

생분해성 고분자를 이용한 약물 전달용 나노 입자

박 태 관 · 유 혁 상

1. 서 론

이 글에서는 현재 나노 입자와 미셀을 이용한 약물 전달 시스템의 연구 진행 경향과 원리, 그리고 응용 실례로 생분해성 고분자로 만들어진 약물 전달체를 들어 설명하고자 한다.

나노 입자는 입자의 크기가 수 nm에서 수백 nm 크기의, 넓은 표면적을 가진 콜로이드 상의 불균일 분산 입자 일종으로, 지금까지 수많은 연구에 의해 나노 입자의 제조, 특성 규명, 약물 봉입에 관한 연구가 이루어져 약물 전달체로서의 가능성이 충분히 입증되었다.^{1,2}

나노 입자가 인체에 투입될 때는 주사, 경구, 피부 등 다양한 방법을 통해 전달되며 이때의 약물의 분포는 다른 전달체와는 구별되는 약물의 분포를 나타내며 이것은 나노 입자의 특성에 따라 조금씩 다르게 나타난다.^{2,3}

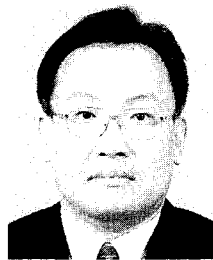
예를 들어, 약물을 인체 내에 투여하면 목표로 하는 장기 외에 다른 장소에도 약물이 분포하게 된다. 그런데 이것은 때때로 사람에게 해로운 효과를 줄 수 있어 건강한 장기나 조직에 손상을 줄 수 있다. 이런 것이 극명하게 나타나는 실제 예가 바로 항암제나 항진균제의 경우이다.⁵

따라서 많은 연구진들이 원하는 장기나 조직에만 약물을 전달시키는 동시에 원하지 않는 조직에 약물이 분포되는 것을 줄여줄 수 있는 전달체를 찾기 시작했다. 그 중 하나가 콜로이드 분산 입자인 나노 입자를 이용한 약물 전달체이다.⁴

현재까지 사용되고 있는 항암 치료를 위한 약물의

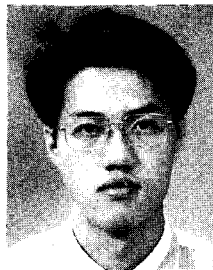
대표적인 예는 독소루비신(doxorubicin) 또는 아드리마이신(adriamycin), 시스플라틴(cisplatin), 탁솔(taxol), 5-fluorouracil 등이 있으며 암치료를 위한 화학 치료 요법으로 광범위하게 사용되고 있다. 그러나 항암제의 문제점은 과도한 부작용으로 인해 많은 양의 항암제를 투여할 수 없으며 치료 가능한 정도의 양만 투여해도 환자에게 심한 고통을 가져다 주고 있다는 점이다.

이렇게 심한 부작용이 나타나는 이유는 항암제가 암세포에만 작용하지 않고 일반세포에도 작용하기



박태관

1981 서울대학교 공업화학과(학사)
 1983 한국과학기술원 생물공학과(석사)
 1990 Univ. of Washington, Seattle, WA, USA 생체재료공학(공학박사)
 1991~1992 Massachusetts Institute of Technology, USA(Postdoc)
 1992 Temple University, School of Pharmacy 조교수
 1996~현재 한국과학기술원 생물공학과 부교수



유혁상

1996 한국과학기술원 생물공학과(학사)
 1998 한국과학기술원 생물공학과(석사)
 1998~현재 한국과학기술원 생물공학과(박사과정)

Biodegradable Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers

한국과학기술원 생물공학과(Park Tae Gwan and Yoo Hyuk Sang, Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, 373-1 Kusong-dong, Yusong-gu, Taejeon 305-701, Korea)

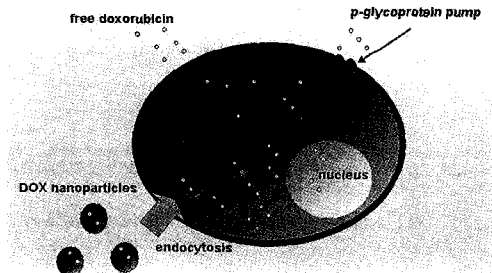


그림 1. 1MDR (multi drug resistance) effect.

