

초임계 이산화탄소를 이용한 5-FU 함유 생분해성 고분자 미세입자 제조

¹정 주 희 · ^{1,2}정 인 일 · ¹주 현 재 · ¹신 재 란 · † ¹임 교 빈 · † ¹유 종 훈
¹수원대학교 공과대학 화공생명공학과, ²연세대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2008. 9. 9., 게재승인 : 2008. 10. 22.)

Preparation of Biodegradable Polymer Microparticles Containing 5-FU Using Supercritical Carbon Dioxide

Ju-Hee Jung¹, In-Il Jung^{1,2}, Hyun-Jae Joo¹, Jae-Ran Shin¹, Gio-Bin Lim^{1†}, and Jong-Hoon Ryu^{1†}

¹Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do, Korea

²Department of Chemical Engineering, Yonsei University, Seoul, Korea

(Received : 2008. 9. 9., Accepted : 2008. 10. 22.)

To obtain maximal efficacy with minimal systemic side-effects, many studies have been carried out to achieve the controlled release of 5-fluorouracil (5-FU). In this study, biodegradable poly(L-lactide) (L-PLA) microparticles containing 5-FU were prepared by a process, called aerosol solvent extraction system (ASES), utilizing supercritical carbon dioxide. The effects of various organic solvents, drug/polymer feeding ratio, polymer molecular weight, and blending with the same polymers with different molecular weights on the formation of 5-FU loaded microparticles were investigated under a predetermined operating condition from our previous study. The drug recovery, entrapment efficiency, and in vitro drug release kinetics were determined by HPLC assays. The drug recovery obtained from the ASES process was found to be very high, whereas the drug entrapment efficiency was considerably low in all the experiments due to the poor affinity between L-PLA and 5-FU. These results indicated that the precipitation rate of L-PLA might be quite different from that of 5-FU so that there was little chance to form 5-FU loaded L-PLA microparticles.

Key Words : 5-fluorouracil, poly(L-lactide), supercritical carbon dioxide, microparticle

서 론

암의 화학요법 (chemotherapy)에 사용되는 대부분의 약물은 비정상적으로 증식하며 세포사멸 (apoptosis) 신호에 대해 강한 저항성을 갖는 암세포의 성장을 억제하기 위해 강한 세포 독성을 가지며 이로 인해 심각한 부작용을 유발하게 된다(1). 항암제의 효능과 생체이용률을 향상시키는 동시에 독성에 의한 부작용과 투약빈도를 최소화할 수 있는 대표적인 방법으로는 항암제를 생분해성 고분자 (biodegradable polymer) 내에 봉입 (entrapment)하여 원하는 형태와 크기를 갖는 미세 또는 나노입자로 제조하여 특정 시간 동안 원하는 속도로 약물을 방출시키는 방법을 들 수 있다(1-4).

고분자 미립자 약물전달시스템 (microparticulate drug delivery system)의 개발에 가장 널리 이용되고 있는 생분해성 합성 고분자로는 poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ϵ -caprolactone), polyanhydride, poly(ortho ester) 등을 들 수 있으며(3), 현재에도 이들 고분자를 이용하여 새로운 약물전달시스템을 개발하기 위한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 PLA와 PLGA 같은 polyester 계통의 생분해성 고분자 미립자 제제의 경우 일반적인 형태의 제형에 비해 훨씬 오랫동안 체내에서 약물의 유효농도를 유지할 수 있으며, 투약이 용이하고, 생체 내에서 이물질 반응을 거의 일으키지 않을 뿐만 아니라, 일정한 기능을 다한 후에는 신진대사를 통해 이산화탄소와 물로서 분해되어 체외로 배출되는 등 여러 가지 장점을 갖기 때문에 많은 연구자들에 의해 중점적으로 연구되고 있다(5, 6).

항암제가 봉입된 미립자 형태 약물전달체의 제조방법으로는 용융법, 에멀전법, 상분리법, 용매 증발 및 추출법, 분무건조법 등이 있으나(6-7), 이들 방법의 경우 과량의 에너지 소비, 다량의 유기용매 및 폐수 배출로 인한 환경오염, 낮은 수율,

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biochemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do, Korea

Tel : +82-31-220-2599, +82-31-220-2243

Fax : +82-31-220-2528

E-mail : jhryu@suwon.ac.kr, gblim@suwon.ac.kr

고비용, 열민감성 약물의 효능 저하, 펩타이드/단백질 약물의 변성, 약물 내 유기용매의 잔존 등 많은 문제점을 안고 있다. 따라서 이와 같은 여러 문제점을 해결할 수 있는 대체기술로서 현재 선진국을 중심으로 초임계 유체 (supercritical fluid) 공정을 이용한 미세 및 나노 입자의 설계 및 제조기술에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

초임계 유체란 어떤 물질의 임계점 (critical point) 이상의 온도와 압력 조건에서 존재하는 유체로서 액체와 기체의 중간적 성질을 보이며, 미세 및 나노입자의 제조에 매우 적합한 열역학적 특성 (높은 용해도, 선택도, 압축성, 감압에 따른 자발적 분리성)과 이동특성 (낮은 표면장력과 점도, 높은 확산계수)을 갖고 있다(7-12). 특히 초임계 이산화탄소의 경우 비교적 낮은 임계압력 (73.8 bar)과 상온 근처의 임계온도 (31°C)를 가지며, 압력 또는 온도를 좁은 범위 내에서 변화시킴으로써 용해도, 확산도 등의 성질을 쉽게 조절할 수 있으며, 인체에 무해하고, 가격이 저렴할 뿐만 아니라 폭발성 및 발화성이 없으며, 감압에 의해 쉽게 회수할 수 있기 때문에 최근 미세 또는 나노입자의 제조공정에서 가장 주목받고 있다(7-12).

