

쥐 경동맥 손상 모델에서 Poly(*n*-butylmethacrylate) 혹은 Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)를 이용한 Paclitaxel 국소 전달 요법의 신생내막 형성 억제 효과

권진숙 · 이호연* · 허신행* · 박노관 · 심태진 · 김유경 · 김범수* · 김동운†

충북대학교 의과대학 내과학교실, *충북대학교 공과대학 화학공학부

(2008년 2월 18일 접수, 2008년 3월 22일 채택)

Inhibition of Intimal Hyperplasia by Perivascular Delivery of Paclitaxel Using Poly(*n*-butylmethacrylate) or Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in Balloon-Injured Rat Carotid Arteries

Jin-Sook Kwon, Ho-Yeon Lee*, Shin-Haeng Heo*, Rho-Kwan Park, Tae-Jin Shim, Yu-Kyug Kim, Beom Soo Kim*, and Dong-Woon Kim†

Department of Internal Medicine, College of Medicine,

Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

*Department of Chemical Engineering, College of Engineering,

Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

(Received February 18, 2008; Accepted March 22, 2008)

초록 : Poly(*n*-butylmethacrylate) (PBMA)와 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PHA)가 혈관 협착 방지를 위한 국소 약물 요법시 유용한 고분자인지 검정하였다. 10% paclitaxel 함유 필름으로부터 방출되는 paclitaxel은 초기 1주간은 빠르게, 30일까지는 중증도로, 이후는 천천히 방출되었다. Paclitaxel 함유 필름들은 풍선 손상을 가한 쥐 경동맥의 신생내막 증식을 억제하였다 (PBMA vs control : 0.03 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.01 mm², $p < 0.05$; PHA vs control: 0.04 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.01 mm², $p < 0.05$). PBMA와 PHA는 혈관 협착 방지를 위한 약물 전달 고분자로 유용할 것으로 사료된다. 고분자 필름은 혈관 외벽에 장착이 용이한 경우 사용될 수 있다. 또한, 이 고분자들은 약물 방출 스텐트 개발시 이용될 수 있다.

Abstract : Polymer is a critical component of local drug delivery to prevent restenosis. This study tested whether poly(*n*-butylmethacrylate) (PBMA) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PHA) was candidates for this purpose. *In vitro* release of paclitaxel from PBMA and PHA loaded with 10% paclitaxel exhibited a triphasic release profile, with a fast initial and intermediate second phase followed by a slow release phase. Perivascular delivery of paclitaxel using these films inhibited neointimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid arteries. The paclitaxel-loaded PBMA or PHA groups showed significant neointimal formation reductions versus the control groups (PBMA vs control: 0.03 ± 0.02 vs 0.10 ± 0.01 mm², $p < 0.05$; PHA vs control: 0.04 ± 0.03 vs 0.09 ± 0.01 mm², $p < 0.05$). This study suggests that PBMA and PHA could be good candidate polymers of local drug delivery to prevent restenosis. Perivascular delivery using these films represents a possible approach for prevention of restenosis. These can be candidate polymers for drug eluting stents.

Keywords : restenosis, drug delivery systems, polymers, paclitaxel.

서 론

최근 허혈성 심질환이나 만성신부전, 또는 말초혈관질환 환자에서 시행되는 경피적 관동맥중재술, 관동맥우회술, 동정맥루형성술, 말초혈관우회술 등의 초기 성공률은 매우 높은 편이나, 장기적으로는 많

은 경우에 있어 혈관 재협착이 일어난다.

관동맥성형술은 허혈성 심질환 환자에서 초기 성공률 90% 이상의 매우 유용한 치료방법이나, 시술 후 6개월 내에 30~50%에서 발생하는 재협착이 장기적인 성공의 걸림돌이 되고 있다.^{1,2} 이러한 재협착의 기전으로는 탄성반도, 혈전형성과 결체조직의 구조화, 내막증식 및 후기 혈관벽 재형성 등이 기초 및 임상적 연구결과로 제시되고 있다.^{3,4} 현재 많이 시행되는 관동맥 스텐트 삽입술은 탄성반도와 혈

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kdwoon@chungbuk.ac.kr

관벽 재형성을 효과적으로 방지하여 재협착률을 약 10% 정도 낮출 수 있었으나, 이 경우 내막의 증식은 더 심한 정도로 유발되어 스텐트 삽입후 재협착(in-stent restenosis)이 발생하는 것으로 되어있다.⁵ 이러한 문제점을 해결하고자 최근에는 내막증식을 억제하는 약물을 사용한 약물 방출 스텐트를 임상에 도입해서 사용하고 있고, 그 결과 재협착률을 획기적으로 줄일 수 있었다.⁵⁻⁸ 이러한 약물 방출 스텐트의 약제로는 paclitaxel과 sirolimus(rapamycin)가 주로 사용되고 있으며, 현재까지의 그 임상 성적은 짧지만 우수하다.⁵⁻⁸ 그러나, 약물 방출 스텐트의 경우 스텐트를 삽입할 수 없는 경우에는 사용할 수 없다는 단점이 남아 있다. 관동맥우회술의 경우에는 경피적 관동맥중재술에 비해 장기적 혈관개통률이 높은 반면, 개흉술이라는 큰 수술이 필요하며 재협착으로 인한 재수술시에는 수술 난이도와 사망률이 높으며, 성공률도 현저히 저하되는 것으로 알려져 있고, 만성신부전 환자들이 혈액 투석을 위해 시행받는 동정맥루형성술(arterio-venous shunt)이나 동정맥우회 이식 수술도 많은 빈도수에서는 재협착으로 재수술하여야 하는 경우가 많다.

