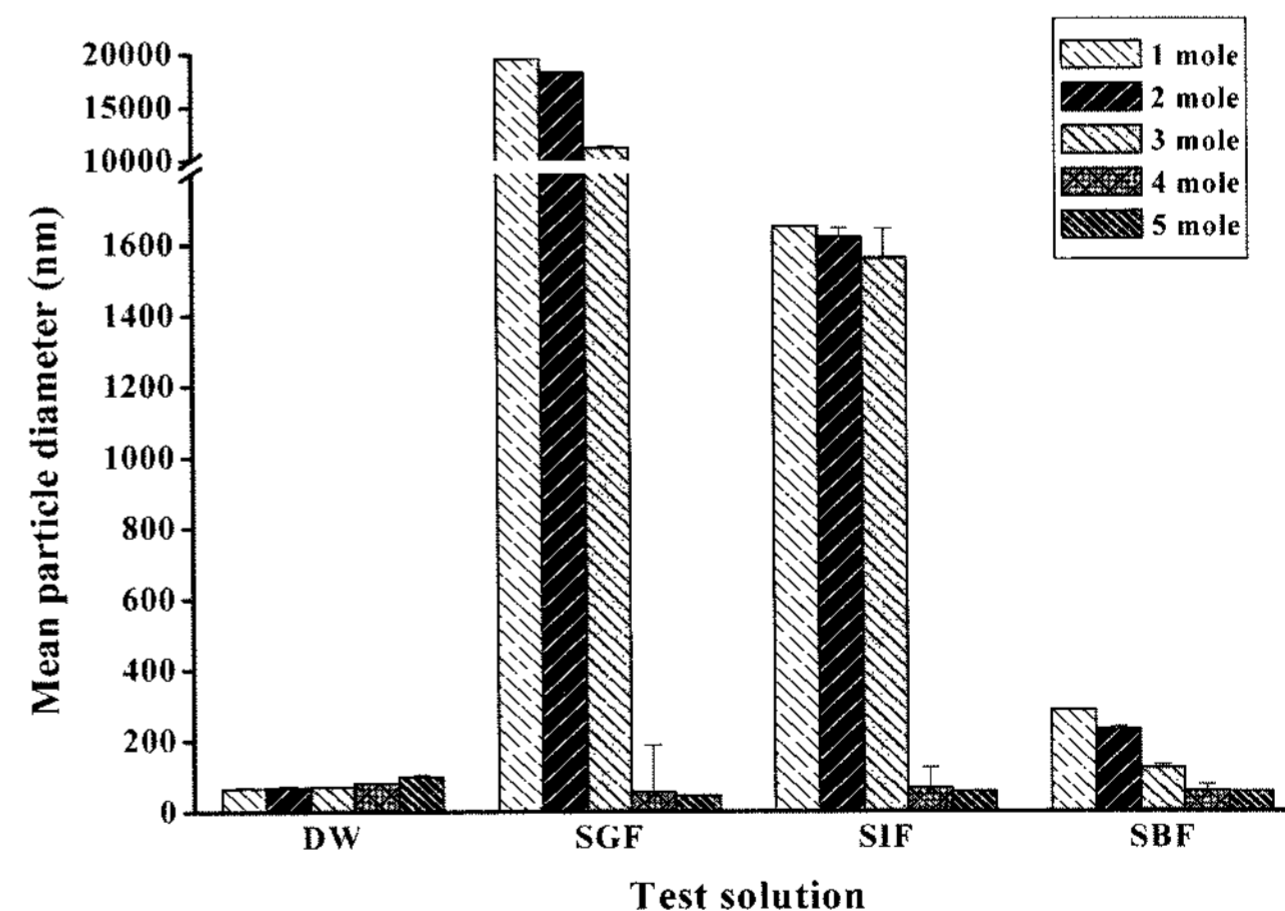


Figure 3—Stability of paclitaxel-loaded lipid nanoparticles prepared with different mole ratio of DSPE-mPEG2000 in distilled water (DW), simulated gastric fluid (SGF), simulated intestinal fluid (SIF) and simulated bile fluid (SBF) at 25°C for 6 hrs, respectively. Stability of lipid nanoparticles at 37°C could not be detected due to aggregation of the lipid nanoparticles. Mole ratio of HSPC:CHOL:DPPA was set to 7:3:5. Amount of paclitaxel was 3 mg, respectively. All data were expressed as a mean±S.D.(n=3).

