

Rosiglitazone 가용화를 위한 PEG-PLA(PLGA) 고분자 미셀의 제조 및 특성분석

김연환 · 임정혁 · 민현수 · 김준기* · 이용규*[†] · 박고은** · 조광재** · 허강무[†]

충남대학교 고분자공학, *충주대학교 화공생물공학, **가톨릭대학교 의과대학 이비인후과학교실
(2010년 1월 12일 접수, 2010년 2월 3일 수정, 2010년 2월 8일 채택)

Preparation and Characterization of PEG-PLA(PLGA) Micelles for Solubilization of Rosiglitazone

Yon-Hwan Kim, Jeong Hyuk Im, Hyun Su Min, Junki Kim*,
Yong-Kyu Lee*[†], Go Eun Park**, Kwang Jae Cho**, and Kang Moo Huh[†]

Department of Polymer Science and Engineering,

Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

*Department of Chemical and Biological Engineering,

Chungju National University, Chungbuk 380-702, Korea

**Department of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine,

The Catholic University of Korea, Uijeongbu St. Mary's Hospital, Gyeonggi-Do 480-717, Korea

(Received January 12, 2010; Revised February 3, 2010; Accepted February 8, 2010)

초록: 본 실험에서는 일련의 poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactide) (또는 -poly(DL-lactide-co-glycolide)) 이중블록 공중합체들을 DL-lactide(또는 glycolide)의 고리열림 중합에 의해 합성하고, 당뇨병 치료제 일종인 rosiglitazone의 가용화를 위한 고분자 미셀 제형으로서의 특성을 평가하였다. 고체분산법을 이용하여 높은 봉입률의 약물 함유 미셀 제형을 효과적으로 제조하였고, 미셀 제형의 수용액 내 안정성을 hydrotropic agent의 일종인 2-hydroxy-N-picolynitnamide (HPNA)의 사용으로 더욱 향상시킬 수 있었다. 생체 외 세포생존평가에서 생체적합성과 낮은 독성을 보였고, 쥐를 이용한 동물실험에서도 약물을 함유한 고분자 미셀이 약물 대조군보다 혈당을 보다 효과적으로 감소시켰다.

Abstract: In this study, PEG-PLA(or PLGA) amphiphilic di-block copolymers were synthesized by ring opening polymerization of D,L-lactide(or glycolide) and applied to polymeric micelle system for solubilization of a rosiglitazone as diabetes drug. The drug could be efficiently loaded into the polymer micelle by solid dispersion technique, and the drug-loaded micelles were characterized and evaluated as a drug delivery carrier by fluorescence spectrometer, DSC, and DLS measurements. The colloidal stability of drug loaded micelles in aqueous media could be enhanced by addition of 2-hydroxy-N-picolynitnamide as a hydrotropic agent. The polymer micelles also showed biocompatible and non-toxic properties *in vitro* cell viability using MTT assay, and the drug loaded micelles were observed to be more effective than free drug for decreasing glucose in blood of rats.

Keywords: PEG-PLA(PLGA) diblock copolymer, polymer micelle, rosiglitazone, hydrotropic agent.

서 론

현재 의약품으로 사용되고 있는 많은 약물들은 난용성으로 생체 내로 투여되었을 때 낮은 용해도에 기인한 낮은 생체이용률(bioavailability)을 보이고, 또한 개발 중인 수많은 약물 후보군 중 상당수가 이러한 난용성으로 인해 제제화에 어려움을 겪고 있다. 따라서, 난용성 약물의 가용화를 위한 많은 다양한 제제방법들이 연구되어 왔지만, 현재까지 그 효과가 미비하거나 응용이 제한적이었다. 고분자 나노입

자는 약물전달시스템에서 중요한 분야 중에 하나이며, 최근에는 양친성 고분자를 이용한 나노입자 제조에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.¹⁻⁹ 소수성 블록과 친수성 블록이 공존해 있는 양친매성 고분자는 수용액상에서 분자간 소수성 상호작용, van der Waals 힘과 같은 물리적 응집력에 의하여 독특한 구조의 나노 집합체를 형성한다. 이는 소수성 블록이 물과의 접촉을 최소화하기 위해 스스로 뭉치려는 경향을 보이는 것으로, 이렇게 뭉쳐진 소수성 집합체가 미세영역(core)을 형성하고 그 바깥쪽을 친수성 블록이 둘러싸고(shell) 있는 고분자 미셀을 형성하여 전체적인 수용액에 대한 용해도를 증가시키게 된다.^{10,11} 이러한 고분자 미셀은 낮은 수용해도와 낮은 생체흡수율을 보이는 난

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khuh@cnu.ac.kr or leeyk@cju.ac.kr

용성 약물의 가용화를 위한 제형으로 광범위하게 활용되고 있다.¹²⁻¹⁹

티아졸리디논(thiazolidinedione)계 화합물인 피오글리타존(pioglitazone, Actose), 로지글리타존(rosiglitazone, Avandia[®]) 및 트로글리타존(troglitazone, Rezulin) 등은 당뇨병 치료제로서 널리 알려져 있다. 이들 약물들은 인슐린의 저항성을 감소시키고 인슐린 분비세포를 보존시킴으로써 당뇨병의 근본적인 치료를 가능하게 하는 제 2형 경구용 혈당강하제로 당뇨병 치료제로 널리 사용되고 있다.²⁰ 심각한 부작용이 없고, 약물 투여에 의한 저혈당, 간 독성, 유산증 혹은 위장관 부작용도 없는 것으로 알려져 있다.²¹⁻²³ 이러한 티아졸리디논계 약물은 효능과 효과 면에서 우수한 약리학적 특성을 가지고 있음에도 불구하고 물에 용해 또는 분산되지 않는 난용적 특성 때문에 체내 흡수율의 감소뿐만 아니라 제제화에 큰 어려움을 겪고 있다. 따라서, 생체이용률을 개선시키기 위하여 다양한 제제화 방법이 연구되고 있다.

본 연구그룹은 선행연구를 통해 양친성 이중블록 공중합체를 이용하여 고체분산법에 의해 피오글리타존을 효과적으로 가용화시킨 고분자 미셀 제형을 개발하였다.¹⁹ 친수성이며 생체적합성이 뛰어난 poly(ethylene glycol) (PEG)을 거대개시제로 하여 DL-lactide (LA), 또는 glycolide (GA)를 고리열림 중합하여 PEG-PLA 또는 PEG-PLGA 이중블록 공중합체들을 합성하였고, 고분자의 화학적 조성 변화를 통해 약물 봉입률을 극대화할 수 있었을 뿐 아니라, 방출속도 또한 제어가 가능함을 보여주었다. 하지만, 고분자 미셀의 화학적 조성 과 미셀 내 약물의 함량에 따라 미셀의 콜로이드 안정성이 현저히 저하된다는 보고도 하였다. 이러한 선행연구의 연속성으로 본 연구에서는 당뇨병 치료제인 로지글리타존의 부작용을 최소화하고 위장흡수 효과를 높이기 위한 가용화 제제로서 양친성 이중블록 공중합체로 구성된 고분자 미셀을 최적화하고, 가용화 제제로서의 효능을 평가하였다. 고분자의 조성을 변화시켜 로지글리타존의 봉입 함량 및 봉입 효율을 극대화하고, 방출 거동을 제어하고자 하였다. 또한, 단점으로 보고된 약물함유 고분자미셀의 수용액 내 안정성을 하이드로트로픽(hydro-tropic) 효과를 이용하여 향상시키고자 하였고, 최종적으로 MTT assay를 통한 생체 외 세포 독성평가와 성능평가를 위한 생체 내 동물실험을 수행하였다.

