

효율적인 약물 방출 스텐트 제조를 위한 고분자 코팅물질 개발

박태현 · 조은애 · 나 건[†]

가톨릭대학교 생명공학부 생명공학전공

(2011년 3월 31일 접수, 2011년 5월 2일 수정, 2011년 5월 4일 채택)

Development of Polymeric Coating Material for Effective Drug-eluting Stent

Tae Hyun Park, Eun Ae Jo, and Kun Na[†]

Department of Biotechnology, The Catholic University of Korea

43-1 Yokkok 2-dong, Wonmi-gu, Bucheon 420-743, Korea

(Received March 31, 2011; Revised May 2, 2011; Accepted May 4, 2011)

초록: 효율적 비혈관용 약물방출 스텐트 제조를 위해 풀루란 아세테이트(pullulan acetate, PA)가 테프론(polytetrafluorethylene; PTFE)으로 피막된 스텐트(PTFE-stent)의 코팅재료로 연구되었다. 파크리탁셀 함유 PA가 코팅된 PTFE-stent의 표면, 약물 방출 거동, 세포독성이 측정되었으며, 동물실험을 통해 이의 기능이 검토되었다. 전자현미경으로 표면을 관찰한 결과 표면이 PTFE 피막에 비해 훨씬 매끄러웠고, 약물은 80일 동안 서방적 방출 거동을 보였다. PA와 함께 코팅된 파크리탁셀의 안정성을 annexin V 결합 염색법을 통하여 측정된 결과 apoptosis의 비율이 천연 파크리탁셀과 유사한 것으로 보아 봉입된 파크리탁셀의 변성이 없음을 알 수 있었다. 소동물 실험에서는 파크리탁셀이 봉입된 PA-PTFE가 고형암의 성장을 억제하였다. 위의 결과로 보아 PA는 효율적 비혈관계 약물방출 스텐트 개발에 매우 유용한 물질이라고 기대된다.

Abstract: For the preparation of effective non-vascular drug eluting stent (DES), pullulan acetate (PA) was investigated as a coating material for polytetrafluorethylene (PTFE)-covered stent. PA was coated on PTFE-covered stent (PTFE-stent) by dip coating technique, and then its surface morphology, drug release behavior and cellular toxicity were tested. Field emission-scanning electron microscopy (FE-SEM) result indicated that its surface was smoother after PA coating without any cracking. The sustained release behavior of paclitaxel from PA-coated PTFE membrane was observed for 80 days. Also, the biological stability of paclitaxel in the membrane was confirmed by annexin V binding assays. Furthermore, the antitumor activity was demonstrated by an *in vivo* test against CT-26 murine colorectal tumors. From the results, we concluded that PA was expected as a useful coating material to design an effective non-vascular DES.

Keywords: drug eluting stent, pullulan acetate, paclitaxel, sustained release.

서 론

90년대 금속 스텐트의 개발에 이어 약물 방출 스텐트의 개발은 현재 혈관계(vascular stent) 및 비혈관계(non-vascular stent) 중앙 치료에 폭 넓게 사용된다. 대표적인 약물 방출 스텐트에는 TaxusTM, CypherTM, EndeavorTM 등이 있다. 하지만 주로 혈관계 약물 방출 스텐트로 식도, 위장관, 담도, 췌장, 대장 등 비혈관계 중앙 치료용 약물 방출 스텐트에 대한 연구는 부족한 실정이다.

