

생체분해성 Poly(γ -benzyl L-glutamate)/Poly(ethylene oxide)/ Poly(γ -benzyl L-glutamate) 블록 공중합체 미립자에서 Cytarabine의 약물방출

조종수 · 박정웅 · 권중근* · 조병욱* · 이강춘** · 김계용*** · 성용길****

전남대학교 고분자공학과 · *조선대학교 화학공학과 ·

전남대학교 약학과 · *한양대학교 공업화학과 · ****동국대학교 화학과

(1990년 8월 10일 접수)

Release of Cytarabine from Biodegradable Poly(γ -benzyl L-glutamate)/ Poly(ethylene oxide)/Poly(γ -benzyl L-glutamate) Block Copolymer Microsphere

Chong-Su Cho, Jung-Woong Park, Joong-Kuen Kwon*, Byung-Wook Jo*,
Kang-Choon Lee**, Kea-Yong Kim***, and Yong Kiel Sung****

Dept. of Polym. Eng., Chonnam National Univ., Kwangju 500-757, Korea

*Dept. of Chem. Eng., Chosun Univ., Kwangju 501-759, Korea

**Dept. of Pharmacy, Chonnam National Univ., Kwangju 500-757, Korea

***Dept. of Industrial Chemistry, Hanyang Univ., Seoul 133-791, Korea

****Dept. of Chemistry, Dongguk Univ., Seoul 100-715, Korea

(Received August 10, 1990)

요약 : 소수성 poly(γ -benzyl L-glutamate)와 친수성 poly(ethylene oxide)의 ABA형 블록 공중합체 (GEG)를 의약전달 matrix로 연구하였다. 항암제인 cytarabine을 함유한 PBLG동중합체와 GEG 블록 공중합체의 미립자가 용매 증발법(solvent evaporation method)에 의하여 제조되었고, 그들로부터 cytarabine의 방출실험이 행해졌다. 중합체들의 미립자 크기는 직경이 0.3에서 1 μ m의 크기로서 대체로 원형을 나타냈다. 블록 공중합체에서의 cytarabine의 방출거동은 블록 공중합체의 친수성인 폴리에틸렌옥사이드의 함량에 의존되었고, 친수성이 커질수록 방출량은 증가되었다.

Abstract : GEG block copolymers consisting of poly(γ -benzyl L-glutamate) as the A component and poly(ethylene oxide) as the B component were investigated as drug delivery matrix. PBLG homopolymer and GEG block copolymer microspheres containing anticancer drug, cytarabine were prepared by a solvent evaporation process and the release patterns of cytarabine from the microspheres were investigated in vitro. The size of PBLG homopolymer and GEG block copolymer microspheres was ranged from 0.3 to 1 μ m in diameter and the shape of the microspheres was almost round. The release pattern of cytarabine from the block copolymer microsphere was dependent on the hydrophilicity of the block copolymers. The more hydrophilic of the block copolymers, the faster release rate of cytarabine from the microspheres.

서 론

약물을 투입할 때 생체 내에서 약의 농도가 시간에 따라서 변하여 약효가 떨어지거나 독성을 나타내는 등의 문제점이 발생하기 때문에 1950년대부터 고분자의 matrix에 약을 물리적 또는 화학적으로 포함시켜 약물의 방출통제를 시도하여 왔었다.¹ 만약 약물의 방출이 통제되면 약의 농도가 시간에 따라서 변화없이 일정한 혈중농도를 유지시키는 점, 가능한 목적 부위에만 투여되는점, 약물의 부작용을 억제하고 사용상의 불편을 막는 점등의 장점을 가지고 있다.² 그러나 위에 열거한 장점에도 불구하고 지속적으로 약물이 방출될 때나, 약물이 전부 방출된 후에 이물질인 고분자가 장시간에 걸쳐 체내에 존재하는 문제점이 있어 최근에는 생체분해성 고분자를 이용하여 생체 내에서 약물이 방출된 후 고분자는 제거할 필요없이 생체 내에서 분해되는 새로운 고분자 연구가 활발히 진행되고 있다.³