실 험

시약 및 재료. Methoxy poly(ethylene glycol) (MPEG, $M_n=2000$), 반응 촉매인 stannous octoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), hydrotropic agent인 2-hydroxy-N-picolylmitinamide (HPNA)는 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였다. PEG-PLA(또는 PLGA) 이중블록 공중합체는 기존의 합성된 고분자를 사용하였고, 새로운 블록구조의 고분자를 합성하기 위해 기본적으로 기존의 합성방법과 조건을 이용하였으나, 원하는 분자량을 얻기 위해 거대개시제로서 MPEG와 단량체인 DL-lactide(또는 glycolide)의 반응비를 조절하여 합성하였다.¹⁹ 공중합 단량체로 사용된 DL-lactide (LA)와 glycolide (GA)는 Polyscience에서 구입하였고, ethyl acetate (Samchun, HPLC 등급)에 재결정 후 사용하였다. 로지글리타존은 (주)동우신테크에서 제공받아 사용하였다. 기타 사용된 모든 용매는 HPLC 등급을 사용하였으며, 그 외의 시약들은 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

고체 분산법을 이용한 약물 봉입 미셀의 제조. 약물이 5, 10% (w/w) 이 함유하도록 일정량의 PEG-PLA(또는 PLGA)와 함께 one-neck 플라스크에 넣고 혼합용매(methanol/acetonitrile=2/1, v/v)에 녹인다. 잘 녹지 않을 경우에는 약간의 열을 가해 주었으며 완전히 투명해질 때까지 녹으면 40 °C에서 감압하에 농축시켜 젤과 같은 필름상으로 만든 후, 37 °C로 예열한 3차 증류수를 넣고 미셀이 고르게 분산되도록 온화하게 저어주었다. 미셀 용액에서 봉입되지 않은 약물은 0.45 μm syringe filter를 이용해 걸러주었다. 걸러진 용액은 곧바로 냉각시켜 3 일 이상 동결건조하여 약물이 함유된 분말상 미셀 입자를 얻었다.

고분자 및 미셀의 특성분석. 합성된 PEG-PLA(또는 PLGA)의 화학적 조성은 ¹H NMR(JNM-AL400, Jeol Ltd, Akishima, Japan)을 통하여 분석하였다. 또한, 합성 전과 후의 분자결합의 구조적인 변화를 살펴보기 위하여 FTIR(MAGNA 560 spectrometer, USA)을 이용하여 분석하였다. KBr pellet을 만들어 시편을 제조하였으며 400~4000 cm^{-1} 범위에서 측정하였다. 고분자의 분자량 및 분자량 분포는 GPC(Agilent 1100 series, USA)를 통하여 분석하였다. 두 개의 컬럼(pLgel 5 μm MIXED-D & E columns), RI 탐지기, quaternary 펌프를 장착했으며, 이동상 용매인 THF를 1 mL/min의 유속으로 측정하였다. PEG를 기준 시료로 이용하였고 컬럼과 탐지기의 온도는 모두 40 °C를 유지하였다.

약물이 봉입된 미셀의 열적 특성을 알아보기 위하여 DSC(Pyris 6, PerkinElmer, USA)를 측정하였다. Aluminum pan에 미셀의 약물 함량은 1 mg 기준으로 하였고 마찬가지로 건조된 고분자와 약물 함량을 동일한 조건으로 준비하였다. 20 mL/min의 질소기류 하에 승온 속도는 10 °C/min로 하였고, 0~240 °C의 범위 내에서 측정하였다. 수용액상에서의 PEG-PLA(또는 PLGA) 미셀과 약물이 봉입된 미셀의 평균 크기 및 분포는 DLS(Zeta-potential & particle size analyzer, ELS-Z, photal) 측정을 통하여 확인하였다. 약물이 봉입된 고분자 미셀의 약물 봉입률을 알아보기 위하여 HPLC(NS-3000i, Futecs) 분석을 수행하였다. 자동 샘플주입기(NS-6000A, Futecs)와 Prontosil C18-ace-EPS 컬럼(250×4.6 mm, 5.0- μm , Bischoff)을 장착하였고, 이동상과 고정상 용매로 혼합용매(phosphoric acid+4 M NaOH+water : acetonitrile=75:25)를 사용하였다. 약물의 UV-흡수파장 235 nm에서 1 mL/min의 유속으로 상온에서 측정하였다.

임계 미셀 농도(CMC) 측정. 합성된 양친성 공중합체가 수용액상에서 미셀을 형성하는 농도를 확인하고자 형광측정기(JASCO FP-6500)를 이용하여 분석하였다. Pyrene(Sigma-Aldrich)을 형광물질로 사용하였고 소량의 THF에 녹인 pyrene 용액을 3차 증류수에 희석하여 6.0×10^{-7} M의 농도로 사용하였다. 잔류 THF의 제거를 위하여 65 °C에서 3시간 열을 가해 주었으며 증류수에 희석된 고분자용액에 pyrene 용액을 1:1 (v/v)로 넣어주었다. 또한, pyrene의 안정화를 위하여 측정 전 sample은 상온에서 24시간 유지하였다. 측정된 고분자의 농도는 1×10^{-5} ~5 mg/mL로 하였고 pyrene의 방출 파장은 350~500 nm에서 측정하였다.

Hydrotropic Agent를 이용한 미셀 제형의 안정화. 수용액상에서 약물이 봉입된 PEG-PLA(또는 PLGA) 미셀의 입자 안정성을 평가하기 위해 샘플을 증류수와 인산완충용액(PBS, pH=7.4)에 각각 0.5 wt%로 녹이고 37 °C의 항온수조 안에서 시간에 따른 미셀 입자크기의 변화를 관찰하였다. 입자 안정성을 높이기 위하여 특정 샘플에 hydro-

tropic agent인 HPNA를 넣고 안정성을 비교하였다.