이론적으로 혈관의 재협착은 시술된 혈관 주변의 국소 부위에서 일어나는 현상이므로, 재협착을 방지하기 위해서는 전신적인 치료요법보다는, 고농도의 약물투여가 가능한 국소약물요법(local drug therapy)과 같은 부위특이적인(site-specific) 치료가 더 유용할 가능성이 있다. 최근 각광을 받고 있는 약물 방출 스텐트도 이러한 부위특이적인 치료방법의 하나로 볼 수 있다.⁵⁻⁸ 이러한 국소 부위의 약물전달에 있어서 중요한 것은 효과적인 약물과 적절한 약물 전달체의 선택이다. 적절한 약물 전달체의 선택은 약물의 선택과 마찬가지로 매우 중요하며, 약물의 전달 속도 조절 등에도 매우 중요한 역할을 한다. 약물 전달체는 국소 부위에 사용되는 만큼 이식된 체내에서 염증 반응 등의 부작용을 일으키지 않으면서 안정적으로 약물을 방출하는 능력을 갖고 있어야 한다. 이외에도 국소 부위에 시술되기 때문에 술자의 의도대로 성형이 가능하여야 한다. 또한, 약물 방출 스텐트에서 대부분 고분자를 전달체로 사용하고 있으며, 이상적인 전달체의 발굴이 매우 중요하다.

국소전달요법에 관한 현재의 연구들은 주로 약물 방출 스텐트에만 집중되어 있는게 현실이다. 관동맥우회술, 동정맥루형성술, 말초혈관우회술 등의 경우에는 혈관 외벽을 통한 약물의 국소전달 요법이 전신부작용도 적으면서 그 효과가 매우 유용할 것으로 사료되나, 이 분야의 연구는 아직까지 미흡한 상태이다.

임상적으로 현재 매우 중요한 위치를 차지하고 있는 약물 방출 스텐트에 개발에 있어, 직접 스텐트를 사용하여 개발을 할 경우 매우 높은 비용과 시간이 소요된다. 그러므로, 적은 비용과 노력으로 실험을 할 수 있는 혈관 외벽을 통한 협착 방지 연구 결과는 약물 방출 스텐트에서 사용될 수 있는 후보 약물 발굴 및 용량 결정, 약물 방출 역동학, 후보 고분자를 선택하는데 큰 도움을 줄 수 있을 것이다.

본 연구진은 외부 온도에 따라 그 성상을 달리하는 Pluronic gel을 이용하여 혈관 외벽을 통한 paclitaxel의 전달이 혈관 재협착을 억제할 수 있다는 결과를 보고한 바 있다.⁹ 이러한 젤 형태의 전달체는 취급이 용이하고, 약물 방출 능력이 뛰어나지만 체내에서 머무는 시간이 너무 짧고, 또한 혈관에 도포시 일률적으로 도포가 되지 않고 쏠림 현상이 발생한다는 단점을 갖고 있으며, 약물 방출 스텐트의 고분자로 사용할 수 없다. 이런 이유로 본 연구에서는 좀 더 취급이 용이하

고 안정적으로 약물을 전달할 수 있는 필름 형태의 paclitaxel 함유 고분자를 제작하여 혈관의 재협착을 효과적으로 방지하는지를 알아보고자 하였다.

Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL), polyhydroxyalkanoates 등의 생분해성 고분자는 수술용 봉합사, 약물전달, 조직공학 등의 의료분야에 폭넓게 활용되어 왔다.¹⁰⁻¹² 본 연구에서는 생분해성 고분자로 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)와 비분해성 고분자로 poly(*n*-butylmethacrylate) (PBMA)를 사용하여 paclitaxel을 포함한 필름을 제조하여 손상된 혈관 외벽에 장착함으로써 혈관 재협착 방지 효과를 알아보고자 하였다. 또한, 이 연구의 결과는 약물 방출 스텐트 개발에 있어 전 단계 연구로도 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

실 험

연구대상. 본 실험의 연구대상은 8주령의 체중 230-250 g의 수컷 Sprague-Dawley Rat (중앙실험동물(주), 서울, 대한민국) (n=23)을 구입하여, 실험 전 2 주간의 안정기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 실험 백서들은 무게를 제한하여 크기에 의한 차이를 배제하였으며, 모두 숫놈의 백서를 사용하여 성별에 의한 차이도 없었다.

Paclitaxel 함유 필름의 제조. 비분해성 고분자 poly(*n*-butylmethacrylate) (PBMA)와 polystyrene-*b*-polybutadiene-*b*-polystyrene(SBS)는 Aldrich에서 구입하였다. 생분해성 고분자 poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) (PHA)는 Ralstonia eutropha(ATCC 17699)를 유가식 배양하여 균체를 얻은 후 chloroform으로 추출, 정제하였다.¹³ 합성된 고분자의 4-hydroxybutyrate의 조성은 3.5 mol%였다.

실험에 사용된 paclitaxel은 삼양 제넥솔(삼양 제넥스)을 사용했으며, 이 제품에는 paclitaxel이 99% anhydrous base로 들어있다.