때문인데, 이로 인해 암세포만 죽이지 않고 정상적인 세포의 성장도 억제, 괴사시키기 때문에 환자는 심한 고통을 느끼게 된다. 따라서, 전 세계의 수많은 연구진은 암세포만 선택적으로 죽일 수 있는 방법을 찾고 있으며 이것이 성공한다면 암세포만을 죽이기 위해 보다 많은 양의 항암제를 투여할 수 있기 때문에 암환자를 치료하는 효과적인 수단이 될 수 있다.⁵

지금까지 암세포만을 목표로 하기 위한 방법으로는 암세포에만 특별히 존재하는 항원에 대한 수용체를 약물에 부착하여 항암제가 암세포에만 부착되도록 하는 방법이 주로 이용되고 있다. 또, 항암 치료가 어려운 이유 중 하나는, 반복적으로 약물을 투여하게 되면 암세포가 세포 안으로 들어온 항암제를 세포 밖으로 다시 내보내는 일종의 세포막 펌프가 작용하기 때문이다. 이 펌프가 작동하면 일정 농도 이상의 항암제가 세포질 내에서 존재할 수 없기 때문에 지속적인 항암제 투여에도 별로 효과가 나타나지 않는 것이다(그림 1).⁴

이런 문제를 해결하기 위한 노력이 계속되고 있으나 항암제의 내성 및 암세포 저항성 약물 제제에 대한 주목할만한 결과가 아직까지 나타나지 않고 있다.

그런데, 나노 입자를 이용하여 항암제를 투여하면, 수십에서 수백 nm에 이르는 특징적인 입자의 크기 때문에, 상대적으로 혈관내벽 세포 연결이 느슨한 암세포 조직에 특이적으로 전달되며, 세포 연결이 조밀한 일반 세포에는 잘 투과할 수 없다. 따라서, 이러한 원리를 이용하여 항암제를 투여하면 항암제의 비특이성을 극복할 수 있다(그림 2).⁶⁻⁸

2. 나노 입자의 제조 방법

수백 nm의 크기를 갖는 입자를 제조하는 방법에는 수많은 방법이 사용되고 있지만 그 중에 약물 전

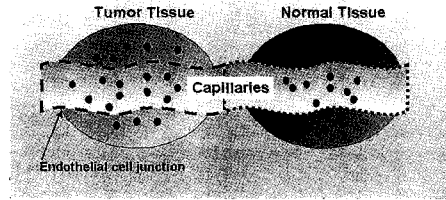


그림 2. EPR (enhanced permeation and retention) effect.

달용으로 가장 많이 사용되는 과정은 emulsification-diffusion solvent evaporation process 방법과 interfacial polymerization 방법이다. Emulsification-diffusion solvent evaporation process는 고분자가 용해될 수 있는 유기용매상에 고분자를 용해시킨 후 이를 일정량의 안정화제가 첨가된 수용액상에 분산시킴으로써 나노 입자를 얻는 방법이다. 이때 나노 입자는 고분자의 응집물로 형성되며 나노 입자의 크기는 안정화제, 고분자의 종류, 분산 방법에 따라 달라진다. 이때 나노 입자에 봉입하려고 하는 약물은 고분자와 함께 유기용매에 용해되어야 한다(그림 3).³

에멀전 중합에 의해서는 polyalkylcyanoacrylate 나노 입자 등을 제조할 수 있다. 이 방법에서는 난용성인 단량체 방울이 수용액상에 에멀전 형태로 존재한다. 이때 음이온 중합이 단량체의 미셀에서 일어난다. 용액의 pH 값이 중합 속도와 약물의 흡착을 조절하게 된다. 이 방법을 이용하면 크기와 약물 흡착률이 일정한 나노 입자를 반복적으로 제조할 수 있다.

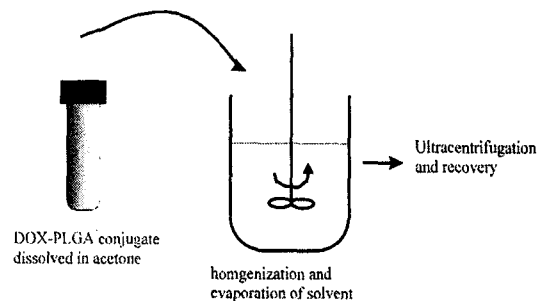


그림 3. Emulsification-diffusion solvent evaporation process.