세포독성평가. 본 연구에서는 합성된 고분자 미셀의 생체적합성을 알아보기 위하여 상피암세포로서 알려진 KB cell(human epidermoid carcinoma cells, 한국세포주은행)을 이용하여 MTT 처리 후 세포 생존율을 관찰함으로써 독성 여부를 판단하였다. KB cell의 기본 배지는 RPMI 1640(GIBCO)에 10% 우태혈청(FBS, GIBCO)과 1%의 항생제(P/S, GIBCO)를 첨가하여 사용하였고, 배양 용기에는 5% CO₂와 95% 공기가 공급되고 적절한 습도와 36.5 °C의 온도가 유지되도록 하였다. 세포의 안정화와 세포 탈착을 위하여 PBS buffer(Biowhittaker)와 trypsin-EDTA(GIBCO)를 사용하였다. 또한 96-well plate(cry-stal-grade polystyrene)를 이용하여 cell 수는 2.5×10⁵개로 각각의 well에 분배하였으며 시료 투여 전 96-well plate에서 24시간 동안 배양하였다. 시료는 0.1~1000 µg/100 µL의 농도로 PBS buffer에 녹였으며 녹지 않을 경우 5% DMSO 용액에 녹인 뒤 KB cell 용액에 투여하였다. 시간에 따른 KB cell 독성을 확인하기 위하여 24, 48시간 동안 배양 후 MTT(SIGMA, M-5655)와 MTT solubilization solution(SIGMA, M-8910)을 처리한 후 UV-측정기(Varioskan Flash, Thermo Electron corporation)를 통하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

실험동물 및 당뇨 유도. 4주령의 암컷 Sprague-Dawley(SD) 쥐(평균무게 160 g, 총 33마리)를 Orient-Bio Co.(경기도, 대한민국)로부터 분양 받아 실험에 사용하였다. 실험동물은 습도 50%, 온도 22 ± 1 °C로 유지되는 동물실험실에서 사육하였으며 물과 사료를 자유롭게 섭취할 수 있도록 공급하였다. 인슐린 의존형 당뇨병을 유도하기 위하여 streptozotocin(STZ, Sigma-Aldrich)을 사용하였다. 당뇨 쥐는 3일간 실험실에서 적응시킨 후, 12시간 절식 후 0.1 M citrate buffer(pH4.5)에 녹인 STZ(45 mg/Kg)을 복강투여 하여 유도하였다. STZ를 투여한 3일 후에 4시간을 공복시킨 후 꼬리 정맥으로부터 채혈을 통해 얻어진 전혈에서 혈당을 측정하여 200 mg/dL 이상인 개체를 선별하여 실험에 사용하였다. 혈당 측정은 혈당측정기(Roche, Germany)를 사용하여 측정하였다.²⁸

혈당 및 무게 변화 측정. 쥐들은 일반먹이(control RD)를 먹인 그룹(1)과 고지방 먹이(23.7% casein, 46% glucose, 23.4% fat)이 포함된 high glucose-fat diet(control HFD)를 먹인 그룹(2)으로 나누었고 4주 동안 매주 체중과 공복혈당을 측정하였다. 당뇨를 입히고 4주 후, STZ를 주입한 쥐들을 다시 당뇨 대조군(STZ HFD) (3), 순수한 rosiglitazone 투여군(STZ HFD free drug) (4), rosiglitazone이 봉입된 PEG-PLA micelle 투여군(STZ HFD polymer micelle, 봉입률 5%, hydrotrope 미첨가) (5)으로 다시 나누고, 약물 및 약물이 함유된 미셀 (4)와 (5)에 각각 rosiglitazone이 30 mg/kg(drug/rat wt)이 되도록 주 3회 경구투여 하였다. 약물 투여 후 그 시점으로부터 0, 1, 2, 3, 4주 후에 계속해서 꼬리정맥으로부터 혈액을 채취한 후 혈당변화를 관찰하였다. 또한, 1주 간격으로 체중을 측정하여 발육 상태를 점검하였다. 모든 실험 종결 후 실험동물들을 희생시키고 장기의 histology 관찰을 위하여 heart, kidney, liver, lung, spleen을 각각 적출하였다. 그 후 10% formaldehyde solution에 고정시킨 후 파라핀블록을 만들어 보관하였으며 4 µm로 절삭하여 Hematoxyline-Eosin 염색을 하였다.²⁹

결과 및 토론

PEG-PLA(또는 PLGA)의 합성 및 특성분석. 거대 개시제인 친수성 MPEG(M_n=2000)를 이용하여 LA(또는 GA)를 개환중합시켰다. 합성된 PEG-PLA(또는 -PLGA) 양친성 고분자는 DL-lactide(또는 glycolide)의 당량비를 조절하여 다양한 조성의 블록공중합체를 합성하였고, 70% 이상의 높은 수득률을 보였다. 기존의 합성되었던 고분자들과 새롭게 합성된 PLA 분자량 1500인 이중블록 공중합체의 조성, 분자량, CMC 측정결과를 Table 1에 정리하였다. Figure 1은 새롭게 중합된 블록 공중합체의 ¹H NMR 분석결과를 보여주고 있다. PEG

Table 1. Characteristics of PEG-PLA(or PLGA) Di-block Copolymers

Copolymers	Molecular weight		PDI ^b	CMC ^c (mg/mL)	Yield (%)
	M _n ^a	M _w ^b			
1 PEG2K-PLA1K	2000 : 1140	3000	1.16	0.0017	74
2 PEG2K-PLA1.5K	2000 : 1590	3410	1.07	0.001	70
3 PEG2K-PLA2K	2000 : 2140	3740	1.29	0.001	70
4 PEG2K-PLGA0.8K	2000 : 760	2290	1.07	0.0076	84
5 PEG2K-PLGA1.4K	2000 : 1380	2520	1.13	0.003	82

^aCalculated from the peak integration of ¹H NMR spectra. ^bDetermined by GPC measurements. ^cDetermined by fluorescence measurement.

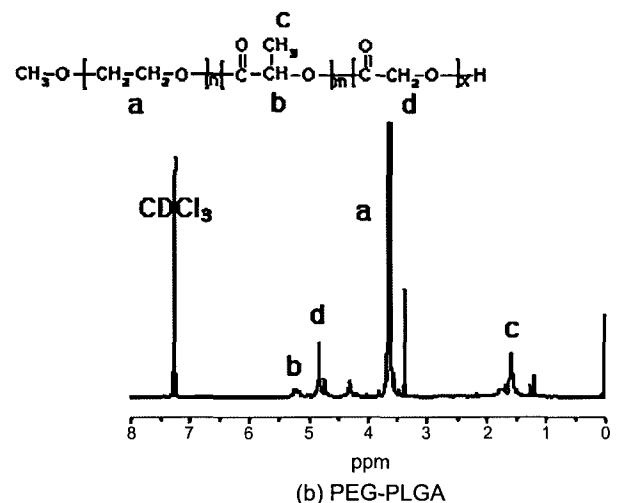
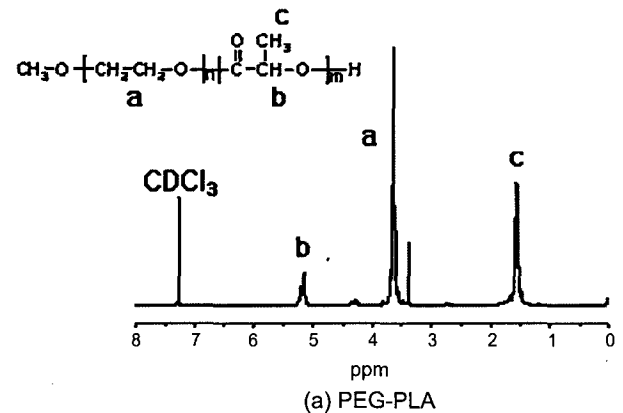


Figure 1. ¹H NMR spectra of PEG-PLA(a); PEG-PLGA(b) di-block copolymers.

