

주사용 약물 담체로서의 Poly(ethylene oxide-*b*-caprolactone) 미셀의 안정성과 체내 독성

김 동 철·유 영 태[†]

건국대학교 공과대학 공업화학과

(1997년 1월 17일 접수)

Stability and *In-vivo* Toxicity of Poly(ethylene oxide-*b*-caprolactone) Micelles for Injectable Drug Carriers

Dong-Chul Kim and Youngtai Yoo[†]

Department of Industrial Chemistry, College of Engineering, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

(Received January 17, 1997)

요약: 양친매성 공중합체인 poly(ethylene oxide-*b*-caprolactone) (PEO-*b*-PCL)을 세 조성 (5k-2.5k, 5k-5k, 5k-7.5k)으로 합성하여 미셀용액으로 제조한 후 정맥주사용 약물담체로서의 입자크기, 안정성, 분해성 및 체내 독성 등에 관해 연구하였다. 공중합체가 수용액에 분산되어 형성한 미셀입자의 크기는 0.045~0.118 μm 으로 친수성인 PEO의 상대적 조성이 높아짐에 따라 입자크기가 감소하는 경향을 나타내었다. 미셀용액은 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 180일 동안의 관찰결과 pH 6.8-7.4(in PBS)에서 입자크기 및 pH의 큰 변화가 없이 장기적인 안정성을 나타내었으나 pH 1.2-3.5에서는 입자의 크기가 증가하면서 침전이 형성되어 불안정하였다. 체외 (*in vitro*) 분해실험에서 미셀은 *lipase* 존재 하에서나 serum에서 효소분해로 미셀용액의 산도가 크게 증가한 반면, *protease* 존재 하에서는 분해정도가 미약하였다. Serum에서의 미셀농도에 따른 안정성의 변화에서는 고형분 농도가 0.025 wt/v% 이상일 때 agglomerate의 형성으로 입도가 급격히 증가하는 것을 발견하였다. 생체 (*in vivo*) 독성시험에서 5k-7.5k 미셀용액 (1, 2 wt/v%) 0.7 mL를 6주령 웅성 mouse의 정맥에 주사한 결과 사망한 예가 없었으며 1시간 간격의 반복 주사에서 6회까지 대부분 생존하여 안전성이 우수함을 알 수 있었다.

ABSTRACT: Amphiphilic block copolymers of ethylene oxide and caprolactone were synthesized for three compositions of 5 k-2.5 k, 5 k-5 k, and 5 k-7.5 k (PEO-*b*-PCL) and micellar aggregates were formed in aqueous medium with the particle size in the range of 0.045-0.118 μm . The feasibility of the micelle solutions was studied in terms of colloidal stability, biodegradability and *in vitro* toxicity for intravenous (IV) drug delivery carriers. It was found that the colloids were stable in neutral pH PBS solution for 180 days at 37 $^{\circ}\text{C}$ while large aggregates were formed in acidic medium of pH 1.2-3.5. Enzymatic degradation of the polycaprolactone core was evidenced in the presence of *lipase* and serum as monitored by carboxylic acid generation, however *protease* showed little activity on the degradation of the particles. The colloidal stability of the micellar aggregates was maintained at the particle concentration less than 0.025 wt/v% in serum. In the animal toxicity test, 0.7 mL of micelle solution of 5 k-7.5 k block copolymer (1, 2 wt/v% solid) was intravenously administered to 6-wk old male mice and the general symptom was observed. This study demonstrated that most of animal subjects survived showing normal weight gain after receiving six times of single dose by 1 h period.

Keywords: micelle, amphiphilic copolymer, PEO-*b*-PCL, parenteral drug delivery, nanoparticles, stability, toxicity.

서 론

주사용 약물전달체에서 고분자 담체의 조건은 사용전까지의 안정성 (stability), 체내에서의 무독성 (nontoxicity), 안전성 (safety), 생체분해성 (biodegradability), 높은 약물담지능력 (high loading capacity), 수·지용성의 광범위한 용해도를 갖는 약물들에의 적용성 등을 들 수 있다.¹ 특히 정맥주사용 약물 운반체 (parenteral drug delivery system)의 입자크기는 일반적으로 혈관의 pore size가 0.8 μm 이고, 병서부 위에는 실핏줄이 발달되어 있으며 endothelial barrier (0.1 μm)를 통과할 수 있어야 하므로 초미립자 (nanoparticles) 수준으로 제조되어야 한다.