생체분해성 고분자를 열거하면 첫째로 polyester계로서 glycolide와 lactide를 개환중합한 poly(glycolic acid)(PGA),⁴ poly(lactic acid)(PLA),⁵ PGA/PLA 공중합체⁵ 등이 있으나 약물방출이 너무 빠른 단점이 있고, poly(caprolactone)과 poly(dioxanone)⁶는 장기간 방출되나 고분자의 합성이 어려운 점이 있다. 둘째로 poly(α -amino acid)계로서 그 중에서 합성이 용이한 poly(glutamic acid)(PGLA)에 관한 연구가 Kovacs 등⁷으로부터 시작하여 Miyama⁸ 등과 Rowland 등⁹에 의하여 시도되었고 Anderson 등¹⁰과 Sidman 등¹¹은 PGLA/leucine 공중합체, Feijen 등¹²은 poly(aspartic acid)/leucine공중합체를 만들어 검토하였다. 그 밖에 저자등에 의하여 겔가지에 -OH기를 갖는 poly(hydroxy propyl glutamine)계와^{13,14} poly(hydroxyethyl aspartamide)계¹⁵에 약물을 결합시킨 뒤 약물의 방출성과 고분자의 분해성에 관한 연구를 검토하였는데 이러한 polypeptide계는 항체문제에 약간의 논란이 있으나,¹⁶ 생체적합성이 좋고 친수성과 소수성의 조절, spacer group도입의 장점을 가지고 있다. 셋째로 poly(alkyl 2-cyanoac-

rylate)계로서 단량체는 원래 순간접착제와 생물조직의 접착에 널리 쓰이는 물질로서 Leonard 등¹⁷에 의하여 처음으로 가수분해된다고 밝혔으나, Mungiu 등¹⁸ 의하여 분해 후의 독성에 관하여 보고한 바 있다. 넷째로는 다당류로서 hydroxyethyl cellulose, hydroxy propyl cellulose, carboxymethyl cellulose와 같은 다당류는 polypeptide보다는 항체문제를 갖지 않으나 생체내에서 분해되는 속도가 느린것이 단점이다.¹⁹ 다섯째는 생체내의 효소보다는 물에 의하여 녹는 것을 이용한 수용성 고분자인 poly(vinyl alcohol),²⁰ poly(ethylene oxide),²¹ methyl vinyl ether/maleic anhydride 공중합체,²² acrylic copolymer²³가 연구되었는데 이러한 고분자들은 너무 친수성이 강하기 때문에 수화에 의하여 측쇄의 절단이 심하고 또한 생체내에서 칼슘화와 같은 생체적합성의 문제가 남아 있다. 그 밖에도 무기고분자인 polyphosphazene계,²⁴ polyamide계,²⁵ polyanhydride계,²⁶ collagen,²⁷ gelatin²⁸ 등도 생체분해성 고분자로서 시도된 바 있다.

고분자 미립자는 일반적으로 10 nm에서 50 μ m에 해당되는 크기의 미립자를 말하며, 입자의 크기가 균일하고 표면적이 크고 물에서 분산이나 분리가 쉬운 특징을 갖고 있기 때문에 비교적 많은 양의 약물을 함유할 수 있고 더욱이 지속적인 약물용출이 가능하며 또한 각 고분자 마립자의 특징에 따라 체내에 분포되어 약물을 요구하는 부위에만 집중화시키고 기타 부위에는 약물농도를 극소화시킬 수 있기에 최근에 많은 진단용 의약고분자에 응용되고 있다. 그중 생체분해성 고분자로서 고분자 미립자를 만들어 약물수송에 응용한 것은 외국에서는 Ikada 등의 PGA의 합성고분자²⁹와 gelatin의 천연고분자³⁰를 이용한 것이 있고 국내에서는 Lee 등³¹이 항암제를 함유한 albumin 및 gellatin미립자를 이용한 것 등으로 아직도 초보단계에 있다.