의 에틸렌(-CH₂-CH₂-, a) 피크는 $\delta=3.65\text{--}4.23$ ppm, 메톡시(-CH₃) 피크는 $\delta=3.4$ ppm에서 관찰되었고, PLA의 메틸렌(-CH-, b) 피크는 $\delta=5.23$ ppm, 메틸(CH₃, c) 피크는 $\delta=1.62$ ppm에서 확인되었으며, PGA의 메틸렌(-CH₂-, d) 피크는 $\delta=4.83$ ppm에서 확인되었다. ¹H NMR 분석을 통한 PLA의 분자량 계산은 PEG의 에틸렌 피크에 대한 PLA의 메틸 피크의 proton 면적 비를 비교하여 계산하였고, PLGA의 분자량 계산은 PEG의 에틸렌 피크에 대한 PLA의 메틸 피크와 PGA의 메틸렌 피크의 proton 면적 비를 비교하여 계산하였다. 이는 GPC로 측정된 분자량과 거의 유사한 결과를 보였으며, 합성된 고분자의 분자량 분포(M_w/M_n)는 1.07~1.29 사이의 좁은 분산도를 보였다. FTIR 측정을 통하여 합성된 고분자는 PEG에서는 볼 수 없었던 카보닐 그룹(C=O)의 파장을 PLA는 1756 cm⁻¹에서, PLGA는 1762 cm⁻¹에서 각각 확인할 수 있었으며 2750~3029 cm⁻¹(-OH), 2850~2990 cm⁻¹(-CH₃, -CH₂-), 1456 cm⁻¹(-CH₃), 1070~1280 cm⁻¹(C-O-C)에서 각각의 파장영역에 해당되는 고분자의 특성사슬결합이 존재함을 확인하였다.

임계미셀 농도(CMC). 형광분석을 통해 얻어진 pyrene 흡수파장의 첫번째와 세번째 형광 강도값인 I_{370} 과 I_{381} 의 비(I_3/I_1)가 급격히 변화하는 구간에서의 변곡점을 임계미셀 농도로 결정하였다. PEG2K-PLA1K의 경우 1.7×10^{-3} mg/mL에서 임계미셀 농도임을 확인하였고, PEG2K-PLA1.5K는 1.0×10^{-3} mg/mL, PEG2K-PLA2K는 1.0×10^{-3} mg/mL, PEG2K-PLGA0.8K는 7.6×10^{-3} mg/mL, PEG2K-PLGA1.4K는 3.0×10^{-3} mg/mL로 측정되었다(Table 1). 이 결과로 보아 소수성이 보다 큰 PLA블록이 PLGA블록보다 상대적으로 낮은 농도에서 미셀이 형성되는 것을 알 수 있고, 같은 고분자 블록인 경우에는 일반적으로 소수성 블록 고분자의 분자량이 커질수록 임계미셀 농도는 작아지는 경향을 볼 수 있었다.

고분자 미셀의 열적 특성. 합성된 고분자와 약물이 함유된 미셀의 열적 거동을 알아보기 위하여 시차주사 열량계(DSC)를 통하여 분석하였다. PEG2K의 경우 58 °C에서 용융점(T_m)이 관찰되었으며, PEG2K-PLA1K, 1.5K, 1K는 53~41 °C 사이에서, PEG2K-PLGA0.8K, 1.4K는 48~45 °C에서 결정성 PEG의 T_m 을 확인할 수 있었다. 이는 순수한 PEG그룹에 PLA(또는 PLGA)블록이 결합하면서 결정성을 다소 감소시켰기 때문이다. 그리고, 약물이 공중합체 내부에 봉입된 미셀과 봉입하지 않고 임의적으로 혼합된 시료의 DSC 결과를 Figure 2에

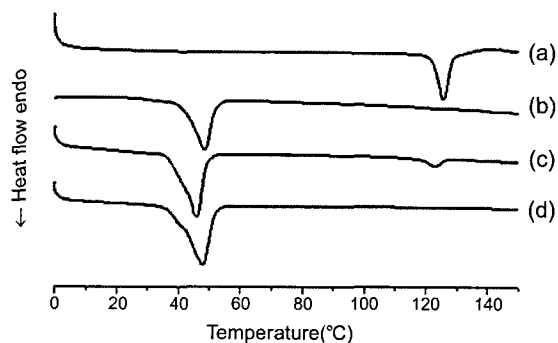


Figure 2. DSC thermograms of rosiglitazone(a); PEG-PLA micelle(b); a mixture of PEG-PLA di-block copolymer and rosiglitazone(c); rosiglitazone loaded PEG-PLA di-block copolymer micelle(d).

나타내었다. 로지글리타존의 T_m 은 125 °C에서 관찰되었고, PEG-PLA(또는 PLGA) 미셀은 약 50 °C부분에서 PEG의 T_m 이 나타났다. PEG-PLA(또는 PLGA)와 약물을 임의적으로 혼합된 시료에서는 PEG와 로지글리타존의 T_m 피크가 모두 관찰되는 반면에 동일한 양의 약물이 봉입된 미셀을 측정할 시료에서는 미셀 표면을 둘러싸고 있는 PEG의 T_m 피크만 관찰될뿐 약물의 특성 용융피크는 관찰되지 않았다. 이렇게 봉입된 약물과 봉입되지 않은 약물의 열적 특성 차이는 약물이 미셀 내부에 도입되는 과정에서 소수성 PLA(또는 PLGA) 블록과의 친화성으로 무정형 상태로 분자 수준으로 잘 혼합되어 존재함을 알 수 있었다.

약물함유 고분자 미셀의 분석. 수용액 상에서 블록공중합체의 자기조립으로 형성된 미셀과 약물이 봉입된 미셀의 크기를 각각 광산란기(DLS)를 이용하여 측정하였다. Table 2에 모든 고분자의 약물봉입 후 생성된 약물함유 미셀의 크기 및 분포도에 대한 결과를 정리하였다. PEG-PLA 이중블록 공중합체들은 PEG2K-PLA1K인 경우 17.7 nm, PEG-PLA1.5K는 17.0 nm, PEG-PLA2K는 14.0 nm로 PLA분자량에 따라 큰 차이 없이 비교적 균일한 나노 자기조립체를 형성하였고, 약물이 봉입된 후에도 이러한 미셀의 평균크기는 샘플마다 약간의 차이는 있지만 17~30 nm의 범위 이내에서 균일하게 생성되어 있는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3).

고분자 미셀 내로의 효과적인 약물봉입을 위해 고체분산법을 이용하여 약물을 도입하였고, 약물과 고분자의 무게비를 1:9(5 wt%), 1:19(10 wt%)로 하여 실험하였다. 약물이 봉입된 고분자 미셀은 동결건조 처리 후 고체상 입자형태로 일정량을 고정상 용매에 녹인 뒤 HPLC분석을 통하여 함유된 로지글리타존의 농도를 측정하여, 다음의 식으로 약물함량(drug loading content, %)과 봉입률(drug loading efficiency, %)을 결정하였다.