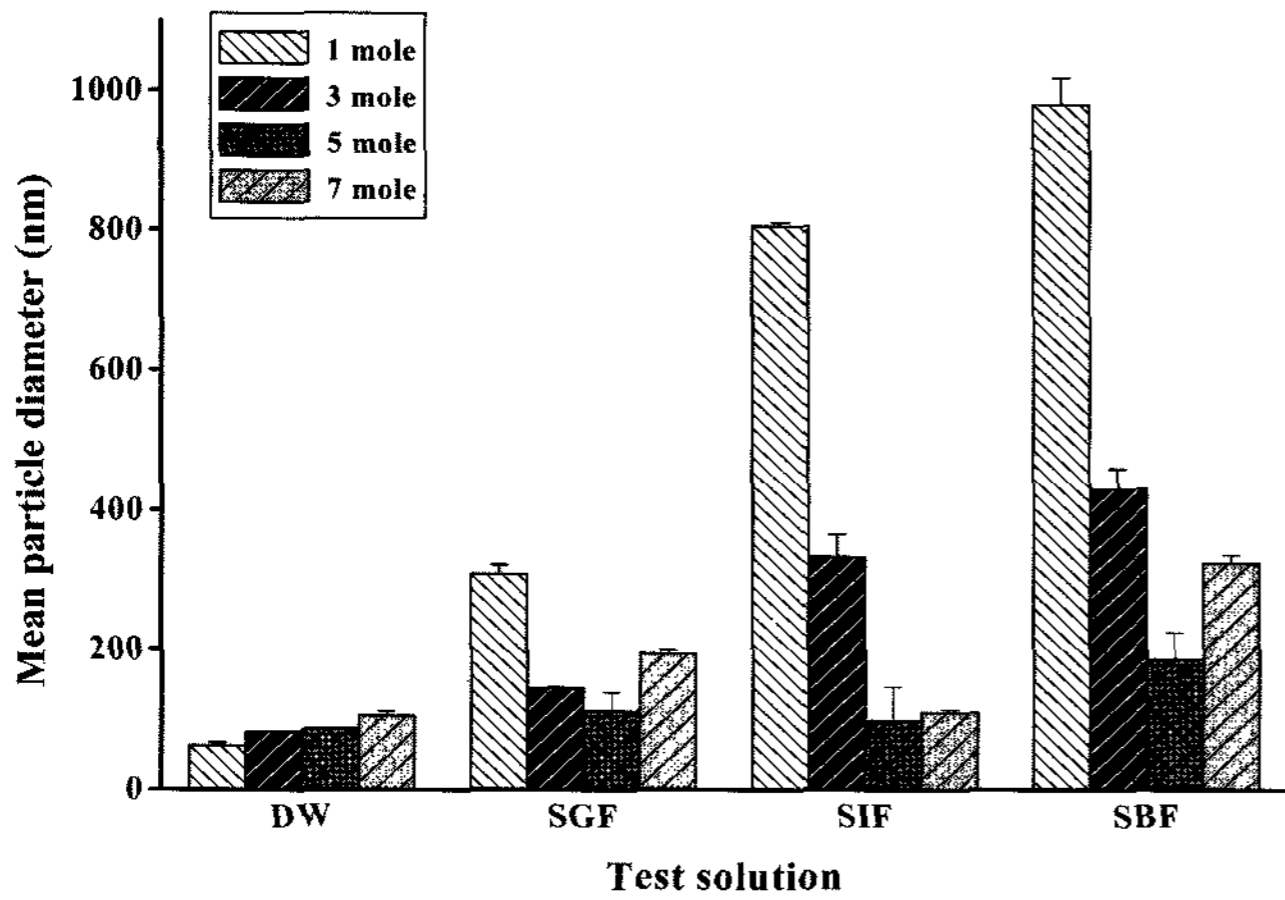


Figure 4—Stability of paclitaxel-loaded PEG-lipid nanoparticles prepared with different mole ratio of CHOL in distilled water (DW), simulated gastric fluid (SGF), simulated intestinal fluid (SIF) and simulated bile fluid (SBF) at 37°C for 6 hrs, respectively. Mole ratio of HSPC:DPPA:DSPE:mPEG2000 was set to 7:5:4. Amount of paclitaxel was 3 mg, respectively. All data were expressed as a mean±S.D.(n=3).