본 연구에서는 생체적합성이 뛰어나고,³² 생체분해성을 갖는 poly(γ -benzyl L-glutamate)/poly(ethylene oxide)/poly(γ -benzyl L-glutamate)(GEG) 블록 공중합체를 합성하고 항암제의 일종인 cytar-

Table 1. Limiting Viscosity Number, $[\eta]$, Weight-Average mol. wt., M_w , and Composition of Samples Prepared^{33,34}

Sample	$[\eta]$	$M_w \cdot 10^{-4}$	Content of Ethylene Oxide Units		Degree of Swelling(%) at 37°C
	dl · g ⁻¹		in mol-%	in wt.-%	
PBLG	1.49	27.3	0.0	0.0	30
GEG-1	0.45	6.9	24.4	6.1	35
GEG-2	0.31	4.5	35.6	10.0	54
GEG-3	0.14	1.8	73.8	36.1	71

Table 2. Negative Ellipticity at 222 nm, $[-\theta]_{222}$, of Samples in 1,2-Dichloroethane(at 25°C)³⁴

Sample	G ^a in mol-%	$[-\theta]_{222}$	$[\theta]_{222}^c/[\theta]_{222}^{b1}$
PBLG	100.0	39,600	1.00
GEG-1	75.6	32,600	0.83
GEG-2	64.4	26,600	0.67
GEG-3	26.2	9,300	0.23

^a G : content of γ -benzyl L-glutamate units in copolymer samples.

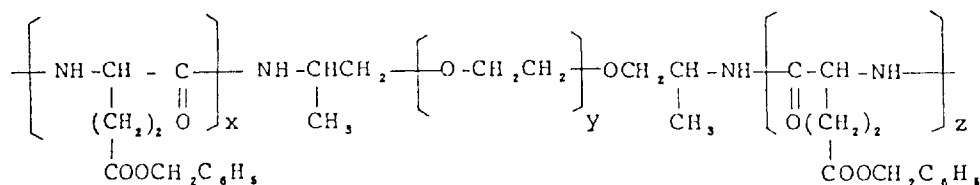
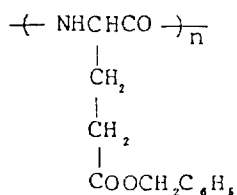
^b $[\theta]_{222}^c$: ellipticity of the block copolymers.

$[\theta]_{222}^{b1}$: ellipticity of the PBLG homopolymer.

bine을 물리적으로 포함한 미립자를 oil/water emulsion상에서 solvent evaporation방법으로 제조하여 in vitro에서의 방출성이 검토되었다.

실 험

재료 : chloroform, *n*-hexane, tetrahydrofuran



및 1,4-dioxane는 정제하여 사용하였고, 항암제인 cytarabine는 Sigma Chem. Co. 제품을 사용하였다. poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG) 및 세 종류의 GEG블록 공중합체의 합성과 구조적인 연구는 이미 보고되었고,³⁴ 그들의 특징과 2차구조를 각각 Table 1과 2에 간략히 나타내었다.

항암제를 함유한 고분자 미립자의 제조 : Cytarabine을 함유한 고분자 미립자는 Fig. 1에 보여진 것처럼 실온과 대기압하에서 solvent evaporation 방법으로 제조하였다. 유화제로는 poly(vinyl alcohol) (분자량 88000, 검화도 99.5%, Hayashi Co.)를 사용하였다. 고분자 미립자에 cytarabine loading은 PBLG(12%), GEG-1(13%), GEG-2(13%) 및 GEG-3(14%)이었다.

접촉각 측정 : 약 5wt%를 포함한 chloroform 용액을 만들어, 이 용액을 깨끗한 광학현미경용 cover glass에 casting하여 실온에서 필름을 제조하였다. 접촉각 측정기인 goniometer(Erma goniometer G-1)를 이용하여 접촉각을 측정하였고 Zisman방법³⁵에 의하여 임계표면장력이 얻어졌다.

주사 전자현미경의 관찰 : Fig. 1으로부터 얻어진 고분자 미립자의 크기와 형태를 관찰하기 위하여 미립자를 Pd/Au로 코팅한 후 주사 전자현미경(JSM 840A, Jeol)으로 관찰하였다.