분말상태의 paclitaxel 2 mg과 고분자 18 mg을 1 mL의 dichloromethane에 용해시킨 후 제형을 위해 유리관 사이에 부어 일정한 두께로 제형을 완성하였다. 완성된 필름 형태의 제형은 실온에서 24시간 이상 건조시켜 dichloromethane을 제거하였다. 완성된 paclitaxel 함유 필름의 두께는 약 40 μ m였으며, 이를 9×10 mm의 크기로 절단하여 200 μ g의 paclitaxel을 함유하도록 제조하였다.

Paclitaxel과 분자량이 유사하고 붉은색의 염료로 *in vitro* 및 *in vivo* 실험에서 방출확인이 쉬운 rose bengal을 paclitaxel 대신 첨가해 필름을 제조하였다. Rose bengal 20 mg을 2 mL 에탄올에 녹인 후, 고분자 180 mg을 8 mL dichloromethane에 녹인 용액과 합쳐 위와 동일한 방법으로 필름을 제조하였다. 이렇게 제조된 rose bengal 함유 필름은 동물 실험에서 대조군으로 사용하였다.

기계적 특성 및 필름의 약물 방출 속도 측정. 만능재료시험기(UTM, LR-30K, LLOYD Instrument)를 사용하여 PBMA, SBS, PHA에 대한 인장 특성을 측정하였다. 두 비분해성 필름과 생분해성 필름을 이용하여 혈관 외벽에 감을 수 있는 필름을 제조하여 고분자의 종류에 따른 약물 방출 특성을 조사하였다. 각 필름들은 10%(w/w)의 paclitaxel을 함유하도록 제조하였다.

Paclitaxel이 함유된 필름을 쥐의 총경동맥(common carotid artery)과 비슷한 크기의 지름 1 mm의 스테인레스 스틸에 감아 50 mL의

phosphate buffered saline (PBS) 용액이 담긴 용기에 넣은 후, PBS 위에 50 mL 옥탄올을 층을 이루도록 주입하여 PBS 내로 방출된 paclitaxel이 다시 옥탄올 층으로 모이도록 유도하였다. 37 °C에서 일정기간 동안 방치한 후 각 시간대별로 옥탄올 층의 시료를 채취하여 spectrophotometer를 이용, 240 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 모두 3번씩 측정하여 표준편차를 나타내었다.

쥐 경동맥 손상 모델. 실험 쥐에 ketamine (50 mg/kg)과 xylazine (6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 마취시킨 후, 우측 경부(neck)를 절개하여 총경동맥, 외경동맥(external carotid artery) 및 내경동맥(internal carotid artery)을 분리한다. Microvascular clamp (Acland, S & T, Switzerland)를 총경동맥의 기시부와 내경동맥의 원위부에 착용시켜 혈류를 일시적으로 중단시킨 상태에서 외경동맥을 절개한다. 절개부위에 2F 풍선도자(Fogarty catheter, Baxter Healthcare Corporation, USA)를 우측 총경동맥으로 삽입하고, 총경동맥의 직경보다 크게 풍선을 부풀린 상태에서 3회를 왕복시켜 인

위적으로 내피세포를 제거한 후 microvascular clamp를 제거하여 혈류를 재관류시켰다. 경동맥의 외부에 분비물 및 혈액을 깨끗이 제거한 후, paclitaxel 함유 필름 혹은 rose bengal 함유 필름으로 혈관 주위를 감싼 후 6호 silk를 이용해 고정시켰다(Figure 1). 이러한 일련의 시술 과정에서 시술자는 대조군과 paclitaxel 치료군을 사전에 전혀 알지 못하도록 하는 맹검법을 이용하여 연구가 이루어졌다.

쥐 경동맥 병리 조직 검사 및 분석. 쥐 경동맥 손상 모델에서 paclitaxel 치료군과 대조군을 약물을 도포한 14일 후에 다시 ketamine (50 mg/kg)과 xylazine (6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 전신 마취를 시키고 복부 정중선을 절개하였다. 복부대동맥에 18 gauge의 catheter를 삽입한 후 catheter 내부로 10% formalin 용액을 100 mmHg의 압력으로 흘려 보냈다. 그 후 즉시 경정맥(jugular vein)을 절단하여 방혈하고, 실험동물을 5분간 관류고정 시켰다. 이후 우측 경동맥을 적출하여 10% formalin 용액에 고정시켜 wax embedding sample로 제작한 후, 샘플 절편의 두께가 4 μm 이하가 되도록 절단하여 표본을 만들었다. 이 표본을 hematoxylin-Eosin 염색을 시행하여 광학 현미경으로 관찰하여 분석하고 image acquisition & processing system (FOCUS)을 이용하여 quantitative morphometry 분석을 시행하는 방법으로 실험을 진행하였다. 분석에 사용하는 변수들은 신생내막의 면적, 중막의 면적, 신생내막과 중막의 면적비, 내강 면적, 혈관면적, 협착정도 등을 사용하였다. 혈관면적은 내강면적, 내막면적 및 중막면적의 합으로 정의하였다.

통계처리. 모든 자료의 값은 평균±표준편차로 표시했다. 대조군과 paclitaxel 치료군 간의 측정값의 차이 및 유의성은 unpaired student t-test를 통해 검증하고, p 값이 0.05 미만인 경우에 통계적인 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 토론

필름의 기계적 특성 분석. 물질의 신장력을 나타내는 파단신장률은 PBMA 필름은 8.2%, SBS 필름은 1830%이었다. 물질을 끌어당길 때 균열되지 않고 버틸 수 있는 최대 하중을 나타내는 인장강도는 PBMA 필름은 5.5 MPa, SBS 필름은 6.1 MPa이었다. Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)의 물성은 4-hydroxybutyrate의 함량에 따라서 변하여, 인장강도 17-104 MPa, 파단신장률 5-1320% 범위로 알려져 있다.¹⁴ 본 연구에서는 3.5 mol% 4-hydroxybutyrate 조성의 PHA를 사용하였으며, 인장강도는 27.7 MPa, 파단신장률 59.1%이었다.