비혈관계 약물 방출 스텐트는 소화관 등의 양성 및 악성 중앙 치료에 사용되는 치료 방법이다. 이러한 소화관 중앙에는 외상이나 관 내의 2차적 자극 등에 의한 양성 중앙(benign tumor)과 소화기암에 의한 악성 중앙(malignant tumor)으로 나눌 수 있다. 양성 중앙에 의한 조직의 과증식(over growth)은 혈관의 재협착과 유사성을 갖는데 이러

한 비혈관계 질환 치료를 위해 생체적합성 고분자와 약물을 함께 코팅한 약물 방출 스텐트에 대한 연구가 진행되고 있다.¹⁻³ 약물 방출 스텐트는 형상 기억과 생체적합성을 갖는 금속에 약물을 코팅하여 체내에 삽입되고 약물의 방출에 의한 질병 치료에 목적을 갖는다. 하지만 기존의 약물 방출 스텐트는 체내에서 약물의 방출 기간이 짧고 삽입 시 매끄럽지 못한 금속 표면으로 인해 내강의 염증반응이 발생하고 이는 조직의 과증식에 이르는 부작용들이 보고되고 있다. 한편 기존의 약물만 코팅된 스텐트의 방출 거동에 한계를 보완하기 위해 생체적합성 고분자를 이용하여 약물 방출 기간을 조절하고 보다 효율적인 약물 방출 스텐트의 개발을 위해 코팅 물질에 대한 연구가 시급하다.⁴⁻⁷

본 연구에서는 효율적인 약물 방출 스텐트의 제조를 위해 생체적합성 고분자를 이용하여 약물의 방출을 조절하고 부작용을 최소화하여 약물의 효능을 극대화시킬 수 있는 새로운 코팅용 고분자 물질의 개발을 수행하였다.

대표적인 생체적합성 고분자에는 poly(lactic acid) (PLA), poly

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kna6997@catholic.ac.kr

(glycolic acid) (PGA) poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ϵ -caprolactone), polyanhydride, poly(orthoester), poly(vinyl alcohol) (PVA), 폴루란, chondroitin sulfate, hyaluronic acid 등이 있다. 생체적합성 고분자는 생체 내에서 분해 시간이 길고 체내 대사 작용에 의해 물과 CO₂로 분해되어 어떠한 부작용 없이 체외로 배출 되는 고분자를 말한다.⁸⁻¹⁰ 이번 연구에서 사용된 생체적합성 물질인 폴루란은 maltotriose를 기본단위로 하여 $\alpha(1\rightarrow4)$, $\alpha(1\rightarrow6)$ 결합으로 구성된 일종의 α -glucan으로 *Aureobasidium pullulans*에 의해 세포 외로 생산되는 다당류이다. 독성이 없고 돌연변이성이 전혀 없는 가식성 천연 다당류로 알려져 있고 이런 여러 가지 특징들로 인해 무공해 재료로 약물 전달체뿐 아니라 광범위한 분야에 그 이용 가능성이 모색되고 있는 고분자이다. 그리고 고분자의 단량체인 글루코오스 링에 다수의 수산화기로 인해 화학적 개질이 가능하다. 이는 폴루란만이 아닌 황산콘드로이친 키토산같은 고분자에서 많이 적용되고 있다.^{11,12} 약물 방출 스텐트에 사용되는 대표적인 약물들은 파크리탁셀, 젬시타빈(gemcitabine), 리팜피신(rapamycin) 등이 있다. 본 연구에서는 약물로 기존의 혈관용 스텐트에서 사용되고 있는 파크리탁셀을 선정하였다. 파크리탁셀은 정맥 주사를 통해 다양한 병소의 종양(난소암, 자궁경부암, 비소세포폐암, 위암, 유방암) 치료에 사용되는 대표적인 항암제이다. 세포 분열주기를 G₂-M기에 머물게 하여 최종적으로는 세포사멸(apoptosis)에 이르게 하는 기작을 갖는 항암제이다.^{13,14}