미립자를 이용한 서방성 약물담체에 관한 연구는 1970년대 이후 현재에 이르기까지 안전성, 효율성 및 Kupffer cell 등에 의한 macrophage의 억제 측면에서 활발히 진행되고 있다.²⁻¹⁷ 초기의 미립자를 이용한 정맥주사용 약물전달체에 관한 연구의 대부분은 phospholipid vesicles이나 liposome에 관한 것으로 이들은 쉽게 붕괴되거나 산화되어 분해되기 때문에 안정성이 적어 아직 실용화되기에는 상당한 어려움에 직면하였다.¹⁰ 또한, 이온계 vesicle들은 체내에서 세포막의 파괴 등 독성을 나타내므로 약물전달체로서 문제점을 내포하고 있다. 따라서 약물전달체로 쓰이는 소재는 비이온성으로 체내 효소에 의한 분해가 가능하며 분해산물은 체내에서 독성이 적고 쉽게 배설되는 것이 바람직하다. 안정한 초미립자는 함유된 약물이 아무런 화학반응을 하지 않는다는 전제하에 확산 또는 담체의 효소 분해에 의해 혈관내로 방출되거나 targeting vector에 의해 특정세포의 receptor에 결합된 후 약물을 방출할 것으로 기대된다.

고분자소재로 polyalkylcyanoacrylate, poly(glycolide), poly(lactide), poly(caprolactone), poly(benzyl glutamate) 등과 poly(ethylene oxide)와의 블록공중합체를 pseudo-latex법 혹은 partial precipitation법에 의해 초미립자로 제조하여 indomycin, doxorubicin 등의 주로 지용성 약물전달체로서 체내

분포, macrophage에 의한 uptake, drug toxicity에 대한 연구결과가 발표되었다.¹⁹⁻²³

본 연구에서는 양친매성 블록 공중합체인 PEO-*b*-PCL를 여러 조성으로 중합하여 미셀로 제조하였다. 본 연구에서는 위의 공중합체가 계면활성을 갖고 아세톤에 용해되는 점을 이용하여 Chang 등이²⁴ acrylic 공중합체에 적용한 autoemulsification법과 Fessi 등이¹⁹ 제안한 partial precipitation법을 응용하여 입자크기가 작고 분포가 균일한 콜로이드로 제조하였다. 이와같은 방법은 지용성 약물뿐 아니라 수용성 유기약물의 담지에도 효과가 있는 것으로 나타났다. 미셀용액을 약물이라는 가정하에서 신약의 예비설계 단계인 온도, pH에 대한 안정성 및 생체 분해성 그리고 체내 안전성을 알아보기 위하여 실험용 쥐를 이용하여 동물독성 실험을 수행하였다. 또한, 혈청에서 미셀농도를 변화시켜 콜로이드 안정성 시험을 통해서 PEO-*b*-PCL 초미립자의 주사용 담체로서의 가능성을 검토하였다.

실 험

시 료. Poly(ethylene glycol) monomethyl ether ($\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, $M_n=5000$, Aldrich Chemical)를 100 $^\circ\text{C}$ 에서 감압건조하여 사용하였으며 ϵ -caprolactone ($M_w=114$, Aldrich Chemical)는 calcium hydride 존재하에 진공증류 후에 사용하였고, 촉매인 stannous octoate (Sigma)는 별도의 정제없이 사용하였다. Human serum (Sigma), lipase (Sigma), protease (Sigma)와 안전성 시험을 위해서 평균체중이 28~32 g의 TCR계 6주령 웅성 mouse (우정화학)를 사용하였다.

분 석. 표면장력의 측정은 Fisher사의 surface tensiometer를 사용하였고, 입자크기는 Brookhaven BI 90 (He/Ne laser, 90 $^\circ$ fixed angle: BIC)으로 측정하였으며, 미셀용액의 잔류 아세톤은 gas chromatography (Shimadzu, GC-17AATF)로 분석하였으며, 분해시 얻어지는 caproic acid (A)의 양은

HPLC (Waters 486 model), 공중합체의 분자량은 GPC (Waters 600E)를 사용하여 측정하였다.

PEO-*b*-PCL 공중합체의 합성. Overhead stirrer가 장착된 250 mL 둥근 플라스크 반응기에 분자량이 5000인 poly(ethylene oxide)[CH₂(OCH₂CH₂)_nOH] 20 g을 110 °C에서 2시간 이상 감압건조한 후 toluene 50 mL를 가하여 용해시켰다. 이 용액에 ε-caprolactone monomer를 합성하고자 하는 공중합체의 조성에 따라 10 g (5 k-*b*-2.5 k), 20 g (5 k-*b*-5 k), 30 g (5 k-*b*-7.5 k)을 가하고 중합반응 촉매로서 stannous octoate 0.75 mL를 최종적으로 주입하여 100~110 °C에서 20시간 동안 질소분위기 하에서 교반하였다. 이 용액을 diethyl ether에 침전시켜 중합물을 회수한 후 건조하여 중합수율과 분자량을 측정하였다.

미셀용액의 제조. PEO-*b*-PCL 1.0 g을 500 mL의 둥근 플라스크에 정밀하게 취하고 증류수 100 mL와 아세톤 300 mL의 혼합용액을 넣어 용해시킨 후 rotary evaporator에서 아세톤을 감압증류하여 제거하여 미셀용액을 제조하였다. 이 용액을 dialysis tube (molecular weight cutoff; 12500 g/mole)에 넣고 밀봉한 다음 일정시간 동안 다량의 증류수에 대해 투석시킨 후 0.45 μm microfilter에 여과하였다.

미셀의 안정성과 분해성.

