

## 고형지질나노입자를 이용한 파클리탁셀의 주사제 설계

최성업 · 김선규 · 이정민 · 최영욱<sup>†</sup>

중앙대학교 약학대학

(2003년 11월 15일 접수 · 2003년 12월 12일 승인)

### Injection Formulation of Paclitaxel Employing Solid Lipid Nanoparticles (SLN)

Sung-Up Choi, Sun-Kyu Kim, Jung-Min Lee and Young Wook Choi<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

(Received November 15, 2003 · Accepted December 12, 2003)

**ABSTRACT**—Many studies have been attempted to overcome the problems of paclitaxel related to the extremely low aqueous solubility of paclitaxel and the unexpected side-effects caused by Cremophor<sup>®</sup> EL in a commercial paclitaxel formulation, Taxol<sup>®</sup>. In order to formulate a new delivery system suitable for intravenous administration without toxic excipients, in this study, paclitaxel was incorporated into solid lipid nanoparticles (Px-SLN) by hot homogenization technique using a microfluidizer. Particle size and zeta potential were measured by a Zetasizer. *In vitro* drug release experiment was performed by a dialysis diffusion method. Each Px-SLN or Taxol<sup>®</sup> was intravenously administered to the male Sprague-Dawley rats at a dose of 5 mg/kg as paclitaxel. Blood samples were deproteinated with acetonitrile and assayed for paclitaxel by the validated HPLC/MS/MS method. Mean particle size and zeta potential were measured as 72.1 nm (< Polydispersity 0.3) and -41.5 mV, respectively. The content of paclitaxel in SLN was 1.42 mg/ml and the drug loading efficiency was 71.2±4.3%. The AUC<sub>t</sub> of Px-SLN was 3.4-fold greater than that of Taxol<sup>®</sup>. The Px-SLN might be a promising candidate for an alternative formulation for the parenteral delivery of paclitaxel.

**Key words**—Paclitaxel, Solid lipid nanoparticles, Pharmacokinetics, Bioavailability

파클리탁셀은 주목나무의 껍질로부터 추출되어 항암활성이 보고된 이후, 난소암, 유방암 등에 사용되고 있는 diterpenoid계 화합물로서,<sup>1)</sup> 물에 대한 용해도가 0.2 µg/ml 이하로 매우 낮은 난용성 약물이다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 탁솔은 에탄올과 크레모포어의 50:50 혼합액에 가용화된 형태로서 시판되고 있으나, 신독성, 신경독성 및 과민반응으로 인하여 임상적으로 사용이 제한적인데 그 원인물질이 크레모포어라고 알려져 있다.<sup>1)</sup> 이러한 과민반응을 해소하기 위해 벡사메타손과 같은 코르티코스테로이드나, 시메티딘, 라니티딘 등의 H<sub>2</sub> 길항제 등으로 전처치 한 후에 사용하도록 추천되고 있다. 적절한 전처치에도 불구하고 그 과민성은 때로 심각한 부작용을 유발하여 사망에 이르기도 한다. 따라서, 궁극적으로 크레모포어가 배제된 안전한 파클리탁셀 주사제형 개발이 절실하며, O/W 에멀전,<sup>2)</sup> 리포솜,<sup>3)</sup> 미셀,<sup>4)</sup> 사이클로덱스트린 포접체,<sup>5)</sup> polymeric particles<sup>6)</sup> 및 solid lipid nanoparticles(SLN)<sup>7)</sup> 등의 수송체에 파클리탁셀을 봉입시켜 주사제를 개발하고자 하는 연구들이 많이

보고되어 왔다. 이중 최근 10여년간 SLN에 대한 연구가 심도있게 진행되었으며, 주사제제로의 가능성이 더욱 부각되었다.

SLN은 에멀전의 오일 대신에 생체에서 유래된 생체적합성 및 생체분해성 고형지질을 사용하므로 생체내 독성이 낮고, 유기용매를 사용하지 않으므로 잔류독성에 대한 염려도 없다.<sup>8-9)</sup> 파클리탁셀이 봉입된 SLN의 제조<sup>7)</sup> 및 *in vitro* 세포독성<sup>10)</sup>에 관한 결과들이 이미 보고되었으나 *in vivo*에서의 평가가 연속하여 이루어지지 않았으며, 최근 Chen 등<sup>11)</sup>에 의해 *in vivo* 연구가 진행되었으나 이는 유기용매를 사용한 단점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 독성이 없는 첨가제로서 고형지질을 사용하여 파클리탁셀을 지질나노입자에 봉입한 후 흰쥐를 대상으로 약물동태학적 평가를 실시하였다.