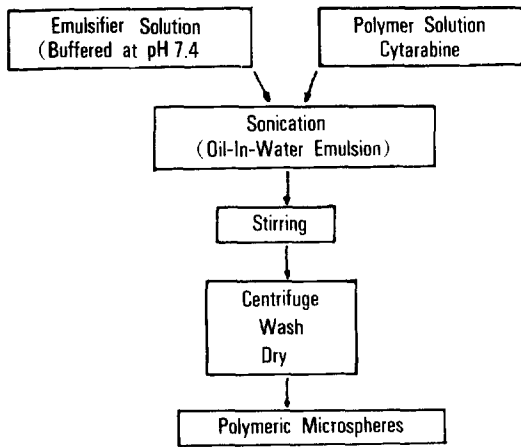
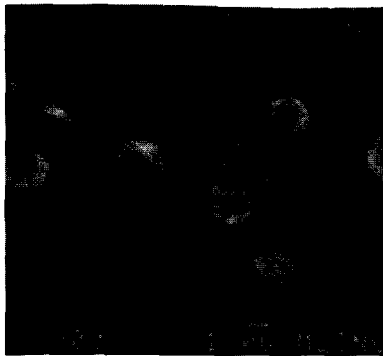
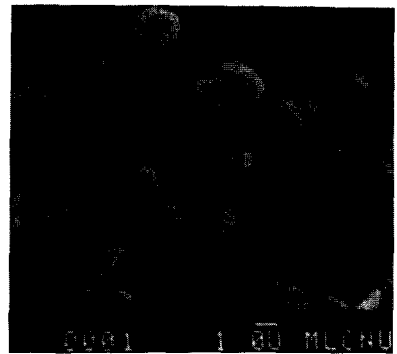


Fig. 1. The schematic diagram of preparation of microspheres.

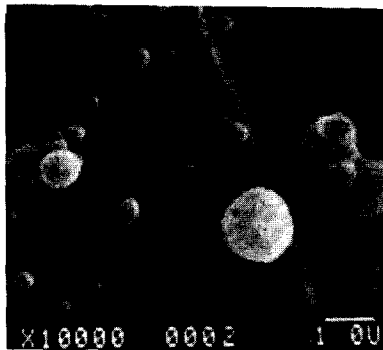
In Vitro에서 항암제의 방출실험: Fig. 1으로부터 얻어진 10 mg의 고분자 미립자를 5 ml의 phosphate buffer saline(pH7.4)에 분산시킨 후 37°C에서 shaker가 달린 항온조에서 약물방출 실험을 행하였다. 미립자에서 방출된 약물의 양은 UV spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda 5)를 사용하여 cytarabine의 최대 흡수파장인 270nm에서의 표준곡선을 이용하여 산출하였다. 소정의 시간 후에 vial에 분산되어있는 고분자 미립자와 방출된 약물을 분리시키기 위하여 원심분리기를 사용하였는데 그때의 조건은 12000 rpm에서 3분간 행하였다.



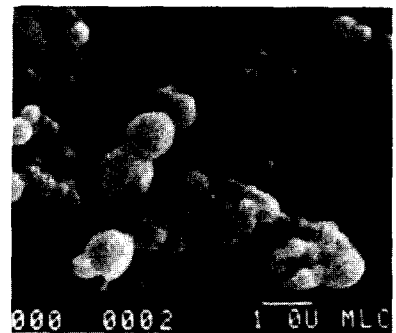
(a)



(b)



(c)



(d)

Fig. 2. SEM photograph of polymeric microspheres containing cytarabine : PBLG(a), GEG-1(b), GEG-2(c), and GEG-3(d).

결과 및 고찰

고분자의 특성

사용된 고분자의 특성은 Table 1과 2에 나타난 바와 같이 PEO의 함량이 증가함에 따라 분자량은 감소되었고, 블록 공중합체의 비결정성은 증가되었다.³⁴

PBLG homopolymer와 GEG block copolymer에 대한 접촉각을 Table 3에 나타내었다.³² 표에 나타난 바와 같이 PEO의 함량이 증가함에 따라 각 액체에서의 접촉각은 감소되었고 임계표면장력은 증가되는 경향을 나타내었다. 이러한 결과들은 블록 공중합체의 표면성질이 친수성인 PEO의 함량이 많을수록 친수성이 증가되기 때문이라고 생각된다.