생체적합성 고분자를 이용한 효율적인 약물 방출 스텐트의 제작을 위해서 폴루란의 수산화기를 아세틸기로 치환하여 폴루란 아세테이트(PA)에 소수성 관능기를 부여하였다. 유기용매에 용해된 PA와 파크리탁셀은 담금 방식을 통해 비혈관계 스텐트의 피막물질인 poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) 피막에 코팅되었다. 봉입된 파크리탁셀은 PA와의 소수성 상호작용을 통해 서방적인 약물 방출이 가능하다. PTFE 피막에 코팅하는 방식은 담금 방식(dip coating technique)으로 중력에 의해 PTFE-스텐트 표면에 코팅이 되는 방법이다. 코팅된 스텐트는 PTFE 피막 스텐트에 비하여 고르고 균일한 매트릭스 층이 형성될 것으로 예상된다. 담금 방식을 통한 표면의 코팅은 피막의 균질도가 높고, 두께 조절이 쉬우며 넓은 면에 코팅이 용이하고 여러 물질에 응용이 가능하다는 장점이 있다.¹⁵⁻¹⁷

이에 따라 체내 삽입 시에 금속 스텐트보다 비혈관 내벽의 미세 상처를 줄이는 효과를 기대할 수 있다. 생체적합성 고분자와 항암제를 이용한 PTFE-스텐트의 코팅 층의 적절한 두께와 고르고 균일한 표면의 특성을 확인하고 서방적인 약물 거동과 방출 약물의 안정성을 확인한다. 소동물 실험에서 또한 Balb/c mice를 통해 종양 세포의 증식이 억제됨을 확인하여 생체적합성 고분자와 항암제 혼합물이 코팅된 피막에서 약물의 거동 및 PA를 이용한 코팅의 특성을 분석하였다.

실 험

시약 및 재료 폴루란(M_w 100000)은 일본 Hayashibara Co.,에서 구입하였고 Samyang Genex Co. (Daejeon, Korea)에서 파크리탁셀(M_w 853.9)을 구입하였다. 추가적으로 acetic anhydride, pyridine, formamide, dimethyl sulfoxide(DMSO), ApoAlert™ Annexin V apoptosis kit(Clontech, Palo Alto, CA, USA)이 사용되었고 PTFE covered stent는 (주)태웅메디칼에서 제공받아 사용하였다(Goyang-

si, Korea).

폴루란의 아세틸화 폴루란 2 g을 50 °C에서 20 mL formamide에서 강력하게 녹인다. 그 후 pyridine 6 mL과 acetic anhydride 7 mL을 첨가하고 상온에서 48시간 동안 반응시킨다. 반응된 물질을 deionized water 200 mL에서 침전 과정을 3번 반복하므로서 불순물이 제거된 순수한 폴루란 아세테이트(PA)를 얻을 수 있다. 얻어진 생성물은 15 mL의 DMSO에 녹여 에탄올 400 mL에 재침전 과정을 거쳐 정제한다. 그 후 얻어진 PA는 ¹H NMR과 FTIR을 통하여 분석한다.

핵 자기 공명법(¹H NMR)과 적외선 분광광도계(FTIR)를 통한 PA의 특성 분석 PA와 tetramethylsilane(TMS)를 DMSO-d₆에 녹여 ¹H NMR(Bruker Advance III 400MHz)을 통해 아세틸기의 생성여부를 확인하고, 폴루란과 PA를 pellet 형태로 제작하여 FTIR(Nicolet, Magna IR 550)을 통해 아세틸기의 C=O 결합을 확인한다. ¹H NMR spectra를 통해 확인한 결과 폴루란 한 개의 글루코오스 링 당 1.71개의 아세틸기가 결합됨을 확인하였다(Table 1).

전자 주사현미경을 통한 표면 형태 관찰(FE-SEM) PTFE 피막에 PA와 파크리탁셀을 녹인 혼합물을 담금 방식(dip coating technique)을 이용하여 코팅을 한 후 코팅 전과 후의 표면상태를 FE-SEM(Hitachi S-4800, Tokyo, Japan)을 통해 비교 분석한다.