### 실험 방법

#### 시약

파클리탁셀(Genexol<sup>®</sup>, Lot. G127, Purity 99.53%)은 삼양제넥스(대전, 한국)로부터 구입하였고, L- $\alpha$ -Lecithin과 Baccatin

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

III(내부표준물질)은 Sigma-Aldrich Company(St. Louis, MO, 미국), Poloxamer 188은 BASF(서울, 한국), Precirol ATO 5과 Vitamin E TPGS(d- $\alpha$ -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate)는 Gattefosse(프랑스)와 Eastman(영국)의 제품을 마성상사(서울, 한국)를 통하여 각각 얻었다. 그외의 시약은 1급 시약을 사용하였다.

#### 파클리탁셀 함유 SLN의 제조(Px-SLN)

파클리탁셀 함유 SLN은 Muller 등<sup>8)</sup>의 hot-homogenization 방법에 준하여 Microfluidizer M-110S(Microfluidics, Newton, MA, 미국)를 이용하여 제조하였다. Precirol(10%)과 약물(0.2%) 및 계면활성제(lecithin 1.6%, TPGS 4.0%)를 90°C의 수욕상에서 가온·용융하고, 동일 온도로 가온된 계면활성제(Poloxamer 188 4.0%)를 함유한 수상을 가하여 조에멀전을 형성시킨 후 Microfluidizer(10,000 psi, 7 cycles)를 통과시켜 Px-SLN을 얻었다.

SLN의 평균입자경 및 제타전위값은 Zetasizer Nano-ZS(Malvern, Worcestershire, 영국)를 이용하였으며, 약물함량은 SLN을 메탄올에 녹여 HPLC로 분석하였다.

#### In Vitro 약물방출실험

투석막(MWCO 12000-14000, Spectra/Por®, Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, 미국)을 이용하여 확산투석법으로 진탕배양기(37.5°C, 150 rpm)에서 실시하였다. 투석막 내부 시험액에 SLN을 가하고 외부 용출매질로 투석된 약물을 HPLC로 분석하였다. 투석막 내외의 시험액은 난용성인 파클리탁셀의 용해도와 SLN의 물리적인 안정성을 고려하여 10% 에탄올을 사용하였다.

#### In Vivo 체내동태실험

Sprague-Dawley 계열의 수컷 흰쥐(체중 200-250 g, 한림 실험동물, 한국)를 대상으로 시험 전 10시간 이상 절식상태에서 에텔로 가볍게 마취하여 좌우 대퇴동·정맥에 폴리에틸렌 튜브를 삽관하였다. 탁솔과 Px-SLN을 대상으로 파클리탁셀로서 5 mg/kg의 용량으로 정맥투여하고, 동맥에서 0.2 ml 채혈하였다. 채혈된 혈액에 내부표준물질(Baccatin III)을 가하고 2배량의 아세트니트릴을 가하여 제단백 후 얻어진 상정액 0.4 ml에 2배량의 증류수를 가하여 HPLC/MS/MS로 분석하였다.

AUC<sub>0-t</sub>는 12시간까지의 실측치로부터 사다리꼴공식을 이용하여 산출하였으며, C<sub>1</sub>는 최초 채혈 시점인 2분에서의 약물 농도를 제시하였으며, 소실상에서의 소실속도 상수 및 반감기는 세미로그플롯으로부터 계산하였다.

#### 파클리탁셀의 분석

HPLC 분석조건-약물의 함량 및 *in vitro* 약물방출시험은 Hitachi HPLC(Hitachi, Tokyo, 일본)를 사용하여 분석하였다.<sup>12)</sup> Hitachi L-7100 펌프, L-7400 UV/Vis 검출기, L-7200 자동시료주입기를 이용하였으며, 이동상은 아세트니트릴:20 mM 인산염완충액(50:50 v/v, pH 5.0), 유속은 1 ml/min, 파장은 227 nm, 컬럼은 Capcell Pak C18(4.6×150 mm, Shiseido, Tokyo, 일본)을 사용하였다.

HPLC/MS/MS 분석조건-생체시료의 분석은 Agilent 1100 HPLC system(Agilent Technologies, Waldbronn, 독일)을 이용하였다.<sup>13)</sup> 컬럼은 Capcell Pak C18(2×35 mm, Shiseido, Tokyo, 일본), 이동상은 아세트니트릴:5 mM 암모늄아세테이트완충액(70:30 v/v, pH 4.5), 유속은 0.2 ml/min에서 정량하였다. 이온검출은 API 3000 triple quadrupole mass spectrometry (Applied Biosystems/MDS SCIEX, Toronto, 캐나다)를 이용하여 multiple reaction monitoring (MRM) mode 방법으로 검출하고, 이온화는 TurboIonSpray™를 이용한 electrospray ionization(ESI) 하였다. MRM mode를 이용한 paclitaxel과 내부표준물질(Baccatin III)의 수소화된 분자이온은 *m/z* 854.6과 604.7이며, 생성된 product ion은 *m/z* 286.2와 327.2이었다.