으로 알려져 있는 콜레스테롤의 함량을 변화시켜 지질나노입자를 제조하였다.^{7,16)} 인지질, 음이온성 지질 그리고 인지질-PEG 복합체의 몰 비율을 7:5:4로 고정하고 콜레스테롤의 몰 비율을 1, 3, 5 그리고 7로 변화시켜 제조한 지질나노입자의 물리적 특성을 Table III에 나타내었다. 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 콜레스테롤의 함량과 비례적으로 지질나노입자의 크기가 증가하였다. 약물의 봉입효율은 콜레스테롤의 함량을 1, 3, 5 그리고 7몰 비율로 증가시킬 때, 19.7±1.3, 38.7±1.3, 70.5±3.1 그리고 49.3±2.4%로 콜레스테롤의 함량이 증가할수록 약물의 봉입효율이 증가하다가 5 몰 이상으로 첨가될 경우 오히려 봉입효율이 감소하는 경향을 보였다. 이는 콜레스테롤이 지질나노입자를 구성하는 인지질의 소수성 부분에 포함되어 입자의 구조를 강화하고, 안정화하지만 일정농도 이상에서는 더 이상 안정화에 기여하지 못하고 약물이 봉입될 수 있는 소수성 영역에 포함되면서 약물의 봉입이 저해된 것으로 보여진다.^{14,16)} 37°C의 SGF, SIF 및 SBF내에서의 지질나노입자의 안정성 평가 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지