Drug Loading Content (%)

$$= \frac{\text{measured amount of drug}}{\text{total amount of drug loaded micelle}} \times 100$$

Drug Loading Efficiency (%)

$$= \frac{\text{measured concentration of drug}}{\text{initial concentration of drug}} \times 100$$

Table 2. Particle Size of Rosiglitazone Loaded PEG-PLA(PLGA) Micelles by DLS Measurements

	Drug-loaded micelles	Drug : Polymer(g)	Diameter(nm)
1	Rosi-PEG2K-PLA1K	1 : 9	17.4 ±4.7
2	Rosi-PEG2K-PLA1K	1 : 19	29.4±13.5
3	Rosi-PEG2K-PLA1.5K	1 : 9	17.7±0.79
4	Rosi-PEG2K-PLA1.5K	1 : 19	21.7±2.96
5	Rosi-PEG2K-PLA2K	1 : 9	21.5±3.2
6	Rosi-PEG2K-PLA2K	1 : 19	24.9±7.7
7	Rosi-PEG2K-PLGA0.8K	1 : 9	26.7±7.5
8	Rosi-PEG2K-PLGA0.8K	1 : 19	20.4±6.4
9	Rosi-PEG2K-PLGA1.4K	1 : 9	28.3±10.2
10	Rosi-PEG2K-PLGA1.4K	1 : 19	28.5±9.9

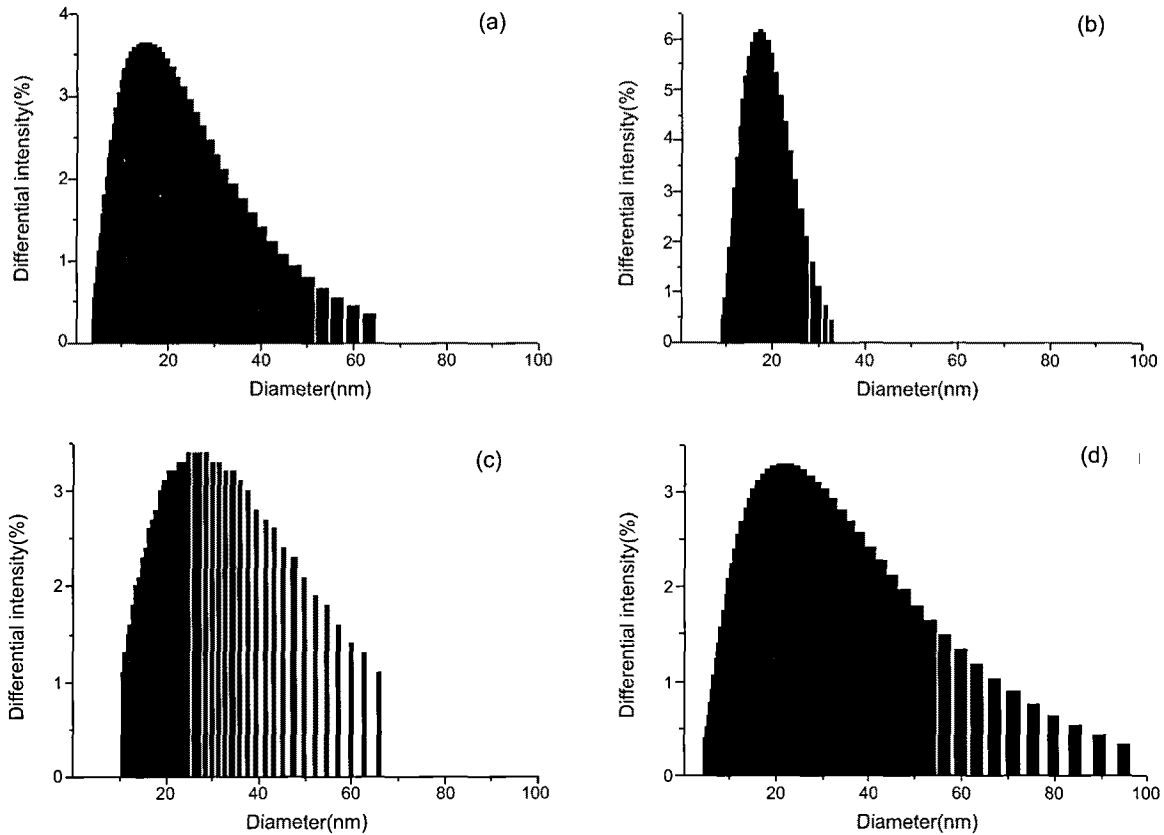


Figure 3. Particle size distributions of PEG2K-PLA1K micelles (a); PEG2K-PLA1.5K micelles (b); rosiglitazone loaded (5 wt%) PEG2K-PLA1K micelles (c); rosiglitazone loaded (5 wt%) PEG2K-PLA1.5K micelles (d) by DLS measurement.

Table 3. Results of Drug Loading with PEG-PLA (PLGA) Micelles

Drug-loaded micelles	Rosi. : Polymer (g)	Yield (%)	Loading content (%)	Loading efficiency (%)
1 Rosi-PEG2K-PLA1K	1 : 9	85	10.9	92.4
2 Rosi-PEG2K-PLA1K	1 : 19	89	5.5	98.2
3 Rosi-PEG2K-PLA1.5K	1 : 9	95	10.4	99.0
4 Rosi-PEG2K-PLA1.5K	1 : 19	96	5.1	98.1
5 Rosi-PEG2K-PLA2K	1 : 9	90	10.8	97.3
6 Rosi-PEG2K-PLA2K	1 : 19	93	5.3	98.1
7 Rosi-PEG2K-PLGA0.8K	1 : 9	83	10.5	87.5
8 Rosi-PEG2K-PLGA0.8K	1 : 19	86	5.2	89.7
9 Rosi-PEG2K-PLGA1.4K	1 : 9	89	11.1	99.1
10 Rosi-PEG2K-PLGA1.4K	1 : 19	86	5.5	94.8

Table 3에 정리된 결과와 같이, 모든 고분자들에 대한 약물함량은 초기 넣어준 양에 비례하여 효과적으로 봉입되었고, 약물의 손실 없이 높은 효율로 봉입되었음을 알 수 있었다(봉입률 87~99%).