## 결과 및 고찰

#### 파클리탁셀 봉입 SLN의 특성

제조된 Px-SLN은 평균 입자경 72.1 nm (<Polydispersity 0.3), 제타전위 -41.5 mV의 콜로이드성 입자이었다. 일반적으로 문헌에 보고되고 있는 나노입자들의 평균입자경은 50-250 nm 정도이고<sup>7-9,11)</sup> 제조된 Px-SLN은 평균입자도 및 분포로 판단할 때 주사제에 적합한 것으로 판단되었다. 또한 제타전위값은 역시 물리적 안정성을 확보하기에 충분한 것으로 판단되었으며, 실제로 냉장 보관시 6개월이상 입자의 응집이 관찰되지 않았다. Px-SLN중의 약물함량은 1.42 mg/ml이며, 약물봉입률은 71.2±4.3%이었다. 파클리탁셀을 스테아린산에 봉입한 문헌에서<sup>11)</sup> 봉입률은 약 58-75%로서 사용한 계면활성제에 따라 다소 차이가 있었다.

#### In Vitro 약물방출

투석막을 이용한 약물방출 결과를 Figure 1에 나타내었으며, 전체적인 양상을 비교할 때 약물이 고형지질에 봉입된 SLN임에도 불구하고 탁솔과의 차이는 거의 없었다. 파클리탁셀은 난용성약물로서 물에 대한 용해도가 0.2 µg/ml 이하로서 매우 낮으며, tween 80 등의 계면활성제를 가한 경우

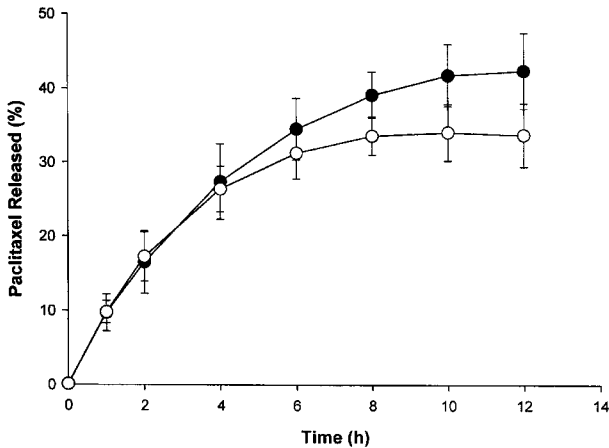


Figure 1—*In vitro* release of paclitaxel from Taxol® (●) and Px-SLN (○). Bars represent mean±S.E. (n=3).

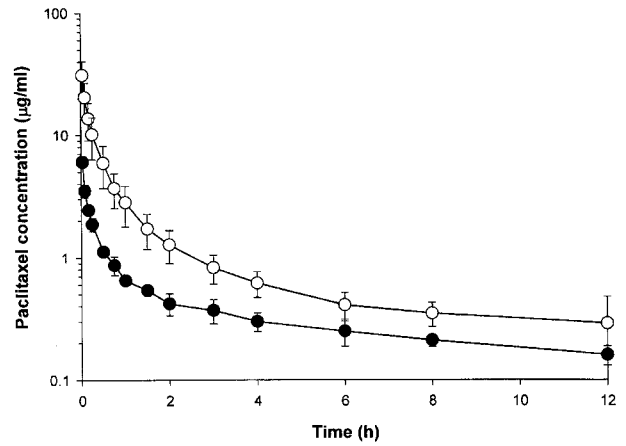


Figure 2—Blood concentration-time curve of paclitaxel after intravenous injection at a dose of 5 mg/kg as paclitaxel in the rats. Bars represent mean±S.E. (n=4) (●; Taxol®, ○; Px-SLN).