고분자 필름은 혈관 외벽에 감기 위해서 유연성과 함께 신장력과 인장강도 등이 커야 한다. 그러나 신장력이 뛰어난 SBS의 경우는 필름 표면이 접착성을 띠어 다루기 어려웠다. 그에 비해 PBMA와 PHA는 신장력은 약하지만 표면에 접착성이 없고 혈관 외벽에 감는 경우 형태를 유지하는 능력이 뛰어났다. 따라서 PBMA와 PHA를 동물 실험에 사용하였다.

필름의 약물 방출 속도 분석. Paclitaxel을 함유한 필름은 약 50일 기량 측정한 결과 37 °C에서 PBMA는 약 26%, SBS 약 15%, PHA는 약 13%의 방출량을 보였다(Figure 2). 약물의 방출 속도는 초기 1주일 정도에 가장 빠르고 이후 30일 정도까지 중등도의 속도로 방출되었고, 이후 매우 천천히 방출되었다. 약물 방출 특성은 약물 및 고분

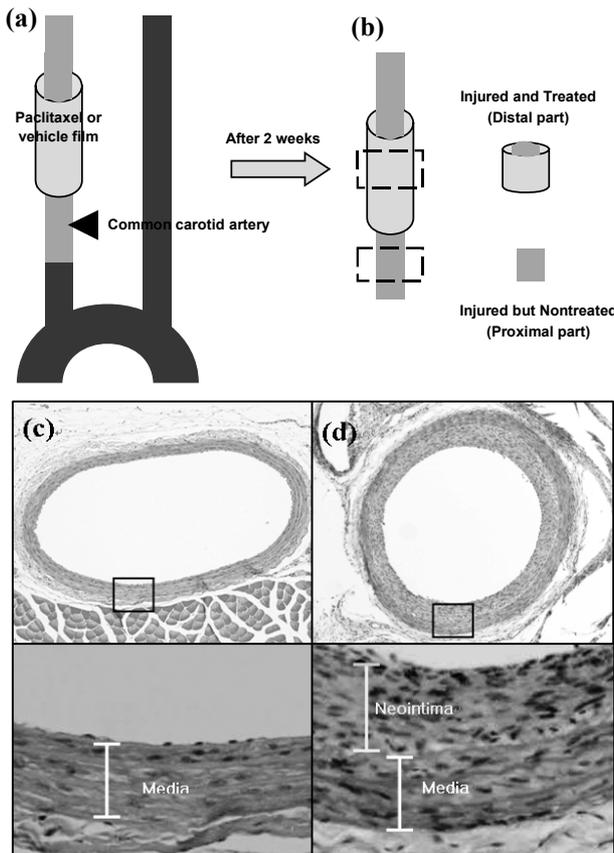


Figure 1. (a) Immediately after injury of the right common carotid artery, a 1-cm-long distal segment of the artery was exposed and treated with paclitaxel-loaded or control films. (b) Two weeks after injury, injured carotid arteries were harvested and histomorphometric analysis was performed with film-implanted and no film-implanted regions. (c) The representative arterial cross-section of the noninjured common carotid artery. (d) The representative arterial cross-section demonstrating the significant neointimal hyperplasia 2 weeks after balloon injury.

자의 친수성/소수성 정도, 분자량, 약물과 고분자 사이의 친화력 등이 복합적으로 약물 방출 속도에 영향을 주어 나타난 결과로 생각된다.

형태조직학적 분석. 치료군과 대조군의 병리조직학적 소견을 경동맥 손상 14일째에 비교해 보면, 치료군에서 신생내막의 형성이 현저하게 경동맥의 내강면적이 넓어지는 것을 확인하였다(Figures 3, 4). Paclitaxel-loaded PBMA 필름군(n=7)의 신생내막의 면적은

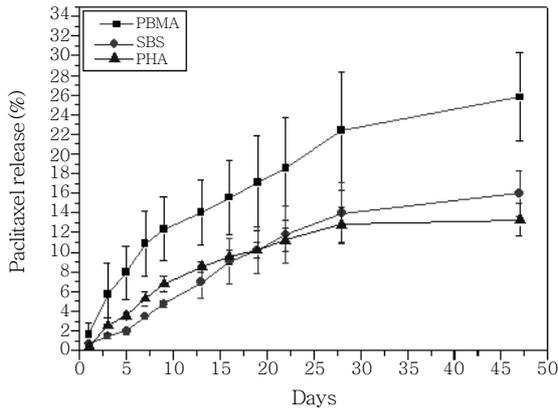


Figure 2. *In vitro* release profile of paclitaxel from PBMA, SBS and PHA polymers loaded with 10% paclitaxel. Polymers exhibited a triphasic release profile, with a fast initial and intermediate second phase followed by a slow release phase. Values are mean \pm standard deviation.

