초임계 이산화탄소를 이용한 Gemcitabine 함유 PLLA 미립자 제조: 공정 변수의 영향

주현재¹, 정인일^{1,2}, 임교빈¹, 유종훈^{1*}

Production of Gemcitabine-Loaded Poly (L-lactic acid) Microparticles Using Supercritical Carbon Dioxide: Effect of Process Parameters

Hyun-Jae Joo¹, In-Il Jung^{1,2}, Giobin Lim¹, and Jong-Hoon Ryu^{1*}

접수: 2011년 1월 31일 / 게재승인: 2011년 2월 21일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: In this study, poly (L-lactic acid) (PLLA) microparticles containing gemcitabine hydrochloride were prepared by a supercritical fluid process, called aerosol solvent extraction system (ASES), utilizing supercritical carbon dioxide as antisolvent. The influence of process parameters such as temperature, pressure, CO₂ and solution flow rate, solution concentration, and feed ratio of drug to polymer on the morphology and characteristics of the microparticles was studied in detail. The gemcitabine-loaded microparticles exhibited a spherical shape with a smooth surface. The entrapment efficiency of gemcitabine increased with increasing temperature, solution concentration and CO₂ flow rate and with decreasing drug/polymer feed ratio. The maximum drug loading obtained from the ASES process was found to be about 11%. The ASES-processed PLLA microparticles containing gemcitabine showed a relatively high initial burst due to the presence of surface pores on the microparticles and the poor affinity between drug and polymer.

Keywords: gemcitabine, poly (L-lactic acid), supercritical carbon dioxide, microparticle, ASES

1. 서론

화학요법 (chemotherapy)으로 사용되는 항암제 중 상당수는 강한 세포 독성을 가지고 있으며, 짧은 반감기 또는 체내에서의 신진대사로 인해 낮은 생체이용률을 보인다. 따라서 약물의 높은 항암 효과에도 불구하고 약물의 과다복용에 따른 부작용이 심각한 것으로 알려져 있다. 약물의 과다 복용에 의한 부작용을 최소화하고 약물의 효과를 극대화하기 위한 방법으로 약물을 생분해성 고분자 내에 봉입하여 미립자를 제조함으로써 특정 시간 동안 원하는 농도로 약물을 방출시키는 고분자 미립자 약물전달시스템 기술 개발에 대한 많은 연구가 진행되고 있다 [1-3]. 이와 같은 약물전달시스템을 개발하기 위해서는 여러 가지 기술이 필요하지만, 가장 중요한 핵심기술은 약물과 고분자 (약물전달체) 및 이들의 혼합물을 원하는 크기와 형태 및 약물의 봉입률을 갖는 미립자로 제조하는 것이다.

고분자 미립자 약물전달시스템에서 일반적으로 사용되고 있는 생분해성 고분자로는 poly (lactic acid) (PLA), poly (glycolic acid) (PGA), 이 둘의 공중합체인 poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly (ϵ -caprolactone), polyanhydride, poly (ortho ester) 등이 있다 [2]. 특히 PLA와 PLGA 같은 polyester계 생분해성 고분자가 전달체로 널리 사용되고 있는 이유는 오랫동안 체내에 유지되며 생체 내에서 고분자가 이물질 반응을 거의 일으키지 않는 생체적합성과 일정한 기

¹수원대학교 화학공학과

¹Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea.
Tel: +82-31-220-2599, Fax: +82-31-220-2528
e-mail: jhryu@suwon.ac.kr

²연세대학교 화공생명공학과

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

능을 다한 후에는 신진대사를 통해 이산화탄소와 물로 분해되어 체외로 배출되는 생분해성의 특성을 가지기 때문이다.

고분자 미립자를 제조하는데 많이 사용되고 있는 방법으로는 용융법, 에멀전법, 상분리법, 용매 증발 및 추출법, 분무 건조법 등이 있다 [4-6]. 이들 방법은 과량의 에너지 소비, 다량의 폐유기용매 및 폐수의 배출로 인한 환경오염, 낮은 수율, 낮은 약물 봉입률, 고비용, 열 민감성에 의한 약물의 변성, 입자제조 후 유기용매의 잔존 등의 많은 문제점을 가지고 있다. 이와 같은 문제점을 해결하기 위한 여러 방법 중 환경친화적 단일공정 기술로서 초임계 유체 (supercritical fluid)를 이용한 미립자 제조기술에 대한 관심이 증대하고 있다.

초임계 유체란 어떤 물질의 임계점 (critical point) 이상의 온도와 압력 조건에서 존재하는 유체로서 액체와 기체의 중간적인 물리적 특성을 가지고 있다. 초임계 유체는 높은 용해도, 선택도, 압축성, 감압에 따른 자발적 분리성 등의 열역학적 특성과 낮은 표면장력과 점도, 높은 확산 계수의 이동특성을 갖고 있어 미립자의 제조에 매우 유리하다 [5,7-10]. 또한, 온도와 압력의 미세 조절을 통해 용해도, 확산도 등의 유체 성질을 쉽게 조절할 수 있으며 감압에 의해 사용된 유기용매와 이산화탄소를 쉽게 분리하여 회수할 수 있다.

