

Cyclosporin A가 봉입된 nanostructured lipid carriers의 물리적 특성연구

송충길 · 정석재 · 심창구 · 김대덕*

서울대학교 약학대학

(2008년 1월 14일 접수 · 2008년 2월 13일 승인)

Physical properties of cyclosporin A-loaded nanostructured lipid carriers

Chung Kil Song, Suk-Jae Chung, Chang-Koo Shim, and Dae-Duk Kim[†]

Department of pharmaceutics, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, South Korea

(Received January 14, 2008 · Accepted February 13, 2008)

ABSTRACT – Cyclosporin A (CyA), a potent immunosuppressive drug used in allogeneic transplants and autoimmune disease, is a typical water-insoluble drug. Recently, nanoparticle carriers were investigated to improve the intestinal absorption of drugs. In this study, CyA-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) were prepared from a hot o/w emulsion using the high pressure homogenization method. The NLCs were consisted of cationic lipids, solid lipids, liquid lipids (oils), surfactant and stabilizer. Encapsulation efficiency of CyA in NLCs was approximately 71%. The average particle size and zeta potential of NLCs were below 250 nm and above +40 mV, respectively. The morphology of NLCs was confirmed by transmission electron microscopy (TEM) analysis. Compared to the CyA powder, higher in vitro release of CyA from NLCs was observed after burst release within 30 min. Thus, CyA-loaded NLCs could be applied not only for parenteral route but also for gastrointestinal administration, which needs further investigation.

Key words – Cyclosporin A, Solid lipid nanoparticles, Nanostructured lipid nanoparticles

시클로스포린 (cyclosporine)은 Figure 1에서 나타난 것과 같이 11개의 아미노산으로 구성된 고리 폴리펩티드이다. 시클로스포린은 신장, 간, 심장등의 장기이식에서 발생하는 면역억제반응 그리고 류마티스와 같은 자가면역병을 치료하는 면역억제제로서 사용되고 있다.¹⁾ 그러나 높은 지용성과 낮은 장관 투과율에 의하여 경구투여시 낮은 생체이용률을 나타내고 용량 의존적인 신독성 및 신장기능 장애등의 부작용을 가지고 있어 약물의 사용에 있어서 많은 제약을 지닌다.^{2,3)} 이러한 물리적 한계성을 극복하고 부작용을 최소화하기 위한 방안으로 시클로스포린이 봉입된 미립자 전달체가 계속해서 개발되고 있다.⁴⁻⁶⁾

미립자 전달체인 에멀전은 난용성 약물의 가용화 및 경구 투여시 생체이용률을 향상시켜 경피, 정맥 그리고 경구투여 등 다양하게 사용되고 있다. 그러나 물리적인 불안정성 때문에 소화기관내에서 낮은 pH와 높은 이온강도등의 요인으로 의해서 치료에 적용하는데 제한을 받고 있다.⁷⁾ 이러한 에멀전의 안정성을 극복하기 위하여 지질을 이용한 나노입자가 1990년대 중반에 소개가 되었다. 고형지질 나노입자는 물리

적 안정성을 증가시키고 화학적으로 불안정한 약을 보호하여 분해를 방지할 뿐 아니라 약물 방출을 조절할 수 있는 장점을 가지고 있다.⁸⁾ 또한 고형지질 나노입자를 사용한 경우 입자의 서방성을 나타낼 뿐 아니라 정맥이나 안점막을 통한 흡수 그리고 심이지장으로의 전달시 약물 용액 자체 보다 높은 혈중약물 농도를 나타낸다고 알려져 있다.⁹⁾ 그러나 난용성 약물에 대한 고형지질의 용해도가 지극히 낮기 때문에 약물의 봉입효율이 현저히 떨어지는 단점이 있다. 이러한 고형지질 나노입자의 단점인 낮은 약물봉입율을 향상시키기 위해 오일을 고형지질과 함께 사용한 나노구조형 지질 전달체가 1990년말에 소개되었다.^{10,11)}

본 연구에서는, Figure 2와 같이 시클로스포린이 봉입된 oil/fat/water (o/f/w)형 나노구조형 지질 전달체를 제조하여 이에 따른 물리화학적 특성 및 방출 특성을 확인함으로써 경구형 제형으로서의 가능성을 평가하였다.

