

쾌속조형기법을 이용한 생분해성 스텐트용 메쉬필름의 약물방출거동 효과

정신영 · 김양은 · 고영주* · 신왕수* · 이준희 · 김완두 · 유영은 · 박수아†

한국기계연구원 나노융합기계연구본부, *㈜삼양바이오팜 의학바이오연구소
(2013년 9월 6일 접수, 2013년 10월 4일 수정, 2013년 10월 7일 채택)

Effect of Drug Eluting Uniformity for Biodegradable Stent by Solid Freeform Fabrication

Sin Young Cheong, Yang Eun Kim, Young Joo Koh*, Wang Soo Shin*, Jun Hee Lee, Wan Doo Kim, Young Eun Yoo, and Su A Park†

Nano Convergence & Manufacturing Systems Research Division,

Korea Institute of Machinery & Materials (KIMM), Daejeon 305-343, Korea

*Medical Devices Research, R&D Center, Samyang Biopharmaceuticals Corporation, Daejeon 305-717, Korea

(Received September 6, 2013; Revised October 4, 2013; Accepted October 7, 2013)

초록: 약물방출 고분자 코팅 스텐트는 수술후 재협착을 획기적으로 줄였지만, 약물방출이 균일한 구조체를 제작하는 것이 어렵고 체내에 구조체를 영구적으로 남겨야 하는 부담을 여전히 가지고 있다. 이를 해결하는 방안으로 생분해성 고분자로 스텐트를 제작하는 방법들이 활발하게 연구되고 있다. 본 연구에서는 조형가공기술(solid freeform fabrication, SFF)의 하나인 쾌속조형기법(rapid prototyping technique)의 3차원 플로팅(3D plotting) 기술을 이용하여 파클리탁셀(PTX) 약물을 함유한 폴리카프로락톤(PCL) 3차원 구조체를 제작하였고, 생분해성 PCL 고분자로부터 PTX의 방출거동과 스텐트 제작 가능성을 고찰하였다. 약물을 포함한 구조체의 표면특성을 SEM으로 확인한 결과 굴곡이 자연스럽고 매끄러운 표면을 가지고 있었다. FTIR을 통해서 약물이 성공적으로 구조체에 포함되었음을 확인하였고, NMR과 HPLC를 통해서 PCL 구조체 중의 PCL함량과 PTX의 서서히 방출됨을 확인되었다. 또한 세포실험을 통해 구조체에서 방출된 약물이 생물학적으로 활성을 유지하고 있으며, 반복제작된 구조체에서도 균일한 활성의 약물이 방출됨을 확인하였다. 이와같은 쾌속조형기법을 이용하여 약물을 포함하는 구조체를 제작하고 분석함으로써, 생분해성 고분자 스텐트로서의 적용가능성을 제시하였다.

Abstract: Biodegradable drug-eluting stent has dual functions of supporting the lumen and treating internal tumor preventing the restenosis by releasing drug. In this study, the polycaprolactone (PCL) based three dimensional (3D) mesh loaded with paclitaxel (PTX) was presented by rapid prototyping (RP) technique of solid freeform fabrication (SFF) for biodegradable drug-eluting stent application. PCL has many advantageous properties such as good biocompatibility, good mechanical properties, and good drug permeability. PTX is widely used in the cancer treatment by inhibiting tumor cell proliferation. Analytical methods of HPLC and NMR were used for simultaneous quantification of PTX. Scanning electron microscopy (SEM) was performed to observe the architecture and morphologies of 3D mesh. The cytotoxicity assay results indicated released PTX's biological activity. This study provided that PCL based 3D mesh loaded with PTX by RP technique has great potential for biodegradable drug-eluting stent application.

Keywords: drug-eluting stent, polycaprolactone (PCL), paclitaxel (PTX), rapid prototyping (RP), solid freeform fabrication (SFF).