약물 방출 스텐트의 코팅 층 두께와 약물 함유량 분석 2 wt%의 고분자의 농도를 갖는 solution에 5번 정도 dipping을 하여 점차적인 두께를 측정하였다. 두께는 Mitutoyo사의 Micro-meter를 이용하여 측정하였다. 약물 함유량 측정은 코팅 층을 녹여내어 파크리탁셀만 추출하여 high performance liquid chromatograph(HPLC)를 통해 acetonitrile과 H₂O를 65:35의 비율로 섞은 이동상을 이용하여 C18 column을 통해 227 nm 파장에서 UV 흡광도를 측정하여 분석한다.

시험관에서의 약물 방출 시험 0.01 M PBS(Phosphate buffer saline) 0.1%, tween20 buffer solution 2 mL에 코팅된 필름을 넣어준 후 shaking water bath(37 °C, 50 rpm)에서 약물 방출을 수행하고 일정 기간마다 버퍼를 교체한다. 얻어진 표본은 *tert*-butyl methyl ether(*t*-BME)로 파크리탁셀만 추출한다. 추출된 약물은 HPLC 정량 및 정성 분석을 하였다. HPLC에 사용된 C18 컬럼은 역상 컬럼으로 파크리탁셀을 정성, 정량 분석할 수 있다.

Flow Cytometer를 통한 방출 약물의 안정성 평가 생체적합성 고분자 매트릭스 층에서 수 일이 지난 후에 방출된 파크리탁셀이 변형 없이 천연의 파크리탁셀과 같은 효과를 나타내는지를 세포실험을 통해 확인한다. PBS buffer상에서 방출된 표본들은 Murine colorectal cancer cell line인 CT-26 cell에 12시간 처리한 후 Annexin V 결합 염색법을¹⁸ 통해 FACS로 분석한다.

소동물에서의 종양 증식 억제 시험 소동물의 암 모델은 Balb/c mice(male, 6~7weeks, n=4)로 선정하였고 암세포는 Murine

Table 1. Physicochemical Characterization and Drug Content in PTFE Film

Membrane	Degree of acetylation ^a	Coating thickness (mm) ^b	Paclitaxel concentration per unit area($\mu\text{g}/\text{mm}^2$) ^c
PTFE film	1.71	0.042(\pm 0.005)	0.72(\pm 0.12)

^aNumber of acetyl groups per one glucose unit of pullulan, estimated by ¹H NMR. ^bMeasured by Micro-meter. ^cPaclitaxel concentration was analyzed by HPLC at 227 nm.

colon cancer cell line인 CT-26 cell을 피하주사(subcutaneous injection)로 주사하였다. 5일 후에 PA와 파크리탁셀의 혼합물이 코팅된 PTFE 피막을 암 조직 및 부분에 삽입한다. 그 후 일정한 날짜를 간격으로 암 조직의 부피(mm³) 변화량을 측정한다.

결과 및 토론

풀루란의 아세틸화. 얻어진 PA는 기본 골격을 이루는 풀루란의 수산화기를 무수화 아세트산을 이용하여 아세틸로 치환된다. 이로 인해 수용성인 풀루란에 소수성인 관능기가 부여되게 되고 이는 소수성 항암제인 파크리탁셀과 소수성 상호작용을 유도한다. 이로 인해 약물에 비해 상대적으로 분자량이 큰 PA가 생체 내에서 분해되는데 시간이 걸리기 때문에 이를 통해 서방적인 약물 방출이 가능하게 된다.

¹H NMR Spectra와 FTIR을 통한 PA의 특성 분석. 화학적 개질화를 통해 합성된 PA(II)를 ¹H NMR과 FTIR을 통해 확인해 본 결과, ¹H NMR에서는 3~5.5 ppm에 걸쳐 풀루란(I)의 글루코오스링에 수소(a)가 관찰되었다. 풀루란 고분자와 달리 PA에서는 2 ppm 부근에 아세틸기에 있는 CH₃의 수소 (b)가 관찰이 된 것을 확인하였다(Figure 1). 형성된 PA의 CH₃ 부분 면적의 정량을 통해 풀루란 한 개의 글루코오스링에 1.71개의 아세틸기가 치환된 것을 확인하