초임계 유체로는 특히 이산화탄소를 많이 사용하는데, 이는 비교적 낮은 임계온도 (31℃)와 임계압력 (73.8 bar)을 가지고 있으며, 인체에 무해하고 가격이 저렴할 뿐만 아니라 폭발성 및 발화 위험이 거의 없기 때문이다. 따라서 미립자 제조에 있어 단일 공정으로 이산화탄소를 이용한 초임계 유체 공정은 다양한 분야에서 주목받고 있는 기술이다 [5,7-10]. 초임계 유체 공정에서 초임계 유체는 고분자 및 약물의 용매 또는 역용매로 사용되며, 온도와 압력을 조절하여 초임계 유체의 용해도를 제어함으로써 고분자와 약물 및 이들의 혼합물을 침전 또는 재결정시켜 미립자를 제조한다.

본 연구에서 사용한 초임계 유체 기술은 aerosol solvent extraction system (ASES) 공정으로서, 초임계 유체를 대상 용질에 대한 역용매로 사용하여 미립자를 제조하는 방법이다. 이 공정에서 고분자와 약물이 용해되어 있는 용액이 미세 노즐을 통하여 초임계 유체 내로 액적 (droplet)의 형태로 분사되면 액적 내의 유기용매는 빠른 속도로 초임계 유체 상으로 증발되고, 동시에 초임계 유체는 액적 내부로 확산되어 액적이 팽창되고, 결과적으로 액적 중 고분자와 약물에 대한 용매의 용해도가 급격히 감소하여 매우 빠른 속도로 미립자가 형성된다 [7-10].

젬시타빈 (gemcitabine, 2',2'-difluorodeoxycytidine)은 deoxycytidine 유도체로 비소형 세포 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암 등의 고형종양에 대하여 항암 작용을 가지고 있는 것으로 알려져 있다 [11-15]. 젬시타빈은 암세포의 DNA 합성을 방해함으로써 암세포를 사멸시키는 작용을 한다. 일반적으로 수액과 함께 섞어서 혈관으로 투여되며, 1,000 mg/m²의 양을 매주 한 차례씩 30분 동안 3주간 투여하고 주사한 후 4주째에는 약물의 투여를 중단하는 방법으로 이용된다. 그러나 젬시타빈은 주로 항암 활성이 없는 2'-deoxy-2',2'-difluoruridine으로 대사되어 혈장으로부터 빠르게 제거되며, 이로 인해 30-90분의 짧은 반감기를 갖기 때문에 많은

약물의 투여가 요구되어 부작용이 심각한 문제가 될 수 있다. 주요 부작용으로는 오심, 구토, 골수 기능 저하 등을 들 수 있다. 현재 젬시타빈을 기반으로 하는 여러 항암제의 조합이 임상시험에 적용되고 있으며, 방사선 치료와도 병합하여 사용되고 있다 [16].

본 연구에서는 서방성 약물방출 미립자를 제조하기 위하여 여러 종류의 생분해성 고분자 중 비교적 분해속도가 느린 poly (L-lactic acid) (PLLA)을 선택하여 실험을 수행하였다. 서방성 약물방출 미립자를 제조하는 방법으로는 기존의 미립자 제조 방법들의 문제점을 개선할 수 있는 대체 공정으로 최근 많이 연구되고 있는 초임계 유체 기술의 하나인 ASES 공정을 사용하였다. 초임계 ASES 공정에서 생분해성 고분자인 PLLA와 친수성 약물인 젬시타빈을 이용해 온도, 압력, 이산화탄소와 용액의 유량, 용액의 농도, 약물/고분자 투입 비율 등의 공정 및 조성 (formulation) 변수가 제조된 미립자의 크기, 형태, 봉입효율 및 약물함량에 미치는 영향과 약물 방출특성을 확인함으로써 초임계 유체 공정의 서방성 약물 방출 미립자제조에 대한 적용가능성 여부를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료

본 연구에서는 생분해성 고분자로 분자량 40,000-70,000 Da의 poly (L-lactic acid) (PLLA) (polysciences, USA)를 구입하여 정제 없이 사용하였다. 대상 약물인 젬시타빈 (2',2'-difluorodeoxycytidine, dFdC) HCl은 Dr. Reddy's Lab. (Hyderabad, Andhra Pradesh, India)에서 구입하여 정제 없이 사용하였다. 초임계 유체로는 99.5% 순도의 이산화탄소 (동민특수가스, 대한민국)를 사용하였으며, 이외의 모든 시약과 용매는 HPLC급으로 구입하여 정제 없이 사용하였다.

2.2. 미립자 제조

약물이 함유된 PLLA 미립자 제조를 위해 사용한 초임계 ASES 공정의 실험 장치는 자체적으로 제작된 것으로, 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. 본 연구에 사용된 ASES 장치는 이산화탄소 공급부분, 용액의 주입과 분사에 이용된 정량펌프와 노즐, 입자 형성이 이루어지는 고압 침전기, 용매 회수부 등으로 나누어진다.