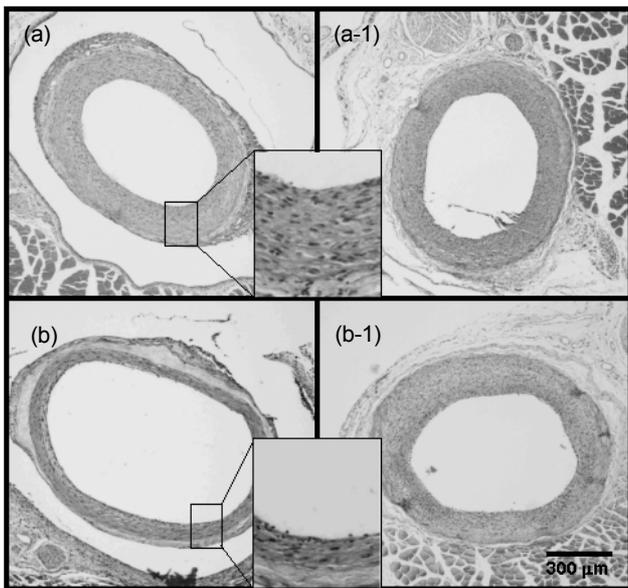


Figure 3. Representative photomicrographs of arterial cross-sections demonstrating the marked inhibition of intimal hyperplasia by perivascular paclitaxel released from PBMA films for 14 days. Hematoxylin-Eosin stain. Bars represent 300 μ m. (a) Control delivery polymer devoid of paclitaxel did not inhibit intimal hyperplasia in balloon-injured arteries. (b) Paclitaxel markedly inhibited intimal hyperplasia in treated balloon-injured arteries (a-1) and (b-1). Balloon-injured but nontreated common carotid arteries of both animals exhibited a marked intimal hyperplasia.

$0.03 \pm 0.02 \text{ mm}^2$, 대조군(n=5)은 $0.10 \pm 0.01 \text{ mm}^2$, paclitaxel-loaded PHA 필름군(n=5)의 신생내막의 면적은 $0.04 \pm 0.03 \text{ mm}^2$, 대조군(n=4)은 $0.09 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ 로 치료군의 신생내막의 형성이 PBMA 필름의 경우 70%와 PHA 필름의 경우 60% 감소하였다 ($p < 0.05$, Table 1).

신생내막의 형성 감소로 내강면적은 PBMA 필름의 경우 paclitaxel 치료군에서는 $0.32 \pm 0.04 \text{ mm}^2$, 대조군에서는 $0.19 \pm 0.03 \text{ mm}^2$, PHA 필름의 경우 paclitaxel 치료군에서는 $0.28 \pm 0.06 \text{ mm}^2$ 인 것에 비해 대조군에서는 $0.21 \pm 0.05 \text{ mm}^2$ 로 넓어졌다($p < 0.05$). PBMA와 PHA 두 형태의 필름 모두 paclitaxel 대조군에 비하여 치료군에서 혈관의 재협착을 방지한 것으로 확인되었다.

도포된 Paclitaxel 효과의 국소성. Paclitaxel-loaded 필름을 혈관외벽에 장착하였을 경우, 혈관의 신생내막 억제 효과는 필름이 감긴 부분에만 국소적으로 나타났다(Figure 3(B) and 4(B)). 흉곽 내부에 위치하여 필름의 장착이 불가능했던 근위부 총경동맥은 대조군과 같이 신생내막의 증식으로 혈관 내경이 좁아지는 것이 관찰되어 paclitaxel의 혈관협착방지 효과가 도달하지 않았음을 확인했다.

토론. 국소 약물 전달 요법은 특정 부위에 약물치료를 가능하게 하고 전신 투여 시 발생할 수 있는 전신적 부작용을 배제할 수 있다. 이러한 국소적인 약물 전달 요법을 가능하게 하기 위해서는 물론 약물의 선택이 중요하지만, 효과적인 약물 전달 기법을 개발하는 것이 더 중요할 수도 있다. 특히 다른 여타의 질병과 달리 혈관질환은 그 적용 부위가 매우 협소하고 그 내부에는 항상 혈액이 흐르고 있기 때문에 약물의 전달이 여의치 않고 전달된다 하더라도 빠른 속도로 손실이 일어나기 때문에 약물이 유효한 농도로 다다르는데 어려움이 많다. 이러한 어려움을 극복하고자 많은 연구가 진행되어 왔으며 가장 성공적인 혈관내 약물 전달 시스템이 약물 방출 스텐트(drug eluting stent)이다.⁵⁻⁸ 그러나 이러한 스텐트만으로는 해결될 수 없는 혈관 질환도 매우 많다. 이러한 점에 대한 대안으로 본 연구진에서는 이미 온도 민감성 겔(Pluronic gel)을 이용한 paclitaxel의 국소 전달 체계가 효과적으로 신생내막의 형성을 억제한다는 결과를 발표하였다. 그러나 이 경우 좀 더 뚜렷한 효과를 보기 위해 paclitaxel을 고농도로 투여할 경우 혈관 평활근 세포에 독성이 나타나는 문제와 겔의 형태를 갖고 있기 때문에 혈관의 전면에 일률적으로 약물이 농도를 유지할 수 없다는 문제가 있다는 것을 보고하였다.⁹ 이외

Table 1. Histomorphometric Indices of Balloon-Injured Carotid Arteries at 14 days

	PBMA film		PHA film	
	Control film	Paclitaxel-film	Control film	Paclitaxel-film
Luminal area (mm^2)	0.19 ± 0.03	$0.32 \pm 0.04^*$	0.21 ± 0.05	$0.28 \pm 0.06^*$
Neointima area (mm^2)	0.10 ± 0.01	$0.03 \pm 0.02^*$	0.09 ± 0.02	$0.04 \pm 0.03^*$
% Stenosis (%)	$34.3 \pm 4.0^*$	$7.9 \pm 5.0^*$	$31.0 \pm 8.5^*$	$11.4 \pm 8.1^*$
Neointima/media ratio	$0.98 \pm 0.12^*$	$0.27 \pm 0.16^*$	$1.03 \pm 0.25^*$	$0.36 \pm 0.22^*$
Media area (mm^2)	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01

* $p < 0.05$ vs control.