미립자의 관찰

Fig. 2에 solvent evaporation 방법으로 제조된 PBLG homopolymer(a)와 GEG-1(b), GEG-2(c) 및 GEG-3(d) 블록 공중합체의 미립자들을 주사 전자현미경으로 관찰하여 나타내었다. 그림에서 고분자에 따라 미립자의 크기와 형태의 차이는 관찰할 수 없었고, 대체로 직경이 $0.3\ \mu\text{m}$ 에서 $1\ \mu\text{m}$ 의 크기인 원형임을 보여주었다. 그런데 약물방출 20일 후에 미립자의 형태는 원래 원형의 형태에서 상당히 일그러진 형태를 나타냈다.

항암제의 방출실험

Fig. 3은 고분자 미립자에서 항암제인 cytarabine의 시간에 따른 방출량을 블록 공중합체의 PEO의

함량에 따라 나타난 것이다. PBLG homopolymer에 비하여 GEG 블록 공중합체가 방출량이 많았고, GEG 블록 공중합체에서는 PEO의 함량이 증가함에 따라 방출량이 증가되었다. 이러한 결과는 PBLG에 도입된 PEO의 함량이 증가됨에 따라 친수성이 증가되었기 때문으로 생각된다. PEO의 함량이 증가됨에

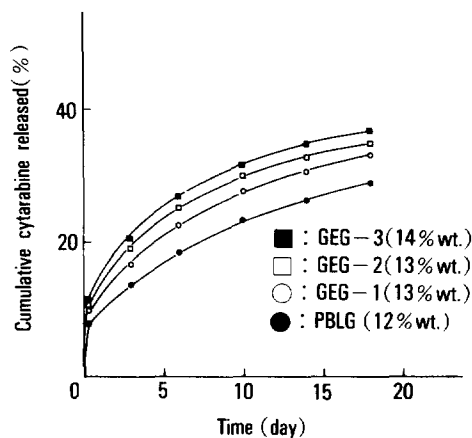


Fig. 3. Release pattern of cytarabine from polymeric microspheres containing cytarabine in saline solution (pH 7.4, 37°C). The numbers in () are contents of loaded drug.

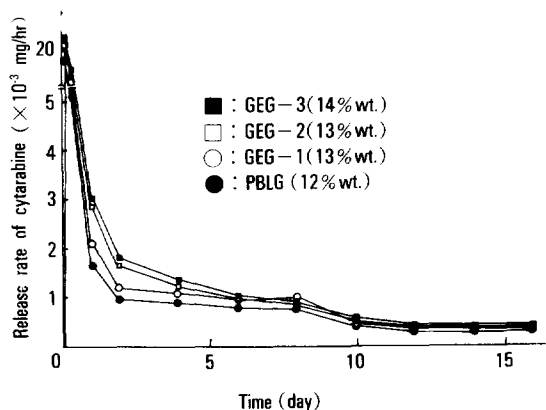


Fig. 4. Release rate of cytarabine from polymeric microspheres containing cytarabine in saline solution (pH 7.4, 37°C). The numbers in () are contents of loaded drug.

Table 3. Contact Angle and Critical Surface Tension (γ_c) of the PBLG Homopolymer and GEG Block Copolymers³²

Solvent	PBLG	GEG-1	GEG-2	GEG-3
Water	72	60	56	48
Glycerol	61	55	52	42
Formamide	59	46	45	39
1,2-Diethandiol	57	44	42	37
Diethylene Glycol	21	18	17	16
Oleic Acid	11	11	11	11
γ_c	25.0	32.5	37.0	39.0

다른 친수성의 증가는 Table 3의 접촉각의 결과로는 알 수 있었고, Cho등³³이 이미 발표한 바와같이 GEG 블록 공중합체의 PEO함량의 증가로 팽윤도가 증가되고 있다는 결과와도 일치하는 경향을 보이고 있다. GEG 블록 공중합체들의 팽윤도는 Table 1에 나타내었다.

Fig. 4는 cytarabine의 방출속도를 나타낸 것으로 초기에는 burst effect로 많은 양이 빠져 나오다가 점점 방출량이 감소하는 경향을 나타내는 monolithic형태³⁶로서 약물방출에서 바람직한 zero order는 기대할 수 없었다.