PBS 용액: PBS 용액 (pH 1.2-7.4) 10 mL에 일정량 (0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mL)의 미셀용액을 가하고 온도 37±0.5 °C, 교반속도 50 rpm으로 하여 교반하면서 일정시간 간격으로 pH 및 입자크기를 측정하고 이 액을 취하여 아세톤을 가하여 미셀을 붕괴하고 HPLC에 의해 용액중 caproic acid (CA)를 정량하였다.

효소용액: 미셀용액 0.1 mL (1.0 mg/mL)를 *protease* 및 *lipase*가 용해된 PBS 용액 10 mL에 넣고, 항온수조에 진탕 (진폭 2.8 cm, 속도 80회/분, 온도 37 °C)하면서 일정시간 간격으로 입자의 크기변화 및 분포와 pH의 변화를 측정하였다. 이때 효소의 농도는 0.01~1 mg/mL (activity; 46 units/mg protein) 범위로 하였다.

혈청 (Serum) 용액: 혈청 10 mL에 미셀용액 (5 k-7.5 k) 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 3, 5, 10 mL를 가하고 항온수조에서 진탕 (진폭 2.8 cm, 속도 80회/분,

온도 37 °C)하면서 일정시간 간격으로 입자의 크기 변화 및 분포와 pH의 변화를 측정하였다. 또한 일정시간 간격으로 이 액을 취하여 아세톤으로 미셀을 붕괴하고 여기에 0.1 M-trichloroacetic acid 용액을 가하여 혈액중에 존재하는 단백질을 침전시켜, 6000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전을 제거하고 PCL의 분해산물인 CA를 정량하였다.

혈청에서의 콜로이드 안정성 (in vitro): 혈청과 미셀용액을 0.2 μm-membrane filter (PP, Whatman)로 여과 후, 혈청 4 mL에 미셀용액을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mL를 가하여 혼합하고 즉시 particle size analyzer를 이용하여 초기 입자의 크기를 측정된 다음 진탕 (진폭 2.8 cm, 속도 80회/분, 온도 37±0.5 °C)하면서 일정시간 간격으로 입자의 크기변화 및 분포를 분석하였다. 동시에 각각의 분자량 길이에 따른 미셀용액 및 혈청 (serum) 용액을 대조로 하여 비교실험을 실시하였다.

동물 독성실험. PEO-*b*-PCL (5 k-*b*-7.5 k) 2.0 g을 증류수 100 또는 200 mL에 분산시킨 1-2 wt/v% 용액을 사용하였다. 실험동물은 일본산 TCR계 mouse로서 무게는 28~32 g의 6주령 수컷 100마리를 입수한 후 1주일간의 항온항습이 유지되는 실험실에서 순화를 거친 뒤 사용하였다. 실험군은 대조군, 저용량군, 고용량군 등의 3군으로 나누었으며 각 투여군은 10 마리씩으로 구성하였다. 미셀농도 2 wt/v%를 고용량으로 정하고 1 wt/v% 농도를 저용량으로 하였으며 대조군으로는 멸균 정제수를 사용하였다. 투여방법 및 투여기간은 미셀용액 약 0.7 mL를 고용량군과 저용량군 mouse의 미정맥으로 투여하고 무게변화 및 생존여부를 관찰하였다. 또한 미셀용액 0.7 mL (2 wt/v%)를 1시간 간격으로 계속하여 미정맥으로 투여하고 각 mouse의 생존여부, 무게변화 및 사료섭취량을 1일 2회 관찰하였다.

결과 및 고찰

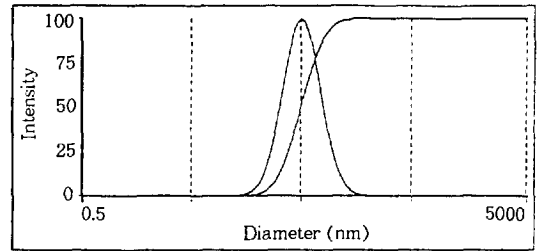
블록 공중합체의 합성과 미셀형 콜로이드의 형성. Poly(ethylene oxide) monomethyl ether (CH₃O(CH₂CH₂O)_nH; $M_n=5000$ g/mole) 및 stannous octoate (Sn(OCOC₇H₁₅)₂)를 각각 개시제 및 촉매로 ε-caprolactone을 개환중합하여 A-*b*-B 타입 (PEO-

Table 1. Results of PEO-*b*-PCL Synthesis

polymer structure	composition	M_n Theor.	M_n Gpc	MWD	yield
PEO- <i>b</i> -PCL	5-7.5	12500	12628	1.15	<99%
	5-5	10000	9980	1.23	<98%
	5-2.5	7500	7652	1.25	<98%

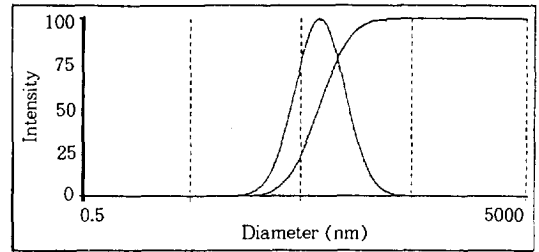
b-PCL) 블록 공중합체를 합성하였다. 블록 공중합체의 분자량은 caprolactone/개시체의 몰비로 조절하였다. Table 1에서 나타낸 바와 같이 중합수율 (>98%)과 GPC를 통한 분자량의 측정을 통하여 이론 분자량에 근접한 블록 공중합체가 합성된 것을 확인하였다. 블록 공중합체의 분자량 분포는 1.15-1.25로 비교적 균일한 고분자 사슬이 얻어졌음을 알 수 있었다.