3. 나노 입자의 특성 규명 방법

약물 전달체로서의 나노 입자 특성을 분석하는 것은 나노 입자의 작은 크기 때문에 어려움이 따른다. 지금까지 많은 연구에서 사용된 나노 입자의 특성 관찰 방법은 여러 가지가 있지만, 이 글에서는 주로 약물 전달체로서의 특성을 측정하기 위한 방법에 초점을 맞추어서 소개하기로 한다.

3.1 광학 현미경

가장 간단한 방법이지만, 나노 입자의 크기가 500 nm 이하이면 관찰이 불가능하며 이 때는 전자 현미경을 사용해야 한다.

3.2 주사전자 현미경(Scanning Electron Microscopy ; SEM)

나노 입자의 표면 모양을 관찰하기에 적당한 방법으로 광범위하게 사용되고 있다. 이 방법을 사용하면 입자의 모양, 표면의 거친 정도, 공극률 등을 알 수 있다. 특히, 나노 입자 제조에 사용되는 계면 활성제와 나노 입자와의 관계, 약물의 흡착 등을 관찰할 수 있다. 나노 입자가 SEM으로 관찰되기 위해서는 나노 입자가 전도성을 띠어야 하며 진공 조건을 견딜 수 있어야 한다. 샘플을 진공 건조한 후 탄소-금으로 코팅처리하고 관찰하기 전 다시 진공 건조한다. 보고된 바에 의하면 계면활성제가 있는 조건에서는 입자 표면에 부드러운 코팅막을 형성하기도 해서 SEM을 사용할 수 없는 경우도 있다. **그림 4**는 polyalkylcyanoacrylate 나노 입자를 SEM을 이용하여 관찰한 것이다. 그림에서처럼 이 나노 입자는 약 150 nm의 직경을 가지는 둥근 구형의 입자인 것을 알 수 있다.

3.3 투과전자 현미경(Transmission Electron Microscopy ; TEM)

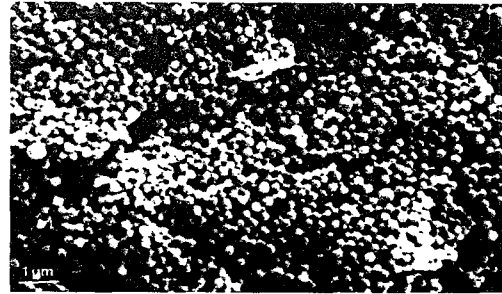


그림 4. SEM을 이용한 polyalkylcyanoacrylate 나노 입자 관찰.

이 기술을 이용하면 나노 입자 한 개를 크게 확대하여 관찰하는 것도 가능하다. 따라서 입자의 모양, 입자 크기 등을 결정하는데 효과적으로 사용될 수 있다. 또한 Freeze/fracture 방법을 사용하면 나노 입자 종류를 구별할 수도 있으며 나노 캡슐의 경우 벽 두께까지도 측정할 수 있다. 실제로 TEM을 이용하여 나노 입자의 크기, 모양을 알아본 그림이 **그림 5**에 실려있다. 이것은 독소루비신이라는 항암제가 봉입된 나노 입자로 고분자는 poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 사용하였다. 그림에서 크기는 약 200 nm 정도로 확인되었다.

4. 입자 크기 분포 측정

나노 입자 크기의 분포는 입자의 크기 분포를 측정함으로써 나노 입자가 분산 용액에서 어느 정도 안정한가를 측정하는 중요한 변수가 된다.