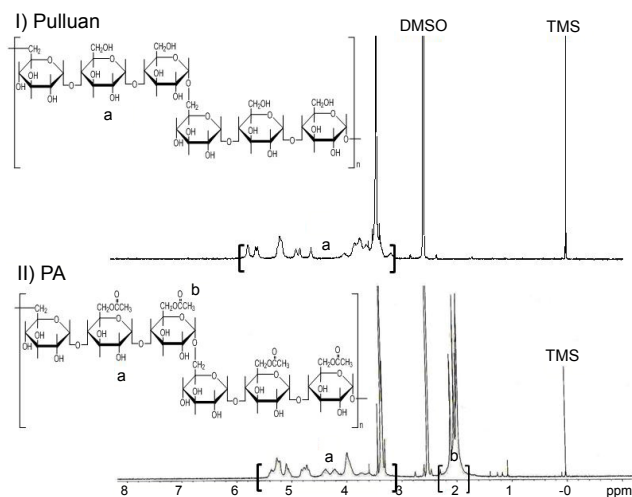


Figure 1. ¹H NMR spectra of pullulan and PA.

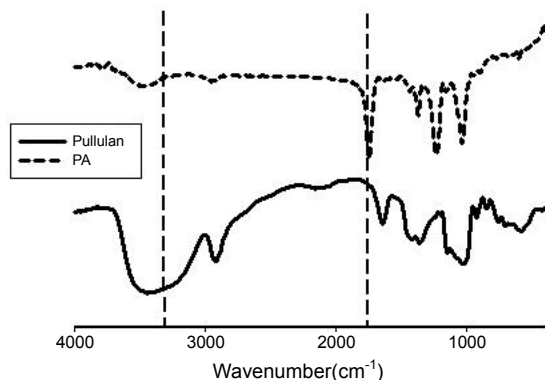


Figure 2. FTIR spectra of pullulan and PA.

였다. FTIR로 확인해본 결과 1750 cm⁻¹ 부근에서 C=O의 피크를 확인하였고 3300 cm⁻¹ 부근에서 수산화기(OH)의 피크가 감소된 것으로 보아 풀루란의 수산화기(OH) 일부가 아세틸기(COCH₃)로 치환된 것으로 판단된다(Figure 2).

전자 주사현미경을 통한 표면 형태 관찰(FE-SEM). 생체적합성 고분자와 항암제의 매트릭스로 코팅이 되지 않은 PTFE 피막은 표면이 고르지 못하고 불균일한 것이 관찰되었지만, PA와 파크리탁셀의 혼합물에 의해 코팅이 된 PTFE 피막의 표면은 매끄럽고 고른 것을 확인하였다. 이는 담금 방식을 통하여 균일한 코팅 표면이 형성되었음을 나타낸다(Figure 3).

약물 방출 스텐트의 코팅 층 두께와 약물 함유량 분석. 담금 방식(dip coating method)을 통하여 형성된 고분자와 파크리탁셀 혼합물 코팅층은 담금 횟수에 의존적으로 두께가 증가하는 것을 확인하였다. 35 μm에서 최대로는 62 μm 정도의 두께가 측정되었다. 약물 함유량은 평균적으로 면적(mm²)당 0.72 μg이 봉입된 것을 확인하였다(Figure 4).

시험관에서의 약물 방출 시험. PA와 파크리탁셀이 코팅된 PTFE 피막을 0.01 M PBS(pH7.4) 0.1%, tween20 버퍼용액에서 일정 시간 동안 동일한 시간 간격으로 버퍼용액을 채워하여 방출된 파크리탁셀의