서 론

스텐트(stent)는 혈관 경색시에 수술을 통해 삽입하여 막힌 혈관을 일시적으로 혹은 영구적으로 확장시켜 주는 스프링

형태의 이식물로 사용량은 점점 증가하고 있다.¹ 최근 미국에서만 6천만명 이상의 동맥경화증 환자가 발병되었고 이로 인해서 매년 450000명 이상이 사망하였으며 약 100000명의 절단시술환자가 발생하고 있다.² 스텐트는 신속하게 협심증을 해소하고 간헐적인 저림증상의 환자가 환부를 절단해야하는 상황으로 악화되는 것을 예방하는데 탁월한 효과를 보여왔다.

초기의 금속성 스텐트(bare metal stents, BMS)들은 관상동

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: psa@kimm.re.kr

맥(coronary arteries)의³⁴ 경우는 30% 이상, 대퇴동맥과⁵ 슬와동맥의^{6,7} 경우 50% 재협착이라는 높은 실패율을 안고 있었다. 이후 약물을 방출하는 고분자물질이 표면처리된 스텐트(polymer coated drug eluting stents, PDES)를 사용함으로써 동맥협착의 재발을 10% 미만으로 획기적으로 감소시킬⁸ 수 있었다.

일부 연구팀에서는 파클리탁셀(paclitaxel, PTX)을 방출하는 섬유를 고분자재료로 제작하여 의학적으로 적용가능성을 확인하는 연구를 진행하고 있다.^{9,10}

PTX는 대표적인 항암제로서 세포주기의 G2/M기에 멈추어 있도록 하여, 세포증식을 억제하는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³ 이러한 PTX는 아주 적은 양으로도 매우 큰 효과를 내기 때문에 관상동맥질환 환자의 치료를 위한 스텐트에 적용하여 평활근세포의 증식을 막는데 이용하고 있다. 그러나 고분자를 이용한 금속스텐트의 표면처리는 두께를 균일하게 구현하기가 매우 어려우므로 약물의 방출이 전체 구조체에서 균일하지 못하다는 단점을 가지고 있다.¹⁴

따라서 최근에는 금속 스텐트의 단점을 극복하기 위해 생분해성 고분자 스텐트가 대두되어지고 있으며 이러한 연구는 세계적으로 아직 초기단계에 있다. 생분해성 스텐트는 일정 기간 적당한 기계적 강도를 유지하다 생분해되고 흡수되어지는 스텐트로서 금속 스텐트를 시술한 환자에게는 불가능한 CT나 MRI 검사를 수행할 수 있다. 또한 PTX와 같은 약물을 함유한 생분해성 고분자 스텐트는 스텐트 내부에 신생내막을 억제하여 재협착을 줄일 수 있다.

이러한 생분해성 약물방출 스텐트의 3차원 형상을 정교하게 제작하기 위해 재현성과 가공성이 높은 조형가공기술(solid freeform fabrication, SFF)을 이용할 수 있다. 이는 컴퓨터 기반 캐드(computer-aided design, CAD)를 이용하여 층층으로 쌓아서 3차원 구조체를 구현하는 방법이다.¹⁵ 이러한 SFF 제조방법에는 쾌속조형기법(rapid prototyping technique)의 3차원 플로팅(3D plotting) 기술이 대표적이며 이는 빠른 속도로 같은 층의 내용을 선으로 그려가면서 층을 쌓아 올려서 3차원 형태를 제작하는 제조방법이다.^{16,17}

또한 스텐트의 재료는 생체적합성과 생분해성이 뛰어난 소재를 이용하여야 한다. 낮은 면역반응과 생분해성, 지속적인 약물방출능을 가지는 생체이식이 가능한 고분자물질로는 폴리락티코글라이콜릭산(poly lactic-co-glycolic acid, PLGA), 폴리락타이드(poly-L-lactide, PLLA), 폴리카프로락톤(polycaprolactone, PCL) 등이 있다.¹⁸ 이들 중 PCL은 생분해성과 생체적합성이 매우 뛰어나고 FDA의 승인을 받은 생체재료이면서 녹는점이 낮아 쾌속조형기법에서 용융하여 쉽게 적용할 수 있고 탄력적이면서도 적당한 기계적 강도를 가지고 있다.¹⁹