에도 겔의 경우에는 체내 흡수 속도가 너무 빠르기 때문에 장기적인 효과를 기대하기 어렵다는 단점이 있다. 본 연구에서는 좀 더 약물 전달이 안정적이고 일률적이며 방출 기간을 연장할 수 있는 방법을 찾기 위해 노력하였다.

Paclitaxel을 방출하는 필름 형태의 약물 전달 시스템은 주로 항암 치료를 위해 많은 연구가 이루어 졌다.^{15,16} 이러한 경우 대부분 상당히 큰 크기의 종양을 치료하기 위한 것이기 때문에 형태나 필름 자체의 강도나 유연성에는 큰 제한을 갖지 않는다. 그러나 혈관에 감는 형태의 필름 형태를 만족하기 위해서는 강도도 중요하지만 특히 필름의 유연성이 무엇보다도 중요하다.

본 연구에서 사용한 PBMA와 PHA 고분자 필름은 파단 신장률 범위는 8~59%로 크지는 않았으나 접착성이 없어 다루기 쉽고 혈관 외벽에 감을 수 있을 정도의 유연성은 가지고 있으면서 강도도 우수해 사용하는데 큰 문제가 없었다. PBMA 필름이 설치 동물 실험에서 좀 더 다루기 쉬웠으며 이러한 점은 혈관 외벽에 필름이 밀착되도록 하는데 매우 유용한 점이 되었다. 그러나 SBS 필름의 경우 유연성은 매우 뛰어나지만 표면의 접착성이 너무 강해서 혈관 외벽에 시술 시 필름간에 서로 붙어버리는 문제를 야기하였다. 이러한 점은 실질적으로 임상에서 응용하고자 할 때 단순히 필름의 강도나 유연성뿐만 아니라 필름 표면 성질에 대한 고찰을 필요로 할 것이라는 점을 나타내는 중요한 결과라 하겠다.

이 연구 외에도 혈관 외벽으로 고분자를 이용하여 paclitaxel을 전

달한 연구들이 있다.¹⁷⁻²⁰ 이 연구들에서는 비분해성 고분자 ethylene vinyl acetate copolymer, 생분해성 고분자 PCL, PLGA를 사용하였으며, 혈관 협착 방지 효과가 좋았다. 그러나, 이 고분자들은 약물 방출 스텐트로 만들어 돼지 관동맥에 삽입한 실험에서는 심한 염증 반응을 일으키는 것이 관찰되었다.^{21,22}

PBMA는 Cordis사의 약물방출 스텐트의 base coat로 이용되고 있으며 혈전 형성 등 생체 적합성이 검증된 고분자로 본 연구에서 비분해성 고분자로 선정하였다.²³ PHA는 양모델에서 혈액에 직접 노출되는 심장 판막의 조직공학에 성공적으로 적용된 바 있으며, 미국의 Tepha 사에 의해 cytotoxicity, sensitization, irritation, hemocompatibility 등의 평가가 이루어져 생체 적합한 의료용 고분자로 추천되고 있다.²⁴ 혈관 외벽으로 약물을 투여하는 방법으로 혈관 협착을 방지하는 것이 본 실험의 일차적인 목적이다. 그러나, 약물 방출 스텐트 개발에 있어 전 단계 연구로도 활용될 수 있을 것으로 기대되기 때문에, 혈액과 직접 노출되는 실험에 사용되어 생체 적합성이 검증된 PBMA와 PHA 고분자 필름을 선택하여 사용하였다.

비분해성 고분자를 사용하여 약물 전달을 하는 경우에는 약물 농도 기울기에 따른 확산에 의해 약물이 방출된다. 이 경우 초창기에는 빠르게 약물 분비가 일어나다가 서서히 줄어든다. 약물 분비 속도의 조절은 약물과 고분자의 비율에 의해 조절할 수 있다. 또한 고분자의 종류 및 농도의 변화로 조절할 수도 있다. 약물이 지용성인가 수용성인가에 따라서 약물 농도의 유지를 위한 전략이 다를 수 있다.²⁵ 생분해성 고분자를 사용한 경우에는 고분자의 표면이 erosion이 일어나면서 약물이 분비되는 방법을 이용할 수도 있다.²⁶

Paclitaxel의 조직내 농도를 직접 측정하는 것은 일반적으로 사용되는 liquid chromatography를 이용한 방법으로는 불가능하고, 방사선 동위 원소인 [³H]paclitaxel을 이용하여 측정할 수 있다. 그러나 이것도 방사선 동위 원소를 다루어야 하고 작은 조직에서는 기술적으로 매우 어려워, 본 실험에서 실시하지 못했다는 제한점이 있다. Creel 등은 양의 경동맥을 적용하여 *in vitro* 환경에서 혈관 외벽으로 [³H]paclitaxel을 적용하였을 때 시간에 따라 약물이 혈관의 내벽 쪽으로 적절히 잘 분포하였다고 보고하였다.²⁷ 본 연구에서 사용한 *in vitro* 방출거동 및 조직학적 신생내막억제 효과와 Creel 등의 보고 결과 등을 종합하면 혈관 외벽으로 적용한 paclitaxel이 혈관 내벽 쪽으로 적절히 침투하여 신생내막 억제 효과를 내었을 것으로 생각된다.