초임계 유체를 이용한 약물전달체 미립자 제조방법은 초임계 유체를 유화중합의 반응매체로 사용하는 중합법과 초임계 유체를 고분자 및 약물의 용매 또는 역용매 (antisolvent)로 사용하여 압력, 온도를 조절하여 용질의 용해도를 제어함으로써 고분자, 약물 및 이들의 혼합물을 침전 또는 재결정시켜 입자를 제조하는 방법으로 대별할 수 있다(8-12). 초임계 유체를 대상 용질에 대한 역용매로 사용하여 입자를 제조하는 대표적인 방법으로는 aerosol solvent extraction system (ASES) 공정을 들 수 있으며, 이 공정에서는 약물과 고분자가 녹아있는 용액이 미세 노즐을 통하여 초임계 유체 내로 미세액적 (droplet)의 형태로 분사된 후, 액적 내의 용매는 매우 빠른 속도로 초임계 유체 상으로 증발되고, 이와 동시에 초임계 유체는 액적 내부로 확산되어 액적을 팽창시켜 액적 중 용매의 약물 및 고분자에 대한 용해도가 급격히 감소하여 매우 빠른 속도로 비교적 균일한 입자형태의 약물전달체가 생성되게 된다(8-12).

5-플루오로우라실 (5-fluorouracil 또는 5-FU)은 피리미딘 (pyrimidine) 유사물질 (analog)로서 결장, 직장, 폐, 췌장, 유방, 위장관 등 여러 장기의 고형암 치료에 사용되는 항암물질이며, 특히 결장직장암과 췌장암의 화학요법에서 오랫동안 사용되어 왔다(13, 14). 5-FU는 세포내 대사에 의해 일차로 5-fluorouridine monophosphate (5-FUMP)로 전환되며 5-FUMP는 정상적인 RNA의 합성을 방해하여 암세포의 증식을 억제하는 작용을 하게 된다. 5-FUMP는 다시 5-fluorodeoxyuridine monophosphate (5-FdUMP)로 전환되어 DNA 복제에 필요한 nucleotide인 티미딘 (thymidine)의 합성효소 thymidylate synthase의 작용을 방해함으로써 빠른 속도로 증식하는 암세포의 DNA 합성을 저해하는 작용을 한다(13, 14). 5-FU는 일반적으로 정맥주사로 12시간 동안 일주일에 10~15 mg/kg 정도 투여하는데, 장기간 투여할 경우 심각한 골수억제작용, 구역질, 구토, 설사, 구내염을 포함한 급성 위장장애 등의 부작용을 유발할 수 있으며, 10~20분의 짧은 반감기로 인한 낮은 생체이용률, 이로 인한 과다한 투약 빈도 등의 문제를 보이고 있다. 이러한 약물의 부작용을 감소시키고 환자의 편의성 증대를 위해 생분해성 고분자에 5-FU를 봉입하여 5-FU의 생체이용률을 향상시키고 장시간 동안 유효

농도범위의 약물을 방출할 수 있는 제형의 개발을 위한 많은 연구가 진행되고 있다(15-18).

본 연구에서는 5-FU의 서방형 미립자 약물전달체 제조를 위하여 생분해성 고분자로 poly(L-lactide) (L-PLA)를 택하여 실험을 수행하였으며, 기존의 미립자 약물전달체 제조 공정의 문제점을 상당 부분 개선시킬 수 있는 대체 공정으로 최근 많이 연구되고 있는 초임계 유체 기술의 하나인 ASES 공정을 사용하였다. 초임계 ASES 공정에서 L-PLA의 분자량, 분자량이 다른 L-PLA와의 블렌딩, 용매, 약물의 투입량 등의 변수가 미립자 약물전달체의 형성과 약물의 봉입 및 방출에 미치는 영향을 고찰하여 초임계 유체 공정의 적용 가능성 여부를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용된 대상약물인 5-fluorouracil (5-FU) (Sigma, USA)은 구입 후 추가 정제 과정 없이 사용하였으며, 5-FU를 봉입하기 위한 생분해성 고분자로는 무게평균 분자량 2,000, 50,000 및 150,000 Da의 poly(L-lactide) (L-PLA) (Polysciences, USA)를 사용하였다. 초임계 유체로는 99.9% 순도의 이산화탄소 (동민특수가스, 대한민국)를 사용하였으며, 이외의 모든 시약은 HPLC급으로 구입하여 더 이상의 정제 과정 없이 사용하였다.

미세입자 제조

약물이 봉입된 고분자 미세입자의 제조에 사용된 초임계 ASES (aerosol solvent extraction system) 공정의 실험 장치는 자체적으로 설계 제작된 것으로 장치의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. 본 연구에서 사용된 ASES 장치는 이산화탄소 공급펌프, 용액의 주입과 분사를 위한 고압 정량펌프와 노즐, 입자 형성이 일어나는 고압 침전기, 용매 회수부 등으로 대별할 수 있다.

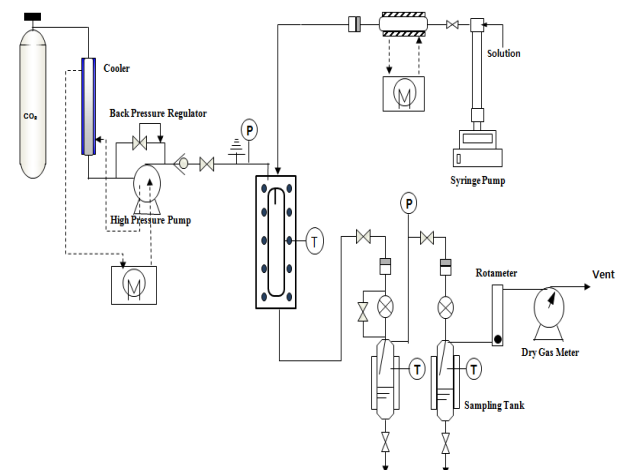


Figure 1. Schematic diagram of the ASES apparatus used in this study.

