한국생물공학회지 제22권 제4호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 22, No. 4, 213-217(2007)

단백질 약물 방출속도에 미치는 친수성 첨가제의 영향

[1]권 영 관 · [2]김 지 현 · † [1]유 영 제
[1]서울대학교 화학생물공학부, [2]동국대학교 생명화학공학과
(접수 : 2007. 2. 2., 게재승인 : 2007. 5. 8.)

Effects of Hydrophilic Additives on the Release Rate of Protein Drugs

Young Kwan Kwon[1], Ji Hyeon Kim[2], and Young Je Yoo[1]†
[1]School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
[2]Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea
(Received : 2007. 2. 2., Accepted : 2007. 5. 8.)

It has been reported that hydrophobic additives generally decrease the release rate of protein drugs from drug delivery systems (DDS) and hydrophilic additives increase the release rate. In many cases, however, the addition of hydrophilic molecule is necessary for improving the stability of protein drugs. In the present work, the effects of hydrophilic additives on the release profiles, and micelle formation of protein drug formulations were investigated to develop a novel method for protein drug delivery. For model protein drug, bovine serum albumin (BSA) was employed and several hydrophilic additives were used in the release experiments. Hydrophilic additive D-sorbitol showed the lower release rates of BSA than other hydrophobic additives due to the gel strengthening ability of the additive and the optimum concentration of D-sorbitol was 3 w/v % for the retarded release rate. In addition, it was found that the addition of D-sorbitol was very effective for obtaining homogeneous and stable DDS. The results were discussed in terms of the micelle formation and the micelle structure, i.e., the differences in gel structure and the distribution of drugs in micelles.

Key Words : Protein drug formulation, drug delivery, pluronics, additive, D-sorbitol

서 론

최근 펩타이드, 단백질 약물 전달 시스템에 관한 관심이 집중되고 있다. 단백질 약물은 대부분 주사로 투여되고 있으나 최근 경구 투여 등 새로운 약물 전달법에 관한 연구가 진행되고 있다. 그러나 아직까지 약물의 투과도가 낮고 효소에 의한 약물 분해 및 낮은 pH에 의한 불활성화 등의 많은 문제점을 나타내고 있어(1, 2) 해결해야 할 과제가 많은 상황이다. 한편 단백질 약물의 생물학적 이용성을 향상시키기 위해서는 일정 기간 동안 약물 방출 속도를 조절하고 유지하거나 인체 내 원하는 부위로 효과적으로 전달하는 방법 등이 매우 중요하며(3), 이를 위해 다양한 천연 또는 합성고분자가 약물 전달체로 활용되고 있다(4). 한편 표적 지향형 약물전달 제제로 자기조합형 거대분자응집 복합체를 활용하는 연구가 보고되고 있다(5). Pluronics는 poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) 블록 공중합체의 일종이다(6). Pluronics는 젖음성, 소포성, 안정성이 우수하여 제약 및 의학 용으로 활용이 가능한 것으로 알려져 있다. 또한 비이온성 계면활성제로 pluronic 마이셀 안쪽에서 약물을 가용화시키고 마이셀 외부는 비독성, 비면역성의 polyoxyethylene 블록을 형성하여 약물전달을 위한 미세구조체로 활용이 가능하다. 인터루킨-2의 복막 투과(7) 및 안과용 국소 전달(8, 9)을 위해 pluronic를 활용하는 연구가 보고되었다.

일반적으로 고분자인 단백질 약물은 저분자 화합물 약물보다 약물 방출 속도가 빠른 것으로 알려져 있다. 이는 수분이나 체액등에 의한 gel swelling 현상으로 설명되는데 고분자 단백질 약물의 경우는 저분자 화합물에 비해 약물제제 내부로의 수분 침투가 빨라 나타나는 현상으로 알려져 있다. 따라서 수분의 침투속도와 약물방출 속도간에는 밀접한 관계가 있고 약물 방출속도를 조절하는데 첨가제가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(10, 11). 친수성 첨가제는 약물 방출속도를 증가시키나 친유성 첨가제는 약물 방출 속도를 감소시킨다. 그러나 친유성 첨가제는 약물 방출속도를 감소시킴에도 불구 약물제제 제조 과

† Corresponding Author : School of Chemical and Biological Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel : +82-2-880-7411, Fax : +82-2-871-1659
E-mail : yjyoo@snu.ac.kr

정에서 높은 점도와 상분리 현상이 문제점으로 지적되고 있으며 안구용 약물에서 안구혼탁 등 일부 부작용이 관찰되기도 하였다.