본 논문에서는 혈관의 재협착을 방지하기 위해 널리 사용되어지는 약물인 PTX를 이용하여 위에서 언급한 쾌속조형기법으로 3차원 PCL 고분자 디스크타입으로 제작하였고 약물

의 방출거동을 실험하여 생분해성 약물방출 스텐트로의 적용가능성을 확인하였다.

실 험

재료 및 시약. 생분해성 고분자 폴리카프로락톤(PCL, 분자량 40000 g/mol)은 시그마 알드리치에서 구입하였으며, 파클리탁셀(PTX, Genexol[®])은 삼양제넥스에서 제공받아 사용하였다.

HPLC를 이용하여 약물방출 거동을 평가하기 위한 이동상으로 사용한 아세토나이트릴(acetonitrile)과 증류수는 시그마 알드리치에서 구입하였다. *In vitro* 세포실험을 위하여 사용한 A549 폐암유래 세포주와 MDAMB435 유방암유래 세포주는 한국생물자원센터(KCTC)에서 분양받았으며, 분석에 사용된 thiazolyl blue tetrazolium bromide, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 시그마 알드리치에서 구입하였다.

약물함유 고분자 디스크제작. 3차원 디스크 타입의 구조체 제작을 위해 쾌속조형기법을 이용한 3차원 바이오프린팅 시스템을 사용하였다. 바이오프린팅 시스템은 3축 스테이지와 노즐로 구성하였다. 노즐은 열을 조절할 수 있는 디스펜서 타입으로 되어 있고, 압력에 의해 고분자가 노즐을 통해 토출되도록 하였다. 이때, 500 μ m의 노즐을 사용하였고, 이에 따라 토출되어지는 한가닥의 두께는 500 μ m, 간격은 500 μ m로 정하였다. 고분자 PCL과 약물 PTX가 7% 함유되도록 혼합한 후, 바이오프린팅 시스템을 이용하여 3차원 형상의 구조체를 제작하였고 지름 5 mm크기의 원형디스크로 준비하였다. 이때, PTX를 포함한 PCL 구조체는 PCL+PTX로 표기하였다.

구조체의 특성 분석. PTX가 포함된 고분자 구조체의 친수성 정도는 접촉각 측정 장치(contact angle meter; Kyowa)를 이용하여 측정하였고, 표면은 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM; FEI)을 이용하여 관찰하였다. 화학적인 구조를 확인하기 위하여 전반사 적외선 분광기(attenuated total reflection-fourier transform infrared, ATR-FTIR; TENSOR FTIR spectrometer, Bruker)를 이용하여 측정하였다.

NMR과 HPLC를 이용한 약물방출능 평가. PCL 구조체에 포함되어 있는 PTX의 양은 chloroform-d에 PCL+PTX 디스크 샘플을 녹여서 ¹H NMR을 이용하여 측정된 특성 피크(PCL 4.1 ppm (2H), PTX 8.1 ppm (2H))를 비교하여 확인하였다(Figure 1).