실험방법

실험재료 및 시약

시클로스포린은 (주) 종근당으로부터 공급받았다. 나노구조형 지질 전달체를 만들기 위하여 사용된 트리미리스틴과

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)880-7870, E-mail : ddkim@snu.ac.kr

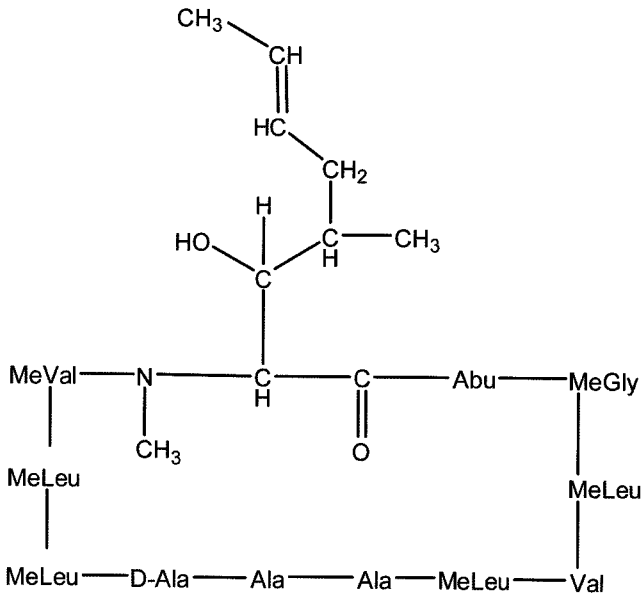


Figure 1—Chemical structure of cyclosporin A.

스테아릴아민은 TCI (Tokyo, Japan), 액상오일인 castor oil 은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 100% soybean phosphatidyl choline (100% soyPC)은 Lipoid (Ludwigshafen, Germany)에서, 폴록사머 188은 BASF(Ludwigshafen, Germany)에서 각각 공급받았다. 그 외의 시약과 용매는 특급 또는 1급을 사용하였다

액상오일에서의 용해도 측정

Table I에 나열한 다양한 액상오일에서의 시클로스포린 용해도를 실온에서 측정하였다. 액상오일 약 1 mL에 과량의 시클로스포린을 넣고 72시간 동안 교반하여 시클로스포린이 포화되도록 하였다. 시클로스포린이 녹아있는 액상오일은

Table I—Solubility of Cyclosporin A in Various Oils at Ambient Temperature

Oil	Solubility (mg/mL)
Castor oil (Ricinoleic acid)	500~600
Labrafil 2130	> 100
Labrafil 1944	> 100
Labrafac lipophile (triglycerides, mixed C8 & C10)	150
Olive oil (glycerides, predominantly C18 & C16)	25 ¹⁸⁾
Peanut oil (glycerides, predominantly C18)	40 ¹⁸⁾
Safflower oil (glycerides, predominantly C18)	70-80 ¹⁸⁾
Soybean oil (glycerides, predominantly C18 & C16)	36 ¹⁸⁾

13,200 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후, 상층액을 멤브레인 필터 (0.2 μm)를 사용하여 여과하고 메탄올로 적당히 희석하여 HPLC로 분석하였다. HPLC의 조건은, 흡광도 210 nm에서 C₁₈ (4.6×250 mm, Shiseido) 컬럼을 사용하였으며, 이동상은 메탄올과 물을 65:35 (v/v)로 혼합하여 1.0 mL/min의 속도로 흘려주었다. 또한 시클로스포린을 측정하기 위하여 컬럼온도는 65°C로 유지하였다.