액체 상태의 이산화탄소는 후방압력조절기 (back-pressure regulator, 26-1700, Tescom, USA)에 의해 일정한 압력으로 조절되어 액체 고압펌프 (Lewa, EL-1, Germany)에 의해 고압 침전기의 상단으로 연속적으로 공급되었으며, 일정 몰비의 5-FU

와 L-PLA를 dichloromethane과 methanol의 혼합용매에 완전히 용해시킨 용액을 주사형 고압정량펌프 (syringe pump, 100DX, ISCO, USA)를 통해 칩전기의 상단에 장착된 내경 127 μm 의 노즐로 공급하여 칩전기 내부의 초입계 이산화탄소상으로 연속적으로 분사하였다. 노즐을 통해 분사된 혼합용액의 미세액적은 액적내의 유기용매와 액적 주변의 초입계 이산화탄소간의 물질전달에 의해 빠른 속도로 과포화 되어 미세입자를 형성하였다. 초입계 이산화탄소상에서 형성된 미세 입자는 칩전기 하단에 장착된 0.5 μm 공극의 금속 필터 (Supelco, USA) 위에 수집되었다. 본 ASES 공정에서 사용된 유기 용매의 경우 칩전기 이후에 장착된 용매 회수부에서 이산화탄소의 감압에 의해 자발적으로 분리와 회수가 이루어지도록 하였다. 특별히 언급된 경우를 제외하고는 모든 실험은 선행 연구(12)를 통해 선정된 35°C의 온도와 13 MPa의 압력 조건에서 용액 유량과 이산화탄소 유량을 각각 0.5 mL/min와 20 L/min (표준상태)로 고정된 후 수행하였다.

입자 형태 및 크기 측정

제조된 미세입자를 소량 채취하여 carbon disk에 부착시킨 후 주사전자현미경 (scanning electron microscope (SEM), JSM 5600, JEOL, Japan)을 사용하여 미세입자의 형태와 크기를 관찰하였다.

미세입자 내 5-FU 봉입률 측정

제조된 미세입자 10 mg을 측정하여 0.01 M 농도의 Tween 20 계면활성제가 첨가된 pH 7.4의 인산완충용액 (phosphate buffer solution with Tween 20, PBST) 5 mL에 넣고 초음파로 30초 동안 처리하여 완전히 분산시킨 후 4000 rpm의 속도로 5분 동안 원심분리하여 형성된 상등액을 채취하여 L-PLA내에 봉입되지 않은 5-FU의 양을 측정하였다. 미봉입 5-FU를 제거한 칩전된 미세입자에 dichloromethane 2 mL를 넣어 L-PLA를 용해시키고, 이 용액에 PBST 10 mL를 첨가하여 5분 동안 vortex mixer로 혼합한 다음 30분간 incubator에서 충분히 교반하여 고분자에 봉입된 5-FU를 PBST 용액상으로 추출한 후 원심분리하여 dichloromethane와 PBST 층을 분리하였다. 상등액인 PBST 용액을 0.45 μm 멤브레인 필터 (Waters, USA)를 이용하여 여과한 후 L-PLA 고분자 미세입자에 봉입된 5-FU의 양을 측정하였다.

고분자에 봉입 또는 미봉입된 5-FU의 함량은 HPLC (600 Series, 717 Autosampler, Waters, USA)를 이용하여 분석하였으며, 분석에 사용된 칼럼으로는 ODS Hypersil (5 μm , 4.6 \times 150 mm, Thermo Electron, USA)을 사용하였다. 이동상으로는 0.01 M 농도의 pH 4.7 sodium acetate 완충용액을 1.0 mL/min의 유속으로 사용하였으며, 266 nm의 파장에서 자외선 검출기를 사용하여 5-FU의 함량을 미리 작성된 검량곡선을 이용하여 분석하였다.

ASES 공정에서 초입계유체/용매의 혼합 유체상에 녹아 소실되었거나 칩전기 표면에 묻어 칩전기 하단에 장착된 금속필터 상에 회수되지 않은 약물의 양을 나타내기 위하여 약물 회수율 (drug recovery)을 아래와 같이 정의하여 사용하였으며, 제조된 미세입자 중 고분자 내에 봉입된 약물의 상대적인 양을 분석하기 위하여 약물의 봉입효율 (entrapment efficiency)을 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{약물회수율 (\%)} = \frac{\text{제조된 미세입자중의 약물의 양}}{\text{미세입자 제조에 사용된 약물의 총량}} \times 100$$

$$\text{봉입효율 (\%)} = \frac{\text{고분자에 봉입된 약물의 양}}{\text{제조된 미세입자 중의 약물의 양}} \times 100$$

약물 방출 시험

초입계 ASES 공정으로 제조된 미세입자 20 mg을 측정하여 0.01 M 농도의 PBST용액 (pH 7.4) 10 mL에 분산시킨 후 이 용액을 37.0 \pm 0.5°C의 일정 온도로 유지되는 shaking incubator (SI-300R, Jeio Tech, Korea)에 넣고 100 stroke/min 조건으로 *in vitro* 방출 시험을 수행하였다. 이 때 초입계 공정으로 제조된 미세입자, 다시 말해 미봉입 5-FU가 포함된 미세 입자를 그대로 이용하여 방출 시험을 실행하였다. 일정한 시간 간격으로 하루 동안 방출 시험을 수행하여 초기방출 상황을 확인하였으며, 총 7일 동안 방출된 약물의 함량을 측정하였다. 일정 시간 동안 방출된 약물의 양을 측정하기 위해 약물이 방출된 용액 8 mL를 취하여 분석하였으며, 동량의 PBST를 추가로 첨가하여 동일한 조건을 유지하며 방출 시험을 계속하였다. 채취한 용액 중의 약물함량을 분석하기 위해 앞에서 언급한 방법으로 HPLC를 사용하였다.

결과 및 고찰

용매의 영향

초입계 유체를 역용매로 사용하는 공정의 경우 고분자와 대상 약물을 용해시키기 위해 사용된 용매의 특성에 따라 형성된 미세입자의 특성, 특히 약물 회수율 및 봉입효율에 큰 차이가 나타날 수 있다. 따라서 본 실험에서는 L-PLA의 용매로는 극성이 비교적 작은 dichloromethane (DCM)을 선정하고, 5-FU의 용매로는 양성자성 (protic) 극성 용매인 MeOH를 사용하였으며, 추가로 고분자와 약물의 단일용매로 비양성자성 (aprotic) 극성 용매인 *N,N*-dimethylformamide (DMF)를 선정하여 용매 특성의 영향을 고찰하였다. 평균분자량이 50,000인 L-PLA 200 mg과 5-FU 80 mg을 20 mL의 DMF, DMF(23%)/DCM(77%) 및 DCM(50%)/MeOH(50%) 3종류의 단일 또는 혼합용매에 용해시킨 후 앞에서 언급한 ASES공정 조건하에서 용매에 따른 약물의 회수율과 봉입효율의 변화를 관찰하였다.