이산화탄소는 냉각기에서 냉각된 후 액체 상태로 고압펌프 (Lewa, EL-1, Germany) 의해 가압되고 후방압력조절기 (back-pressure regulator, 26-1700, Tescom, USA)에 의해 일정한 압력으로 조절되어 고압 침전기의 상단으로 연속적으로 공급된다. 일정 중량비의 젬시타빈과 PLLA를 각각 dimethyl sulfoxide (DMSO)와 dichloromethane (DCM)에 완전히 용해시켜 동일부피로 혼합한 후, 이 혼합용액을 주사형 고압정량펌프 (syringe pump, 100DX, ISCO, USA)를 이용하여 고압 침전기 상단에 위치한 내경 127 µm의 노즐을 통해 연속적으로 흐르는 초임계 이산화탄소상으로 분사하였다. 노즐을 통해 분사되는 혼합용액의 액적에서는 액적 내 유기용매와 액적 주변의 초임계 이산화탄소간의 물질전달에

의해 빠른 속도로 과포화가 유도되어 미립자가 형성된다. 고압 침전기에서 형성된 미립자는 침전기 하단에 장착된 0.5 μm 공극의 금속필터에 의해 수집되었다. 본 실험에서 사용된 유기용매는 침전기 이후에 장착된 용매 회수부에서 감압에 의해 자발적으로 분리와 회수가 이루어지도록 하였다. 초기의 온도와 압력 변화에 따른 미립자 제조 실험에서는 용액 농도를 13 mg/mL으로, 용액과 이산화탄소의 유량을 각각 0.5 mL/min과 10 L/min (표준상태)으로 고정하였으며, 이후 공정 변수의 영향을 고찰하기 위해 초기 실험에서 얻은 실험 결과를 바탕으로 최적 조건을 선정 후 실험을 수행하였다.

Fig. 1. Schematic diagram of the supercritical ASES apparatus used in this study.

2.3. 입자 크기 및 형태 측정

ASES 공정을 통해 얻은 미립자를 carbon disk에 부착시킨 후 전계방사주사전자현미경 (field emission scanning electron microscope, FESEM, JSM6700F, JEOL, Japan)을 사용하여 미립자의 크기와 형태를 관찰하였다.

2.4. 약물 봉입률 측정

제조된 미립자 10 mg을 칭량해 0.01 M 농도의 Tween 20 계면 활성제가 첨가된 pH 7.4의 인산완충용액 (phosphate buffer solution with Tween 20, PBST) 10 mL에 넣어 분산시키고, 4,500 rpm의 속도로 10분간 원심분리한 후 5 mL의 용액을 채취하고 0.45 μm 실린지 필터를 사용하여 여과한 후 미립자에 봉입되지 않은 젬시타빈 양을 측정하였다. 남아있는 5 mL의 용액에 1 mL의 DCM을 첨가하여 PLLA를 완전히 용해시키고, 두 용매를 섞어 준 (vortex) 후, 37.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 온도의 incubator에서 20분간 교반하여 미립자에 봉입된 젬시타빈을 PBST 용액상으로 추출한 후 4500 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 DCM과 PBST 용액층을 분리하였다. 상등액인 PBST 용액을 채취해 0.45 μm 실린지 필터를 사용하여 여과한 후 제조된 미립자내에 봉입된 젬시타빈의 양을 측정하였다.

젬시타빈의 양은 고성능 액체크로마토그래피 (high-performance liquid chromatography, HPLC, 600 Series, 717 Autosampler, Waters, USA)를 이용하여 분석하였으며, 컬럼으

로는 ODS Hypersil (5 μm , 4.6 $\times$ 150 mm, Thermo Electron, USA)을 사용하였다. 이동상으로는 50 mM 농도의 pH 5.0 sodium acetate 완충용액과 MeOH을 91 : 9 (v/v)로 혼합하였으며, 1 mL/min의 유속으로 270 nm의 파장에서 자외선 검출기를 사용하여 젬시타빈의 양을 미리 작성된 검량곡선을 이용해 분석하였다.

ASES 공정에서 얻어진 미립자 중의 봉입된 약물의 양을 약물봉입률 (drug loading)로 정의하였으며, 제조된 미립자 중 고분자 내에 봉입되지 않은 약물의 양과 봉입된 약물의 양을 상대적으로 분석하기 위하여 봉입효율 (entrapment efficiency)을 다음과 같이 정의하였다.

$$\text{약물봉입률 (\%)} = \frac{\text{고분자 내에 봉입된 약물의 총량}}{\text{제조된 미립자의 총량}} \times 100$$

$$\text{봉입효율 (\%)} = \frac{\text{고분자 내에 봉입된 약물의 총량}}{\text{제조된 미립자 중의 약물의 총량}} \times 100$$

2.5. 약물 방출 시험

제조된 미립자 10 mg을 칭량하여 0.01 M 농도의 PBST용액 (pH 7.4) 10 mL에 분산시킨 후 이 용액을 37.0 $\pm$ 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 의 일정 온도에서 rotator (AG, FINEPCR, Korea)를 사용하여 30 rpm의 속도로 *in vitro* 방출 실험을 수행하였다. 임의의 시간 간격으로 실험을 수행하여 초기방출 상황을 확인하였으며, 방출된 약물의 양을 측정하였다. 일정 기간 동안 방출된 약물의 양을 측정하기 위해 약물이 방출된 용액 5 mL를 채취하여 분석하였으며, 동량의 PBST 용액을 추가로 첨가하여 동일한 조건을 유지하며 방출 시험을 계속하였다. 채취한 용액 중의 약물함량을 분석하기 위해 앞에서 언급한 방법으로 HPLC를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 온도와 압력의 영향

ASES 공정에서는 온도와 압력에 따라 초임계 이산화탄소의 물성이 바뀌기 때문에 온도와 압력의 변화가 미립자의 형태 및 약물 함량과 봉입효율에 미치는 영향을 고찰하기 위한 실험을 수행하였다. 온도와 압력의 영향을 분석하기 위하여 온도와 압력을 각각 35-65 $^{\circ}\text{C}$, 130-250 bar의 범위에서 변화시켜 실험을 수행하였다.