본 실험에서 합성한 세가지 조성의 블록 공중합체는 수용액에 직접 분산되지 않았다. 따라서 먼저 아세톤에 용해시킨 후 수용액을 가한 다음 아세톤을 감압하에서 서서히 제거하여 푸른색을 띄는 미셀용액으로 제조하였다. 미량의 잔류 아세톤은 투석막 (dialysis bag)을 이용하여 20시간 이상 증류수에 방치한 후 기체 크로마토그래피에 의해 아세톤이 검출되지 않음을 확인하였다. 농도에 따른 표면 장력의 변화에 의하여 측정된 임계미셀농도는 5 k-2.5 k, 5 k-5 k, 5 k-7.5 k (PEO-PCL)의 경우 10^{-7} - 10^{-8} mole/L로 나타나 다른 비이온계 계면활성제에 비해 매우 낮은 값을 갖는 것을 알 수 있었다. 특히 블록 공중합체의 조성에서 소수성인 PCL의 함량이 높을수록 임계미셀농도 (CMC)가 감소하여 더욱 낮은 농도에서 미셀이 형성되는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 소수성이 증가할수록 unimer의 수용액에서 낮은 용해도로 인한 불안정성으로 보다 낮은 농도에서 미셀화됨으로써 자유에너지가 감소하기 때문이다. PCS (photon correlation spectrometry)로 측정된 미셀입자의 크기는 Fig. 1에서 보인 바와 같이 조성이 친수성에 가까울수록 감소하는 경향을 보였다. 상대적으로 지용성이 큰 PEO-*b*-PCL (5 k-*b*-7.5 k)에서 입자의 크기가 가장 크고 지용성이 적은 PEO-*b*-PCL (5 k-*b*-2.5 k)에서 입자크기는 감소하였다. 외부 수용액의 pH값에는 큰 영향을 나타내지 않았으나 인산염 완충용액 (PBS, 10 mmole/L)에서는 증류수에서 보다 다소 증가하였다.



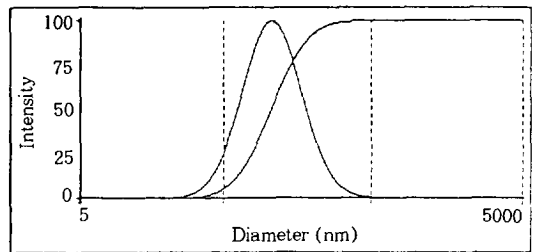
Lognormal Size Distribution
 Elapsed Time 00 : 06 : 00
 Eff. Diam. 50.6 nm
 Polydispersity 0.168
 GSD 1.483

(a)



Lognormal Size Distribution
 Elapsed Time 00 : 04 : 00
 Eff. Diam. 73.7 nm
 Polydispersity 0.298
 GSD 1.667

(b)



Lognormal Size Distribution
 Elapsed Time 00 : 04 : 00
 Eff. Diam. 105.5 nm
 Polydispersity 0.238
 GSD 1.588

(c)

Figure 1. Particle size distribution of PEO-*b*-PCL in water; (a) 5 k-2.5 k, (b) 5 k-5 k, and (c) 5 k-7.5 k.

안정성과 분해성. 위와 같이 제조된 미셀 용액은 고형분의 농도를 1.0 wt/v%로 조절하고 10 mmole/L

Table 2. The pH and Particle Size (PS, nm) Changes of Micelle in Buffer Solutions at 37 °C

polymer	time(days)						
	initial	10	20	30	60	90	180
	pH/PS	pH/PS	pH/PS	pH/PS	pH/PS	pH/PS	pH/PS
5 k-7.5 k	7.40/113	7.38/115	7.38/118	7.39/114	7.38/128	7.38/125	7.30/126
	6.80/108	6.79/103	6.79/103	6.77/112	6.75/115	6.71/123	6.69/120
	3.50/112	3.48/118	3.48/149	3.45/149	3.44/185	3.44/208	3.44/385
	1.20/109	1.20/129	1.19/479	1.19/837	1.18/1341	1.17/1850	1.17/4145
5 k-5 k	7.40/79	7.38/75	7.37/85	7.35/95	7.35/87	7.33/105	7.33/90
	6.80/78	6.78/80	6.78/83	6.78/90	6.75/89	6.73/95	6.73/88
	3.50/76	3.49/85	3.48/135	3.47/142	3.47/179	3.45/192	3.44/360
	1.20/72	1.20/115	1.18/425	1.19/720	1.18/1110	1.17/1542	1.17/3750
5 k-2.5 k	7.40/46	7.39/53	7.38/50	7.36/64	7.35/63	7.34/65	7.32/59
	6.80/50	6.80/55	6.80/48	6.79/66	6.79/65	6.79/65	6.78/73
	3.50/47	3.49/77	3.48/115	3.47/129	3.47/159	3.47/178	3.46/345
	1.20/45	1.19/113	1.18/383	1.17/959	1.17/959	1.18/1242	1.18/3341