미셀의 입자 안정성 평가. 약물함유 미셀의 수용액 내 안정성을 시간에 따른 입자크기의 변화를 관찰하여 평가하였다. Figure 4에서의 결과와 같이 로지글리타존이 봉입된 고분자 미셀들은 종류수 내에서는 PEG2K-PLGA1.4K를 제외한 모든 미셀이 응집 또는 침전현상 없이 일주일 이상의 입자 안정성(17~200 nm)을 가짐을 확인할 수 있

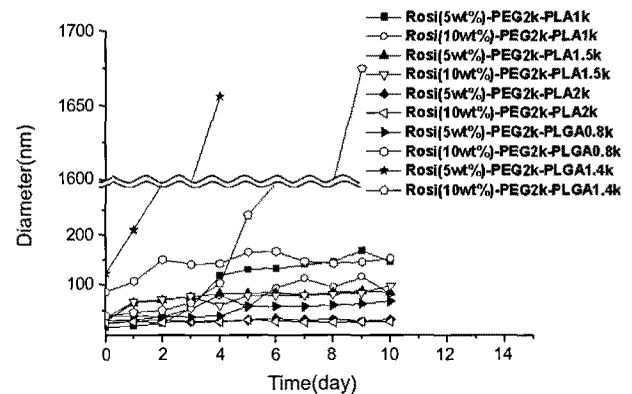


Figure 4. The colloidal stability of rosiglitazone loaded micelles in distilled water at 37 °C by DLS.

었다. PEG2K-PLGA1.4K의 경우는 상대적으로 긴 소수성 블록과 높은 약물봉입률로 같은 종류의 PEG2K-PLGA0.8K의 경우보다 안정성이 낮은 것으로 사료된다. 한편, Figure 5에서 보여지듯이 PBS (pH=7.4) 용액에서는 PEG2K-PLA2K의 경우만을 제외한 대부분의 약물함유 미셀들이 용해 후 수 십분 만에 응집 및 침전되는 것을 관찰할 수 있었다. 약물봉입후의 미셀의 안정성 저하는 피오글리타존의 경우에서도 보고되었고,¹⁹ 파클리탁셀(paclitaxel)과 같은 기타 다양한 약물함유 미셀에서도 보고된 바 있어³ 이러한 미셀의 수용액 내 안정

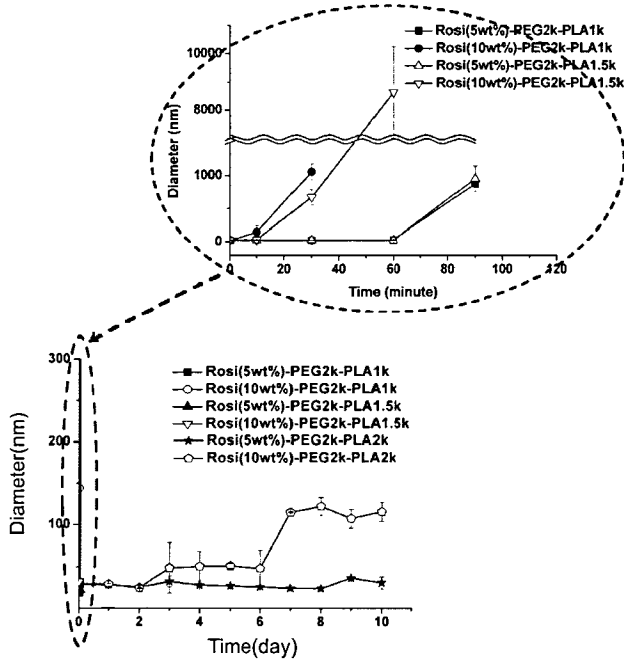


Figure 5. The colloidal stability of rosiglitazone loaded micelles in PBS at 37 °C by DLS.

성의 향상 또한 가용화와 함께 고려되어야 할 중요한 문제이다. 본 연구진은 이러한 미셀의 수용액 내 안정성을 향상시키기 위해 hydro-tropic agent를 사용하였다. Hydro-tropic agent (또는 hydro-trope)란 수용액에 잘 녹는 양친성 저분자 화합물로서,²⁴ minimal hydro-trope concentration (MHC) 이상에서 일부 hydro-trope들이 비극성 미세영역의 비공유결합 자기회합을 통해 난용성 화합물을 가용화시키는 것으로 알려져 있다.^{25,26}

PBS(pH=7.4) 용액에 로지글리타존이 5, 10 wt%로 함유된 PEG2K-PLA1.5K 미셀을 분산시킨 후, hydro-tropic agent의 일종인 HPNA를 0.1%(w/w)의 농도로 각각 첨가하였다. Figure 6에서 나타난 바와 같이 5, 10 wt% 약물함유 미셀들 모두 응집 및 침전현상이 현저히 저하되는 것을 관찰하였다. Hydro-tropic agent는 고농도로 약물의 가용화제로 주로 사용되었고, 최근 연구에서 고분자 구조에 도입함으로써 항암제의 가용화에 탁월한 효과를 보이는 것으로 보고되었다.^{13,16} 본 연구에서는 이러한 hydro-tropic agent의 사용이 고분자 미셀 제형의 안정성 향상에 효과적임을 보여주었고, 관련하여 보다 상세한 효과를 계속 연구 중에 있다.

세포 독성평가 및 동물실험. 합성된 고분자 미셀의 세포 독성평가를 위하여 사람의 구강 상피암 세포주인 KB cell을 이용하여 생체 외 세포 독성평가를 실시하였다. PEG-PLA(또는 PLGA) 미셀의 독성평가 결과는 UV-측정기를 통하여 MTT의 흡광도를 측정하였다. 0.1~1000 µg/100 µL의 5개의 농도 범위에서 48시간 동안 KB cell의 생존율을 측정한 결과 24시간에서는 모든 KB cell의 80% 이상이 생존하고 있음을 확인할 수 있었다. 반면, 48시간 경과 후, 농도가 10 µg 이하에서는 모든 KB cell의 50% 이상이 생존하고 있었으나 농도가 100 µg 이상에서는 일부 cell수가 20% 이하로 급격히 감소함을 알 수 있었다(Figure 7). 따라서, 생체 외 세포 독성평가 결과로 10 µg

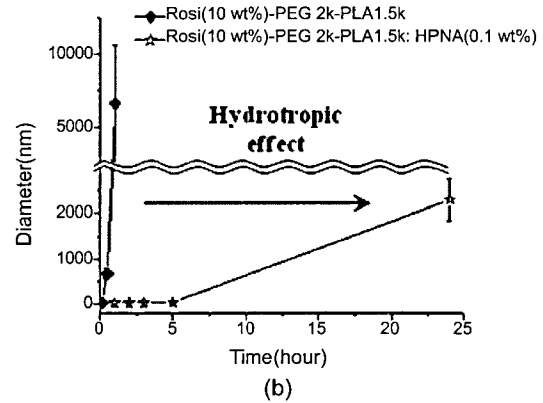
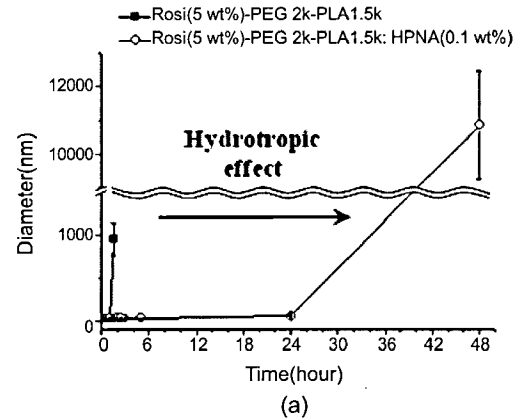


Figure 6. Enhanced colloidal stability of rosiglitazone 5 wt% (a); 10 wt% (b) loaded micelles by hydro-tropic agent (PBS, 37 °C).