Fig. 2에 나타난 것처럼 약물의 봉입효율은 5% 이하로 상당히 낮은 결과가 얻어졌다. 이것은 ASES 공정에 의해 생성된 5-FU의 대부분이 고분자 표면에 존재하거나 단독으로 결정화되어 L-PLA 내에 봉입된 약물이 매우 적음을 의미한다. 이와 같은 현상은 약물과 약물을 봉입하고자 하는 고분자간의 친화력이 매우 낮아 서로 상분리된 후 재결정화 되는 경우 일반적으로 일어나는 현상으로 알려져 있다(8). 또한 약물이 고분자 내에 충분히 봉입되기 위해서는 약물과 고분자의 과포화 (supersaturation) 속도와 이로 인한 재결정화의 속도가 유사해야 하는데 본 연구에서 사용한 5-FU/L-PLA 시스템의 경우 L-PLA의 결정화가 매우 빠른 속도로 진행된 후 5-FU가 생성된 L-PLA 미세입자의 표면에서 상대적으로 느린 속도로 결정화 되거나 독립적으로 입자를 생성하기 때문에 실제로 고분자 내에 봉입된 약물의 양이 매우 작은 것으로 설명할 수 있다(8).

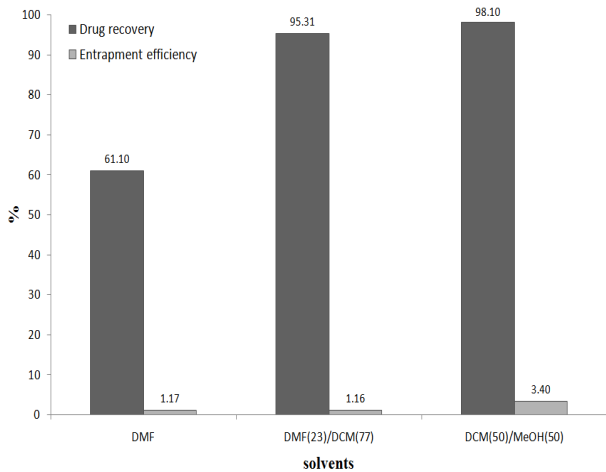


Figure 2. The effect of organic solvents on the drug recovery and entrapment efficiency.

단일용매인 DMF를 사용한 경우 약 60%의 낮은 약물회수율이 얻어졌으나, DCM/MeOH 혼합용매의 경우에는 98% 이상의 높은 회수율을 나타내었다. 용매의 5-FU에 대한 용해력이 역용매인 초임계 이산화탄소 (SCCO₂)에 의해 급속히 감소하여 높은 과포화도를 이룬 후 입자가 형성되는 것이 일반적이나, 용매가 초임계 상으로 팽창되는 속도가 늦거나 팽창된 후의 초임계 혼합용액이 입자 형성에 요구되는 충분한 과포화를 이루지 못하는 경우에는 상당량의 5-FU 분자들이 입자를 형성하지 못하고 고압 침전기 아래에 장착된 필터를 통하여 소실되어 낮은 약물 회수율을 나타내게 된다. 상온에서 5-FU의 각 용매에 대한 용해도는 DMF의 경우 28.50 mg/mL 이고, MeOH의 경우에는 7.69 mg/mL이며, DCM의 경우에는 5-FU가 거의 녹지 않는 것으로 알려져 있다(19). 또한 각 용매의 휘발성과 SCCO₂에 대한 친화력을 기준으로 판단한 경우에도 DCM이 가장 빠른 속도로 SCCO₂상으로 팽창되고 DMF가 가장 느리게 팽창된다. 따라서 DMF를 사용한 경우 SCCO₂상으로 용액이 분산된 후 역용매인 SCCO₂에 의해 충분한 과포화가 이루어지지 않아서 미처 입자를 형성하지 못하고 필터를 통해 소실되는 약물의 양이 가장 크고, 5-FU의 재결정화에 가장 유리한 혼합용매인 DCM/MeOH의 경우에는 약물의 소실이 거의 없는 것으로 판단된다. 이러한 실험결과를 토대로 L-PLA와 5-FU의 용매로 각각 DCM과 MeOH를 사용하여 추후 실험을 수행하였다.

약물/고분자 투입비의 영향

약물이 봉입된 고분자 나노 및 미세입자의 제조에 있어서 약물과 고분자간의 투입비율은 입자의 크기 및 방출특성에 큰 영향을 미칠 수 있다. 따라서 최적의 투입비를 선정하는 것은 실험적으로 매우 중요하다고 할 수 있으며, 다양한 약물/고분자 시스템에 대해 초임계 유체 입자 제조공정의 경우 약물/고분자 투입비가 미세입자의 형성과 특성에 미치는 영향에 대한 연구가 최근까지 꾸준히 진행되어 왔다(8-11). 본 연구에서는 5-FU를 MeOH에 용해시켜 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8% (w/v)의 농도로 제조한 용액과 평균분자량이 50,000 Da인 L-PLA를 2.0% (w/v)의 농도로 용해시킨 DCM 용액을 동일 부피비로 혼합하여 앞에서 언급한 ASES 공정 조건하에서 미

세입자를 제조하여 약물/고분자 투입비의 변화가 약물의 회수율과 봉입효율에 미치는 영향을 조사하였다.

Fig. 3에 나타난 것처럼, 5-FU/L-PLA 투입비가 증가함에 따라 약물 회수율은 초기에는 급격히 증가하다가 20% 이상에서는 서서히 증가하는 경향을 나타내었으며, 약물 봉입효율의 경우 고분자 대비 약물의 양이 4배 증가한 경우에도 소량 증가하는 결과를 나타내었다. 약물 회수율의 증가는 투입한 5-FU의 양이 증가함에 따라 입자 형성에 필요한 과포화 상태에 도달하기가 용이해져서 필터를 통해 소실되는 5-FU의 양이 감소하기 때문이다. 한편 5-FU의 봉입효율이 소폭 증가한 이유는 침전된 L-PLA 사슬들의 자유공간 (free volume) 내부에 존재할 수 있는 상분리되지 않은 5-FU의 상대적인 양이 증가하기 때문인 것으로 판단된다. 여전히 낮은 봉입효율이 얻어지는 이유는 앞에서 설명한 바와 같이 5-FU와 L-PLA간의 매우 낮은 친화력에 의해 5-FU와 L-PLA가 먼저 상분리된 후 입자를 형성하기 때문에 먼저 형성된 L-PLA 미세입자의 표면에 5-FU가 재결정되거나 독립적으로 5-FU 입자를 형성하기 때문이다(8).