본 연구에서는 bovine serum albumin (BSA)을 모델 단백질 약물로 설정하고 BSA 함유 pluronic 약물제제에서 다양한 첨가제가 약물 방출 속도에 미치는 영향을 고찰하였다. 약물 방출 속도를 감소시키면서 낮은 점도와 상분리 없는 균일한 상태를 유지시킬 수 있는 효과적인 첨가제에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

시약

Pluronic F127은 한국 BASF에서 기증받아 사용하였다. D-sorbitol, methylcellulose (MC), Polyvinyl pyrrolidone (PVP), FITC-albumin (BSA)은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 1, 6-Diphenyl-1, 3, 5-hexatriene (DPH)은 Aldrich 사에서 구입하였다. D-sorbitol은 98% 중량 퍼센트 이상을 사용하였다. Methylcellulose의 점도는 20°C, 2% 수용액에서 15 cp였으며 Polyvinyl pyrrolidone의 평균 분자량은 10,000, 점도는 12~18 cp였다.

FITC-albumin의 pluronic 제제의 제조

FITC-albumin 함유 pluronic 제제는 콜드 방법(12)을 변형하여 제조하였다. 먼저 25% (w/v)의 pluronic 수용액을 제조하였다. 제조한 pluronic 수용액 20 mL에 일정량의 첨가제를 첨가하여 4°C에서 용해하고 용액이 균일화되도록 24~60시간 동안 4°C에서 보관하였다. 이후 첨가제가 함유된 pluronic 용액에 FITC-Albumin (6.5 mg/5 ml)을 추가하여 4°C에서 보관하였다. Pluronic 제제를 첨가제 종류에 따라 PF127MC, PF127PVP, PF127Sorb로 구분하였고 첨가제를 첨가하지 않은 제제는 control PF127이라 하였다.

In vitro 약물 방출 연구

*In vitro*에서의 FITC-Albumin 방출 연구를 37°C에서 수행하였다. 먼저 PF127 약물 제재를 vial에 담아 37°C 항온조에서 젤을 형성시켰다. 젤이 형성된 후 3 mL의 증류수를 vial에 첨가하고 10분 간격으로 젤에서 방출되는 용액 1 mL를 샘플링하였다. 샘플링 후 부피 변화를 막기 위해 증류수 1 mL를 다시 추가하였다. 첨가제의 종류와 농도를 변화시켜가며 동일한 실험을 반복하였다. 샘플링 용액 속 FITC-Albumin 양은 Spectrofluometer를 이용하여 37°C에서 정량하였다.

상대 점도 측정

Pluronic 제제의 상대 점도를 점도계 (Tokimec Inc.)를 이용하여 측정하였다. 측정 오차를 감소시키기 위해 시료 당 점도를 6번씩 측정하여 평균 점도를 구하여 사용하였다.

마이셀 형성 관찰을 위한 염료 용해

증류수에 고분자와 첨가제를 용해시켜 pluronic 수용액을 제조하고 적정한 농도로 희석하였다. 메탄올에 DPH을 용해하여 4 mM DPH 염료 stock 용액을 제조하고 pluronic 2.5 mL에 DPH stock 용액 25 L를 첨가하여 염료 최종 농도를 메탄올 1% v/v, DPH 0.4 mM이 되게 하였다. 용액을 3~24시간 동안 암실에 두어 평형에 도달하게 한 후 spectrophotometer를 이용하여 30°C, 356 nm에서 DPH 염료 양을 정량하였다.

결과 및 고찰

PF127 제제의 *in vitro* 약물 방출 특성

첨가제가 단백질 약물 방출속도에 미치는 영향을 고찰하였다. 약물 제제에서 약물의 방출속도는 약물제제 속 첨가제의 용해도와 분자량 등 크기에 영향을 받는다(13). 첨가제가 친수성일 경우 약물제제 내부로의 물의 침투가 용이하여 약물방출 속도가 증가하며 분자량이 큰 경우 점도를 향상시켜 약물방출 속도를 감소시키는 것으로 보고되었다. 또한 크기가 큰 첨가제는 신장으로 배출되지 않고 신체 내부에 축적될 수 있기 때문에 약물제제를 만들 때에는 첨가제의 크기 및 생분해성 여부에 대한 고려도 필요하다. 본 연구에서는 친유성인 methylcellulose (MC), 친수성이며 크기가 큰 Polyvinyl pyrrolidone (PVP), 친수성이며 크기가 작은 D-sorbitol 등 세 종류의 첨가제를 선택하여 약물 방출특성을 고찰하였다.