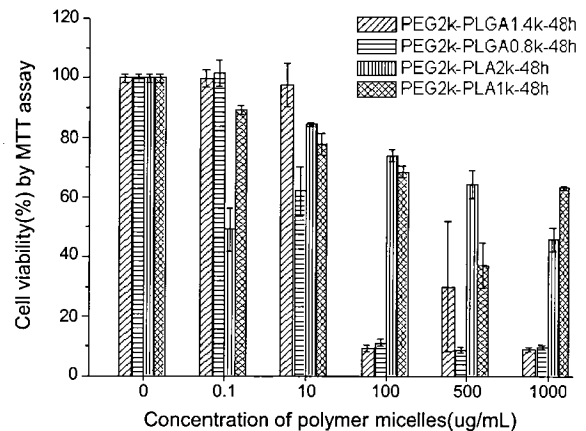


Figure 7. MTT assay result of PEG-PLA(or PLGA) copolymers.

이하 농도의 고분자 및 약물 봉입 미셀에서는 48시간 동안 독성이 거의 없음을 확인할 수 있으며 100 µg 이상인 경우 48시간 이상에서 세포 독성이 다소 관찰되는 것을 확인할 수 있었다.

실험동물에서 STZ 투여 후 혈당이 증가하는 원인은 glucose와 유사한 구조를 가진 STZ가 췌장 β-세포의 세포막에서 GLUT₂에 의해 β-세포 안으로 유입되고 유입된 후에는 베타세포의 인슐린 분비능과 관련된 당수송 및 당대사 과정에 관여하는 DNA를 알킬화 함으로써 베타세포의 손상 및 파괴를 유발하고 인슐린의 분비를 억제시키는 것에

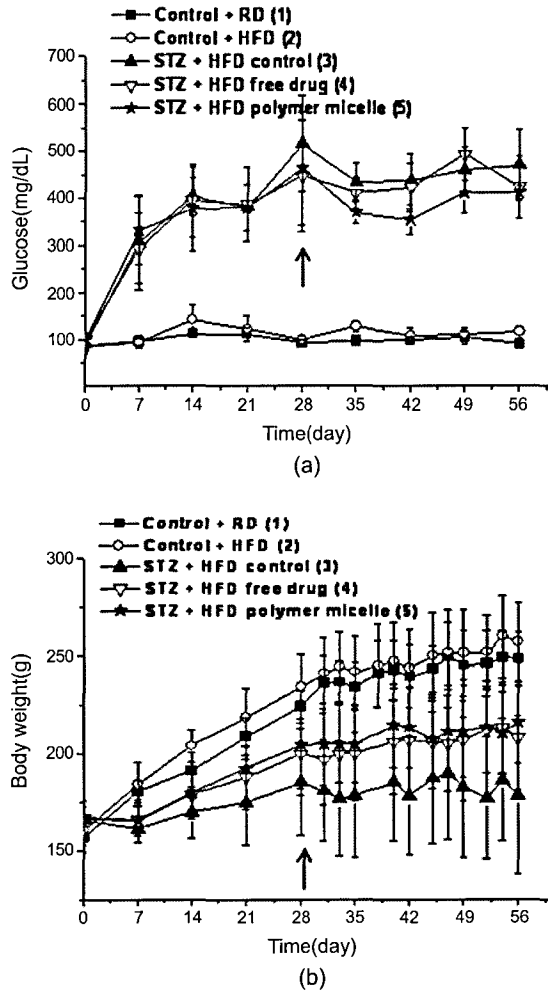


Figure 8. The blood glucose level (a); body weight (b) of rats.

기인한다. 이러한 인슐린 분비억제는 체내혈액 중의 당치료를 둔화시켜 결과적으로 혈당을 상승시키는 것이다. STZ를 주입한 쥐들은 대조군에 비해 물을 많이 먹는 것을 확인할 수 있었으며, 소변의 양도 많은 것을 확인할 수 있었다. 당뇨를 유발시킨 후 4주차에 약물 및 약물함유 PEG-PLA micelle을 투여하여 주마다 혈당 변화를 측정하면서 4주간 관찰하였다. Figure 8에 나타난 바와 같이 STZ가 투여되지 않은 당뇨 대조군 (1)과 (2)는 처음 혈당인 83.4와 88.6 mg/dL을 마지막 주인 8주까지 89.4와 115.2 mg/dL로 비슷하게 유지하였으며, 당뇨 쥐 그룹 (3), (4), (5)는 STZ를 투여하고 4주 동안 처음 혈당인 91.6, 99.33, 99.5 mg/dL에서 4주 후 각각 515.6, 447.8, 463.7 mg/dL로 혈당이 증가하였다. 이는 당뇨병이 유도되면서 STZ에 의해 인슐린 분비가 억제되고 그 결과 혈당이 상승한 것으로 보인다. 약물 (4) 및 약물이 봉입된 PEG-PLA micelle(5)을 투여하고 8주 후 당뇨 쥐의 혈당이 422.3과 412.2 mg/dL로 낮아진 결과로 보아 약물의 효능이 나타난 것으로 사료된다. 또한, 약물함유 PEG-PLA micelle(5)의 투여는 약물대조군인 로지글리타존(4)의 혈당저하 보다 우수한 것으로 나타났다. 당뇨병 모형군 (3),(4),(5)의 체중은 8주 군으로 갈수록 증가하였으나 그 증가량이 정상군 (1), (2)보다 현저히 적었다. 이는 인슐린의 분비가 억제되면서 혈액 내의 포도당을 글리코젠의 형태

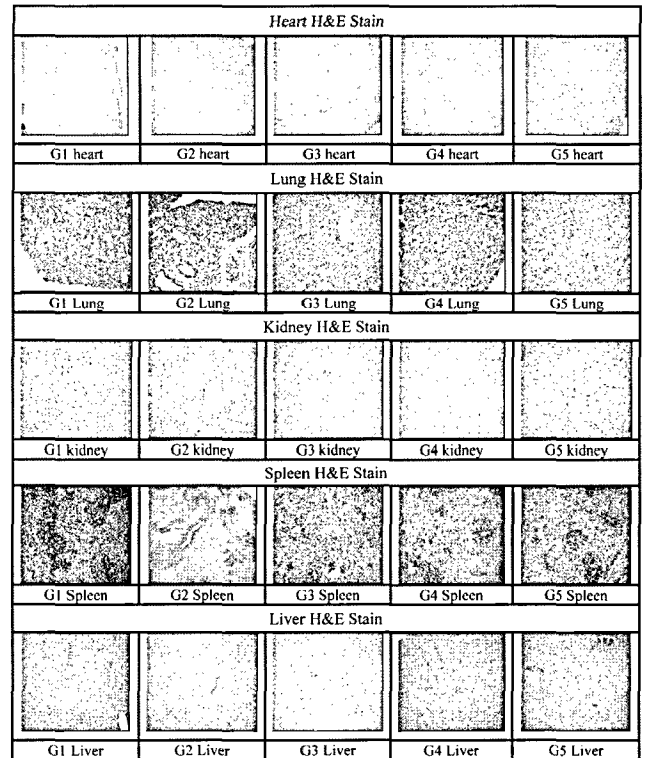


Figure 9. Histological staining of the organs of rats treated with rosiglitazone or drug loaded polymeric micelle at a dosage of 30 mg/kg. Panels G1, G2 and G3 were the heart, lung, kidney, spleen and liver in the control group (control+RD, control+HFD, and STZ+HFD control), respectively. Panels G4 and G5 were heart, lung, kidney, spleen and liver in the treated group (rosiglitazone and drug loaded polymeric micelle), respectively (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 100$).