쥐 경동맥 손상 모델을 이용한 효과 검증에서도 paclitaxel이 포함된 PBMA와 PHA 필름이 혈관 재협착률을 약 70% 정도 감소시켰다. 이것은 필름으로부터 방출된 paclitaxel이 어떠한 기능적인 손실 없이 방출된 후 체내에서 정상적으로 작동하고 있음을 알려주는 결과라 하겠다. 또한 PHA 필름은 박테리아의 성장 과정에서 얻어지는 생분해성 물질로서, 체내에서 가수분해 또는 esterase에 의해 분해된다. Poly(4-hydroxybutyrate)의 체내 분해는 porosity에 의존하는 것으로 보고되었으며 분해기간은 80% porosity sample의 경우 10주에 완전히 분해되는 되는 것으로 알려져 있다.²⁴ 이러한 점은 체내에 지속적으로 고분자가 남아 있게 됨으로써 발생할 수 있는 염증 반응 등의 부작용을 줄일 수 있다는 장점을 갖게 될 것이다.

혈관 손상 후 재협착 발생 과정에서 첫 수주간은 신생내막의 증식이 매우 활발하여 이 기간에 신생 내막을 효과적으로 억제하기 위해서는 고농도의 증식 억제 약물이 필요하다. 그러나, 이 시기 이후에는

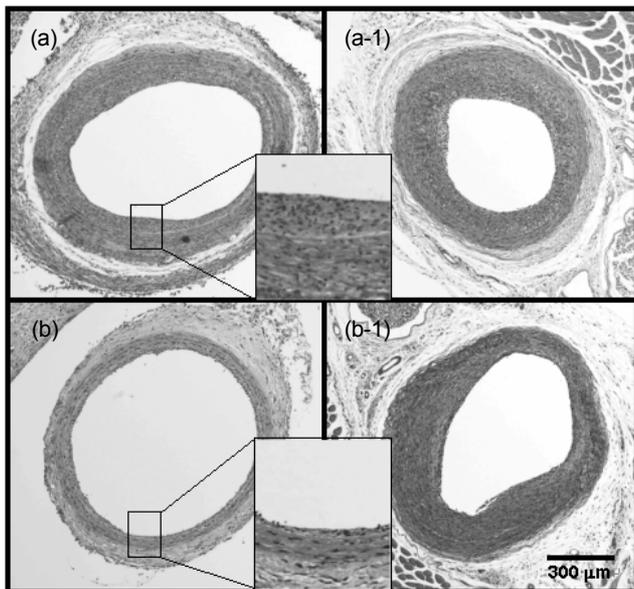


Figure 4. Representative photomicrographs of arterial cross-sections demonstrating the marked inhibition of intimal hyperplasia by perivascular paclitaxel released from PHA films for 14 days. Hematoxylin-Eosin stain. Bars represent 300 μ m. (a) Control delivery polymer devoid of paclitaxel did not inhibit intimal hyperplasia in balloon-injured arteries. (b) Paclitaxel markedly inhibited intimal hyperplasia in treated balloon-injured arteries (a-1) and (b-1). Balloon-injured but nontreated common carotid arteries of both animals exhibited a marked intimal hyperplasia.

신생 내막 억제 효과를 유지하면서 혈관 내피 세포의 회복을 방해하지 않는 정도로 약물을 유지하여 내피 세포가 회복되게 하여 혈전 발생 등의 부작용을 막을 수 있게 하는 것이 바람직하다. 이번 실험에 사용된 PBMA와 PHA 고분자 필름으로부터 방출되는 paclitaxel은 초기 1주일 정도에 가장 빠르고 이후 30일 정도까지 중등도의 속도로 방출되었고, 이후 매우 천천히 방출되었다. 그래서 본 실험에 사용된 고분자는 약물 방출 특성이 재협착 방지에 사용하기에 매우 적합한 고분자로 생각된다. 향후 약물 방출 스텐트에도 사용될 수 있을 것으로 기대된다

결 론

PBMA와 PHA 고분자 필름으로부터 방출되는 paclitaxel은 초기 수주간은 많은 양이, 이후에는 매우 천천히 방출되었다. 이런 방출 특성은 재협착 방지 목적에 적합하다. 이 고분자 필름들을 이용한 paclitaxel 혈관 외벽 국소 전달법은 신생내막의 형성을 효과적으로 억제하여 혈관 협착을 방지하였다. 그러므로, PBMA와 PHA는 재협착 방지를 위한 국소 약물 요법에 적합한 고분자로 생각된다. 이 고분자 필름을 이용한 약물 전달 방법은 임상적으로는 관동맥우회술, 동정맥루형성술, 말초혈관우회술 시술 등 혈관외벽에 장착이 비교적 용이하며, 내벽으로의 전달에 많은 제약이 있는 경우에 유용하게 사용될 수 있을 것이다. 또한 이 고분자들은 약물 방출 스텐트 개발시 후보 고분자로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글 : 본 연구는 산업자원부 지방기술혁신사업(과제번호 RTI04-03-06)와 보건복지부 보건의료기술진흥사업(과제번호 : 0405-ER01-0304-0001)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