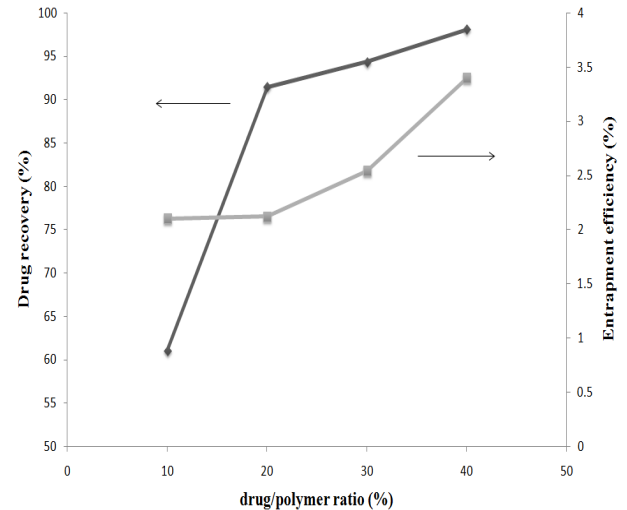


Figure 3. The effect of drug/polymer ratio on the drug recovery and entrapment efficiency.

고분자 분자량의 영향

생분해성 고분자의 분자량에 따라 체내에서 가수분해 되는 속도가 변하기 때문에 고분자 분자량의 변화와 동일한 고분자이나 분자량이 다른 고분자와의 블렌딩이 미세입자의 제조 및 약물의 회수율과 봉입효율에 미치는 영향을 연구하였다. 먼저 L-PLA의 고분자 분자량의 영향을 알아보기 위하여 서로 다른 분자량 (2,000, 50,000, 150,000)을 갖는 3종류의 L-PLA를 DCM에 2.0% (w/v)의 농도로 녹인 고분자 용액과 고분자 대비 40%의 5-FU를 MeOH에 용해시킨 용액을 동일 부피비로 혼합한 후 ASES 장치의 침전기 내부에 분사하여 미세입자를 제조하고 이를 회수하여 고분자 분자량의 변화가 미세입자의 크기 및 형상과 약물의 봉입효율 및 회수율에 미치는 영향을 정리하여 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다.

Fig. 4에서 알 수 있듯이, L-PLA의 분자량이 증가함에 따라 약물의 봉입효율과 회수율은 다소 감소하였으며 150,000의 경우 가장 낮은 봉입효율을 나타내었다. L-PLA의 분자량이 매우 큰 경우에는 L-PLA 사슬의 크기가 매우 커서 주어진 용매에 대한

용해도가 감소하고 L-PLA 사슬간의 얽힘 (entanglement) 현상이 나타나는 농도가 상당히 낮아지기 때문에 더 빠른 속도로 입자를 형성하여 5-FU의 재결정 속도와의 차이가 증가하여 고분자 내에 봉입된 약물의 양이 감소하기 때문이 것으로 설명할 수 있다. 약물 회수율이 분자량의 증가에 따라 감소한 이유는 5-FU, L-PLA, DCM, MeOH 및 SCCO₂의 5성분계의 상분리 경로가 L-PLA의 분자량에 따라 바뀌기 때문에 일어난 결과로 판단되나 현재까지 진행된 연구결과로부터 그 이유를 명확히 설명하기는 어렵기 때문에 향후 추가적인 연구가 필요하다고 사료된다.

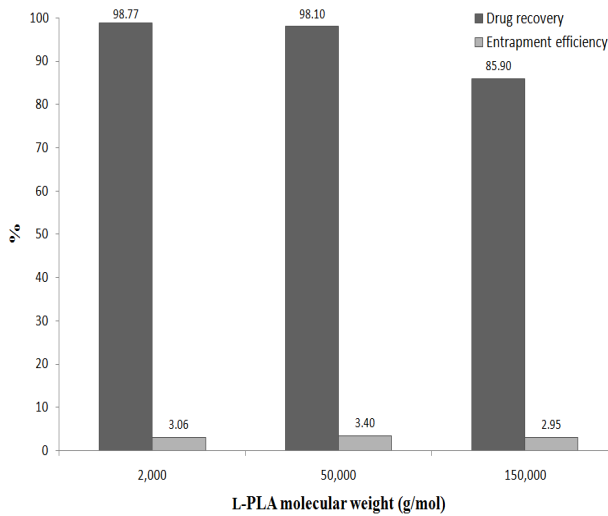


Figure 4. The effect of L-PLA molecular weight on the drug recovery and entrapment efficiency.

고분자의 분자량을 변화시켜 제조한 미세입자의 형상을 주사전자현미경 (SEM)으로 관찰하여 그 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 평균 분자량이 2,000인 L-PLA로부터 제조된 미세입자의 경우 분자량이 큰 L-PLA로부터 제조된 것에 비해 크기가 더 크고 불규칙한 형상을 나타내었다. L-PLA의 분자량이 증가함에 따라 제조된 미세입자의 크기가 작아지고 형상도 구형에 가까워졌으며, 분자량 150,000으로부터 제조된 미세입자의 경우 입자간의 엉킴 (agglomeration)의 정도가 증가했음을 알 수 있었다. 약물이 봉입된 나노 및 미세입자의 제조에 가장 널리 사용되는 에멀전/용매증발법, 나노침전법 등의 경우 일반적으로 고분자의 분자량이 증가하면 제조된 입자의 크기도 증가하는 것으로 알려져 있으나(20), 본 실험에서 사용된 초임계 ASES 공정의 경우 반대의 결과가 얻어졌다. 이와 같은 현상은 에멀전법의 경우 용매의 증발에 따라 매우 느린 속도로 입자가 형성되는 것에 비해 ASES 공정에서는 수만 내지 수십만 배 빠른 속도로 입자가 형성되기 때문이다. L-PLA의 분자량이 증가할수록 L-PLA 분자의 DCM에 대한 용해도가 감소하고 L-PLA 사슬간의 얽힘 (entanglement) 현상이 나타나는 농도가 낮아지기 때문에 더 빠른 속도로 입자를 형성하여 제조된 미세입자의 크기가 작아지고 형상도 구형에 가까워진다. 또한 L-PLA 고분자의 경우 얽힘 현상이 나타나는 임계분자량 (critical molecular weight)은 약 9,000 Da으로 알려져 있기 때문에(21) 분자량이 2,000인 L-PLA의 경우에는 입자 형성에서 분자량이 큰 L-PLA와는 다른 거동을 보일 수 있다.