PTX의 방출정도는 디스크 샘플을 바이알에 넣고 PBS(1% SDS)에 담겨 항온 수조(37°C)에서 흔들며 주면서 4주 동안 약물을 방출시켰다. 일정 시간(1, 2, 3, 4, 8주) 간격으로 시료를 취하여 HPLC를 이용하여 PTX의 방출거동을 측정하였다. 고정상으로 Eclipse XDB-C18 컬럼(4.6 mm×150 mm)을 사용하였고, 기공크기는 5 μ m였다. 이동상으로 아세토나이트릴과 증류수를 사용(60 vol%:40 vol%)하였으며, 1 mL/min의 속도

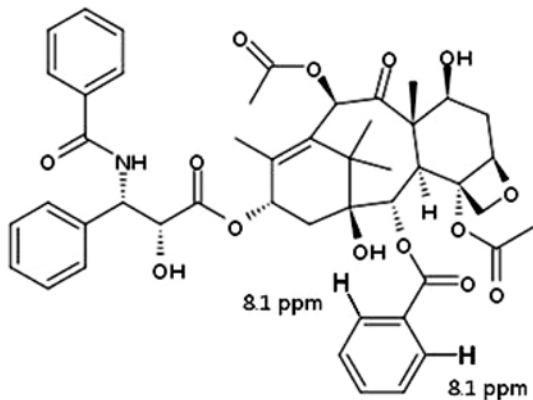


Figure 1. Chemical constitution of PTX.

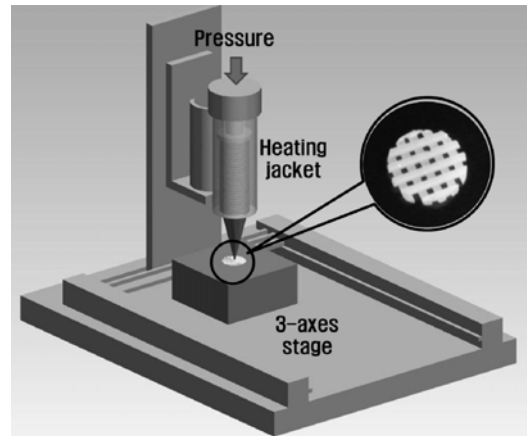


Figure 2. Rapid prototyping system of solid freeform fabrication.

로 측정하였다.

In Vitro 세포실험을 통한 방출약물 활성평가. 위와 같이 제작된 5 mm PCL 디스크를 70% EtOH에 수분간 담근 뒤 1.5 mL tube에 한 개씩 옮기고 clean bench 안에서 완전히 말렸다. 다 마른 디스크가 있는 1.5 mL tube에 PBS를 1 mL씩 넣고 37°C, 150 rpm의 교반배양기에서 약물을 방출시켰다. 6 일 뒤 튜브에서 디스크를 꺼내고 튜브는 4°C의 냉장고에 보관하였다.

A549, MDA-MB-435 세포주는 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 10% FBS를 함유하고 있는 DMEM 배양액으로 3~4 일 간격으로 계대배양하여 유지하여 준비하였다. 각 세포주를 96 well plate(falcon)의 각 well에 1×10³ cells씩 상동배양액 100 µL와 함께 넣어서 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에 넣어 주었다. 6시간 뒤에 냉장보관 중인 약물이 방출된 PBS를 여러 농도로 희석하여 각 well에 10 µL씩 추가해주고, 37°C, 5% CO₂ 세포배양기에서 배양하였다. 3일 뒤 96 well plate의 각 well에 5 mg/mL로 PBS에 녹아있는 thiazolyl blue tetrazolium bromide를 10 µL씩 추가한 뒤 동일조건에서 3시간 배양하였다. 배양이 끝난 plate를 꺼내어 각 well의 배양액을 바닥의 세포소실이 없도록 조심히 제거하고 DMSO를 50 µL씩 넣은 뒤 상온에서 교반하면서 녹여냈다. 1시간 뒤 victor x3(Perkin Elmer)로 550 nm 흡광도를 측정하였다.

결과 및 토론

본 연구에서는 생분해성 약물방출 스텐트 개발을 위해 PTX 약물을 함유한 PCL 구조체를 쾌속조형기법을 이용해 3차원 디스크 구조체로 제작하고 분석하여 약물방출거동을 관찰하였다.

고분자 디스크 특성. 디스크 타입의 3차원 구조체는 쾌속조형기법을 이용한 바이오프린팅 시스템을 사용하여 제작하였다(Figure 2).