참 고 문 헌

- J. J. Popma, R. M. Califf, and E. J. Topol, *Circulation*, **84**, 1426 (1991).
- P. de Groote, C. Bauters, E. P. McFadden, J. M. Lablanche, F. Leroy, and M. E. Bertrand, *Circulation*, **91**, 968 (1995).
- J. S. Forrester, M. Fishbein, R. Helfant, and J. Fagin, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **17**, 758 (1991).
- J. W. Currier and D. P. Faxon, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **25**, 516 (1995).
- A. Farb, P. F. Heller, S. Shroff, L. Cheng, F. D. Kolodgie, A. J. Carter, D. S. Scott, J. Froehlich, and R. Virmani, *Circulation*, **104**, 473 (2001).
- A. Gershlick, I. De Scheerder, B. Chevalier, A. Stephens-Lloyd, E. Camenzind, C. Vrints, N. Reifart, L. Missault, J. J. Goy, J. A. Brinker, A. E. Raizner, P. Urban, and A. W. Heldman, *Circulation*, **109**, 487 (2004).
- D. R. Holmes, Jr., M. B. Leon, J. W. Moses, J. J. Popma, D. Cutlip, P. J. Fitzgerald, C. Brown, T. Fischell, S. C. Wong, M. Midei, D. Snead, and R. E. Kuntz, *Circulation*, **109**, 634 (2004).
- S. J. Park, W. H. Shim, D. S. Ho, A. E. Raizner, S. W. Park, M. K. Hong, C. W. Lee, D. Choi, Y. Jang, R. Lam, N. J. Weissman, and G. S. Mintz, *N. Engl. J. Med.*, **348**, 1537 (2003).
- J.-S. Kwon, S.-S. Park, Y.-G. Kim, J.-H. Son, Y.-S. Lee, K. S. Kim, K.-K. Hwang, D.-W. Kim, and M.-C. Cho, *Korean Circ. J.*, **35**, 221 (2005).
- J.-S. Park, J.-H. Shin, D.-H. Lee, J.-M. Rhee, M.-S. Kim, H.-B. Lee, and G.-S. Khang, *Polymer(Korea)*, **31**, 201 (2007).
- S. H. Kim, K.-S. Lee, Y. H. Kim, W. J. Choi, B. S. Kim, E.-G. Kim, and D. S. Kim, *Polymer(Korea)*, **31**, 153 (2007).
- H.-S. Kim, J. S. Kim, D.-W. Kim, B. C. Kang, B. H. Lee, and B. S. Kim, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 107 (2003).
- J. S. Kim, B. H. Lee, and B. S. Kim, *Biochem. Eng. J.*, **23**, 169 (2005).
- Y. Saito, S. Nakamura, M. Hiramitsu, and Y. Doi, *Polymer Int.*, **39**, 169 (1996).
- A. B. Dhanikula and R. Panchagnula, *The AAPS J.*, **11**, e27 (2004).
- J. Grant, M. Blicher, M. Piquette-Miller, and C. Allen, *The Pharm. Sci.*, **94**, 1512 (2005).
- B. Kelly, M. Melhem, J. Zhang, G. Kasting, J. Li, M. Krishnamoorthy, S. Heffelfinger, S. Rudich, P. Desai, and P. Roy-Chaudhury, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **21**, 2425 (2006).
- N. M. Pires, B. L. van der Hoeven, M. R. de Vries, L. M. Havekes, B. J. van Vlijmen, W. E. Hennink, P. H. Quax, and J. W. Jukema, *Biomaterials*, **26**, 5386 (2005).
- T. Masaki, R. Rathi, G. Zentner, J. K. Leypoldt, S. F. Mohammad, G. L. Burns, L. Li, S. Zhuplatov, T. Chirananthavat, S. J. Kim, S. Kern, J. Holman, S. W. Kim, and A. K. Cheung, *Kidney Int.*, **66**, 2061 (2004).
- J. K. Jackson, J. Smith, K. Letchford, K. A. Babiuk, L. Machan, P. Signore, W. L. Hunter, K. Wang, and H. M. Burt, *Int. J. Pharm.*, **283**, 97 (2004).
- S. C. Goodwin, H. C. Yoon, G. Chen, P. Abdel-Sayed, M. M. Costantino, S. M. Bonilla, and E. Nishimura, *Cardiovasc. Intervent. Radiol.*, **26**, 158 (2003).
- W. J. van der Giessen, A. M. Lincoff, R. S. Schwartz, H. M. M. van Beusekom, P. W. Serruys, D. R. Holmes, Jr., S. G. Ellis, and E. J. Topol, *Circulation*, **94**, 1690 (1996).
- G. Acharya and K. Park, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **58**, 387 (2006).
- S. F. Williams and D. P. Martin, "Applications of PHAs in medicine and pharmacy", in *Biopolymers, Polyesters III*, Y. Doi and A. Steinbüchel, Editors, Wiley-VCH, Weinheim, p. 91 (2002).
- C. W. Hwang, D. Wu, and E. R. Edelman, *Circulation*, **104**, 600 (2001).
- A. Finkelstein, D. McClean, S. Kar, K. Takizawa, K. Varghese, N. Baek, K. Park, M. C. Fishbein, R. Makkar, F. Litvack, and N. L. Eigler, *Circulation*, **107**, 777 (2003).
- C. J. Creel, M. A. Lovich, and E. R. Edelman, *Circ. Res.*, **86**, 879 (2000).