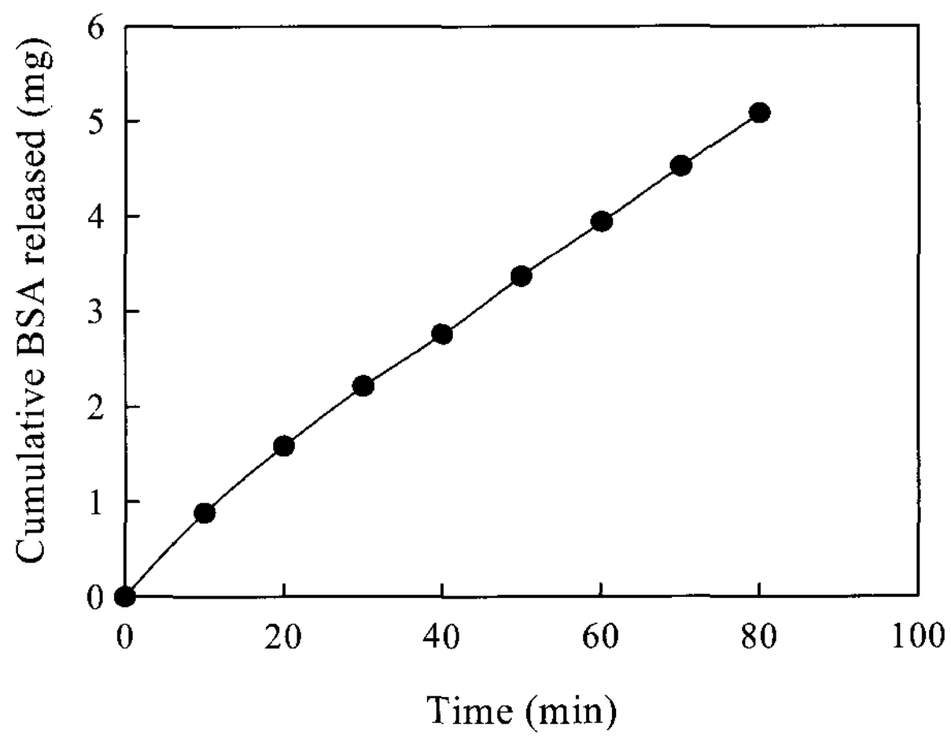


Figure 1. The cumulative amount of the released BSA in the control PF127 formulation.

먼저 첨가제가 없을 때의 control PF127 제제에서의 BSA 방출 특성을 살펴보았다. Fig. 1에서와 같이 BSA 누적 방출양은 시간에 따라 선형적으로 증가하고 있으며 PF127 제제에 초기 함유되어 있던 BSA 양의 80%가 80분 내에 방출되었다.

첨가제의 종류 및 농도가 PF127 제제 속 단백질 방출에 미치는 영향을 고찰하였다. 80분이 경과한 후 방출된 단백질 양을 측정하여 초기 단백질 함유량에 대비하여 나타내었다. Fig. 2에서와 같이 BSA의 누적 방출량은 첨가제의

특성 및 농도에 영향을 받아서 당초 예상과 같이 친유성 MC는 BSA의 방출을 감소시키고 친수성 PVP는 BSA의 방출을 증가시킴을 알 수 있었다. 또한 첨가제 농도가 증가할수록 방출속도 감소 및 증가 현상이 심화됨을 알 수 있었다. 한편 D-sorbitol 을 첨가하였을 경우 친수성 첨가제임에도 불구 BSA 방출 속도가 감소하였고 오히려 일정 농도 범위에서는 친유성 MC에서보다 낮음을 알 수 있었다. 그러나 3% (w/v) 이상의 고농도에서는 D-sorbitol의 농도가 증가할수록 BSA의 방출 속도가 증가하여 일반적인 친수성 첨가제에서와 같은 약물 방출 특성을 보임을 알 수 있었다. 첨가제는 약물제제 gel 구조를 강화하기 위해 첨가되는데 D-sorbitol의 경우 친수성임에도 불구하고 크기가 작아 일정 농도 범위까지는 gel 구조를 강화하는 역할을 하여 약물 방출 속도를 감소시키는 것으로 보인다. 그러나 일정 농도 이상에서는 체액의 투과가 증가하여 약물의 방출속도가 증가하는 것으로 판단된다. 본 시스템에서 약물 방출 속도 감소 면에서 볼 때 최적의 첨가제는 3% (w/v) D-sorbitol 임을 알 수 있었다.