PLLA를 2.0% (w/v)의 농도로 DCM에 용해시킨 용액과 고분자 대비 30 wt.%의 젬시타빈을 DMSO에 용해시킨 용액을 동일 부피로 혼합한 후 주사형 고압정량 펌프를 이용하여 침전기 내부로 분사하여 미립자를 제조하고 이를 회수하여 온도와 압력의 변화에 따라 제조된 미립자의 크기와 형태 및 봉입효율을 확인하였다.

200 bar의 압력에서 온도의 변화가 약물이 봉입된 미립자의 형태에 미치는 영향을 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰하여 Fig. 2에 나타내었다. 그림에서 알 수 있듯이 온도가 증가함에 따라 입자 크기와 기공이 증가한다는 사실을 확인하

었다 [17]. 봉입효율의 경우 온도가 증가함에 따라 증가하다가 다시 감소하는 것을 확인하였으며, 이를 정리하여 Table 1에 나타내었다. 55°C 실험온도에서 봉입효율이 37%로 가장 높은 값을 나타내었으며, 이는 일정 압력에서 온도가 증가함에 따라 액적 내 고분자와 약물의 과포화가 더 빠르게 유도되어 고분자의 고형화 속도가 현저히 증가하고 이로 인해 더 많은 약물이 봉입되기 때문인 것으로 추정된다. 다시 말해, 일정 압력조건에 상대적으로 낮은 온도보다는 높은 온도에서 초임계 이산화탄소의 확산속도가 더 높아 액적내 용질의 과포화가 더 빠른 속도로 유도되기 때문이다.

Fig. 2. SEM micrographs of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 200 bar and different temperatures: (a) 35°C, (b) 45°C, (c) 55°C, and (d) 65°C.

약물을 고분자 내에 효율적으로 봉입하기 위해서는 약물과 고분자의 재결정화 속도가 유사해야 한다. 낮은 온도에서는 과포화가 유도되는 속도가 감소하기 때문에 약물과 고분자가 독립적으로 입자를 형성할 확률이 증가하여 약물의 봉입효율이 감소하는 것으로 추정된다 [18-19]. 또한, ASES 공정에 사용된 PLLA 고분자는 60-65°C의 온도범위에서 유리전이온도 (glass transition temperature, T_g)를 갖는 준결정성 (semicrystalline) 물질로서 PLLA 내부로 가스제 역할을 하는 초임계 이산화탄소가 침투하면 T_g 가 감소하게 되어 온도가 높아질수록 제조된 입자의 크기 및 형태가 불규칙하게 된다. 입자 크기가 커지는 것은 일정 압력에서 온도가 증가함에 따라 T_g 에 가까워져 침전기내에서 형성된 고분자 미립자가 초임계 이산화탄소와 용매에 의해 가소화되어 서로 뭉치기 때문이다. 한편, 65°C에서 봉입효율이 감소하는 이유는 입자의 기공 크기가 증가하여 약물이 봉입되었다고 하더라도 봉입된 약물의 양을 측정할 때 약물이 기공을 통해 빠져 나오는 것 때문인 것으로 생각되어 진다.

동일 온도조건 (55°C)에서 압력의 변화가 제조된 미립자의 크기와 형태에 미치는 영향을 Fig. 3에 제시하였다. SEM 관찰 결과에서 알 수 있듯이 미립자 크기나 형태는 온도에 더 큰 영향을 받으며, 일정 온도에서는 압력 변화에 따른 미립자의 크기와 형태 차이가 거의 없는 것으로 확인되었다. 반면, 봉입효율은 압력이 증가함에 따라 약간 증가하는 것을 확인

하였다. 이는 압력이 증가함에 따라 초임계 이산화탄소의 밀도가 증가하면서 침전기내에 분사되는 액적으로 침투되는 초임계 이산화탄소가 많아져 분사된 용액의 액적이 더 빠른 과포화가 유도되기 때문이며, 이로 인해 약물의 봉입효율은 증가하게 된다.

Fig. 3. SEM micrographs of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and different pressures: (a) 130 bar, (b) 150 bar, (c) 200 bar, and (d) 250 bar.

온도와 압력의 변화에 따라 미립자의 크기와 형태 및 봉입효율이 달라지는 이유는 ASES 공정에서 미립자가 형성되는 과정에서 찾을 수 있다. ASES 공정에서 분사된 액적은 두 가지 메커니즘에 의해서 과포화상태에 도달하여 미립자가 형성된다. 하나는 액적 내 포함되어 있는 유기 용매가 초임계 이산화탄소 내로 증발하면서 과포화되어 입자를 형성하는 것이다. 유기 용매의 빠른 증발은 액적의 빠른 과포화를 유도해 결과적으로 고분자의 고형화 속도가 증가하여 봉입된 약물의 양이 증가하는 것으로 보인다. 다른 하나는 액적 내로 주위의 초임계 이산화탄소가 침투해 들어가면서 용매가 팽창하여 용질에 대한 용해도가 감소하면서 과포화가 유도되는 것이다. 따라서 압력이 높아지면 초임계 이산화탄소의 밀도가 높아져 액적으로 침투하는 양이 증가하여 빠른 속도로 과포화가 유도되는 것이다. 온도와 압력의 변화에 따라 위의 두 가지 메커니즘이 상호적으로 작용한다. 낮은 온도에서는 압력의 영향이 더 크게 나타나고, 높은 온도에서는 압력의 영향이 감소하게 된다. 따라서 앞에서 언급한 온도와 압력의 변화에 따른 실험 결과는 이 두 메커니즘의 상호작용에 의한 것으로 설명할 수 있다 [19-20].