의 PBS 용액이 되도록 전해질을 미셀용액에 용해시킨 후 pH를 1.2-7.4의 범위에서 산을 가하여 조절하였다. Table 2는 여러 산도하에서 미셀입자의 안정성을 크기의 변화를 통해 관찰한 것이다. 180일 동안의 관찰에서 중성에 가까운 pH범위에서는 입자크기의 변화가 매우 완만하게 증가하여 안정한 것을 알 수 있었으나 pH 3.5, pH 1.2에서는 입자크기가 뚜렷하게 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 poly(ethylene oxide) chain에 근접한 에스터기의 분해가 선행되어 콜로이드의 sheath (corona)를 형성하는 PEO사슬이 유리됨에 따라 미셀간의 합체가 진행되는 것으로 추측된다. Poly(caprolactone)의 가수분해에 의해 최종적으로 얻어지는 caproic acid (CA)의 농도를 HPLC를 이용하여 측정된 결과 Fig. 2에 보인 바와 같이 낮은 pH에서는 초기부터 단량체 크기로 분해가 이미 일어나고 있음을 보여주고 있다. 중성 완충용액 (pH 6.8, 7.4)에서 2개월까지는 분해된 CA의 양은 검출되지 않았고 3개월째부터 측정되었는데 pH 1.2에서 3개월 이후부터 급격히 증가하였다.

체내의 pH는 위장을 제외하면 부위에 따라 중성이거나 약산성으로 알려져 있다. 따라서 미셀입자의 분해 및 안정성의 변화는 산축매에 의한 결과보다는 체내의 분해효소에 의해 일어날 것으로 추측된다. 본 연구에서는 *lipase*와 *protease*를 미셀용액 (10 mmole/L PBS, pH 7.4)에 첨가하여 입자의 크기변화와 pH의

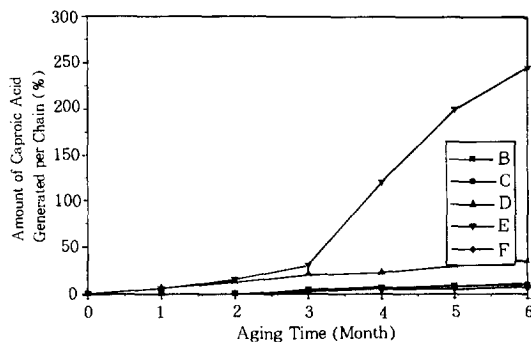


Figure 2. The caproic acid generation of micelle solution under various pH at 37 °C; 5 k-5 k, 1 wt/v%, B; pH 7.4 in PBS buffer, C; pH 6.8 in PBS buffer, D; pH 3.5 in PBS buffer, E; pH 1.2 in PBS buffer, F; in distilled water.

변화를 관찰하였다. Fig. 3에서 보인 바와 같이 *lipase* 존재하에서는 용액의 pH는 급격히 감소하는 경향을 보였다. 그러나 *protease*의 경우에는 미셀용액의 산도변화는 매우 미미하였고 오히려 미셀입자의 크기가 크게 증가하고 침전이 형성되는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 *protease*의 경우 미셀입자의 agglomeration을 초래하는 역할을 하는 것으로 추측된다. Serum용액에서의 분해거동은 *lipase*와 *protease*의 혼합용액에서와 유사한 산성도의 증가를 나타내었다. 그러나 2-3일 이후에 더 이상의 pH변화가 측정되지 않고 있는 것은 37 °C의 *in vitro* 조건에서

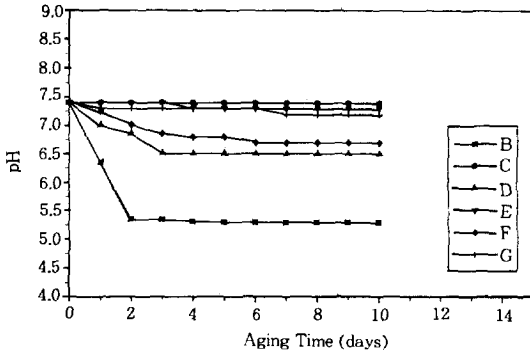


Figure 3. *In-vitro* enzymatic degradation of micelles in the presence of B; lipase, C; protease, D; lipase and protease, E; in pH 7.4 PBS buffer solution, F; in serum, G; in distilled water, 5 k-5 k, 1 wt/v%.

효소의 활성이 시간에 따라 소진되었기 때문으로 생각된다.