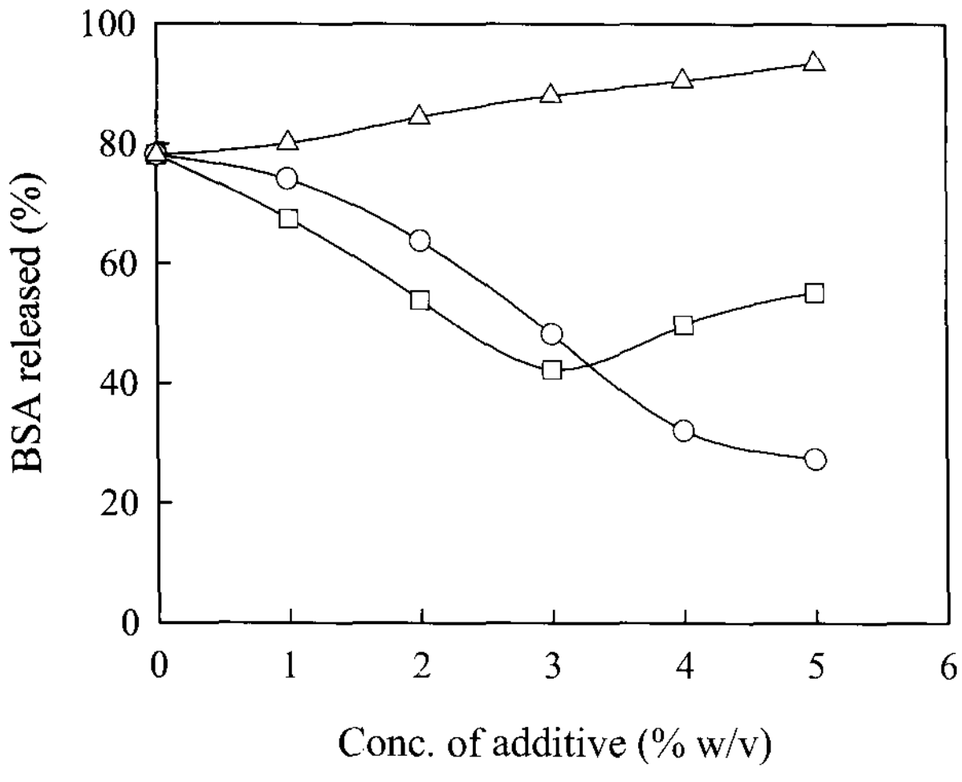


Figure 2. The cumulative amount of the released BSA at the various additives (△: PVP, □: D-sorbitol, □: MC).

약물제제의 상대점도

다양한 첨가제를 함유한 pluronic 단백질 약물제제에서 점도와 약물 방출 속도와의 관계를 고찰하였다. 점도는 약물 방출속도에 중요한 역할을 하며 점도가 증가할수록 약물 방출 속도가 감소하는 것으로 보고되고 있다(14, 15). 그러나 점도가 높을 경우 약물제제 제조과정에서 어려움이 있기 때문에 점도가 낮아야 하며 특히 본 시스템의 경우 4°C에서 약물제제를 제조하였기 때문에 저온에서의 점도가 중요하다.

Fig. 3에서와 같이 친유성 MC를 첨가한 약물제제 PF127MC 의 경우 MC 농도가 증가함에 따라 점도가 급격히 증가하였다. 특히 3% 이상에서는 점도가 200 cp 이상으로 증가하여 약물제제를 제조하기가 매우 어려웠다. 반면 친수성 PVP와 D-sorbitol을 각각 첨가한 약물제제 PF127PVP, PF127Sorb의 경우 첨가제 농도 증가에도 불구하고 50~80 cp 수준의 낮은 점도를 나타내고 있다. Control PF127 제제의 점도가 87.2 cp임을 감안할 때 친수성 첨가제가 오히려 점도를 감소시킴을 알 수 있었다. 한편 PF127Sorb 제제의 경우 D-sorbitol 농도와 관계없이 50 cp 수준의 낮은 점도를 일정하게 유지하고 있어 점도가 약물 방출 속도 감소에 미치는 영향은 없는 것으로 보인다. 또한 점도가 낮고 균일한 액상을 유지하여 약물제제 제조에 좋은 환경을 나타내고 있었다.