3.2. 이산화탄소 유량의 영향

ASES 공정에서 이산화탄소 유량은 미립자를 형성하는데 있어 분사된 액적의 과포화를 유도하는 속도에 영향을 줄 수 있기 때문에, 이산화탄소 유량의 영향을 고찰하고자 앞의 실험에서 봉입효율이 가장 높게 얻어진 55°C와 200 bar의 조건에서 실험을 수행하였다. 이산화탄소 유량을 5, 7, 10, 15, 20, 25 L/min (표준상태)으로 변화시키면서 그에 따른 영향을 관찰하여 Fig. 4와 Table 1에 나타내었다.

Fig. 4에 나타난 바와 같이 5 L/min의 이산화탄소 유량에서는 불규칙하고 덩어리진 입자가 제조되었다. 10 L/min 이상의 유량에서 제조된 미립자는 구형에 가까운 형태로 크기는 SEM 사진으로 볼 때 1-4 μm 정도로 큰 차이가 없었으며, 이산화탄소 유량이 증가할수록 덜 뭉치는 것으로 관찰되었다. 이는 ASES 공정에서 이산화탄소 주입 유량이 감소하면 초임계 이산화탄소와 용매가 침전기 내에서 머무는 체류시간이 길어져 용매의 농도가 상대적으로 증가하기 때문이다. 침전기내 용매의 농도가 증가하면 고분자와 약물의 미립자가 형성되는데 방해받게 되며, 고형화 속도도 느려진다. 또한 미립자가 형성된 후에도 상대적으로 높은 용매의 농도 때문에 미립자가 서로 달라붙거나 봉입된 약물도 다시 빠져나올 수 있다. 반면 이산화탄소 유량이 증가하면 초임계 이산화탄소와 용매가 침전기 내에 머무는 체류시간이 짧아지고 이산화탄소의 상대적인 양이 많아져 제조된 미립자가 서로 뭉치는 정도가 감소하게 된다.

Table 1에 나타난 것처럼 봉입효율은 이산화탄소 유량이 증가함에 따라 점차로 증가하다가 15 L/min 이후에서는 약 50%로 유지되는 것으로 확인되었다. 이산화탄소 유량이 증가할수록 봉입효율이 증가하는 것은 이산화탄소 유량이 증가하면 침전기 내 이산화탄소의 농도가 증가하여, 결과적으로 액적 내로 확산되는 순수한 이산화탄소의 양이 증가하기 때문에 액적의 더 빠른 과포화를 유도하기 때문으로 생각된다. 따라서 ASES 공정에서 이산화탄소 유량은 제조된 입자가 용매에 의해 부분적으로 용해되거나 가소화 되지 않을 정도의 유량이 필요한 것으로 판단된다.

Fig. 4. Effect of CO₂ flow rate on the size and morphology of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55 °C and 200 bar: (a) 5 L/min, (b) 7 L/min, (c) 10 L/min, (d) 15 L/min, (e) 20 L/min, and (f) 25 L/min.

Table 1. Entrapment efficiency and drug loading of various gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared under different process conditions

Exp. no.	T (°C)	P (bar)	CO ₂ flow rate (L/min)	Solution flow rate (mL/min)	Solution concentration (mg/mL)	Feed ratio (drug/polymer)	Entrapment Efficiency (%)	Drug loading (%)	
gem 1	35	200	10	0.5	13	30	19 ± 3.21	4.2 ± 0.73	
gem 2	45						29 ± 5.49	6.5 ± 1.12	
gem 3	55						37 ± 2.71	8.3 ± 0.42	
gem 4	65						30 ± 1.56	6.7 ± 0.22	
gem 5		130					34 ± 0.69	7.7 ± 0.34	
gem 6		150					34 ± 1.87	7.8 ± 0.77	
gem 7		250					37 ± 4.79	8.5 ± 1.08	
gem 8			5					6 ± 1.13	1.3 ± 0.21
gem 9			7					27 ± 1.82	6.1 ± 0.09
gem 10			15					49 ± 1.44	11.0 ± 0.46
gem 11			20					53 ± 1.20	11.3 ± 0.79
gem 12			25					50 ± 6.11	11.3 ± 0.79
gem 13	55	200		0.1		32 ± 1.38	7.3 ± 0.22		
gem 14				0.3		32 ± 0.77	7.3 ± 0.18		
gem 15				0.7		39 ± 0.27	8.7 ± 0.23		
gem 16				1.0		28 ± 0.73	6.4 ± 0.15		
gem 17			20		6.5	37 ± 1.97	8.7 ± 0.76		
gem 18					26	34 ± 2.53	7.6 ± 0.36		
gem 19				0.5	39	20 ± 1.41	4.6 ± 0.42		
gem 20						20	53 ± 0.04	8.5 ± 0.07	
gem 21					13	10	71 ± 2.44	6.4 ± 0.28	

3.3. 용액 유량의 영향

용액이 노즐을 통해 침전기내로 분사될 때, 용액 유량이 약 물 봉입 미립자의 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 선행 실험에서 봉입효율이 가장 높게 나온 55°C와 200 bar로 온도와 압력을 고정하고 20 L/min의 일정한 이산화탄소 유량하에서 미립자 제조 실험을 수행하였다. 용액 주입 유량을 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0 mL/min으로 변화시켜 실험을 수행하였으며, 제조된 미립자의 특성을 분석하여 Fig. 5와 Table 1에 나타내었다. Fig. 5에 나타낸 바와 같이 용액 유량이 느릴 때 미립자의 크기와 형상이 상대적으로 작고 구형에 가까워지는 것이 관찰되었다.