접촉각 측정 결과, PTX 약물을 포함하지 않은 PCL 구조

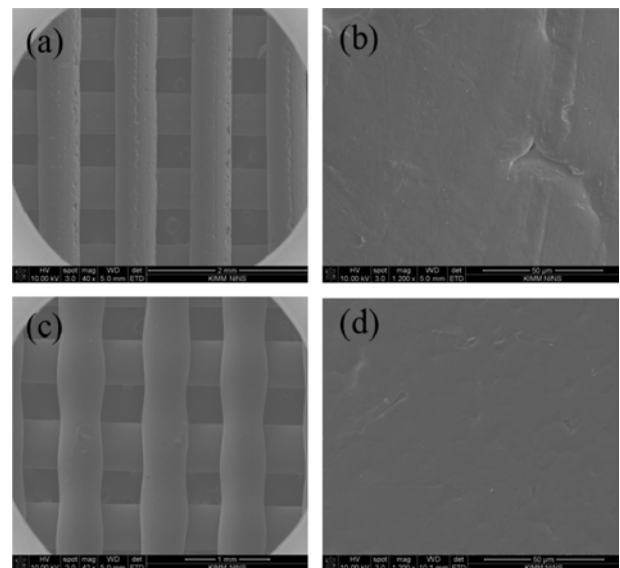


Figure 3. SEM images: (a) PCL 40x; (b) PCL 1200x; (c) PCL+PTX 40x; (d) PCL+PTX 1200x.

체는 126±6°, PTX 약물을 포함한 PCL 구조체는 124±5°로서, PCL은 일반적으로 소수성 고분자이고, PTX 자체가 극소수성인 약물이지만, 큰 차이를 나타내지는 않았다.

PTX를 함유한 PCL 구조체와 PTX를 함유하지 않은 PCL 구조체의 표면은 SEM을 통해 관찰하였다(Figure 3). 구조체 내부의 가닥이 겹쳐 있는 메쉬 형태를 확인하였고, PTX를 함유하지 않은 PCL 구조체와 비교했을 때, 5% PTX를 함유한 PCL 구조체 표면은 PTX 파티클이 명확히 구분되어 관찰되어지는 않았다. PTX를 함유하지 않은 PCL의 가닥은 곧게 뻗어있었고, PTX를 함유한 PCL의 가닥은 약간 굴곡진 형태를 가졌다. 표면은 PTX를 함유한 PCL이 PTX를 함유하지 않은 PCL에 비해 매끄러워 보였다. 메쉬 형태의 구조는 가닥의 굵기와 간격, 패턴 디자인을 조절할 수 있어 3차원 형태

의 스텐트 제작에 유리할 것으로 사료된다.

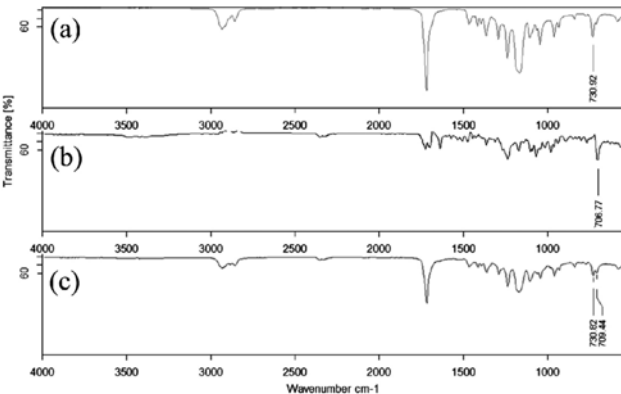
구조체의 약물함유 확인. PTX를 포함하여 제작한 PCL 구조체의 약물함유여부를 판단하기 위하여 디스크를 전반사 적외선 분광기로 측정하였다.