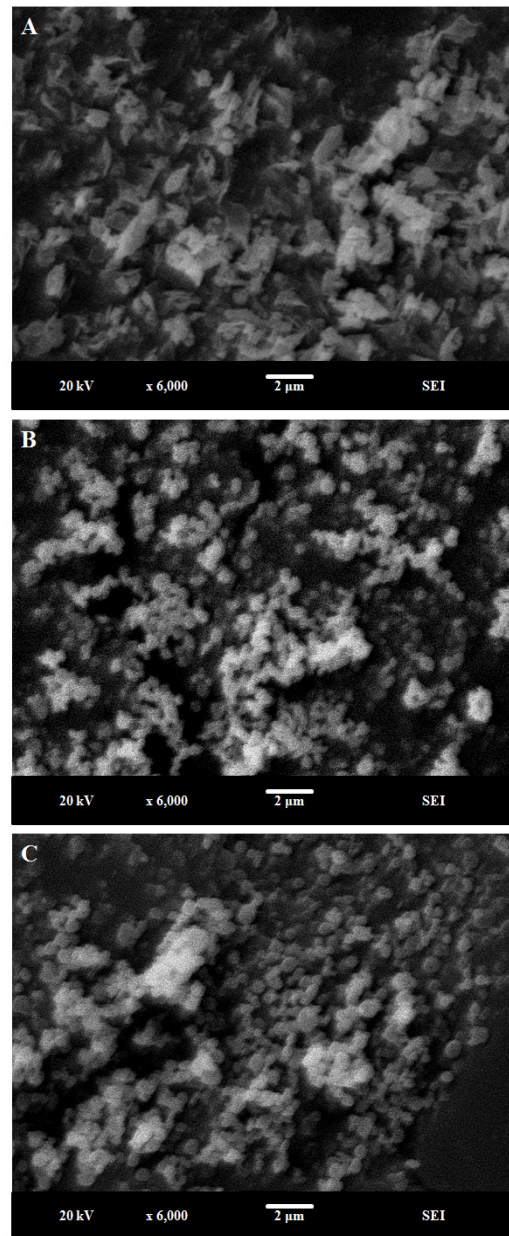


Figure 5. SEM micrographs of 5-FU loaded microparticles prepared from L-PLA polymers of different molecular weights: (A) 2,000; (B) 50,000; and (C) 150,000.

고분자 블렌딩의 영향

생분해성 고분자의 경우 일반적으로 결정성이 작고 분자량이 낮을수록 생분해 속도가 빠른 것으로 알려져 있기 때문에 분자량이 매우 낮은 L-PLA를 상대적으로 분자량이 큰 동일한 고분자와 블렌딩 (blending)하여 약물의 방출 속도를 조절할 수 있다. 분자량이 다른 두 L-PLA 고분자의 블렌딩이 약물의 봉입효율 및 회수율과 입자의 형상에 미치는 영향을 분석하기 위하여 위와 동일한 실험 조건에서 분자량 50,000과 2,000의 L-PLA의 함량을 변화시켜 2% (w/v) 농도로 제조된 고분자 용액과 고분자 총량 대비 40%의 5-FU를 MeOH에 녹인 용액을 혼합하여 ASES 공정으로 미세입자를 제조하였다.

Fig. 6에 나타낸 바와 같이 약물의 회수율은 분자량 2,000인 L-PLA와의 블렌딩에 의해 다소 감소하는 경향을 보였다.

분자량이 작은 L-PLA를 30% 블렌딩한 경우에는 약물의 봉입효율이 상당히 낮아지는 현상이 나타났으며, 이는 크기가 작은 고분자 사슬과 크기가 큰 사슬이 동시에 입자를 형성할 때 주성분인 분자량 50,000의 사슬들이 형성하는 자유부피에 약물이 봉입될 기회가 크기가 작은 분자량 2,000의 L-PLA 분자와의 경쟁에 의해 감소하기 때문인 것으로 판단된다. 이것은 고분자와 약물의 혼합용액에 poly(ethylene glycol) 등을 첨가하였을 경우 약물의 봉입효율이 감소하는 현상(22)과 유사한 결과이다.

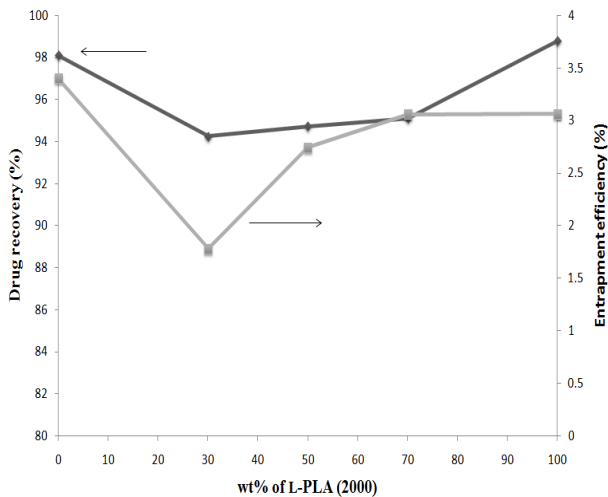


Figure 6. Variation in the drug recovery and entrapment efficiency with the content of L-PLA with molecular weight 2,000.

분자량이 크고 작은 두 종류의 L-PLA를 블렌딩하여 제조한 미세입자의 크기 및 형상의 변화를 SEM으로 관찰하여 그 결과를 Fig. 7에 제시하였다. 사진에서 알 수 있듯이 분자량 2,000인 L-PLA의 함량이 증가할수록 크기가 작은 구형의 형상을 보이다가 점차적으로 크기가 커지면서 분자량 2,000의 함량이 높은 경우에는 불규칙한 모양을 갖게 됨을 확인할 수 있었다.

