

## W/O/W 이중유화법을 이용한 겔시타빈 함유 Methoxy Poly(ethylene glycol)-*b*-Poly(L-lactide) 미립자 제조

유종훈<sup>1\*</sup>, 정인일<sup>1,2</sup>, 이지은<sup>1</sup>, 임교빈<sup>1</sup>

## Preparation of Gemcitabine-Loaded Methoxy Poly(ethylene glycol)-*b*-Poly(L-lactide) Microparticles Using W/O/W Double Emulsion

Jong-Hoon Ryu<sup>1\*</sup>, In-Il Jung<sup>1,2</sup>, Ji-Eun Lee<sup>1</sup>, and Giobin Lim<sup>1</sup>

접수: 2011년 5월 17일 / 게재승인: 2011년 6월 13일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** In this study, gemcitabine-loaded methoxy poly(ethylene glycol)-*b*-poly(L-lactide) (MPEG-PLLA) microparticles with different PEG block lengths were prepared by a W/O/W double emulsion technique. The present study focuses on the investigation of the influence of various preparative parameters such as the ratio of internal water phase and oil phase, polymer concentration, solvent composition of organic phase and salt concentration of external water phase on the morphology and encapsulation efficiency of the microparticles. The microparticles fabricated at high volume ratios of internal water phase to oil phase and at high polymer concentrations showed a relatively high encapsulation efficiency and low porosity. When a dichloromethane/ethyl acetate mixture was used as solvent, both the encapsulation efficiency and drug loading of the microparticles decreased as the level of ethyl acetate increased. The addition of a salt (NaCl) to the external water phase significantly improved the encapsulation efficiency up to 40%, and the microparticles became more spherical with their size and porosity decreased.

**Keywords:** gemcitabine, double emulsion, MPEG-PLLA, microparticle

### 1. 서론

약물전달 시스템은 약물을 효율적으로 전달하여 약물이 부작용을 최소화하고 효능 및 효과를 극대화 할 수 있도록 약물의 제형을 설계하는 기술이다. 인체 질병 치료를 위해 사용되는 약물은 약리효과가 최적으로 발현되며 사용이 편리한 제형으로 가공된 후 경구, 주사, 경피, 점막, 이식 등 다양한 경로를 통하여 환자에게 투여된다. 체내에 투여된 약물은 흡수되고 혈액과 림프계의 운반 경로를 통하여 각 장기로 이동된 후 대사 및 배설 과정을 통해 소실된다. 이러한 과정에서 약리 효과는 생체내의 질환 부위에 도달한 약물에 비례하여 발현되고 질환 부위 이외의 부위에 도달한 약물은 부작용의 원인이 된다. 따라서 약물 투여에 따른 부작용을 최소화하고 효능을 극대화하기 위한 약물전달 시스템 개발에 대한 다양한 연구가 진행되어 오고 있다 [1-4].

일반 정상세포와 달리 급속히 분열 및 증식하는 암세포의 성장을 억제하기 위해 사용되는 항암제는 강한 세포독성을 가지고 있어 심각한 부작용을 유발한다 [5]. 특히 항암제의 반복적인 투여는 부작용과 함께 항암제의 다약제내성 (multidrug resistance, MDR)을 유발하기 때문에 치료효과가 저하되는 결과를 보인다 [6]. 이러한 문제점들을 해결하기 위한 방법으로 약물을 생분해성 고분자 (biodegradable polymer)내에 봉입 (entrapment)하여 원하는 형태와 크기를 갖는 미립자를 제조하여 약물의 방출 속도를 제어하는 다양

<sup>1</sup>수원대학교 화학공학과

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea  
Tel: +82-31-220-2599/+82-31-220-2243, Fax: +82-31-220-2528  
e-mail: jhryu@suwon.ac.kr

<sup>2</sup>연세대학교 화공생명공학과

<sup>2</sup>Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

한 방법들이 연구되고 있다 [7-9]. 이러한 방법은 항암제가 일정기간 이상 체내에서 치료효과범위의 농도로 일정하게 유지될 수 있도록 하여 항암제의 투약 빈도와 부작용을 최소화하고 생체이용률과 효능을 향상시킬 수 있다.