나노구조 지질 전달체의 제조

시클로스포린이 봉입된 다양한 조성(Table II)의 나노구조 지질 전달체를 제조하기 위하여 Hot homogenization technique을 이용하였다. 고형지질인 트리미리스틴, 액상오일인 castor oil, 계면활성제인 100% soyPC 그리고 모델약물인 시클로스포린 혼합물을 튜브에 넣어 지질의 녹는점 이상인 75°C에서 용해하였다. 그리고 안정제로 사용된 폴록사머 188과 양이온성 계면활성제인 스테아릴아민은 같은 온도의 물 1 ml에 따로 혼합하여 용해하였다. 완전히 용해된 수상 혼합

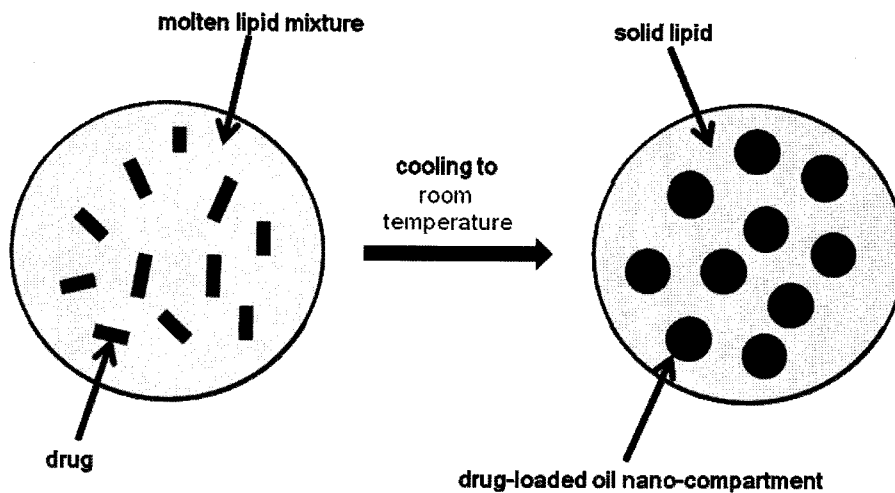


Figure 2—Schematic diagram of multiple type nanostructured lipid carriers (NLCs).

Table II—Composition of Various NLCs in 1 mL Aqueous Medium

Ingredient(mg)	Rx1	Rx2	Rx3	Rx4	Rx5
Trimyristin	100	97.5	95	92.5	90
Castor oil	0	2.5	5	7.5	10
100% soyPC	10	10	10	10	10
Poloxamer 188	15	15	15	15	15
Stearyl amine	10	10	10	10	10

물을 오일상 혼합물에 혼합하여 팁 초음파발생장치(Vibra cell, Sonic & Materials Inc, USA)를 이용하여 1분간 섞어 주어 균일하지 않은 hot-에멀전을 형성하였다. Hot-에멀전을 고압균질기(Inc EmulsiFlex-Cs, Avestin, Canada)를 사용하여 500 bar에서 5번 시행하여 입자의 크기가 균일한 hot-에멀전을 제조한 후 상온에서 냉각시켜 균일한 나노구조 지질 전달체를 얻었다.¹²⁾

나노구조 지질 전달체의 물리적 특성평가

시클로스포린이 봉입된 나노구조 지질 전달체의 입자의 크기, 입자의 분포 그리고 표면전하는 입자를 물에 분산하여 입도분석기 및 제타전위측정기(ELS-8000, Otsuka, Japan)를 사용하여 측정하였다. 또한 입자의 형태는 입자를 희석하여 grid위에 떨어뜨린 후 완전히 건조하여 투과전자현미경(JEM-1010, JEOL, Japan)을 사용하여 확인하였다. 나노구조 지질 전달체의 봉입률은 HPLC(Shimadzu, Japan)를 통하여 측정하였다. 제조한 나노구조 지질 전달체를 건조하여 클로로포름을 사용하여 완전히 녹인 후 아세토나이트릴로 시클로스포린을 추출한 후 상기의 HPLC법으로 정량하였다. 봉입률의 계산방법은 다음과 같았다.¹³⁾