PTX의 흡광곡선이 대부분 PCL과 겹쳐서 특징을 가려내기 쉽지 않으나 PTX를 함유한 PCL에서 PTX에서의 동일하게 PTX의 C-C 결합으로부터의 709 cm^{-1} 흡광을²⁰ 확인하여 PTX가 존재함을 확인할 수 있었다. 그리고 PCL+PTX 구조체는 PCL의 CH_2 long chain으로부터의 730 cm^{-1} 흡광도²¹ 동시에 보여주어 PTX가 포함되어 있는 PCL 구조체가 잘 제조되었음을 확인할 수 있었다(Figure 4).

또한 $^1\text{H NMR}$ 실험을 통해 측정된 특성 피크를 비교해 본 결과, 쾌속조형기법을 이용해 제작한 PTX를 함유한 PCL 3차원 디스크 PCL+PTX 구조체에서 PTX가 약 7%(w/w) 함유되어 있음을 확인하였다.

약물의 방출정도를 정량적으로 판단하기 위하여 PCL+PTX 디스크를 37°C 에서 8주 동안 담지하였고, 7일 간격으로 샘플을 취하여 HPLC로 분석하여 방출된 양을 측정하였다. HPLC 분석을 통해 알아본 PTX의 방출능은 1주 후 약 30%, 4주 후 60%, 8주 후 73%가 방출되었고, 이후 PCL 분해에 따라서 PTX가 서서히 방출될 것으로 예상되어진다(Figure 5).

ATR-FTIR



NMR

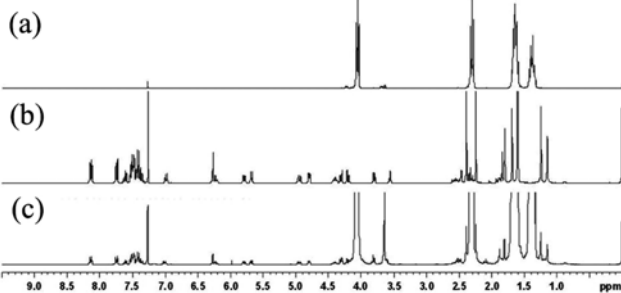


Figure 4. ATR-FTIR and $^1\text{H NMR}$ results: (a) PCL; (b) PTX; (c) PCL+PTX.

In Vitro 세포실험을 통한 약물방출능 평가. 앞서 $^1\text{H NMR}$, HPLC 분석을 통해 약물의 방출이 확인된 것과 같이 제작된 구조체의 PBS에 방출된 약물의 생물학적 활성도를 비교하여 약물의 방출효과와 PCL의 무독성을 확인하였다. 또한 반복하여 제작한 구조체간의 약물방출 균일성을 비교하였다.

Figure 6에서 보는 바와 같이 PTX를 포함하지 않은 구조체를 담지했던 PBS에서는 생물학적 분열억제반응이 나타나지 않은 반면 PTX를 포함하여 제작된 구조체를 담지했던

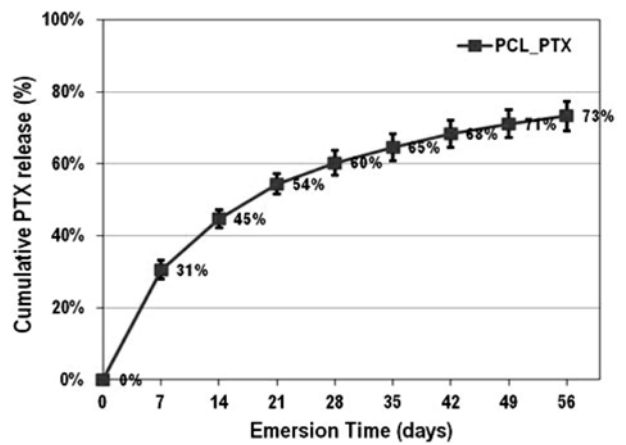


Figure 5. HPLC results; PTX release from PCL+PTX.