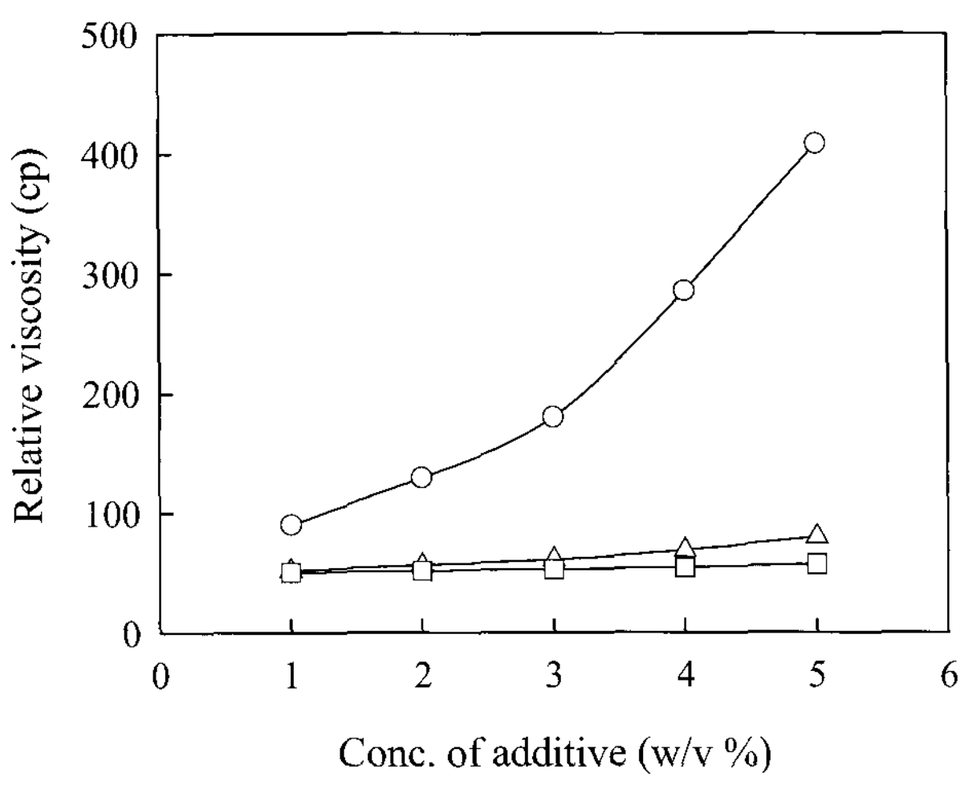


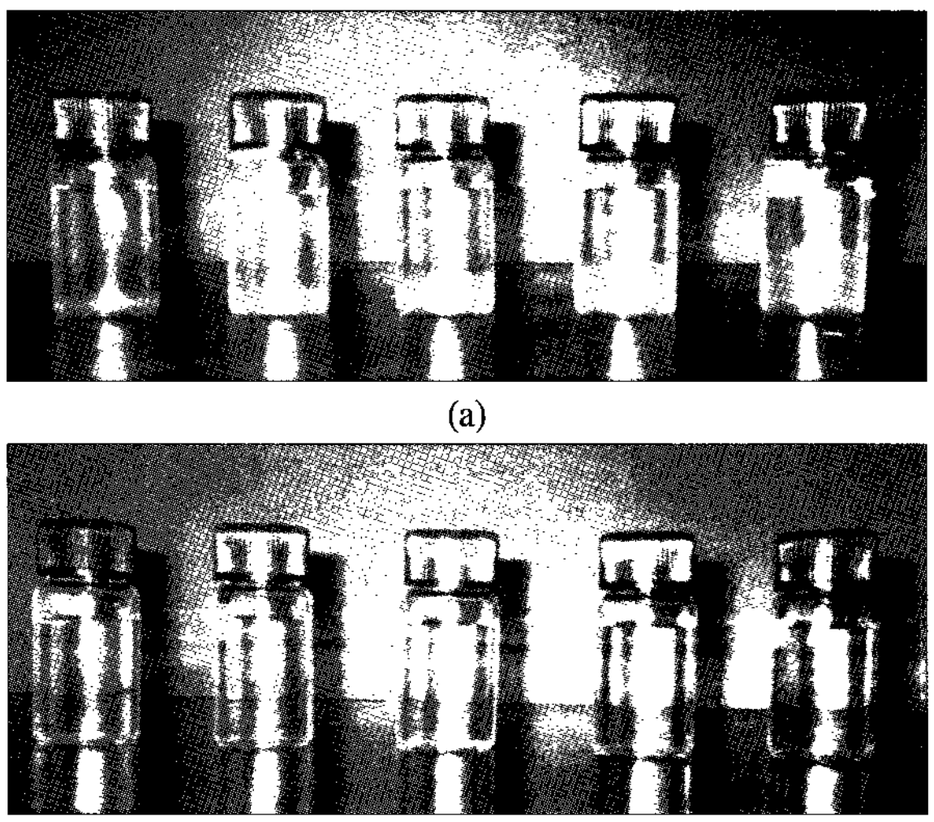
Figure 3. Relative viscosity of the PF127 formulations containing various additives (△: PVP, □: D-sorbitol, □: MC).