Entrapment Efficiency (EE)%

$$= \frac{\text{Amount of measured CyA (mg)}}{\text{Amount of total CyA (mg)}} \times 100$$

비교용출시험

나노구조 지질 전달체에서의 시클로스포린의 방출을 확인하기 위하여 용출실험을 실시하였다. 시클로스포린이 봉입된 200 μ L 나노구조 지질 전달체를 셀룰로오스 투석막(GeBA, M.W 6-8 kDa)에 넣어 잘 밀봉한 후 5 mL 용출시험액(0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4, 0.2% sodium dodecyl sulfate (w/v))에 넣고 37°C water bath에서 100 rpm으로 흔들며 주었다. 정해진 시간에 용출액 0.2 mL를 취하여 0.2 μ m 멤브레인 필터로 여과한 후 시클로스포린의 함량을 HPLC법으로 사용하여 측정하였다. 또한, 용출액 채취 후 바로 용출시험액 동량을 용출기에 보충하여 용출시험액의 양

Table III—Physicochemical Properties of Various NLCs

Parameter	Rx1	Rx2	Rx3	Rx4	Rx5
size (nm)	228.2	250.7	244.9	241.3	230.3
poly dispersity	0.18	0.21	0.17	0.18	0.14
zeta potential (mV)	47.8	41.1	43.5	44.1	43.0

을 일정하게 유지하였다.¹⁴⁾

결과 및 고찰

나노구조 지질 전달체의 물리적 특성

고형지질 전달체의 약물봉입률이 낮은 단점을 극복하기 위하여 나노구조 지질 전달체에 시클로스포린을 봉입하였다. 다양한 액상 오일에서의 시클로스포린의 용해도를 HPLC로 측정한 결과는 Table I과 같았다. Castor oil에서의 시클로스포린의 용해도는 500~600 mg/mL를 나타내어 비교 액상 오일중 가장 높은 값을 나타내었다. Castor oil을 액상오일로 선택한 후 Table II와 같은 다양한 조성으로 고압 균질기를 통하여 나노구조 지질 전달체를 제조하였다. 제조된 입자의 크기와 표면전하를 입도분석기 및 제타전위측정기로 각각 측정한 결과는 Table III과 같았다. 약물의 봉입에 상관없이 입자의 크기는 220-250 nm를 나타내었다. 입자가 균일하게 형성되었는지를 확인하기 위한 척도인 입자의 분포도 (poly dispersity)는 0.2 이하를 나타내었다. 입자 표면의 전하는 약 +40 mV로서 양전하를 나타내었고 이것은 조성에 포함된 스테아릴아민때문인 것으로 생각된다. 상온 보관시 입자의 크기 증가나 응집현상등은 보이지 않았는데 이는 폴록사머에 의해 입자의 표면에 친수성 장벽이 형성되고 스테아릴아민에 의해 표면의 양전하가 입자의 안정성을 증가시키기 때문인 것으로 생각된다.¹⁵⁾ 시클로스포린을 봉입한 나노구조 지질 전달체 (Rx5)의 봉입률을 HPLC를 사용하여 측정한 결과 71%의 봉입률을 나타내었다. 하지만 castor oil이 없거나

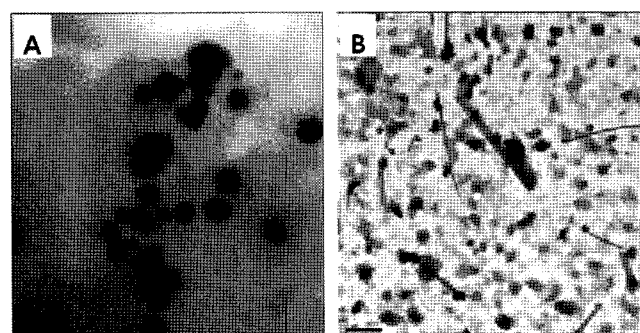


Figure 3—Transmission electron microscopic image of (A) Rx1 (Bar scale=100 nm) and (B) Rx5 (Bar scale=1 μ m).