에도 수상에서의 용해도는 크게 증가하지 않는다고 보고 되었다.<sup>11)</sup> 스테아린산을 고형지질로 하여 제조된 파클리탁셀 함유 SLN의 *in vitro* 용출실험에서 Chen 등<sup>11)</sup>은 30% 에탄올을 용출매질로 선택하여 24시간 후 5-20%의 파클리탁셀 방출을 확인하였다. 본 실험에서는 SLN의 물리적 특성은 변화시키지 않으면서 파클리탁셀의 용해도를 증가시킬 목적으로 10% 에탄올을 선택하였다. 실제로 10% 에탄올 매질에서 SLN의 입자크기가 변화하지 않아 방출매질이 SLN의 응집이나 용해 등을 초래하지 않았다. 10% 에탄올에서 파클리탁셀의 포화용해도는 197 µg/ml로 관찰되었으며, 본 실험조건에서 SLN으로서 투석막에 가한 파클리탁셀의 이론농도는 35 µg/ml이었기 때문에 100% 약물방출을 가정할 때에도 투석막 내부는 충분히 sink condition이 유지되었다고 판단되었다. 따라서 고형지질입자로부터 용출된 파클리탁셀은 투석막 내에서 충분한 녹을 수 있으며, 용해된 약물은 곧바로 투석막을 통과하여 신속히 외부 방출매질로 확산되었다고 생각된다.

파클리탁셀이 매우 난용성이기 때문에 이론적으로는 SLN으로부터의 약물방출은 느리게 나타나야 할 것으로 사료됨에도 불구하고, 실질적으로는 신속히 방출되는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과는 SLN의 평균입자경이 72 nm로서 비표면적이 매우 커서 표면에 봉입 또는 부착된 약물이 신속히 확산되었고, SLN 제조시 사용되는 다량의 계면활성제가 난용성약물인 파클리탁셀의 용해를 도와주어 초기 약물방출이 빠르게 일어났기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 4시간 이후의 약물 방출은 탁솔에 비해 다소 느린데, 이때부터는 고형지질 입자 내부 중심부에 봉입된 약물이 방출되는 시기인 것으로 추정되며 사용한 지질(Precirol ATO 5)의 녹는 점이 약 53-57°C임을 감안할 때 용출시험조건에서 봉해되지 않기 때문에 추가적인 약물방출이 느렸을 것으로 판단된다.

Table 1—Pharmacokinetic Parameters of Paclitaxel after iv administration of Taxol® and Px-SLN in Rats

Formulation	AUC <sub>t</sub> (µg/ml·h)	C <sub>t</sub> (µg/ml)	Terminal phase	
			K <sub>el</sub> (h <sup>-1</sup> )	t <sub>1/2</sub> (h)
Taxol®	4.399±0.37	6.03±1.01	0.074±0.081	9.43±2.16
Px-SLN	15.034*±4.36	31.10*±7.72	0.056±0.017	12.33±3.34

AUC<sub>t</sub>: area under the curve from 0 to 12 h, C<sub>t</sub>: concentration at time 2 min (initial sampling point), K<sub>el</sub>: elimination rate constant for terminal phase, t<sub>1/2</sub>: half-life for terminal phase. (mean±S.D., \*; p<0.05)

### 파클리탁셀의 혈중농도추이

탁솔과 Px-SLN을 정맥 투여한 후 혈중농도추이곡선은 Figure 2와 같고 약물동태학적 파라미터는 Table 1에 제시하였다. 동일 투여량에도 불구하고 SLN은 탁솔에 비해 초기 농도가 높은 혈중농도를 나타내었다. 전반적인 혈중농도 양상은 매우 유사하였으나, 분포상에서의 혈중농도 감소가 SLN의 경우 다소 느리게 나타났다. 12시간까지의 AUC를 비교하면 SLN이 탁솔에 비해 3.4배, 초기농도는 5.2배 높게 관찰되었다.

Spencer 등<sup>1)</sup>에 의하면 파클리탁셀은 약 88-98%의 높은 혈장단백결합에도 불구하고, 조직으로의 분포속도가 빨라 혈중에서 빠른 소실을 보인다고 보고하였다. 탁솔의 경우 가용화된 상태이므로 파클리탁셀의 빠른 분포특성을 따르기 때문에 초기 농도가 낮았을 것으로 사료된다. SLN의 경우는 지질수송체에 봉입된 상태이므로 조직으로의 분포에 의한 초기 소실량이 적어 상대적으로 높은 혈중 농도를 나타낸 것으로 추정되며, 동시에 본 연구에서는 혈중농도 분석시 전혈 중의 약물농도를 정량하였으므로 지질수송체에 함유된 약물도 혈중약물농도에 반영되었기 때문인 것으로 간주된다.