정맥주사용 약물운반체로서 중요한 요소는 plasma 내에서의 안정성과 식균세포 등에 의한 uptake 속도이다. Poly(ethylene oxide)를 sheath구조로 하는 미립자형 운반체의 경우 전단계인 단백질 (IgG, C3b 등)흡착 (opsonization)을 어느 정도 억제하는 기능을 갖는 것이 많은 연구자에 의해 보고되고 있다.^{17,18} 그것은 PEO가 비이온성으로 PEO내의 ether oxygen들이 water lattice 안에 잘 배열될 수 있으며 side group이 없는 선형고분자이고 steric 및 electrostatic에 의한 장애 요인이 없어 mobility가 우수하며 수용액 중에서 excluded volume이 커서 단백질이나 다른 입자가 접근할 때 쉽게 반발시킬 수가 있기 때문으로 해석되고 있다. 그러나 이와 같은 단백질 흡착이 일어나는데 대한 입자의 크기의 효과는 아직 상반된 결과가 발표되고 있다.

본 연구에서는 PEO-*b*-PCL 미셀의 농도가 혈액내에서 콜로이드 안정성에 미치는 영향이 매우 큰 사실을 발견하고 serum에 여러 농도의 미셀입자 (5 k-5 k)를 가하여 단백질 흡착 및 응집에 의한 입자크기의 변화를 관찰하였다. Fig. 4에서 나타낸 바와 같이 serum내의 입자의 농도가 0.075 wt/v% 이상일 때에는 첨가 즉시 급격한 입자크기의 증가가 측정되었으며 0.025 wt/v%에서는 입도의 증가속도가 크게 둔화되었다. 그것은 혈액내의 물분자가 혈중에 포함된 전해질, 혈당, 혈중 단백질과 결합하고 있어

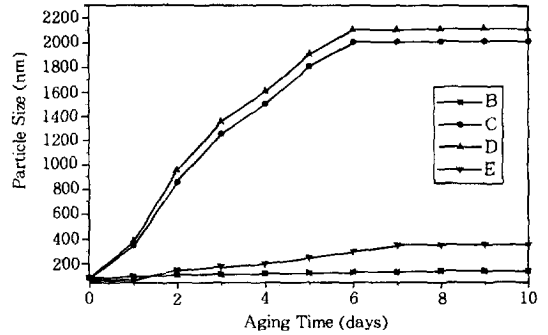


Figure 4. The effect of particle concentration on the colloidal stability in serum at 37 °C, B; control (serum without micelle), C; 0.075 wt/v%, D; 0.1 wt/v%, E; 0.025 wt/v%, 5 k-5 k.

serum에서 미셀의 sheath구조인 PEO의 배열상태가 증류수나 저농도의 완충용액에서와 매우 다를 수 있다고 볼 수 있다. 즉, 혈액내에서는 매우 제한된 양의 물분자만이 PEO와 결합할 수 있어 입자농도가 높아지면 수용액에서 보다 sheath층의 두께가 매우 얇아지게 되어 반발력이 약화되기 때문에 단백질흡착이 쉽게 일어나는 것으로 추측된다. 이와 같은 콜로이드 입자에 대한 단백질의 흡착은 particle-particle, particle-cell 사이의 bridging aggregation을 일으켜 입도의 급격한 증가를 가져오는 것으로 나타나고 있다.

체내 독성. 미셀용액의 체내 독성실험은 본 연구에서 제조한 세가지 조성중 가장 입자크기가 크고 소수성으로 입자응집이 일어나기 쉬워 뇌 모세혈관 등의 clogging의 우려가 높은 5 k-7.5 k 블록 공중합체를 대상으로 수행하였다.

LD₅₀ test의 정의는 어느 농도에서 mouse가 50% 생존하느냐를 알아보기 위한 실험으로서 mouse의 군을 10마리를 한군으로 하여 5마리가 생존할 때의 농도로서 mouse의 무게를 28-32 g 및 5-6주령을 사용하는 것은 신진대사가 활발하고 자라나는 시기이기 때문이다. 음성 mouse를 5주째에서 1주간 순화시켜 6주째 사용하였으며 시료는 고분자 중합체의 농도를 1.0 wt/v%, 2.0 wt/v%의 주사용 증류수를 사용하여 제조한 후 0.2 μm-membrane filter (PP type)로 여과하여 사용하였다. 고분자 중합체의 농도를 2% 까지로 한것은 그 이상의 농도에서는 미셀체

Table 3. The LD₅₀ Test of 2 wt/v% Micelle (5 k-7.5 k) Administration (0.7 mL/hr)

group	No. of injection									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	body weight(g) and survival									
control	30.08	30.05	30.13	30.18	30.21	30.24	30.27	30.21	dc*	-
1	29.11	29.09	29.10	29.11	29.10	29.13	29.15	29.16	dc	-
2	29.22	29.19	29.20	29.22	29.22	29.23	29.25	29.26	dc	-
3	29.01	28.97	29.00	29.01	29.02	29.02	29.04	29.04	dc	-
4	30.26	30.09	30.08	30.06	30.07	30.10	30.12	30.14	30.14	dc
5	30.26	30.24	30.23	30.24	30.24	30.25	30.24	30.25	30.28	dc
6	29.34	29.31	29.33	29.34	29.35	30.36	30.37	30.36	dc	-
7	30.02	30.00	29.95	29.99	30.01	30.03	30.05	30.05	30.06	dc
8	29.53	29.52	29.52	29.53	29.55	29.56	29.57	dc	-	-
9	29.04	29.01	29.03	29.04	29.06	29.08	29.09	dc	-	-
10	29.72	29.70	29.71	29.73	29.75	29.75	29.77	30.01	30.00	dc

*dc: 50% of subjects are deceased, each group was consisted of 10 mice.