4.1 광자 상관 계수 분광법(Photon Correlation Spectroscopy ; PCS)

이 방법은 quasi-elastic light scattering spec-

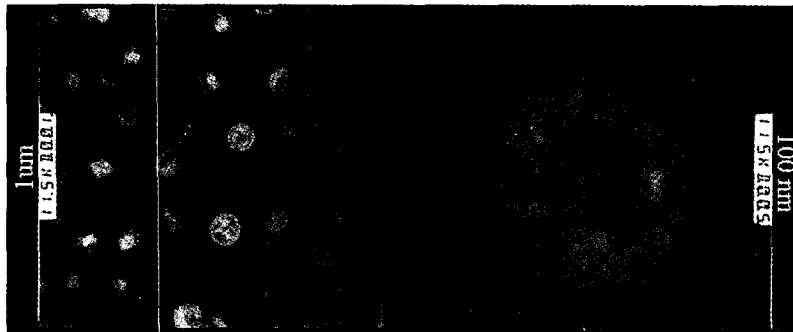


그림 5. TEM을 이용한 독소루비신 나노 입자의 관찰.

troscopy (QELSS) 또는 dynamic light scattering (DLS)라고도 불리는 비침해적인 확산 측정 방법이다.

대부분의 경우 광산란 분광법에서는 산란 입자 등의 상호 확산 계수를 직접 구한다. PCS를 이용하여 실제적으로 입자 크기를 판별한다. 입자가 회석되어 있는 분산 용액을 사용하여 반복적이며, 빠르고 정확하게 입자 크기를 판별할 수 있는 것이 장점이다. 입자 크기의 측정 범위는 약 5 nm에서 5 μ m이다. 그러나 이 방법은 비침해적이며 비파괴적인 방법이기 때문에 시료 준비과정에서 주의를 기울이지 않으면 먼지 등으로 인해 실험적인 오류가 발생할 수 있다는 점에 유의해야 한다.

4.2 전자 현미경을 이용한 측정법

그림 5에서처럼 TEM을 이용하면 거의 정확하게 입자의 크기를 측정할 수 있다. 그러나 나노 입자 중 몇 개만 관찰가능하며 시료 제조에 시간이 소요된다는 점이 단점으로 작용할 수 있다.

5. 약물의 봉입량

나노 입자는 콜로이드 형태로 존재하기 때문에 나노 입자에 봉입된 약물의 양을 측정하는 것은 그다지 쉬운 일은 아니다. 많은 사람들에 의해 사용된 방법은 초원심분리법(ultracentrifugation)이다. 이 방법에서는 초원심분리 후에 얻어진 상층액에 존재하는, 봉입되지 않은 약물을 측정한다. 일반적으로 봉입된 총 약물의 양은 나노 입자를 완전히 건조시켜 적당한 용매에 녹여 분광학적 방법 등으로 약물의 양을 측정하게 된다. 이론적으로 이때 얻어진 값은 초기에 넣어준 약물의 양과 일치해야 한다. 그런데 이런 방법들의 문제점은 시료를 처리하는 과정에서 시료의 분해 현상이 발생한다는 데 있다. 또, 어떤 연구진들은 약물의 양을 측정할 때 봉입되지 않은 약물과 봉입된 약물을 합해서 총 약물의 양이라고 계산하기도 한다. 일반적으로 나노 입자에 봉입된 약물의 양을 측정할 때는 총 약물의 양에서 원심분리 후 얻어진 상층액에 존재하는 봉입되지 않은 약물의 양을 빼서 구하거나, 원심분리 후 얻어진 침전물을 직접 적당한 용매에 녹여 구하게 된다. 후자의 방법을 사용하기 위해서는 상층액과 침전물을 주의를 기울여 분리해야 한다.

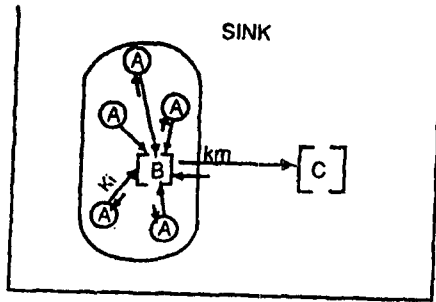
6. 표면 전하 측정

나노 입자는 구성된 고분자 표면의 기능기의 분리나 이온의 흡착, 수용액 상의 이온 물질로 인해 전하를 띠게 된다. 이런 나노 입자의 표면 전하는, 혈액내의 여러 구성 물질에 작용하여 생물학적 반응을 변화시킬 수 있기 때문에 나노 입자의 표면 전하는 중요한 의미를 가진다. 나노 입자의 표면 전하는 적정(titration)이나 전기영동법(electrophoretic technique) 등으로 구할 수 있다. 또, 나노 입자의 표면 전하는 사람의 혈청의 영향으로 좀 더 감소하는 것으로 나타났으며 이것은 혈청속에 존재하는 여러 물질들이 나노 입자에 흡착되어 일어나는 것으로 생각된다.