Pluronic 제제 안정성

약물의 안정성은 약물전달체 설계에 있어 매우 중요한 요소이다. Pluronic은 수용액에서 마이셀이 형성되고 마이셀들이 3차원 구조로 안정화된 gel matrix를 형성하는 것으로 보고되고 있다(16, 17). Katakam 등(18)은 인체성장호르몬의 gel matrix 안에서의 안정성과 단백질 방출 특성에 관한 연구를 수행하여 pluronic gel에서 단백질이 안정화됨을 보고하였다. 한편 약물을 함유하기 위한 pluronic gel matrix 자체의 안정성도 약물제제 제조 및 안정성 확보에 있어서 중요한 요소이다. 특히 첨가제는 마이셀과 gel의 형성 및 구조에 영향을 미쳐 결과적으로 약물방출 특성에도 관여할 수 있다. 그러나 pluronic이 pH 민감형 고분자와 혼합되었을 때 상분리 현상이 관찰된 바 있으나(19) 첨가제 등이 첨가되었을 경우 pluronic gel matrix의 안정성에 관한 연구는 아직까지 미흡한 상황이다.

먼저 MC와 D-sorbitol을 첨가한 Pluronic 제제의 안정성을 살펴보았다. Fig. 4(a)에서와 같이 MC를 첨가한 pluronic 제제의 경우 pluronic gel matrix와 MC의 뚜렷한 상분리 현상을 관찰할 수 있다. 이러한 상분리 현상은 BSA 약물이 첨가되면 약물, 첨가제, 고분자 물질 간의 상호작용을 변화시켜 궁극적으로 약물 전체 제제에서 BSA의 분포 정도를 변화시킬 수 있다. 따라서 최종 약물제제에서 약물이 균일하게 분포되어 있을 가능성이 매우 높고 이에 따라 약물 방출 특성의 변화가 있을 것으로 예측된다. 그러나 D-sorbitol이 첨가된 Fig. 4(b)의 경우에서는 상분리가 없고

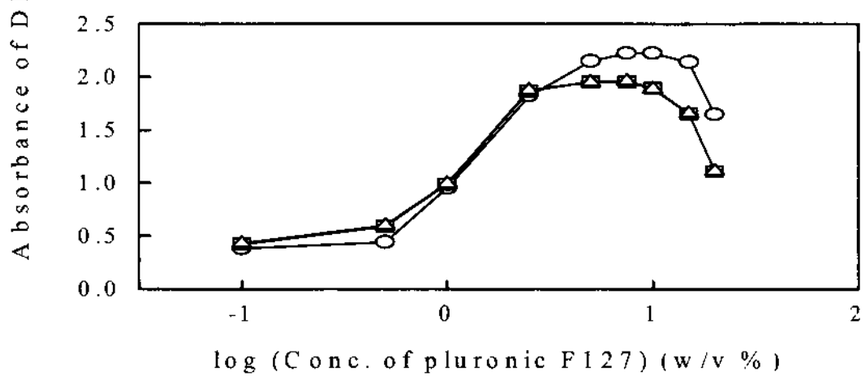
D-sorbitol과 pluronic gel이 균일한 용액상태를 유지하고 있었다. 따라서 이 제제에 BSA 약물이 첨가된 경우 약물이 균일하게 분포된 약물제제가 만들어지고 약물이 pluronic gel matrix 내에서 안정화되며 이에 따라 약물방출 특성도 변화되지 않을 것으로 판단된다.