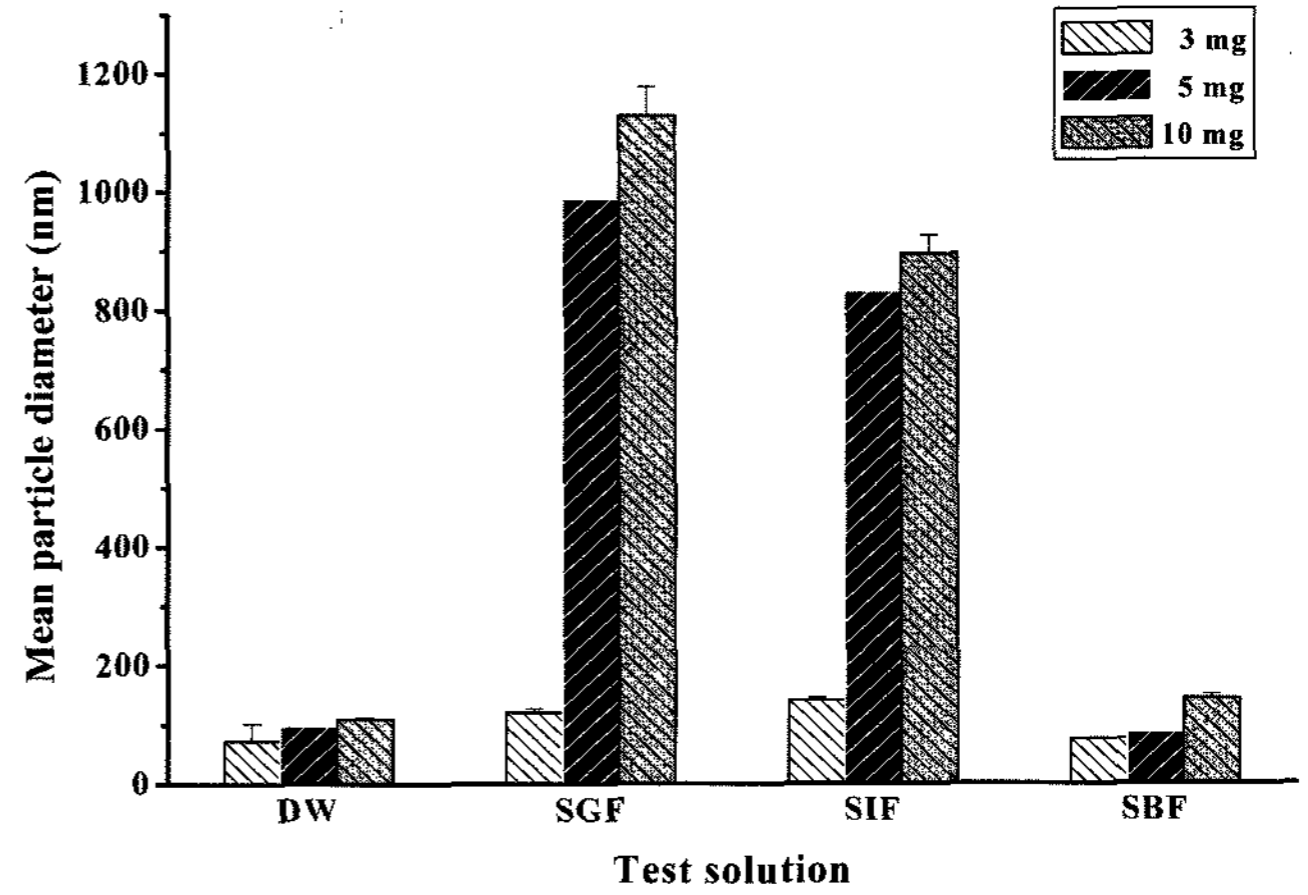


Figure 5—Stability of paclitaxel-loaded PEG-lipid nanoparticles prepared with different amount of paclitaxel in distilled water (DW), simulated gastric fluid (SGF), simulated intestinal fluid (SIF) and simulated bile fluid (SBF) at 37°C for 6 hrs, respectively. Mole ratio of HSPC:CHOL:DPPA:DSPE-mPEG-2000 was set to 7:5:5:4. All data were expressed as a mean±S.D.(n=3).

질 그리고 DSPE-mPEG2000의 몰 비율이 7:5:5:4일 때 입자의 크기가 6시간동안 200 nm 이하로 유지되는 것으로 보아 SGF, SIF 및 SBF내에서의 지질 나노입자의 안정성이 증가되었음을 알 수 있다. 이것은 콜레스테롤이 인지질과 음이온성 지질의 소수성 부분에 포함됨으로써 지질나노입자 구조의 안정화에 기인하였기 때문이라 생각된다.

약물의 함량에 따른 지질나노입자의 물리적 특성과 안정성 평가

약물의 함량에 따른 지질나노입자의 크기와 봉입효율 측정하기 위해 인지질, 콜레스테롤, 음이온성 지질 그리고 인지질-PEG 복합체의 몰 비율을 7:5:5:4로 고정하고 파클리탁셀의 함량을 3, 5 그리고 10 mg(지질과 약물의 질량비로는 72.5:1, 43.5:1 그리고 21.7:1)로 변화시켜 제조한 지질나노입자의 물리적 특성을 Table IV에 나타내었다. 전체 지질대비 약물의 함량이 증가할수록 지질나노입자의 크기가 커지는 경향을 보였다. 이는 파클리탁셀이 봉입될 수 있는 지질나노입자의 소수성 영역인 지방쇄에 파클리탁셀이 봉입되

Table IV—Physical Properties of Paclitaxel-loaded PEG-lipid Nanoparticles Prepared with Different Amount of Containing Paclitaxel

¹⁾ Amount of paclitaxel (mg)	Mean particle diameter (nm)	Entrapping efficiency (%)	Zeta potential (mV)
3	86.9±6.8	70.5±3.1	-22.9±1.2
5	98.3±4.3	67.0±0.6	-20.3±0.4
10	109±7.1	76.7±2.7	-21.3±1.0

¹⁾Lipid nanoparticles was composed of HSPC:CHOL:DPPA:DSPE-mPEG2000 as a mole ratio of 7:5:5:4. Weight ratio of lipid to paclitaxel was 72.1:1, 43.5:1 and 21.7:1, respectively. All data were shown as a mean±S.D.(n=3).