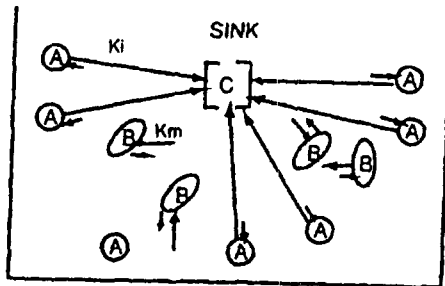
7. 체외 약물 방출 실험 (In vitro Drug Release Kinetics)

약물의 나노 입자로부터 약물이 방출되는 거동을 측정하는 방법은 여러 가지가 있다. 그런데 콜로이드 형태의 나노 입자로부터 약물이 방출되는 현상을 sink 조건에서 측정하는 것은 기술적으로 어렵다. 이것은 방출된 약물과 나노 입자를 빠르고 효과적으로 분리하는 방법이 어렵기 때문이다. 정적 또는 동적 조건에서 약물의 방출을 측정하려는 시도가 이루어졌는데 그 중 대표적인 것이 투석막(dialysis membrane)을 이용한 방법이다.

투석 백 확산법(dialysis bag diffusion technique)에서는, 특정 부피의 콜로이드 형태의 나노 입자를 투석막에 집어넣고 밀봉하여 방출실험을 시행할 완충용액 등에 집어넣는다. 이 시스템을 37 $^{\circ}$ C로 유지하면서 계속 교반시켜준다. 이 실험은 다양한 용액에서 수행될 수 있다. 특정 시간에 투석 백 밖으로 나온 약물의 양을 적당한 측정 방법으로 결정하여 약물 방출량을 측정한다. 이 시스템의 단점은, 방출량이 약물의 방출에 의해서만 결정되지 않고 분산 시스템의 여러 상(phase) 사이의 분배계수에 의해서도 영향을 받는다는 점이다. 그럼에도 불구하고, 이 방법은 정맥 주사를 위한 나노 입자에 대해 체내 방출량을 예상하는데 유용하게 사용될 수 있다. 그림 6은 투석 백 확산법을 간략하게 나타낸 그림이다. 이외에도 방출된 약물과 나노 입자를 분리하기 위해 원심 분리 등의 방법도 사용한다. 그러



I
Dialysis bag diffusion technique



II
Bulk reverse dialysis bag technique

그림 6. 투석 백을 이용한 나노 입자의 약물 방출 실험.

나 이때는 보다 주의깊게 분리하여 방출된 약물과 나노 입자가 혼합되는 것을 방지해야 한다.

8. 생분해성 고분자를 이용한 독소루비신 나노 입자

서론에서 설명한 바와 같이 나노 입자의 형태로 제제화를 하면 많은 장점을 얻을 수 있다. 그러나 나노 입자를 emulsification-diffusion solvent evaporation process 방법을 이용해 특정 약물을 제제화할 때 문제가 되는 것 중 하나가 약물의 봉입률 문제이다. 고분자와 약물을 혼합하여 수용액 상에 분산시킬 때 약물의 일부가 수용액 상으로 빠져나가 봉입률을 낮추는 원인이 된다. 낮은 봉입률은 경제적인 측면과 약물의 효과면에서도 모두 불리하다. 그래서, 생분해성 고분자에 약물을 접합시켜 봉입률을 높이는 동시에 약물의 지속적인 방출을 얻으려는 시도를 진행하였다.^{9,10} 그림 7은 약물을 PLGA에 접합시켰을 때 나타나는 약물 방출 효과를

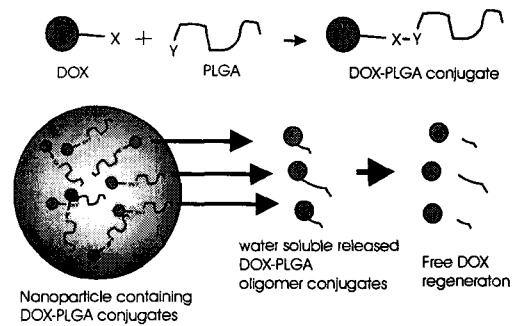


그림 7. 약물과 고분자가 접합된 나노 입자.