In vitro 약물 방출 특성

생분해 속도가 느린 고분자에 약물이 봉입된 나노 및 미세입자의 약물 방출 특성은 고분자의 침식 (erosion)뿐만 아니라 약물의 확산에 의해서도 영향을 받을 수 있다. 약물의 방출이 약물의 확산에 의해 지배되는 경우에는 시간에 따른 약물 방출곡선이 포물선 형태를 나타내며, 고분자의 침식에 의한 경우에는 선형의 방출곡선을 보인다(23, 24).

5-FU를 MeOH에 0.2, 0.4, 0.6 및 0.8% (w/v)의 농도로 녹인 용액과 분자량 50,000의 L-PLA를 DCM에 2.0% (w/v)농도의 용해시킨 고분자 용액을 혼합한 후 위와 동일한 공정조건에서 미세입자를 제조하여 약물/고분자 투입비가 시간에 따른 in vitro 방출 특성에 미치는 영향을 조사하여 Fig. 8에 나타내었다. 약물이 봉입된 미세입자를 제조하여 실제로 투약하는 경우 미봉입 또는 입자의 표면에 존재하는 약물을 세척하지 않고 그대로 사용해야 하기 때문에 본 실험에서는 제조된 미세입자를 세척하지 않은 상태로 5-FU의 방출시험을 수행하였다.

Fig. 8에 나타낸 것과 같이 모든 경우에서 5-FU의 초기방출이 약 80~90% 정도에 이를 정도로 매우 빠른 속도로 약물이 방출되었으며 이후에는 매우 느리게 약물이 방출되었다. 이는

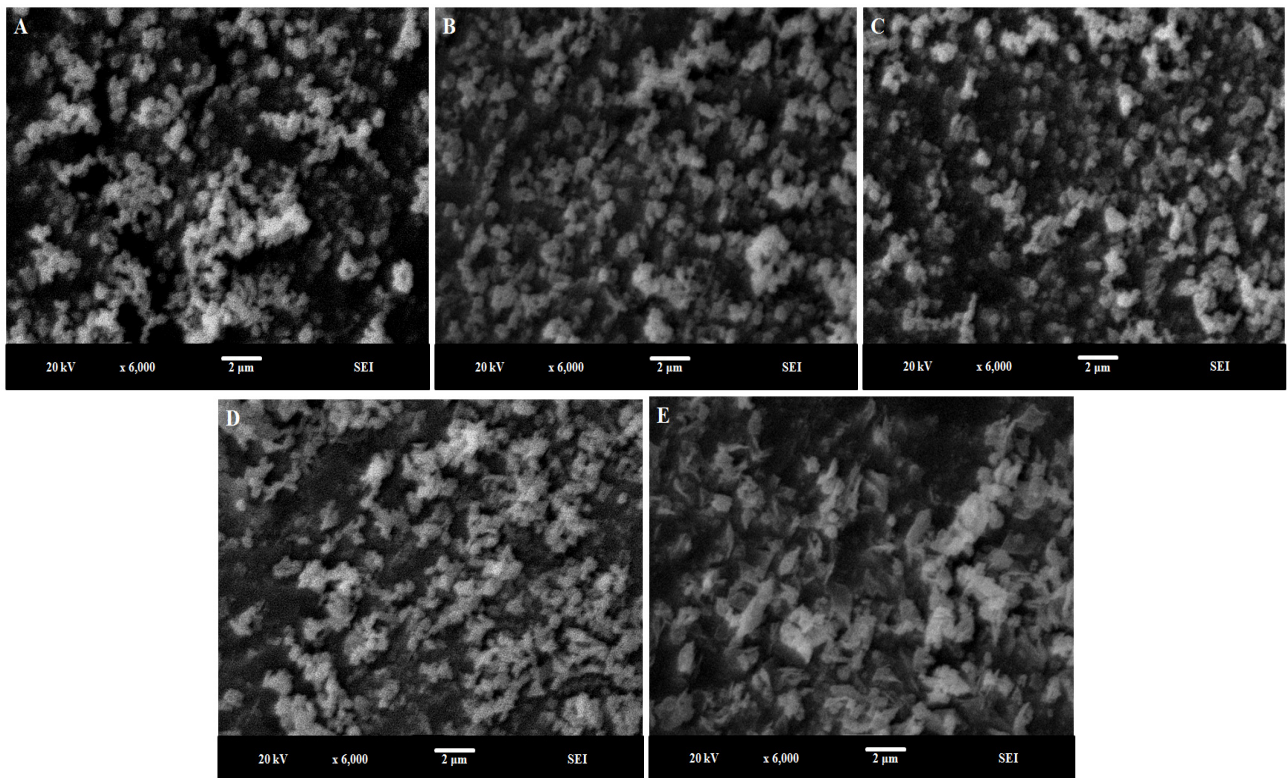


Figure 7. SEM micrographs of 5-FU loaded microparticles prepared from L-PLA polymers of different molecular weights: (A) pure L-PLA 50,000; (B) 30% L-PLA 2,000; (C) 50% L-PLA 2,000; (D) 70% L-PLA 2,000; and (E) pure L-PLA 2,000.

앞의 약물/고분자 투입비가 약물 회수율과 봉입효율에 미치는 영향에서 설명한 것처럼 회수된 대부분의 약물이 봉입되지 않고 미세입자의 표면 또는 단독으로 입자를 형성하여 존재하기 때문이다. 고분자 대비 많은 양의 약물이 투입된 30%와 40%의 경우 미봉입된 5-FU의 절대량이 10%와 20%의 경우에 비해 훨씬 많고, 5-FU의 물에 대한 용해도가 13.26 mg/mL로 아주 높지는 않기 때문에 상대적으로 완충용액에 친화적으로 용해되어 초기 방출이 낮게 나타난 것으로 판단된다.