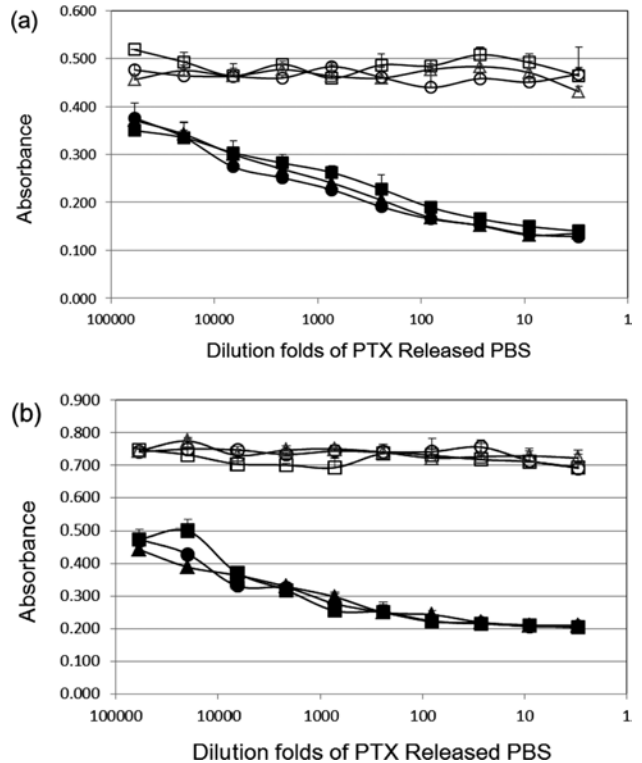


Figure 6. Cytotoxicity results: (a) A549; (b) MDA-MB-435; -□- -○- -△- PCL, -■- -●- -▲- PCL+PTX.6.

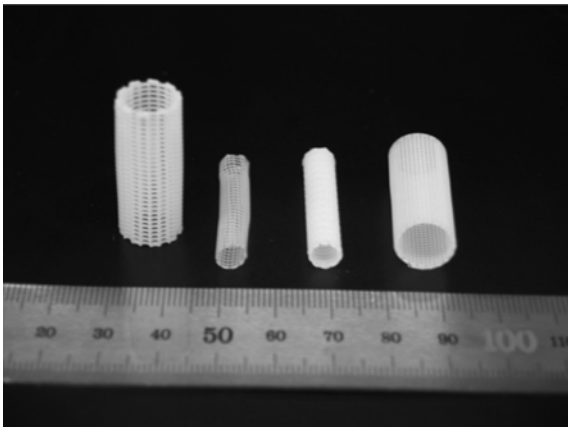


Figure 7. Possible models of biodegradable PCL stents by solid freeform fabrication.

PBS에서는 두 세포종 모두에서 PTX에 의한 세포의 분열억제양상을 보여주었다. 그리고 각 구조체를 담지했던 PBS의 희석률 변화에 따른 세포분열억제효과의 변화추이를 비교한 결과에서도 서로 같은 희석률에서 균일한 활성의 변화를 보여주어 구조체의 각 부분에서 약물방출이 균일하게 이루어짐을 알 수 있었다.

PTX를 함유한 PCL 구조체의 적용가능성. 본 연구에서는 PTX를 함유한 PCL 구조체를 제작하여 약물방출 거동을 관찰하였고, 이를 이용하여 튜브형태의 3차원 형태를 제작함으로써 생분해성 약물방출 스텐트로서의 적용 가능성을 확인하였다(Figure 7).

결론

본 연구는 조형가공기술을 이용하여 세포의 증식속도를 억제하는 항암제인 PTX를 포함하는 생분해성 PCL 고분자 구조체를 제작하였고, 이를 통해 기존의 약물방출 금속스텐트의 한계 중 하나인 불균일한 약물방출능을 해결할 수 있는지 평가하였다.