표 1. 독소루비신 나노 입자의 봉입률

	Loading Efficiency(w/w, %)	Loading Amount(w/w, %)
DOX-PLGA NPs	95.0±7.5	1.90±0.25
DOX/PLGA NPs	33.3±4.3	0.66±0.19

DOX-PLGA NPs: DOX-PLGA conjugate contained nanoparticles.

DOX/PLGA NPs: free DOX encapsulated nanoparticles.

개략적으로 나타낸 그림이다.

표 1에 표시된 약물의 봉입(drug loading)은 나노 입자 용액을 원심 분리의 방법으로 침전물을 얻어 이것을 dimethylsulfoxide (DMSO)에 완전히 용해시킨 후 480 nm에서 흡광도를 측정해 얻은 것이다. 표 1에서는 약물을 PLGA에 접합시켰을 때가, 단순히 약물을 고분자와 섞어 나노 입자를 만들었을 때에 비해 높은 봉입률을 얻을 수 있다는 것을 알 수 있다.

그림 8은 독소루비신과 PLGA로 만들어진 나노 입자와 약물이 봉입되어 있지 않은 나노 입자의 표면 전하(zeta potential)의 변화를 시간에 따라 측정한 것이다. 이때의 표면 전하는 전기영동법으로 측정되었다. 그림에서 보는 것처럼 초기 나노 입자의 표면 전하는 음전하를 띠는데 이것은 PLGA의 말단에 카복실기가 붙어있기 때문이라고 생각된다. 그런데 PLGA는 수용액상에서 분해되어 락트산(lactic acid)과 글리콜산(glycolic acid)을 생성시키므로 이것이 나노 입자에 붙어 표면 전하를 더욱더 감소시키게 되며, 그림처럼 시간에 따라 표면 전하의 감소가 일어나게 된다. 그런데, 독소루비신-PLGA 나노 입자의 경우에는 아무런 약물로 봉입되어 있지 않은 나노 입자에 비해 표면 전하의 감소가 적은 것을 볼 수 있다. 이것은 나노 입자에 봉입된

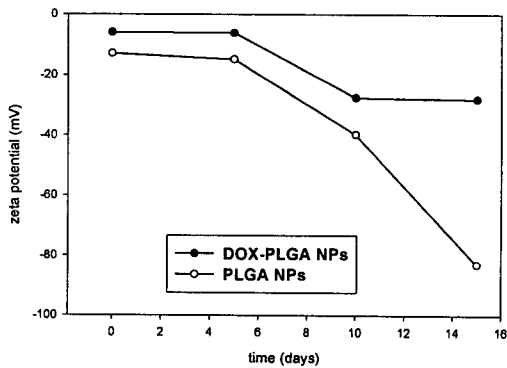
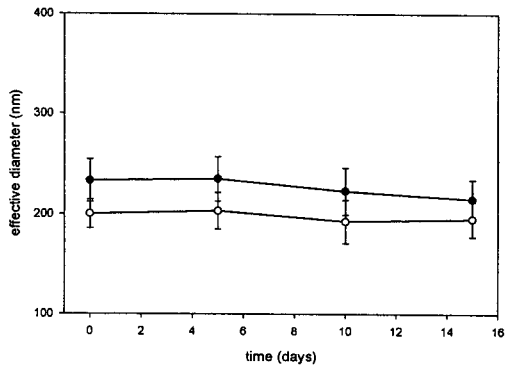


그림 8. 독소루비신 나노 입자의 크기와 표면 전하의 변화.

독소루비신이 양 전하를 가지며 이것이 방출되면서 나노 입자의 표면에 붙어 표면 전하의 감소를 줄여 주었을 것이라고 생각된다.