초임계 공정에서 용액이 침전기 안에 분사될 때 침전기 내부 압력과 용액 유량에 따라 분사되는 형태가 달라진다 [21-22]. 따라서 본 실험에서는 침전기의 내부 압력을 일정하게 고정하고 용액 유량을 변화시켜 분사형태에 대한 영향을 확인하고자 하였다. 용액 유량에 따라 분사될 때 노즐 끝에서 액적이 형성되는 (jet breakup) 지점까지의 길이가 변하게 되며, 이것은 미립자의 크기와 형태가 변하는 이유 중의 하나이다.

Fig. 5. SEM micrographs of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and 200 bar using different solution flow rates: (a) 0.1 mL/min, (b) 0.3 mL/min, (c) 0.5 mL/min, (d) 0.7 mL/min, and (e) 1.0 mL/min.

동일 압력에서 용액 유량이 증가하면 jet breakup의 길이가 증가하기 때문에 이 경우 jet breakup 내에서 입자 생성이 일어날 수 있으며 분사된 용액의 미세 액적의 양이 증가하기 때문에 액적 주위의 초임계 이산화탄소와 충분한 물질전달이 이루어지지 않는다. 결과적으로 침전기 내에서 생성된 미립자가 초임계 이산화탄소에 의해 충분히 건조되지 못하기 때

문에 약물 봉입률이 상대적으로 감소하며 입자들이 서로 묻치는 경향을 나타내 넓은 범위의 입자분포를 갖게 된다. 즉, 미세 액적의 형성을 통한 미립자 형성이 아니기 때문에 형태가 불규칙하고, 비교적 느린 고형화로 인해 낮은 봉입효율을 가진다. 또한 용액 유량이 너무 느린 경우에는 노즐을 통해 용액이 분사되지 않기 때문에 불규칙적이고 매우 큰 덩어리인 입자들이 형성된다.

본 실험에서 설정한 모든 용액 유량에서 구형의 입자가 형성되었으며, 이는 본 실험에서 설정한 침전기 내부의 압력이 높아 용액 유량이 느리더라도 용액의 분사가 이루어졌기 때문이다. 본 실험에서 용액 유량을 0.5 mL/min로 선정할 경우 봉입효율이 가장 좋은 결과가 얻어졌으나, 온도와 압력이 달라지면 침전기 내부의 초임계 이산화탄소의 밀도가 달라지기 때문에 분사된 미세 액적과 주위의 초임계 이산화탄소와의 물질전달 속도에 영향을 미쳐 미립자 특성이 변하게 된다. 따라서 온도와 압력 조건이 변하게 되면 이에 상응하는 최적 유량 조건을 선정하여야 한다.

3.4. 용액 농도의 영향

용액 농도가 제조된 미립자의 특성에 미치는 영향을 확인하기 위해 55°C와 200 bar로 온도와 압력을 고정하고 20 L/min의 일정한 이산화탄소 유량하에서 용액 농도를 6.5, 13, 26, 39 mg/mL로 변화시켜 실험을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 6과 Table 1에 나타내었다. 용액 농도를 변화시켜 제조한 미립자의 경우 SEM 사진으로 볼 때 형태에는 큰 차이가 없었다. 봉입효율은 증가하다가 감소하는 경향을 보였으며, 용액의 농도가 13 mg/mL일 때 봉입효율은 53%로 최대치를 나타내었다.

Fig. 6. Effect of solution concentration on the size and morphology of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and 200 bar: (a) 6.5 mg/mL, (b) 13 mg/mL, (c) 26 mg/mL, and (d) 39 mg/mL.

용액의 농도가 낮으면 분사된 액적에는 상대적으로 포함된 용질의 양이 적기 때문에 초임계 이산화탄소에 의해 용질이 과포화에 이르는데 상대적으로 더 많은 시간이 필요하다.

반면에 용액의 농도가 높으면 분사된 액적에 포함된 용질의 상대적인 양이 많기 때문에 초임계 이산화탄소에 의해 더 빠른 과포화가 유도되며, 결과적으로 고분자의 고형화가 더 빨리 일어나기 때문에 봉입효율은 증가하게 된다. 용액의 농도가 13 mg/mL일 때 봉입효율이 가장 높게 측정되었으며, 이는 용액의 농도가 지나치게 높은 경우 과포화되는 속도가 너무 빨라 고분자와 약물이 독립적으로 미립자를 형성하였기 때문이다 [8]. 결론적으로 용액의 농도와 이산화탄소 주입 유량에 따라 고분자와 약물 입자의 고형화 속도가 달라지게 되며, 주어진 조건에서 이 두 공정 변수를 조절해 고분자와 약물 입자의 고형화 속도의 차이를 줄일수록 높은 봉입 효율을 얻을 수 있을 것으로 판단된다 [23].