조형가공기술의 쾌속조형기법으로 제작한 생분해성 고분자 구조체는 ¹H NMR과 HPLC으로 약물이 서서히 방출됨을 관찰하였고, 세포실험을 통하여 구조체간 방출약물의 균일한 활성을 확인하였다. 따라서 위와 같은 방법으로 생분해성 고분자 구조체를 스텐트로 제작하였을 때 약물을 환부에 고르게 전달하여 치료성공률을 높일 수 있을 것으로 예상되어진다. 그러므로 본 연구의 생분해성 고분자 구조체를 스텐트로서 활용할 수 있는 가능성이 높은 것으로 사료되어진다.

감사의 글: 본 연구는 지식경제부 기술혁신사업(10038666) 지원으로 수행되었음.

참고 문헌

1. F. Alexis, S. S. Venkatraman, S. K. Rath, and F. Boey, *J. Control. Release*, **98**, 67 (2004).
2. E. J. Topol, *Textbook of Cardiovascular Medicine*, 3rd Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2007.
3. M. S. Chen, J. M. John, D. P. Chew, D. S. Lee, S. G. Ellis, and D. L. Bhatt, *Am. Heart. J.*, **151**, 1260 (2006).
4. D. O. Williams and J. D. Abbott, *Circulation*, **116**, 2363 (2007).
5. C. C. M. Bosiers, K. Deloosse, J. Berbist, and P. Peeters, *Vasc. Health Risk Manag.*, **4**, 553 (2008).
6. D. Siablis, K. Pantelis, D. Karnabatidis, G. C. Kagadis, K. Katsanos, and J. Tsolakis, *J. Endovasc. Ther.*, **12**, 685 (2005).
7. A. G. Grant, C. J. White, T. J. Collins, J. S. Jenkins, J. P. Reilly, and S. R. Ramee, *Catherter. Cardiovasc. Interv.*, **71**, 112 (2008).
8. J. W. Moses, M. B. Leon, J. J. Popma, P. J. Fitzgerald, D. R. Holmes, C. O'Shaughnessy, R. P. Captuo, D. J. Kereiakes, D. O. Williams, P. S. Teirstein, J. L. Jaeger, and R. E. Kuntz, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 1315 (2003).
9. J. Xie and C.-H. Wang, *Pharmaceut. Res.*, **23**, 1817 (2006).
10. J. Zeng, X. Xu, X. Chen, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, and X. Jing, *J. Control. Release*, **92**, 227 (2003).
11. J. Liebmman, J. A. Cook, and C. Lipschultz, *Cancer Chemoth. Pharm.*, **33**, 331 (1994).
12. R. Wessely, *Eur. Heart. J.*, **28**, 2720 (2007).
13. T. H. Wang, H. S. Wang, and Y. K. Soong, *Cancer Chemoth. Pharm.*, **88**, 2619 (2000).
14. T. A. Fischell, *Circulation*, **94**, 1494 (1996).
15. D. T. Pham and S. S. Dimov, *Rapid Manufacturing: the Technologies and Applications of Rapid Prototyping and Rapid Tooling*, Springer, London, 2000.
16. I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, and S. H. Teoh, *Biomaterials*, **23**, 1169 (2002).
17. R. Langer and D. Tirrell, *Nature*, **428**, 487 (2004).
18. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, and A. R. Kulkarni, *J. Control. Release*, **70**, 1 (2001).
19. J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek, C. L. Flanagan, P. H. Krebsbach, S. E. Feinberg, S. J. Hollister, and S. Das, *Biomaterials*, **26**, 4817 (2005).
20. M. Hamoudeh, R. Diab, and H. Fessi, *Drug. Dev. Ind. Pharm.*, **34**, 698 (2008).
21. J. Krzaczkowska, Z. Fojud, M. Kozak, and S. Jurga, *Acta Phys. Pol. A*, **108**, 187 (2005).