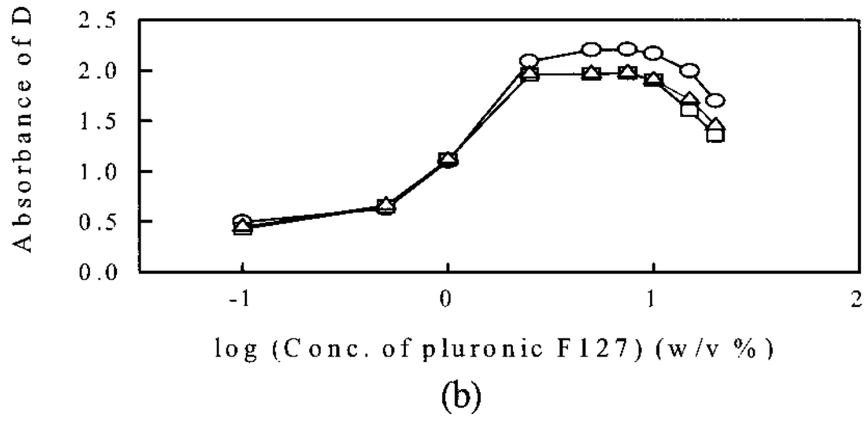
(a)

(b)

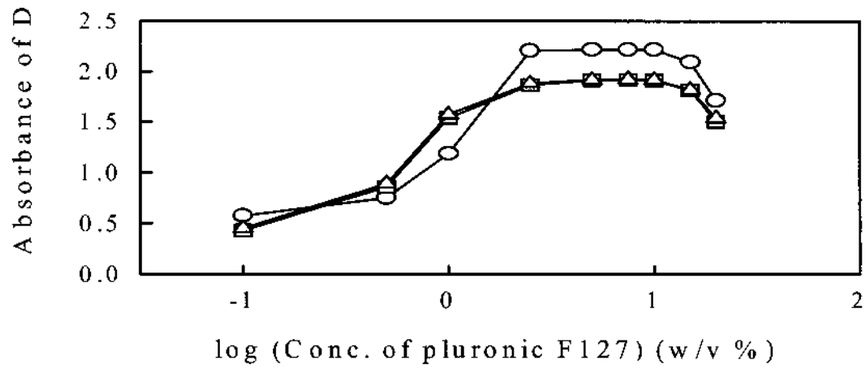
Figure 4. Stability of PF127 formulations containing (a) MC, (b) D-sorbitol.



(a)



(b)



(c)

Figure 5. UV absorbance of DHP at the various pluronic concentrations (△: PVP, □: D-sorbitol, □: MC) ((a) 1% additive, (b) 2% additive, (c) 3% additive).

Pluronic 수용액에서 첨가제가 마이셀 형성 및 구조에 미치는 영향을 간접적으로 살펴보았다. 첨가제 종류 및 농도를 달리한 다양한 pluronic 수용액에서의 마이셀 형성 특성을 DPH (1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene) 염료의 가용화 여부를 측정하여 조사하였다. 다양한 농도의 pluronic 수용액에 다양한 첨가제와 DPH 염료를 첨가한 후 염료의 농도를 측정하여 마이셀 형성 특성을 관찰하였다. 첨가제 농도가 1~2%에서는 첨가제 종류와 무관하게 CMC가 동일함을 알 수 있었다(Fig. 5(a), (b)). 그러나 Fig. 5(c)에서와 같이 첨가제 농도가 3%일 때 첨가제 종류에 따라 마이셀 형성 특성이 다름을 알 수 있었다. 친수성 첨가제가 첨가된 경우 친유성 첨가제 MC에 비해 CMC가 낮아서 낮은 농도의 pluronic으로도 약물제제를 만들 수 있다. 또한 친수성 첨가제의 경우 친수성인 마이셀 표면에 작용하여 마이셀 구조를 좀 더 강화하는 역할을 할 것으로 보인다. 한편 친수성 첨가제인 D-dorbitol과 PVP의 경우에는 DPH 가용화 정도가 유사하여 친수성일 경우 마이셀 형성에서 첨가제 종류는 관계가 없는 것으로 보인다.

요 약

첨가제가 단백질 약물 방출 속도 및 약물 제제 제조 및 구조에 미치는 영향을 고찰하였다. 친수성 첨가제인 D-sorbitol의 경우 친유성 첨가제보다 단백질 약물 방출 속도를 감소시킬 수 있었으며 최적의 농도는 3% (w/v)로 나타났다. 또한 제제 제조시 점도를 낮게 유지할 뿐 아니라 상분리 없는 균일한 pluronic 용액상태를 유지하여 약물이 첨가될 경우에 균일한 약물제제를 만들 수 있었다. 한편 D-sorbitol은 pluronic 수용액의 CMC를 낮추고 마이셀 표면에 작용하여 구조를 강화하는 역할을 수행하는 것으로 보인다. 따라서 pluronic 제제에 D-sorbitol을 첨가하여 단백질 약물의 안정성을 향상시키고 효과적인 약물전달 시스템을 설계할 수 있었다.