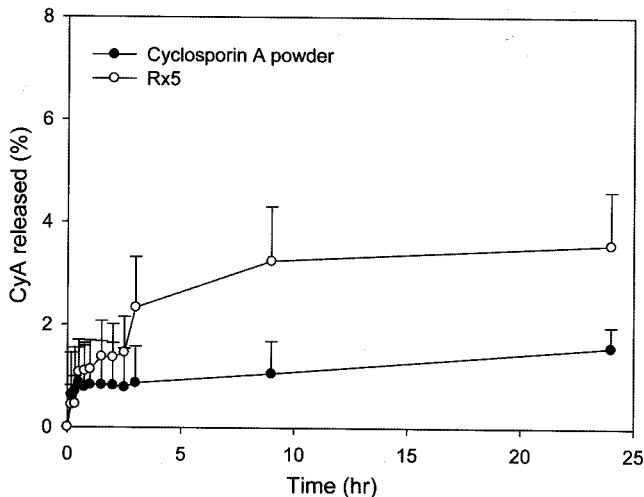


Figure 4—In vitro release profiles of cyclosporin A from NLC and cyclosporin A powder. The release medium was 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 0.2% sodium dodecyl sulfate at 37°C.

함량이 낮은 조성 (Rx1~Rx4)에서는 5 mg 시클로스포린이 전부 녹지 않았으며, 입자 제조 후 입자에서 약물이 급격히 방출되어 봉입률을 측정하지 못하였다. 투과전자현미경을 이용하여 관찰한 입자의 형태는 Figure 3과 같았다. Figure 3A는 오일을 사용하지 않는 고형지질입자 (Rx1)의 형태를 나타내고 있고 Figure 3B는 나노구조 지질 전달체 (Rx5)의 형태를 측정한 것으로 구형입자와 함께 편형형태의 입자형태가 확인되었고 이러한 관찰은 이미 보고된 문헌과 일치한다.¹⁶⁾

나노구조 지질 전달체에서의 시클로스포린의 방출

나노구조 지질 전달체로부터의 약물의 방출을 용출시험액 (0.1 M phosphate buffer saline, pH 7.4, 0.2% sodium dodecyl sulfate (w/v)) 에서 24시간동안 측정한 결과는 Figure 4와 같았다. 시클로스포린 분말로부터의 방출은 30분 이내에 완료되었으며, 전체량의 1% 정도만이 용출된 것은 시클로스포린의 난용성 때문인 것으로 생각된다. 그러나 나노구조 지질 전달체를 사용한 경우에는 2시간 30분까지 약 3% 이상의 초기 방출을 보였으며, 그 이후 방출이 천천히 진행되는 것을 확인할 수 있었다. 나노구조 지질 전달체의 이러한 초기 방출 현상은 표면에 존재하는 시클로스포린이 초기에 급격히 방출되고 그 이후 서서히 방출되기 때문인 것을 알 수 있었다.¹⁷⁾