어지면서 증가된 약물의 함량에 의해서 지질나노입자의 크기가 증가한 것으로 생각된다. 파클리탁셀의 함량에 따른 SGF, SIF 및 SBF내에서 지질나노입자의 크기변화를 Fig. 5에 나타내었는데, 37°C의 SGF, SIF 및 SBF내에서의 지질나노입자의 안정성은 봉입된 약물함량이 증가할수록 감소하였다. 이와 같이 지질나노입자에 봉입된 약물이 많아질수록 안정성이 감소하는 이유는 파클리탁셀과 같은 소수성 약물은 지질나노입자를 구성하는 지질의 소수성 영역에 존재하게 되는데 봉입된 약물의 함량이 증가할수록 SGF, SIF 및 SBF이 갖는 산이나 염이온들과 같은 외부환경과의 접촉량이 증가하면서 지질나노입자가 구조적으로 불안정해지기 때문이라 사료된다.^{14,21)}

결 론

지질나노입자의 인공 소화액내에서의 안정성을 증가시키기 위하여 PEG로 그 표면이 개질된 지질나노입자를 제조하였다. 모델 약물로 사용된 파클리탁셀을 지질나노입자에 봉입함에 있어서 음이온성 지질의 함량 및 종류, 인지질-PEG 복합체의 함량, 콜레스테롤의 함량과 파클리탁셀의 농도가 미치는 지질나노입자의 특성 그리고 인공 위액(SGF), 인공 장액(SIF) 및 인공 담즙액(SBF)내에서의 입자 안정성을 고찰하였다. 음이온성 지질로는 DPPA를 사용한 경우 가장 작은 입자크기와 높은 봉입효율을 가진 지질나노입자가 제조되었고, DPPA의 함량이 증가할수록 입자간의 전기적 반발력에 의해 더 작은 입자가 형성되었으나 일정비율 이상으로 첨가 시 더 이상 전기적 반발력을 증가시키지 못해 입자의 크기변화에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다. DSPE-mPEG의 함량이 증가할수록 입자의 크기와 약물의 봉입효율이 증가하는 경향을 보였고, PEG로 개질된 지질나노입자와 개질하지 않은 대조 지질나노입자의 SGF, SIF 및 SBF내에서의 안정성을 비교한 결과, PEG로 개질된 지질나노입자의 안정성이 현저히 향상됨을 알 수 있었다. 지질나노입자 형성 시 콜레스테롤의 함량이 증가함에 따라 입자의 크기가 증가되었고, 그와 비례적으로 파클리탁셀의 봉입효율도 증가하였으며, 파클리탁셀의 농도가 증가할수록 37°C의 SGF, SIF 및 SBF내에서의 안정성은 감소하였다. 따라서 표면에 도입된 PEG가 SGF, SIF 및 SBF내에 있는 이온흡착으로부터 입자를 보호하여 입자의 구조적 붕괴를 방지함으로써 안정성이 증가된 지질나노입자의 제조가 가능하며, 이처럼 SGF, SIF 및 SBF내에서의 안정성이 증가된 지질나노입자에 약물을 봉입함으로써 봉입된 약물의 효능과 효과를 증가시킬 수 있는 효율적이고 안정한 약물전달체로서 응용 가능성

이 기대된다.