약물 봉입을 위한 생분해성 고분자로는 주로 poly (lactic acid) (PLA), poly (glycolic acid) (PGA), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL), polyanhydride, poly (ortho ester) 등이 사용되고 있다 [7]. 특히 PLA와 PLGA 같은 polyester 계통의 생분해성 고분자 미립자 제제의 경우 일반적인 형태의 제형에 비해 훨씬 오랫동안 체내에서 약물의 유효농도를 유지할 수 있다. 또한, 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 [10,11].

친수성과 소수성의 특성을 가지는 서로 다른 두 고분자가 연결된 양친매성 AB 타입의 블록 공중합체는 현재 약물전달체로 많은 연구가 진행되고 있다. 소수성 고분자로는 주로 poly (alkylcyanoacrylate), poly (benzyl glutamate), PGA, PLA, PCL 등이 이용되며, 친수성 고분자로는 poly (ethylene glycol) (PEG)가 가장 많이 이용되고 있다. 양친매성 고분자는 미셀 (micelle) 형성을 통한 지용성 약물 전달체로 주로 이용되고 있다 [12-15].

PEG는 무독성과 비면역성의 수용성 고분자로 단백질의 항원성을 감소시켜 혈류에서의 반감기를 연장하기 위해 주로 사용되고 있다. 또한 FDA (Food and Drug Administration) 승인 고분자로 PEG의 말단에 반응성기를 결합한 활성화 PEG를 이용할 경우 약물과의 접합성도 높기 때문에 약물의 PEG화 (PEGylation)에 많이 이용되고 있다 [16-18].

Poly (L-lactic acid)는 대표적인 폴리에스터계 생분해성 고분자로 전분과 같은 천연물의 발효로부터 얻어진 lactic acid를 통해 쉽게 합성할 수 있다. 그러나 Poly (L-lactic acid)는 낮은 생분해속도와 높은 소수성 및 높은 결정성 때문에 기계적 물성이 다소 취약하다는 단점이 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 공중합체 제조 또는 다른 고분자와의 블렌드 등의 방법이 이용되고 있다. 대부분의 공중합체는 lactide를 glycolide 또는 caprolactone과 같은 단량체와 함께 개환중합하거나 methoxy poly (ethylene glycol) (MPEG)를 개시제로 사용하여 lactide의 개환중합을 통해 합성된다 [19].

젬시타빈 (gemcitabine 또는 2',2'-difluorodeoxycytidine monohydrochloride, GEMZAR)은 desoxycytidine 유도체로 비소형 세포 폐암, 췌장암, 난소암, 유방암, 방광암 등의 고형종양 대하여 항암 작용을 가지는 것으로 잘 알려져 있다 [20-24]. 젬시타빈은 세포내에서 desoxycytidine 인산화 효소에 의해 젬시타빈의 3인산염 (2',2'-difluorodeoxycytidine triphosphate, dFdCTP)으로 활성화된 후 DNA 합성을 억제하여 암세포를 사멸시키는 역할로 항암효과를 나타낸다. 그러나 젬시타빈은 주로 불활성 대사물질인 2'-deoxy-2',2'-difluorouridine (dFdU)으로 대사되어 혈장으로부터 신속히 제거되는 낮은 반감기 때문에 종종 많은 횟수와 높은 약물

투여가 요구되며, 그로인한 부작용의 문제점이 발생되고 있다. 이러한 젬시타빈의 부작용을 최소화하고 효능 향상을 위한 방법으로 PEG와 conjugated된 젬시타빈 전구체 (prodrug), lipophilic 유도체, 젬시타빈이 봉입된 리포솜 및 마그네타이드-PCL 나노 입자의 제조 등에 대한 연구가 앞서 수행된 바 있다 [25-27].