3.5. 약물/고분자 투입비의 영향

약물이 봉입된 미립자 제조에 있어서 약물과 고분자의 투입 비율은 미립자의 크기 및 방출 특성에 영향을 미칠 수 있기 때문에 다양한 약물/고분자 시스템에 대해 초임계 유체 입자 제조공정에서 약물/고분자 투입비가 미립자의 형성과 특성에 미치는 영향에 대한 연구가 최근까지 꾸준히 진행되어 왔다 [8]. 본 연구에서는 젬스타빈을 DMSO에 용해시켜 0.2, 0.4, 0.6% (w/v)의 농도로 제조한 용액과 평균분자량이 40,000-70,000 Da인 PLLA를 2.0% (w/v)의 농도로 용해시킨 DCM 용액을 동일 부피로 혼합하여 앞에서 언급한 ASES 공정 조건하에서 미립자를 제조하여 약물/고분자 투입비의 변화가 약물의 봉입효율에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 7. Effect of drug/polymer feed ratio on the size and morphology of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and 200 bar: (a) 10 wt.%, (b) 20 wt.%, and (c) 30 wt.%.

Table 1에 나타난 바와 같이 약물/고분자의 투입비가 증가함에 따라 봉입된 약물의 양은 증가한 반면 봉입효율은 감소하였다. 이는 약물의 양이 증가함에 따라 약물과 PLLA간의 상분리 속도가 빨라져서 입자가 형성되기 전에 상분리 되는 양이 현저히 증가하기 때문이다 [24]. 또한 Fig. 7의 SEM 사진으로부터 알 수 있듯이 본 실험에서 설정한 농도 범위에서

서는 약물/고분자의 투입비가 생성된 입자의 크기와 형태에 미치는 영향이 거의 없다는 사실을 확인하였다.

3.6. In vitro 약물 방출 특성

생분해성 속도가 느린 고분자에 봉입된 약물의 방출 특성은 고분자의 침식 (erosion)에 의한 것보다 약물의 확산에 의한 방출이 더 기대된다. 약물의 방출이 약물의 확산에 의해 지배되는 경우에는 시간에 따른 약물 방출곡선이 포물선 형태를 나타내며, 고분자의 침식에 의한 경우에는 선형의 방출곡선을 보인다 [25-26].

이산화탄소 주입 유량이 각 7, 20 L/min일 경우 제조한 미립자와 고분자 대비 약물의 투입비가 각 10, 30%인 경우에서 제조한 미립자에 대하여 약물의 *in vitro* 방출 특성을 조사하여 Fig. 8과 Fig. 9에 나타내었다. Fig. 8에 나타낸 바와 같이 약물의 초기 방출은 거의 비슷한 경향을 보였으나 이후 방출패턴은 다소 상이하게 나타났다. 봉입효율이 약 27%인 경우 (7 L/min 유량)에는 24시간내에 약 90% 정도에 이를 정도로 매우 빠른 속도로 약물이 방출되었으며 이후에는 방출이 거의 되지 않았다. 반면에 봉입효율이 53%인 경우 (20 L/min 유량)에는 약 85%의 초기 방출을 보였으나 이후에는 느린 속도지만 약물이 방출되는 것으로 관찰되었다. 이는 봉입된 약물의 양이 더 많기 때문에 느리지만 지속적인 방출이 가능한 것으로 판단된다. 또한 초기 방출이 높게 나타난 것은 미봉입된 약물이 많기 때문이며, 친수성 약물인 젬스타빈과 소수성 고분자인 PLLA와의 친화력이 낮기 때문에 입자 표면에 봉입된 약물도 빠르게 방출된 것으로 판단되며, 입자 표면에 존재하는 기공도 높은 초기 약물 방출에 영향을 준 것으로 생각된다.

Fig. 8. Effect of CO₂ flow rate on the *in vitro* release profiles of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and 200 bar.

Fig. 9에 나타난 바와 같이 약물/고분자 투입비가 큰 경우에는 하루 동안 약 85% 이상으로 매우 빠른 속도로 약물이 방출되었으며 이후에는 매우 느리게 약물이 방출되었다. 이는 미립자 표면부근에 봉입된 약물의 절대량이 상대적으로 많기 때문에 농도 차에 의한 약물의 확산이 더 잘 진행되기

때문이다. 또한 약물이 단독으로 입자를 형성하여 미봉입된 상태로 존재하기 때문에 초기방출이 높은 것이다. 반면, 약물/고분자 투입비가 감소하면서 하루 동안 방출된 양이 75% 정도로 다소 감소하였다. 이는 약물/고분자 투입비가 높은 경우에 비해 입자 표면 쪽에 봉입된 약물의 절대량이 상대적으로 적으므로 약물의 확산이 느리게 진행되기 때문이다. 그러나 두 경우 모두 초기 방출 이후의 약물 방출특성은 유사한 경향을 나타내었다.

Fig. 9. Effect of drug/polymer feed ratio on the *in vitro* release profiles of gemcitabine-loaded PLLA microparticles prepared at 55°C and 200 bar.