Table 4. The General Symptom of Mouse Groups after 6 Times of Administration of 2 wt/v% Micelle Solution (5 k-b-7.5 k, 0.7 mL/hr)

group	body weight (g)										15 (days)
	0	1	2	3	4	5	6	7	10		
control	31.20	31.21	31.24	31.25	31.28	31.32	31.35	31.39	31.42	31.42	sv*
1	31.23	31.25	31.28	31.30	31.33	31.37	31.42	31.48	31.52	31.52	sv
2	31.01	31.02	31.06	31.08	31.09	31.12	31.13	31.15	31.16	31.16	sv
3	31.42	31.48	31.52	31.54	31.58	31.60	31.61	31.64	31.68	31.68	sv
4	31.10	31.14	31.18	31.21	31.24	31.27	31.30	31.32	31.35	31.35	sv
6	30.80	30.84	30.89	30.93	30.94	30.96	30.98	31.02	31.05	31.05	sv
7	31.50	31.53	31.60	31.65	31.69	31.72	31.75	31.78	31.82	31.82	sv
8	29.12	dc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	30.88	30.90	30.96	30.98	30.99	31.03	30.05	31.09	31.09	31.09	sv
10	29.21	dc	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*sv: All subjects in each group show no particular symptom.

조시 침전이 일부 형성되기 때문이다.

PEO-*b*-PCL을 미정맥으로 투여시 1시간씩 간격을 준 것은 신진대사로 고분자 미셀용액을 수용할 수 있는 시간을 주기 위함이다. 고용량군인 2 wt/v% 미셀용액의 주사 후에도 실험도중 대조군을 포함한 모든 투여군에서 어떠한 특이 증상도 관찰되지 않았으며 폐사한 동물도 없었다. 따라서 고분자 중합체의 최대 LD₅₀의 근사값을 알기 위해서 상기의 실험결과 사망한 예가 없는 2 wt/v% 농도의 고분자 미셀용액을 선정하여 0.7 mL씩 시간당 투여하면서 mouse의 무게변화 등을 관찰한 결과 Table 3에서와 같이 6

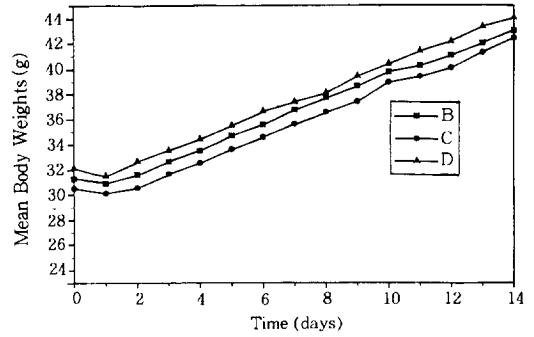


Figure 5. The effect of micelle dose on the body weight change of mice after receiving 6 times of injection (0.7 mL/injection/hr, 5 k-7.5 k), B; control, C; 2 wt/v% micelle, D; 1 wt/v% micelle.

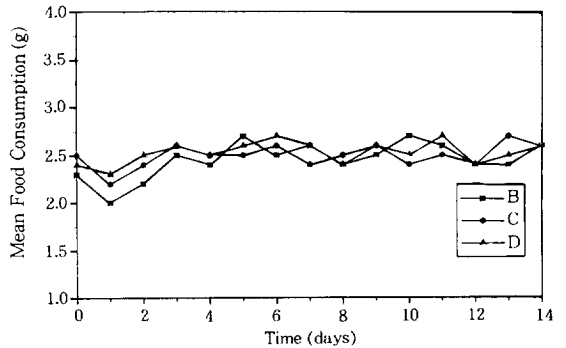


Figure 6. Mean food consumption of mice treated with micelle solution, B; control, C; 2 wt/v% solution, D; 1 wt/v% solution (0.7 mL/injection/hr, 5 k-7.5 k).