고분자를 이용한 입자 제조에 다양한 방법들이 이용되고 있으며, 그 예로는 용매 추출/증발, 상분리, 분무 건조법 등이 있다. 그 중 분무 건조법은 상대적으로 간단하고 대량 생산이 가능하기 때문에 가장 널리 이용되고 있지만 공정 온도가 높아 온도에 민감한 약물이나 재료는 사용할 수 없다는 단점을 가지고 있다. 그러나 용매추출법을 사용하면 산업적으로 대형화하기 쉬우며, 무균의 미립자를 제조할 수 있다는 장점이 있어 가장 널리 사용되고 있는 방법이다 [28].

약물을 질환 부위에 집중적으로 전달하면 치료 효능을 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라 약물 투여량을 줄일 수 있어 부작용도 최소화할 수 있다. 콜로이드형 약물방출 시스템은 작은 입자 크기로 인해 비경구적 투여가 가능하며 특정 조직이나 기관으로의 약물 전달을 위한 지연형 방출 체제로써 유용하다. 이러한 장점을 지닌 콜로이드형 약물방출 시스템에는 리포솜, 에멀전, 고분자 미립자, 나노입자, 그리고 천연의 운반체로 적혈구나 리포 단백질 등이 연구 되어지고 있다. 본 연구에서는 W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> 다중유화법을 이용하여 항암제인 젬시타빈이 봉입된 methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly (L-lactide) (MPEG-PLLA) 입자를 제조하였으며, 공정 변수가 입자의 크기와 형태 및 약물 봉입 효율 (encapsulation efficiency)에 미치는 영향에 대해 연구를 수행하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험재료

젬시타빈 (gemcitabine hydrochloride)은 (주)유한양행으로부터 공급받아 사용하였다. 다른 크기의 methoxy poly (ethylene glycol)를 가지는 methoxy poly(ethylene glycol)-b-poly (L-lactide) (MPEG-PLLA)는 1,000, 2,000, 5,000 g/mol의 무게평균 분자량 가지는 MPEG (Sigma-Aldrich)를 개시제로 사용하여 L-lactide (Tokyo Chemical Industry Co., Japan)의 개환중합 (ring opening polymerization)을 통하여 합성하였다. 촉매로는 stannous octoate (Sn(Oct)<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하였으며, L-lactide는 에틸 아세테이트 (ethyl acetate, EtAc)를 이용하여 재결정 후 사용하였다. 계면활성제로는 poly (vinyl alcohol) (PVA, 87-90% hydrolyzed, MW=30000 - 70000 g/mol, Sigma-Aldrich, USA)를 사용하였으며, 기타 용매와 시약은 각각 HPLC급과 시약급 이상의 제품을 구입하여 더 이상의 정제 과정 없이 사용하였다.

### 2.2. MPEG-PLLA 합성

MPEG의 다른 분자량을 가지는 MPEG-PLLA 블록 공중합체는 MPEG를 개시제로, Sn(Oct)<sub>2</sub>를 촉매로 사용하여 L-lactide의 개환중합을 이용하여 합성하였다. 먼저 100 mL의

유리 반응기에 일정량의 MPEG 넣고 3회 질소 purge 한 후 120°C의 oil bath에 넣고 진공펌프를 연결하여 3시간 감압 건조하여 수분을 제거하였다. 유리 반응기를 실온에서 냉각한 후 질소를 주입하고 무수 toluene에 용해된 Sn(Oct)<sub>2</sub>를 모노머 대비 0.1% (w/w)의 비율로 첨가하였다. 120°C 온도와 진공 하에서 1시간 동안 toluene을 제거하고 L-lactide을 유리 반응기에 넣은 후 130°C까지 승온시켜 질소분위기에서 24시간 반응을 진행하였다. 반응이 종료되면 유리 반응기를 실온으로 냉각시키고, 반응물을 chloroform에 용해시킨 후 -4°C로 냉각된 diethyl ether에 고분자를 침전시켜 회수하였다. 회수된 고분자는 40°C 온도에서 24시간 동안 진공 건조하고, 냉동 보관하여 사용하였다.