4. 결론

본 연구에서는 초임계 ASES 공정을 이용하여 고형종양에 항암효과를 가지고 있으나, 혈장 내에서 매우 짧은 반감기로 인해 높은 투여량에 의한 부작용이 심각한 친수성 항암제인 젠시타빈을 생분해성 고분자인 PLLA에 봉입하는 실험을 수행하였다. 공정 조건의 변수에 따른 미립자의 크기와 형상 및 봉입효율을 고찰하여 초임계 유체 공정의 적용 가능성을 알아 보았다. 그 결과 제조된 미립자는 1-5 μm 크기의 구형 미립자를 얻을 수 있었으며, 공정 조건의 조작을 통해 봉입효율을 조절할 수 있었다. 그러나 제조된 미립자를 통한 약물의 방출 실험 결과 소수성과 낮은 생분해 속도를 가지는 PLLA 미립자의 경우 약물의 높은 초기 방출과 낮은 약물 방출 속도를 가짐을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과 초임계 ASES 공정을 통해 젠시타빈이 함유된 PLLA의 미립자를 효과적으로 제조할 수 있었으나 약물의 초기방출 감소와 약물의 방출 속도 개선을 위해서는 향후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

감사

본 연구는 차세대 성장 동력 바이오신약장기사업단의 연구

비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Feng, S. S. and S. Chien (2003) Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases. *Chem. Eng. Sci.* 58: 4087-4114.
- Park, J. H., M. Ye, and K. Park (2005) Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. *Molecules* 10: 146-161.
- Langer, R. (2006) Biomaterials for drug delivery and tissue engineering. *MRS Bull.* 31: 477-485.
- Jain, R. A. (2000) The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 21: 2475-2490.
- Ghaderi, R. (2000) A supercritical fluids extraction process for the production of drug loaded biodegradable microparticles. Ph. D. Dissertation, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Li, M., O. Rouaud, and D. Poncelet (2008) Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *Int. J. Pharm.* 363: 26-39.
- Kompella, U. B. and K. Koushik (2001) Preparation of drug delivery systems using supercritical fluid technology. *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Syst.* 18: 173-199.
- Yeo, S. D. and E. Kiran (2005) Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. *J. Supercrit. Fluids* 34: 287-308.
- Bahrami, M. and S. Ranjbarian (2007) Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids* 40: 263-283.
- Martin, A. and M. J. Cocero (2008) Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms. *Adv. Drug Del. Rev.* 60: 339-350.
- Mangeold, C. (2001) Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 28: 1-6.
- Locher, C., E. Fabre-Guillevin, F. Brunetti, J. Aurox, J. Charles Delchier, P. Piedbois, and L. Zelek (2008) Fixed-dose rate gemcitabine in elderly patients with advanced pancreatic cancer: An observational study. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68: 178-182.
- Fruscella, E., D. Gallo, G. Ferrandina, G. D'Agostino, and G. Scambia (2003) Gemcitabine: current role and future options in the treatment of ovarian cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 48: 81-88.
- Wirk, B. and E. Perez (2006) Role of gemcitabine in breast cancer management: An update. *Semin. Oncol.* 33: 6-14.
- Maase, H. V. D. (2001) Gemcitabine in advanced bladder cancer. *Semin. Oncol.* 28: 11-14.
- Umanzor, J., M. Aguiluz, C. Pineda, S. Andrade, M. Erazo, C. Flores, and S. Santillana (2006) Concurrent cisplatin/gemcitabine chemotherapy along with radiotherapy in locally advanced cervical carcinoma: A phase II trial. *Gynecol. Oncol.* 100: 70-75.
- Chen, A.-Z., X.-M. Pu, Y.-Q. Kang, L. Liao, Y.-D. Yao, and G.-F. Yin (2007) Study of poly (L-lactide) microparticles based on supercritical CO₂. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 18: 2339-2345.
- J. Jung and M. Perrut (2001) Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *J. Supercrit. Fluids* 20: 179-219.
- J. H. Kim, S. Y. Lee, B. Y. Kim, J. H. Ryu, and G. B. Lim (2003) Preparation of L-PLA microparticles using pure and cosolvent-

- modified supercritical carbon dioxide. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 18: 385-392.
20. Tu, L. S., F. Dehghani, and N. R. Foster (2002) Micronisation and microencapsulation of pharmaceuticals using a carbon dioxide antisolvent. *Powder Technol.* 126: 134-149.
21. Kim, M. Y., Y. W. Lee, H. S. Byun, and J. S. Lim (2006) Recrystallization of poly (L-lactic acid) into submicrometer particles in supercritical carbon dioxide. *Ind. Eng. Chem. Res.* 45: 3388-3392.
22. Song, K. H., C.-H. Lee, J. S. Lim, and Y.-W. Lee (2002) Preparation of L-PLA submicron particles by a continuous supercritical antisolvent precipitation process. *Korean J. Chem. Eng.* 19: 139-145.
23. Reverchon, E., G. Della Porta, and M. G. Falivene (2000) Process parameters and morphology in amoxicillin micro and submicro particles generation by supercritical antisolvent precipitation. *J. Supercrit. Fluids* 17: 239-248.
24. Taki, S., E. Badens, and G. Charbit (2001), Controlled release system formed by supercritical anti-solvent coprecipitation of a herbicide and a biodegradable polymer. *J. Supercrit. Fluids* 21: 61-70.
25. Ritger, P. L. and N. A. Peppas (1987) A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Contro. Rel.* 5: 37-42.
26. Kim, C.-J. (1999) Release kinetics of coated, donut-shaped tablets for water soluble drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 7: 237-242.