로 저장시키지 못하고, 근육에서 단백질을 합성하기 위한 아미노산의 흡수를 촉진시키지 못하기 때문이다. 또한, 당뇨 쥐들의 컨디션이 정상군보다 현저히 떨어지기 때문에 먹이의 흡수가 원활하지 못한 것으로 추측된다.

로지글리타존을 포함한 thiazolidinediones 계열 2형 당뇨 치료제의 경우 약물 부작용으로 간독성 (hepatotoxicity),²⁷ 신독성 (nephrotoxicity),²⁸ 심근병증 (myocardopathy)²⁹ 등이 보고된 바, 본 연구에서 사용된 약물의 독성을 평가하기 위하여 약물투여 종료 후 주요 장기 (heart, kidney, liver, lung, spleen)를 채취하여 H&E 염색을 시행하였다. 조직검사 결과 치료군의 간(liver)에서 경미한 염증세포의 침윤이 관찰되었으나 대조군과 비교하여 차이는 없었으며, 각각의 약물을 투여한 군과 Control군 모두에서 조직과사 등 약물독성을 시사하는 조직손상소견이 관찰되지 않아 약물에 따른 부작용이 없거나 경미하다고 판단된다(Figure 9).

결론

본 연구에서는 생체적합성 고분자인 PEG-PLA (또는 PLGA)를 합성하고, 난용성 약물인 로지글리타존을 가용화하기 위한 고분자 미셀 제제로서의 특성을 평가하였다. 고체분산법을 이용하여 약물을 미셀 내

부로 효과적으로 봉입시킬 수 있었으며, hydrotropic agent인 HPNA의 사용으로 약물이 함유된 고분자 미셀의 수용액 내 안정성을 보다 향상시킬 수 있었다. 동물실험에서는 STZ로 유도한 당뇨 쥐에서 로지글리타존이 봉입된 PEG-PLA 미셀이 혈당저하에 효능을 갖는 것으로 검증되었으며 이 효과는 약물대조군인 로지글리타존의 효과보다 더 우수한 것으로 나타났다. 또한, 쥐의 장기와 조직들에서 약물에 따른 부작용이 없거나 경미하다고 판단되었다.

감사의 글: 본 연구는 지식경제부 소재원천기술개발사업과 교육과학기술부, 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업(이용규, 김준기)의 연구비 지원으로 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. S. K. Agrawal, N. Sanabria-DeLong, J. M. Coburn, G. N. Tew, and S. R. Bhatia, *J. Control. Release*, **112**, 64 (2006).
2. E. Blanco, E. A. Bey, Y. Dong, B. D. Weinberg, D. M. Sutton, D. A. Boothman, and J. Gao, *J. Control. Release*, **122**, 365 (2007).
3. J.-P. Xu, J. Ji, W.-D. Chen, and J.-C. Shen, *J. Control. Release*, **107**, 502 (2005).
4. A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, *J. Control. Release*, **77**, 155 (2001).
5. T. G. Park, W. Lu, and G. Crotts, *J. Control. Release*, **33**, 211 (1995).
6. R. T. Liggins and H. M. Burt, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 191 (2002).
7. L. Hongbo, J. Anna, G. Jian, and E. U. Kathryn, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **37**, 703 (1999).
8. Y. H. Bae, K. M. Huh, Y. Kim, and K.-H. Park, *J. Control. Release*, **64**, 3 (2000).
9. K. M. Huh and Y. H. Bae, *Polymer*, **40**, 6147 (1999).
10. G. Gaucher, M.-H. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J.-C. Leroux, *J. Control. Release*, **109**, 169 (2005).
11. G. S. Kwon and T. Okano, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **21**, 107 (1996).
12. S. C. Kim, D. W. Kim, Y. H. Shim, J. S. Bang, H. S. Oh, S. W. Kim, and M. H. Seo, *J. Control. Release*, **72**, 191 (2001).
13. K. M. Huh, S. C. Lee, Y. W. Cho, J. Lee, J. H. Jeong, and K. Park, *J. Control. Release*, **101**, 59 (2005).
14. A. Lavasanifar, J. Samuel, and G. S. Kwon, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 169 (2002).
15. Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki, and K. Kataoka, *J. Control. Release*, **82**, 359 (2002).
16. Y. W. Cho, J. Lee, S. C. Lee, K. M. Huh, and K. Park, *J. Control. Release*, **97**, 249 (2004).
17. K. Na, K. H. Lee, D. H. Lee, and Y. H. Bae, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **27**, 115 (2006).
18. T. Ooya, K. M. Huh, M. Saitoh, E. Tamiya, and K. Park, *Sci. Tech. Adv. Mater.*, **6**, 452 (2005).
19. J. H. Im, Y.-K. Lee, and K. M. Huh, *Polymer(Korea)*, **32**, 143 (2008).
20. B. L. Kolte, B. B. Raut, A. A. Deo, M. A. Bagoool, and D. B. Shinde, *J. Chromatogr. B*, **788**, 37 (2003).
21. J. M. Malinowski and S. Bolesta, *Clin. Ther.*, **22**, 1151 (2000).
22. G. Derosa, S. A. T. Salvadeo, A. D'Angelo, E. Fogari, P. D. Ragonesi, L. Ciccarelli, M. N. Piccinni, I. Ferrari, A. Gravina, P. Maffioli, and A. F. Cicero, *Arch. Med. Res.*, **39**, 412 (2008).
23. M. Hanefeld, R. Patwardhan, and N. P. Jones, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Diseases*, **17**, 13 (2007).
24. K. M. Huh, H. S. Min, S. C. Lee, H. J. Lee, S. Kim, and K. Park, *J. Control. Release*, **126**, 122 (2008).
25. C. R. E. Mansur, L. S. Spinelli, E. F. Lucas, and G. Gonzalez, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **149**, 291 (1999).
26. S. C. Lee, G. Acharya, J. Lee, and K. Park, *Macromolecules*, **36**, 2248 (2003).
27. K. G. Tolman and J. Chandramouli, *Clin. Liver. Dis.*, **7**, 369 (2003).
28. E. L. Kennedy, R. Tcho, and P. J. Harvison, *Toxicology*, **186**, 79 (2003).
29. R. Marfella, M. Portoghese, F. Ferraraccio, M. Siniscalchi, M. Babieri, C. Di Filippo, M. D'Amico, F. Rossi, and G. Paolisso, *Heart*, **95**, 1020 (2009).