감사의 글: 본 연구는 한국과학재단 연구비의 보조로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. D. F. Williams, CRC series in biocompatibility Vol. II, Williams, D. F. (d.), CRC press, Florida, 129 (1981).
2. D. A. Wood, *Int. J. Pharm.*, **7**, 1 (1980).
3. J. Heller, *Biomaterials*, **1**, 51 (1980).
4. E. J. Frazza and E. E. Schmitt, *J. Biomed. Mater. Res.*, **1**, 43 (1979).
5. D. K. Gilding and A. M. Reed, *Polymer*, **20**, 1459 (1979).
6. C. G. Pitt et al., *J. Pharm. Sci.*, **68**, 1534 (1979).
7. K. Kovacs, A. Kotai, and I. Szabo, *Nature(London)*, **185**, 266 (1960).
8. T. Miyama, S. Mori, and Y. Takeda, U. S. Patent, 3371, 069 (1968).
9. G. F. Rowland, G. J. O'Neill, and D. A. L. Davies, *Nature(London)*, **255**, 487 (1975).
10. J. M. Anderson, D. F. Gibbons, R. L. Martin, A. Hiltner, and R. Woods, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **5**, 197 (1974).
11. K. R. Sidman et al., Research Monograph Series, 4, NIDA, D. R. Willette, 33 (1976).
12. K. W. Marck, R. H. Wildevu, W. L. Sederel, A. Bantjes, and J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.*, **11**, 405 (1977).
13. N. Negishi, D. B. Bennett, C. S. Cho, S. Y. Jeong, W. A. R. Van Heeswijk, J. Feijen, and S. W. Kim, *Pharm. Research*, **4**, 305 (1987).
14. J. Feijen, D. Gregonis, C. Anderson, R. V. Peterson, and J. Anderson, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 871 (1980).
15. P. Neri, G. Antoni, F. Benvenuti, F. Cocola, and G. Gazzei, *J. Med. Chem.*, **16**, 893 (1973).
16. M. Sela, *Science*, **166**, 1365 (1969).
17. F. Leonard et al., *J. Appl. Polym. Sci.*, **10**, 259 (1966).
18. C. Mungiu et al., *J. Polym. Sci., Polym. Sym.*, **66**, 189 (1979).
19. M. G. Wirick, *J. Water Pollut. Control Fed.*, **46**, 512 (1974).
20. J. B. Brown, *Ann. Surg.*, **152**, 534 (1960).
21. F. E. Baily et al., Polyethylene Oxide, Academic Press, New York (1976).
22. A. H. Knectal, *Perfum. J.*, **78**, 95 (1963).
23. D. K. Gilding, Biocompatibility of Clinical Implant Materials, Vol. II, CRC series, D. F. Williams d., 214 (1983).
24. H. R. Allcock, T. X. Neenan, and W. C. Kossa, *Macromolecules*, **15**, 693 (1982).
25. E. Roggendorf, *J. Biomed. Mater. Res.*, **10**, 123 (1976).
26. H. Rosen, J. Chang, G. Wnek, R. Linhardt, and R. Langer, *Biomaterials*, **4**, 131 (1983).
27. T. Nishihara et al., *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **13**, 243 (1967).
28. T. Agishi et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 119 (1975).
29. Y. Ikada et al., *J. Bioactive and Compatible Polymers*, **3**, 126 (1988).
30. Y. Tabata, Ph. D. thesis, Kyoto Univ. (1987).

31. K. C. Lee et al., *Int. J. Pharm.*, **44**, 49 (1988).
32. C. S. Cho, S. C. Song, S. W. Kim, D. W. Ryang, Y. K. Sung, and K. Y. Kim, *J. KOSOMBE*, **8**, 199 (1987).
33. C. S. Cho and S. W. Kim, *J. Control. Release*, **7**, 283 (1988).
34. C. S. Cho and S. W. Kim, *Makromol. Chem.*, **191**, 981 (1990).
35. H. Y. Fox and W. A. Zisman, *J. Colloid Sci.*, **7**, 109 (1952).
36. R. E. Baker, M. E. Tuttle, H. K. Lonsdale, and J. W. Aynes, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 20 (1979).