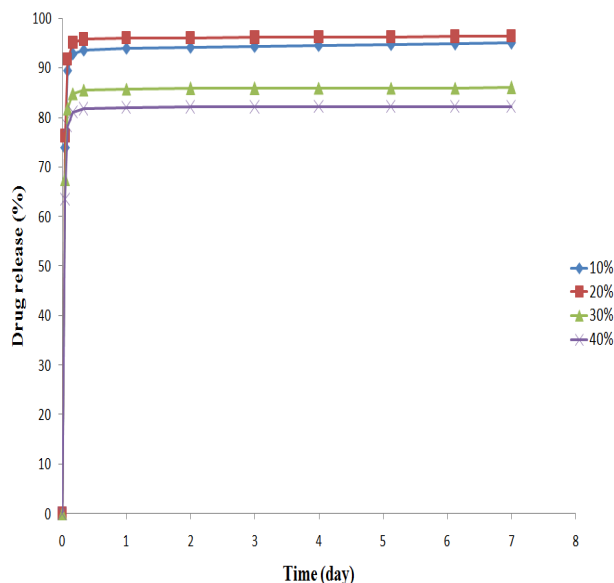


Figure 8. *In vitro* release profiles at 37°C in a phosphate buffer solution of pH 7.4 for various 5-FU loaded microparticles prepared using different drug/polymer ratios.

요약

본 연구에서는 뛰어난 항암효과를 가지고 있지만 매우 짧은 반감기로 인한 많은 투약 빈도수와 이로 인한 부작용을 나타내는 5-FU의 부작용을 줄이고 투약의 편의성을 증대시키고자 생분해성 고분자인 L-PLA에 약물이 봉입된 미세입자를 제조하였다. 제조 방법으로는 기존의 미립자 약물전달체 제조 공정의 문제점을 상당 부분 개선시킬 수 있는 대체 공정으로 주목 받고 있는 초임계 ASES 공정을 사용하였다. 고분자의 분자량 및 분자량이 다른 동일한 고분자와의 블렌딩, 용매, 약물 투입량 등의 변수가 미세입자의 형성과 약물의 회수율, 봉입효율 및 방출에 미치는 영향을 고찰하여 초임계 유체 공정의 적용 가능성 여부를 조사하였다. 5-FU와 L-PLA의 용매로 각각 MeOH와 DCM을 사용한 경우 가장 좋은 결과가 얻어졌으며, L-PLA의 분자량이 큰 경우 구형의 입자가 생성되었으며 입자의 크기도 작은 결과가 나타났다. 모든 실험에서 약물의 봉입효율이 매우 낮게 나타났는데 이는 5-FU와 L-PLA의 매우 낮은 친화도에 기인하는 것으로 판단된다. 약물과 고분자 간의 세결정화 속도의 차이를 얼마나 줄일 수 있는가가 약물 봉입효율에 가장 큰 영향을 미칠 것으로 판단되며, 약물의 봉입효율을 향상시키기 위해서는 향후 초임계 공정의 공정변수에 대한 좀 더 자세한 연구와 약물과 고분자간의 친화력을 높여 일 수 있는 첨가제

에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사

본 연구는 차세대 성장 동력 바이오신약장기사업단의 연구비 지원에 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.
- Langer, R. (2006), Biomaterials for drug delivery and tissue engineering, *MRS Bull.* **31**(6), 477-485.
- Park, J. H., M. Ye, and K. Park (2005), Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs, *Molecules* **10**, 146-161.
- Kim, K. K. and D. W. Pack (2006), Microspheres for drug delivery, In *Biological and Biomedical Nanotechnology*, A. P. Lee and L. J. Lee, Eds., p19, Springer, New York.
- Anderson, J. M. and M. S. Shive (1997), Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Del. Rev.* **28**, 5-24.
- 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, Division of Pharmaceutics, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- 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.
- 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.
- Martin, A. and M. J. Cocero (2008), Micronization processes with supercritical fluids: fundamentals and mechanisms, *Adv. Drug Del. Rev.* **60**, 339-350.
- Kim, J. H., 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.
- Longley, D. B. and P. G. Johnston (2007), 5-fluorouracil: Molecular mechanisms of cell death, In *Apoptosis, Cell Signaling, and Human Diseases: Molecular Mechanisms*, Vol. 1, R. Srivastava, Ed., p263, Humana Press, New Jersey.
- Rich, T. A., R. C. Shepard, and S. T. Mosley (2004), Four decades of continuing innovation with fluorouracil: Current and future approaches to fluorouracil chemoradiation therapy, *J. Clin. Oncol.* **22**, 2214-2232.
- Fu, Y. J., S. S. Shyu, F. H. Su, and P. C. Yu (2002), Development of biodegradable co-poly (d,l-lactide/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method, *Colloids Surf. B* **25**, 269-279.
- Guney, O. and A. Akgerman (2002), Synthesis of controlled-release products in supercritical medium, *AIChE J.* **48**, 856-866.

17. Hussain, M., G. Beale, M. Hughes, and S. Akhtar (2002), Co-delivery of an antisense oligonucleotide and 5-fluorouracil using sustained release poly (lactide-co-glycolide) microsphere formulations for potential combination therapy in cancer, *Int. J. Pharm.* **234**, 129-138.
18. Faisant N., J. Akiki, F. Siepman, J. P. Benoit, and J. Siepman (2006), Effects of the type of release medium on drug release from PLGA-based microparticles: Experiment and theory, *Int. J. Pharm.* **314**, 189-197.
19. Hsu, L. S. F. and T. C. Marss (1980), Determination of 5-fluorouracil in human plasma by high pressure ion-exchange chromatography, *Ann. Clin. Biochem.* **17**, 272-276.
20. Mittal, G., D. K. Sahana, V. Bhardwaj, and M. N. V. R. Kumar (2007), Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior *in vitro* and *in vivo*, *J. Control. Rel.* **119**, 77-85.
21. Dorgan, J. R., J. Janzen, M. P. Clayton, S. B. Hait, and D. M. Knauss (2005), Melt rheology of variable L-content poly (lactic acid), *J. Rheol.* **49**, 607-619.
22. Blanco-Prieto, M. J., K. Besseghir, O. Zerbe, D. Andris, P. Orsolini, F. Heimgartner, H. P. Merkle, and B. Gander (2000), In vitro and in vivo evaluation of a somatostatin analogue release from PLGA microspheres, *J. Control. Rel.* **67**, 19-28.
23. 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.
24. Kim, C. (1999), Release kinetics of coated, donut-shaped tablets for water soluble drugs, *Eur. J. Pharm. Sci.* **7**, 237-242.