파클리탁셀의 소실반감기는 흰쥐에서 3.46시간,<sup>14)</sup> 마우스

에서는 0.34-1.31 시간,<sup>3,15)</sup> 사람에서는 3.8-16.5 시간으로<sup>1)</sup> 보고되었다. 본 연구에서는 Figure 2에 제시한 바와 같이, 세미로그플롯에서 6시간 이후 직선성이 관찰되어 이로부터 구한 소실상에서의 반감기는 탁솔은 9.43시간, SLN은 12.33 시간로서 약간의 차이를 나타내었으나, 혈중농도가 지속적으로 유지되지는 못하였다. 즉, SLN의 *in vitro* 약물방출 결과를 감안할 때 4-6시간 이후에도 SLN 내에 일부 약물이 잔존하고 있어 이론적으로는 일정시간 이후에도 지속적인 약물방출이 이루어질 수 있을 것으로 기대할 수 있었으나, 실제로는 다른 결과를 나타내었다. 그 이유로는 분포후상에서 SLN으로부터 약물 방출이 모두 완료되어 이후 동일한 패턴으로 소실되었을 가능성과 또는 SLN이 입자성 수송체이므로 시간이 경과함에 따라 macrophage 등에 의해 소실되었을 가능성을 배제할 수 없었다.

## 결 론

파클리탁셀을 기존 hot melt homogenization 방법으로 SLN에 효과적으로 봉입할 수 있었으며, 평균 입자경 및 그 분포로 판단할 때 주사제에 적합하였다. 또한, 제타 전위 값은 일반적으로 물리적 안정성을 확보하기에 적절한 범위에 있었다. 비록 소실반감기가 탁솔에 비해 명확히 지연되지는 않았으나, 생체이용률(bioavailability) 파라미터인 AUC<sub>0-∞</sub>가 약 3.4배 높고, 독성을 나타내는 크레모포어가 배제된 제제임을 고려할 때 Px-SLN은 기존 탁솔의 대체제제로서 개발 가능성이 있다고 기대되었다.

## 감사의 말씀

본 연구는 2002년도 중앙대학교 연구기자재 구입 지원프로그램과 2003년도 중앙대학교 학술연구비 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) C. Spencer and D. Faulds, Paclitaxel; A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of cancer, *Drugs* **48**, 794-847 (1994).
- 2) B. Tarr., T. Sambandan and S. Yalkowsky, A new parenteral emulsion for the administration of Taxol, *Pharm. Res.*, **4**, 162-165 (1987).
- 3) P. Crosasso, M. Ceruti, P. Brusa, S. Arpicco, F. Dosio and L. Cattel, Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes, *J. Controlled Rel.*, **63**, 19-30 (2000).
- 4) H. Alkan-Onyuksel, S. Ramakrishnan, H. Chai and J. Pezzuto, A mixed micellar formulation suitable for the parenteral administration of Taxol, *Pharm. Res.*, **11**, 206-212 (1994).
- 5) U. Sharma, S. Balasubramanian and R. Straubinger, Pharmaceutical and physical properties of paclitaxel (Taxol) complexes with cyclodextrins, *J. Pharm. Sci.*, **84**, 1223-1230 (1995).
- 6) L. Mu and S. Feng, Fabrication, characterization and *in vitro* release of paclitaxel (Taxol) loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers, *J. Controlled Rel.*, **76**, 239-254 (2001).
- 7) R. Cavalli, O. Caputo and M. Gasco, Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **10**, 305-309 (2000).
- 8) R. Muller, W. Mehnert, J. Lucks, C. Schwarz, A. Muhlen, H. Weyhers, C. Freitas and D. Ruhl, Solid lipid nanoparticles (SLN)-An alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **41**, 62-69 (1995).
- 9) W. Mehnert and K. Mader, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications, *Adv. Drug Del. Rev.*, **47**, 165-196 (2001).
- 10) R. Muller and W. Mehnert, Solid lipid nanoparticles (SLN) as potential carrier for human use: interaction with human granulocytes, *J. Controlled Rel.*, **47**, 261-269 (1997).
- 11) D. Chen, T. Yang, W. Lu and Q. Zhang, *In vitro* and *in vivo* study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel, *Chem. Pharm. Bull.*, **49**, 1444-1447 (2001).
- 12) S. Lee, S. Yoo and K. Lee, Rapid and sensitive determination of paclitaxel in mouse plasma by HPLC, *J. Chromatogr. B.*, **724**, 357-363 (1999).
- 13) G. Basileo, M. Breda, G. Fonte, R. Pisano and C. James, Quantitative determination of paclitaxel in human plasma using semi-automated liquid-liquid extraction in conjunction with liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **32**, 591-600 (2003).
- 14) L. He, G. Wang, and Q. Zhang, An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile, *Int. J. Pharm.*, **250**, 45-50 (2003).
- 15) S. Kim, D. Kim, Y. Shim, J. Bang, H. Oh, S. Kim and M. Seo, *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy, *J. Controlled Rel.*, **72**, 191-202 (2001).