참고문헌

- 1) S.A. Wissing, O. Kayser and R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deli. Rev.*, **56**, 1257-1272 (2004).
- 2) M. Trotta, F. Debernardi and O. Caputo, Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique, *Int. J. Pharm.*, **257**, 153-160 (2003).
- 3) M. Rawat, D. Singh, S. Saraf and S. Safar, Nanocarriers: Promising vehicle for bioactive drugs, *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1790-1798 (2006).
- 4) W.R. Rerkins, I. Ahmad, X. Li, D.J. Hirsh, G.R. Masters, C.J. Fecko, J.K. Lee, S. Ali, J. Nguyen, J. Schupsky, C. Herbert, A.S. Janoff and E. Mayhew, Novel therapeutic nano-particles (lipocores): trapping poorly water soluble compounds, *Int. J. Pharm.*, **200**, 27-39 (2000).
- 5) G. Suresh, K. Manjunath, V. Venkateswarlu and V. Satyanarayana, Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **8**(1) article 24 (2007).
- 6) R.B. Greenwald, Y.H. Choe, J. McGuire and C.D. Conover, Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates, *Adv. Drug Deli. Rev.*, **55**, 217-250 (2003).
- 7) C.M. Lee, H.C. Lee and K.Y. Lee, O-palmitoylcurdlan surface (OPCurS)-coated liposomes for oral drug delivery, *J. Biosci. Bioeng.*, **100**, 255-259 (2005).
- 8) A.K. Singla, A. Garg and D. Aggarwal, Paclitaxel and its formulations, *Int. J. Pharm.*, **235**, 179-192 (2002).
- 9) S.K. Kumar, S.A. Williams, J.T. Isaacs, S.R. Denmeade and S.R. Khan, Modulating paclitaxel bioavailability for targeting prostate cancer, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4973-4984 (2007).
- 10) S.S. Feng and G. Haung, Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel(Taxol) from nanospheres of biodegradable polymers, *J. Control. Release*, **71**, 53-69 (2001).
- 11) P. Labrie, S.P. Maddaford, J. Lacroix, C. Catalano, D.K.H. Lee, S. Rakhit and R.C. Gaudreault, In vitro activity of novel dual action MDR anthranilamide modulators with inhibitory activity at CYP-450, *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 7972-7987 (2006).
- 12) S. Peltier, J.M. Oger, F. Lagarce, W. Couet and J.P. Benoît, Enhanced oral paclitaxel bioavailability after administration of paclitaxel-loaded lipid nanocapsules, *Pharm. Res.*, **23**, 1243-1250 (2006).
- 13) M.D. Chavanpatil, Y. Pati and J. Panyama, Susceptibility of nanoparticle encapsulated paclitaxel to p-glycoprotein-mediated drug efflux, *Int. J. Pharm.*, **320**, 150-156 (2006).
- 14) S.H. Jung, J.E. Lee, H. Seong and B.C. Shin, Preparation of the dexamethasone-incorporated lipid nanosphere: Characteristics of lipid nanosphere by varying species and ratio of

- lipid, *J. Kor. Chem. Soc.*, **50**, 464-470 (2006).
- 15) S.H. Jung, J.E. Lee, H. Seong and B.C. Shin, Preparation of dexamethasone-21-palmitate incorporated lipid nanosphere: Physical properties by varying components and ratio of lipid, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **36**, 224-261 (2006).
- 16) H. Ohvo-Rekila, B. Ramstedt, P.L. Ki and J.P. Slotte, Cholesterol interactions with phospholipids in membranes, *Prog. Lipid Res.*, **41**, 66-97 (2002).
- 17) R.L. Hong, C.J. Huang, Y.L. Teng, V.F. Pang, S.T. Chen, J.J. Liu and F.H. Chang, Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice, *Clin. Cancer Res.*, **5**, 3645-3652 (1999).
- 18) E. Zimmermann and R.H. Müller, Electrolyte- and pH-stabilities of aqueous solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions in artificial gastrointestinal media, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **52**, 203-210 (2001).
- 19) V.M. Samsonov, N.Y. Sdobnyakov and A.N. Bazulev, Size dependence of the surface tension and the problem of Gibbs thermodynamics extension to nanosystems, *Colloids and Surfaces*, **239**, 113-117 (2004).
- 20) M.N. Magomedov, Dependence of the surface energy on the size and shape of a nanocrystal, *Phys. Solid State*, **46**, 954-968 (2004).
- 21) Y. Hu, J. Xie, Y.W. Tong and C.H. Wang, Effect of PEG conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the HepG2 cells, *J. Control. Release*, **118**, 7-17 (2007).