REFERENCES

1. Choi, C.-S., S.-M. Park, W.-H. Song, C.-M. Lee, K.-Y. Lee, D.-W. Kim, and J.-C. Kim (2003), Release properties of BSA from pectin beads for colonic drug delivery, *Kor. J. Biotechnol.* **18**, 161-164.
2. Fix, J. A. (1996), Oral controlled release technology for peptides: status and future prospects, *Pharm. Res.* **13**, 1760-1764.
3. Kim, M. S., K. S. Seo, H. Hyun, G. Khang, S. H. Cho, and H. B. Lee (2006), Controlled Release of bovine serum albumin using MPEG-PCL diblock copolymers as implantable protein carriers, *J. Appl. Pol. Sci.* **102**, 1561-1567.
4. Andrianov, A. K. and L. G. payne (1998), Polymeric carriers for oral uptake of microparticulates, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **24**, 155-170.
5. Kabanov, A. V., E. V. Batrakova, N. S. Melik-Nubarov, N. A. Fedoseev, T. U. Dorodnich, V. Y. Alakhov, V. P. Chekhonin, I. R. Nazarova, and V. A. Kabanov (1992), A new class of drug carriers: micelles of poly(oxyethylene)-poly(oxypropylene) block copolymers as microcantainers for drug targeting from blood in brain, *J. Cont. Relaease* **22**, 141-157.

6. Schmolka, I. R. (1991), Poloxamers in the Pharmaceutical Industry. In *Polymers for Controlled Drug Delivery*, P. J. Tarcha Eds., p189, CRC Press Boca Raton.
7. Johnston, T. P., M. A. Punjabi, and C. J. Froelich (1992), Sustained delivery of interleukin-2 from a poloxamer 407 gel matrix following intraperitoneal injection in mice, *Pharm. Res.* **9**, 425-434.
8. Miller, S. C. and M. D. Donovan (1982), Effect of poloxamer 407 gel on the miotic activity of pilocarpine nitrate in rabbits, *Int. J. Pharm.* **12**, 147-152.
9. Waring, G. O. and R. R. Harris (1979), Double masked evaluation of poloxamer artificial tear in keratoconjunctivitis. In *Symposium on Ocular Therapy. Vol. 11*, J. H. Leopold and R. P. Burnsm, Eds., p127, Wiley, N.Y.
10. Ford, J. L. M. H. Rubinstein, F. McCaul, and J. E. Edgar (1987), Importance of drug type, tablet shape and added diluents on drug release kinetics from hydroxypropylmethylcellulose matrix tablets, *Int. J. Pharm.* **40**, 223-224.
11. Desai, S. D. and J. Blanchard (1998), In vitro evaluation of pluronic F127-based controlled-release ocular delivery systems for pilocarpin, *Pharm. Sci.* **87**, 226-230.
12. Schmolka, I. R. (1972), Artificial skin. Preparation and properties of pluronic F-127 gels for the treatment of burns, *J. Biomed. Mat. Res.* **6**, 571-582.
13. Urtti, A., M. Juslin, and O. Minalainen (1985), Pilocarpine release from hydroxypropyl-cellulose-polyvinylpyrrolidone matrices, *Int. J. Pharm.* **25**, 165-178.
14. Guzman, M., F. F. Garcia, and M. R. Aberturas (1992), Polyoxyethylene-polyoxypropylene block copolymer gels as sustained release vehicles for subcutaneous drug administration, *Int. J. Pharm.* **80**, 119-127.
15. Bhardwaj, R. and J. Blanchard (1996), Using poloxamer 407 controlled-release delivery system for the α-MSH analogue melatan-I, *J. Pharm. Sci.* **85**, 915-919.
16. Alexandridis, P. and T. A. Hatton (1995), Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloid & Surfaces A* **96**, 1-46.
17. Alexandridis, P., D. Zhou, A. Khan (1996), Lyotropic Liquid Crystallinity in Amphiphilic Block Copolymers: Temperature Effects on Phase Behavior and Structure for Poly(ethylene oxide)-b-poly(propylene oxide)-b-poly(ethylene oxide) Copolymers, *Langmuir* **12**, 2690-2700.
18. Katakam, M., L. N. Bell, and A. K. Banga (1995), Effect of surfactants on the physical stability of recombinant human growth hormone, *J. Pharm. Sci.* **84**, 713-716.
19. Joshi, A., S. Ding, and K. J. Himmelstein (1993), US Patent 5, 252318