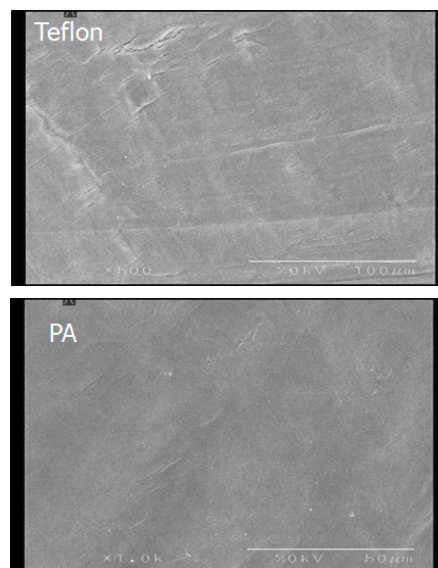


Figure 3. Surface observation of PTFE membrane and PA-coated film by FE-SEM.

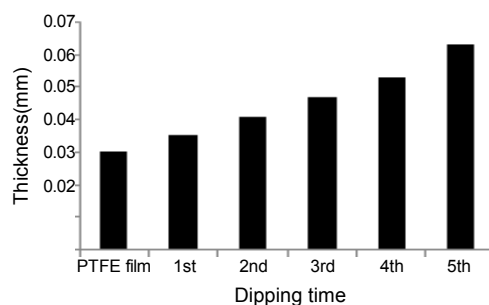


Figure 4. PTFE film thickness alteration followed by dipping times.

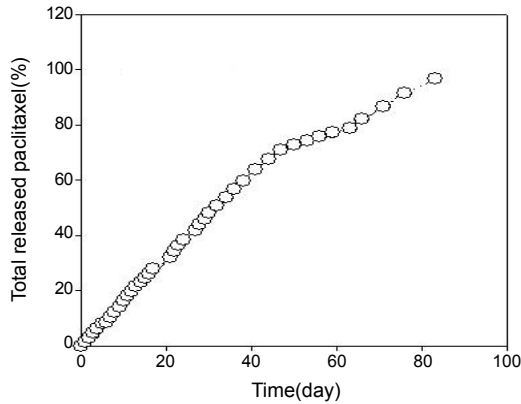


Figure 5. *In vitro* release profiles in PBS (pH7.4) buffer at 37.0 °C of paclitaxel from PA-coated PTFE membrane.

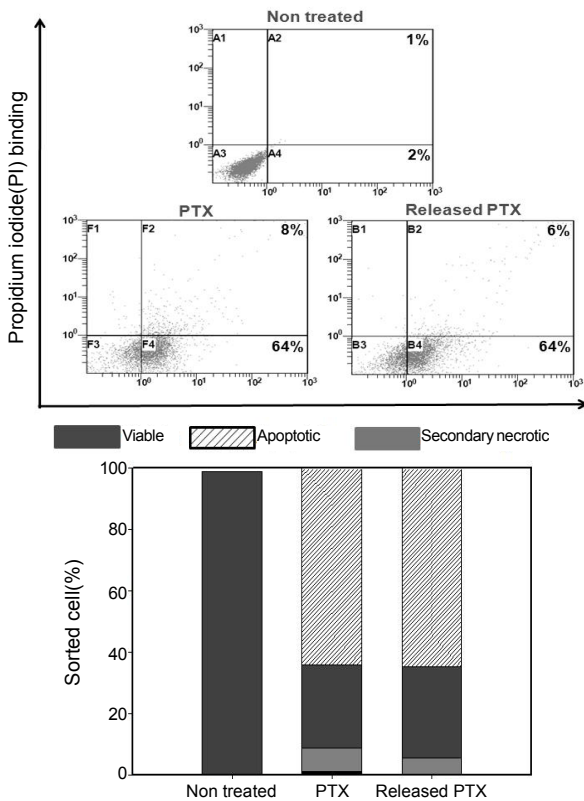


Figure 6. Biological stability of released paclitaxel from paclitaxel (PTX)-coated film. Released paclitaxel also shows apoptotic activity.