PLGA는 시간에 따라 분해되는 생체 분해성 고분자인데, 이것으로 만든 나노 입자가 분해됨에 따른 입자 크기의 변화를 알아보기 위해 DLS 방법으로 PLGA에 독소루비신이 접합된 나노 입자의 크기를 분석하였다(그림 8). 그림에서 보는 것처럼 나노 입자의 크기는 약 1주일 동안 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 이것으로 나노 입자의 분해 양상이 bulk erosion이라는 것을 짐작할 수 있다.

그림 9는 독소루비신 접합 PLGA 나노 입자와 독소루비신과 PLGA를 단순히 섞어 만든 나노 입자의 누적 방출량을 시간에 따라 구한 것이다. 독소루비신과 PLGA를 섞어 제조한 나노 입자의 경우, 초기 7일 동안만 방출이 이루어지는 burst 효과를 보였으나, 독소루비신이 PLGA에 접합된 경우에는 수 주 동안 지속적인 방출을 보였다. 이것은 독소루비신이 PLGA에 접합되어 있기 때문에 PLGA의 분해 속도에 의해 방출이 조절되기 때문으로 생각된다.

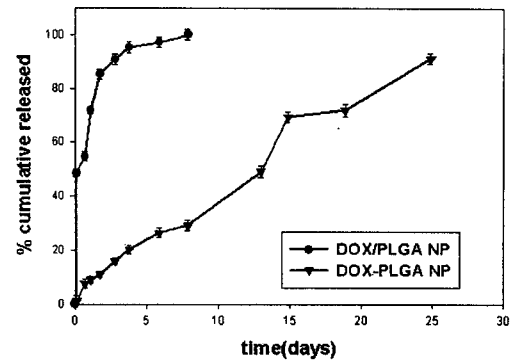


그림 9. 독소루비신 나노 입자의 누적 방출량.

PLGA는 분자량이 1,000이하로 될 때만 수용액에 녹기 때문에 이런 현상이 발생된 것이다. 결과적으로 독소루비신을 PLGA에 접합시킴으로써 독소루비신의 지속적인 방출을 얻을 수 있었다.

9. 결 론

나노 입자는 지금까지 수많은 연구에 의해 약물 전달체로서의 가능성이 충분히 입증되었다. 나노 입자의 크기는 전자현미경 뿐만 아니라 광산란 방법에 의해서도 구할 수 있다. 또, 입자의 모양은 SEM 또는 TEM을 이용하여 측정가능하며, SEM은 나노 입자의 겉모습, TEM은 보다 정확한 개별적 나노 입자의 모습까지도 관찰할 수 있다. 나노 입자로부터 방출된 약물을 측정하는 방법은 투석 백을 이용한 방법, 원심분리를 이용한 방법 등이 있다. 독소루비신과 생분해성 고분자인 PLGA를 접합시켜 나노 입자를 제조한 후 그 특성을 알아보았다. 생체분해성 고분자로 제조된 나노 입자는 생체조건에서 분해되며 이 고분자에 접합된 독소루비신은 고분자의 분해 속도의 영향을 받아 수 주 동안 지속적인 방출효과를 나타냈다.

참 고 문 헌

1. Couvreur and C. Vauthier, *J. Control. Rel.*, **17**, 187 (1991).
2. Y. Tabata, Y. Murakami, and Y. Ikada, *J. Control. Rel.*, **50**, 123 (1998).
3. J. Kreuter, *J. Control. Rel.*, **16**, 169 (1991).
4. Colin de Verdier, C. Dubernet, F. Nemati, M. F.

- Poupon, F. Puisieux, and P. Couvreur, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 504 (1994).
5. Colin de Verdiere, C. Dubernet, F. Nemati, M. F. Poupon, F. Puisieux, and P. Couvreur, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **33**, 504 (1994).
6. L. S. Heuser and F. N. Miller, *Cancer*, **57**, 461 (1986).
7. L. W. Seymour, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, **9**, 132 (1992).
8. H. Maeda and Y. Matsumura, *CRC Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Sys.*, **6**, 193 (1989).
9. H. S. Yoo, J. E. Oh, K. H. Lee, and T. G. Park, *Pharm. Res.*, **16**, 1114 (1999).
10. H. S. Yoo and T. G. Park, *J. Control. Release*, **68**, 419 (2000).