회까지는 사망한 예가 없었고 7회부터 사망하기 시작하여 9회에 모두 사망하였다. 이것이 주사에 의한 쇼크인지의 여부를 확인하기 위해서 0.7 mL씩 6회까지 투여 후 더 이상의 주사를 중단하고 관찰한 결과 Table 4에서와 같이 체중이 작은 2마리는 1일 경과 후 사망하였고 나머지는 생존하였다. 일반적으로 mouse는 하루에 투여할 수 있는 양이 약 3-4 mL 정도까지 한정되어 있으며 그 이상 투여시에는 혈관이 파열되므로 약물의 독성을 알 수가 없어, 본 실험에서는 약물의 독성보다는 주사에 의한 쇼크로 판단되므로 본 PEO-*b*-PCL system은 약물의 주성분이 아닌 부형제의 개념으로 독성없는 안전한 주사용 약물 전달 carrier로서의 가능성을 보여주었다. 각 군에 대한 체중변화는 Fig. 5에 나타냈으며 초기 주사 후

1일째 체중이 통계학적으로 유의성이 있는 감소로 나타났는데 이는 주사에 의한 환경변화로 인정되었으며 2일째 이후부터는 정상적인 체중을 유지하여 각 투여 군간의 유의차는 인정되지 않았다. 주사 후 1일째 동물의 사료 섭취량의 감소를 나타냈으며 이는 control과 비교하여 주사에 의한 쇼크로 판단되며 2일째 모든 군에서 정상적인 사료섭취가 관찰되었다 (Fig. 6).

결 론

양친매성 고분자인 PEO-*b*-PCL로 제조된 미셀입자의 크기는 5 k-7.5 k, 5 k-5 k 및 5 k-2.5 k에서 각각 0.094-0.118 μm , 0.062-0.085 μm 및 0.045-0.076 μm 으로 지용성이 증가함에 따라 입자크기가 증가하였다. 미셀의 안정성은 중성 완충용액(37 °C)에서 180일 동안 관찰결과 pH와 입자크기 변화는 작았으며 pH 1.2 및 pH 3.5에서는 입자의 크기가 증가하면서 침전 및 CA의 검출량이 급격히 증가하여 미셀이 산성에서는 불안정함을 보였다. 또, serum에서는 미셀의 고형분이 전체 serum의 0.025 wt/v% 이상의 농도에서 입자의 크기가 급격히 증가하였다. 이는 흡착단백질의 가교에 의한 입자간의 응집현상 때문으로 생각된다. 미셀의 효소분해성 시험에서 *lipase* 존재하에서는 pH는 산성으로 크게 증가하여 생체효소분해가 일어남을 확인하였다. 미셀의 독성시험에서 mouse의 미정맥을 통해 0.7 mL를 주사한 결과 한 마리도 사망한 예가 없었고, 6회 주사시까지 대체로 안전하였다.

참 고 문 헌

1. M. J. Poznansky, in "Drug Delivery Systems Characteristics and Biomedical Applications", R. L. Juliano ed., p. 253-315, Oxford University Press, 1980.
2. R. W. Baker, M. E. Tuttle, H. K. Lonsdale, and J. W. Aynes, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 20 (1979).
3. T. G. Park and A. S. Hoffman, *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 659 (1992).
4. L. B. Peppas and N. A. Peppas, *J. Controlled Release*, **8**, 267 (1989).
5. J. Kost, T. A. Horbett, B. O. Ratner, and M. Singh, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 1117 (1985).
6. R. A. Siegel and B. A. Firestone, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, **156**, 164 (1988).
7. L. C. Dong and A. S. Hoffman, *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, **16**, 95 (1989).
8. N. F. Sheppard, Jr., M. Y. Madrid, and R. Langer, *J. Appl. Sci.*, **46**, 19 (1992).
9. W. H. Barr, J. Adir, and L. Garrettson, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **12**, 779 (1971).
10. A. C. Allison and G. Gregoriadis, "Liposomes in Biological System", Wiley, New York, 1979.
11. M. A. Wheatley, M. Chane, E. Park, and R. Langer, *J. Appl. Polym. Sci.*, **43**, 2123 (1991).
13. J. T. Goodwin and G. R. Somerville, "Physical Methods for Preparing Microcapsules", in "Microcapsulation Process and Applications", J. E. Vandegaer, ed., p. 119, Plenum Press, New York, 1976.
14. A. J. Baillie, A. T. Florence, L. R. Hume, G. T. Muirhead, and A. Rogerson, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 863 (1985).
15. D. Knoll and J. Hermans, *J. Biol. Chem.*, **258**, 5710 (1983).
16. S. W. Shalaby, A. S. Hoffman, B. D. Ratner, and T. A. Horbett(Eds.), "Polymer as Biomaterials", p. 361, Plenum Press, New York, 1984.
17. N. Ammoury, H. Fessi, J. P. Devissaguet, and S. Benita, *Pharma.*, **5**, 647 (1989).
18. P. Couvreur and C. Vauthier, *J. Controlled Rel.*, **17**, 187 (1991).
19. P. K. Gupta, *J. Pharm. Sci.*, **79**, 949 (1990).
20. L. Illum, M. A. Khan, E. Mark, and S. S. Davis, *Int. J. Pharm.*, **30**, 17 (1986).
21. P. Jani, G. W. Halbert, J. Landridge, and A. T. Florence, *J. Pharm. Pharmacol.*, **42**, 821 (1990).
22. R. K. Chang, J. C. Price, and C. Hisiao, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **15**, 361 (1989).