양을 측정하였다. 수용액 상인 PBS 버퍼에 파크리타셀이 방출되기가 어렵기 때문에 tween20이라는 계면활성제를 첨부하여 약물 방출을 용이하게 하였으며 약물 방출 샘플에서 파크리타셀만 추출하기 위해 t-BME를 이용하였다. 약물 방출 경향은 폴루린이라는 생체적합성 고분자를 사용했기 때문에 초기에 봉입된 약물의 대부분이 나오는 초기방출(initial burst) 현상없이 80일 정도에 걸쳐 서방적으로 방출되는 것을 Figure 5에서 확인하였다. 또한 PA를 이용한 약물 코팅 층이 극한 소수성인 PTFE 필름에서 안정하게 유지되어 있음을 의미하기도 한다.

Flow Cytometer를 통한 방출 약물의 안정성 평가. 고분자와 항암

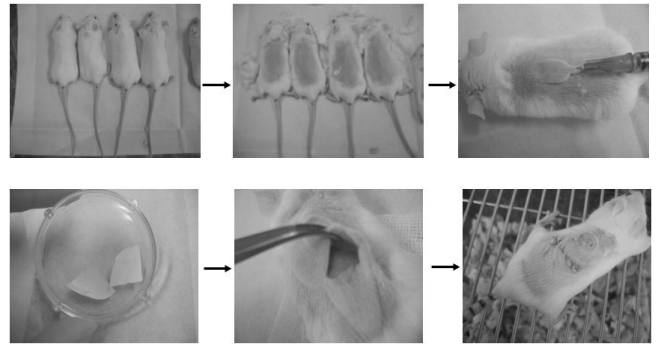


Figure 7. *In vivo* inoculation of paclitaxel-eluting film beneath Balb/c mice cancer tissue.

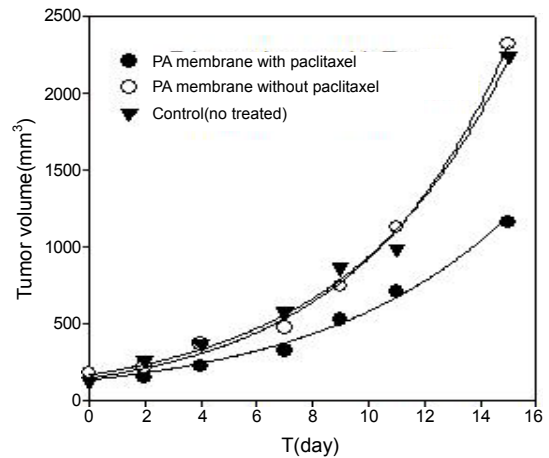


Figure 8. Inhibition of tumor growth by PA and paclitaxel-coated film.

제로 코팅된 필름에서 방출된 약물을 Murine colon cancer cell line 인 CT-26에 12시간 처리하여 방출된 파크리타셀이 변성 없이 기존의 약물과 같은 독성을 나타내는지에 대한 실험을 진행하였다. 아무것도 처리하지 않은 대조군과 7일 후에 방출된 약물인 실험군 그리고 방출 약물과 같은 농도의 천연의 파크리타셀을 세포에 처리한 결과, 기존의 약물의 독성과 같은 수준의 독성을 나타내는 것을 확인하여 고분자 층에 의해 봉입되어 있던 약물이 변성 없이 세포에 독성을 갖는 것을 Figure 6에서 확인할 수 있다.

소동물에서의 종양 증식 억제 시험. Balb/c mice에 CT-26 cancer cell line에 의한 종양이 형성되면 PA와 파크리타셀이 코팅된 매트릭스를 종양 부위 밑 부분에 삽입하였다(Figure 7). 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹과 약물 없이 고분자만 코팅된 필름이 삽입된 그룹에서는 2주 동안에 걸쳐 종양의 크기가 0일째에 비해 10배 이상 증가하였다. 하지만 약물과 고분자가 함께 코팅된 필름이 삽입된 실험군에서는 4.5배 정도의 증가를 보여 실험군이 대조군에 비해 2배 이상 종양의 증식을 억제하는 것으로 사료된다(Figure 8).