결 론

시클로스포린은 면역억제제로서 에멀전 형태의 제제로 많

이 사용되고 있다. 이번 실험에서는 시클로스포린을 에멀전 제제가 아닌 지질 나노입자에 봉입하였으며, 이때 고형지질과 오일을 함께 사용한 나노구조 지질 전달체를 사용함으로써 에멀전 제제의 불안정성을 극복함과 동시에 지질 나노입자의 낮은 봉입률을 개선하고자 하였다. 나노구조 지질 전달체의 입자크기는 220~250 nm였으며, Rx5에서의 시클로스포린의 봉입률은 70% 이상을 나타내었다. 입자로부터의 시클로스포린의 방출을 in vitro에서 관찰한 결과, 시클로스포린의 분말상태보다 높은 방출 속도가 2시간 이상 지속되었다. 시클로스포린이 봉입된 나노구조 지질 전달체는 초기에 입자표면에 존재하는 약물이 급격히 방출된 후 서서히 약물이 방출되는 것을 알 수 있었다. 따라서 나노구조 지질 전달체는 경구투여시 약물의 큰 손실 없이 장관내에서 흡수될 수 있는 약물 전달체로서 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 (F104AA010008-07A0101-00810)의 지원으로 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) J.L. Italia, V. Bhardwaj and M.N.V.R. Kumar, Disease, destination, dose and delivery aspects of ciclosporin: the state of the art, *Drug Disco. Today*, **11**, 846-854 (2006).
- 2) D. Faulds, K.L. Goa and P. Benfield, Cyclosporin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in immunoregulatory disorders, *Drugs*, **45**, 953-1040 (1993).
- 3) N.E. Taylor, A.E. Mark, P. Vallat, R.M. Brunne, B. Testa and W.F. Van Gunteren, Solvent dependent conformation and hydrogen bonding capacity of cyclosporin A: evidence from partition coefficient and molecular dynamics simulations, *J. Med. Chem.*, **36**, 3753-3764 (1993).
- 4) J.L. Italia, D.K. Bhatt, V. Bhardwaj, K. Tikoo and M.N.V. Ravi Kumar, PLGA nanoparticles for oral delivery of cyclosporine: Nephrotoxicity and pharmacokinetic studies in comparison to Sandimmune Neoral[®], *J. Control. Release*, **119**, 197-206 (2007).
- 5) M.H. El-Shabouri, Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A, *Int. J. Pharm.*, **249**, 101-108 (2002).
- 6) E. Ugazio, R. Cavalli and M.R. Gasco, Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **241**, 341-344 (2002).
- 7) P.J. Carrigan and T.R. Bates, Biopharmaceutics of drugs administered in lipid-containing dosage forms I: GI absorption of griseofulvin from an oil-in-water emulsion in the rat,

- J. Pharm. Sci.*, **62**, 1476-1479 (1973).
- 8) J.F. Pinto and R.H. Müller, Pellets as carriers of solid lipid nanoparticles (SLN™) for oral administration of drugs, *Pharmazie*, **54**, 506-509 (1999).
 - 9) K. Manjunath, V. Venkateswarlu, Pharmacokinetics, tissue distribution and bioavailability of nitrendipine solid lipid nanoparticles after intravenous and intraduodenal administration, *J. Drug Target.*, **14**, 632-645 (2006)
 - 10) M. Radtke and R.H. Müller, NLC-nanostructured lipid carriers: the new generation of lipid drug carriers, *New Drugs*, **2**, 48-52 (2001).
 - 11) R.H. Müller, M. Radtke and S.A. Wissing, Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs, *Int. J. Pharm.*, **242**, 121-128 (2002).
 - 12) L. Hu, X. Tang and F. Cui, Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs, *J. Pharm. Pharmacol.*, **56**, 1527-1535 (2004).
 - 13) Q.Y. Xiang, M.T. Wang, F. Chen, T. Gong, Y.L. Jian, Z.R. Zhang and Y. Huang, Lung-targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles, *Arch. Pharm. Res.*, **30**, 519-525 (2007)
 - 14) Y. Li, K.J. Zhu, J.X. Zhang, H.L. Jiang, J.H. Liu, Y.L. Hao, H. Yasuda, A. Ichimaru and K. Yamamoto, In vitro and in vivo studies of cyclosporin A-loaded microspheres based on copolymers of lactide and epsilon-caprolactone: comparison with conventional PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.*, **295**, 67-76 (2005)
 - 15) C. Washington, Stability of lipid emulsions for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **20**, 131-145 (1996).
 - 16) K. Jores, W. Mehnert, M. Drechsler, H. Bunjes, C. Johann and K. Mäder, Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *J. Control. Release*, **95**, 217-227 (2004).
 - 17) J.X. Wang, X. Sun and Z.R. Zhang, Enhanced brain targeting by synthesis of 3',5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **54**, 285-290 (2002).
 - 18) Cyclosporin emulsions, US Patent 5660858 (1997).