결론

본 연구에서 생체적합성 고분자와 항암제를 사용하여 PTFE-스텐드에 코팅을 함으로써 코팅 물질로서의 PA의 특성을 실험하였다. 담금 방

식(dip coating technique)을 통해 기존의 약물 방출 스텐트에 피막된 PTFE 피막의 표면을 고르고 균일하게 코팅하였고 생체적합성 고분자의 소수성기를 부여하는 화학적 개질화와 시험관에서의 서방적인 약물 거동을 확인하였고 방출된 약물 또한 어떠한 변성 없이 기존의 천연 약물과 같은 독성을 나타내는 것을 확인하였다. 소동물 실험에서도 약성 종양의 증식을 억제하는 것으로 관찰되었다. 이는 PTFE 피막된 스텐트 표면에 코팅되어 약물 전달을 하는데 있어서 PA라는 생체적합 고분자가 효율적인 코팅 물질이 될 수 있다라고 해석될 수 있다.

감사의 글: 본 연구는 지식경제부 소재원천기술개발사업의 연구비 지원으로 수행되었습니다(K0006028).

참 고 문 헌

1. B. F. Regan, U.S. Patent 4,795,458 (1989).
2. Z. R. Rulbul, E. Bruckheimer, J. C. Love, J. T. Fahey, W. E. Hellenbrand, *Catheter. Cardiovasc. Diagn.*, **39**, 36 (1996).
3. S. Sheth, F. Litvack, V. Dev, M. C. Fishbein, J. S. Forrester, and N. Eigler, *Circulation*, **94**, 1733 (1996).
4. L. Vanderburgh and C.-S. Ho, *Prog. Cardiovasc. Dis.*, **39**, 187 (1996).
5. R. Bonan and A. W. Asgar, *US Cardiology*, **6**, 81 (2009).
6. J. H. Shin, *Nucl. Med. Mol. Imaging*, **40**, 106 (2006).
7. A. Chieffo and A. Colombo, *Minerva Cardioangiol* 2002, **50**, 419 (2002)
8. K.-H. Jeong and Y.-J. Kim, *Polymer(Korea)*, **30**, 512 (2008).
9. D. M. Kim, B. S. Lee, C. H. Park, K. Park, T.-I. Son, M. H. Jeong, and D. K. Han, *Polymer(Korea)*, **34**, 178 (2010).
10. H. M. Wache, D. J. Tartakowska, A. Hentrich, and M. H. Wagner, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14**, 109 (2003).
11. W. Park, S.-J. Park, and K. Na, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **79**, 501 (2010).
12. S. Meng, Z. Liu, L. Shen, Z. Guo, L. L. Chou, W. Zhong, Q. Du, and J. Ge, *Biomaterials*, **30**, 2276 (2009).
13. J. H. Chang, K. Y. Kim, S. C. Ahn, and H. Y. Kwon, *Korea Society of Life Science*, **17**, 1027 (2007).
14. G. W. Stone, S. G. Ellis, D. A. Cox, J. Hermiller, C. O'Shaughnessy, J. T. Mann, M. Turco, R. Caputo, P. Bergin, J. Greenburg, J. J. Popma, and M. E. Russell, *New Engl. J. Med.*, **350**, 3 (2004).
15. K. Kato, A. Tsuzuki, H. Taoda, Y. Torii, and Y. Butsugan, *J. Mater. Sci.*, **29**, 5911 (1994).
16. S. Moon, S.-G. Yang, and K. Na, *Biomaterials*, **32**, 3603 (2011).
17. K. Na, Y.-I. Jeong, and K.-Y. Lee, *Biotechnol. Bioproc. Eng.*, **2**, 48 (1997).
18. M. van Engeland, Luc J. W. Nieland, Frans C. S. Ramaekers, B. Schutte, and Chris P. M. Reutelingsperger, *Cytometry*, **30**, 1 (1998).