### 2.3. 미립자 제조

약물 함유 고분자 미립자는 W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> 다중유화법을 이용하여 제조하였다. 일정량의 젬시타빈을 증류수 (W<sub>1</sub>)에 용해시킨 내부 수상과 dichloromethane (DCM, O) 10 mL에 일정량의 MPEG- PLLA를 용해시킨 중간 유상을 각각 제조하였다. 제조된 내부수상을 유상에 첨가한 후 초음파 분산기 (VCX 130, Sonics & Materials, Inc., USA)로 amplitude 50%에서 펄스 (pulse, 1s ON/1s OFF)를 주어 1분간 처리한 후 W<sub>1</sub>/O 1차 유화를 제조하였다.

1차 유화를 주사기 펌프 (LSP01-1A, Baoding Longer Precision Pump Co., Ltd., China)를 이용하여 29 G 바늘을 통해 1 mL/min의 유속으로 PVA 수용액 (W<sub>2</sub>, 1% (w/v)) 100 mL에 주입하면서 기계식 교반기 (Direct driven digital stirrer SS-20, Global Lab., Korea)를 이용하여 300 rpm의 속도로 교반하였다. 1차 에멀전의 주입 후 교반기의 속도를 800 rpm까지 높여 추가적으로 1분간 교반하였고, 이어 균질기 (DI 25 digital (ULTRA TURRAX), IKA® Werke GmbH & Co. KG, Germany)로 6000 rpm에서 30초간 분산시켜 W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> 2차 유화를 형성하였다. 회전식 증발기 (HS-2001N, Hahn Shin Science Co., Korea)를 이용하여 40°C, 150 rpm에서 1시간 동안 제조된 유화로부터 유기용매를 제거하여 입자를 제조하였다. 고형화 된 입자는 원심분리기 (Mega 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea)로 4°C, 10,000 g에서 15분간 원심 분리하고, 증류수로 3회 세척한 후 동결 건조 (Maxi-dry lyo, Heto Lab Equipment, Denmark)하여 미립자를 회수하였다.

### 2.4. SEM 분석

회수된 미립자의 크기 및 형태는 전계방사 주사전자현미경 (field emission scanning electron microscopy, FE-SEM, JSM6700F, JEOL Ltd., Japan)을 이용하여 관찰하였다. SEM분석은 소량의 미립자를 채취하여 카본 테이프가 부착된 금속 스텐브 (metal stub)에 고정시키고, 금/팔라듐 (Au/Pd) 코팅한 후 15 kV에서 수행하였다.

### 2.5. 봉입효율 측정

제조된 미립자 10 mg을 칭량하여 튜브에 넣고 1 mL의 DCM에 고분자를 용해시킨 뒤, 이 용액에 0.05% Tween 20이 함유된 pH 7.4의 0.01 M 인산완충용액 (phosphate buffered saline,

pH 7.4, with Tween 20, PBST) 10 mL을 첨가하여 vortexing 혼합을 하였다. 이후 shaking incubator (SI-300R, Jeio Tech., Korea)에 튜브를 수평방향으로 위치시키고, 37°C, 120 rpm에서 교반하여 DCM에 용해되지 않은 약물이 PBST 액상으로 추출되도록 하였다. 30분 후 4500 rpm에서 15분간 원심 분리하여 DCM과 PBST 층을 분리하였다. 상층액인 PBST 용액을 채취하여 0.45 µm 주사기필터 (DISMIC®-13HP, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)를 통해 여과한 후 270 nm의 파장에서 high performance liquid chromatography (HPLC, 600 Pump and Controller with 717 Autosampler and 486 Tunable Absorbance Detector, Waters Co., USA)로 약물 함량을 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 ODS Hypersil (5 µm, 4.6 × 150 mm, Thermo Electron, USA)이고, 이동상으로는 메탄올이 10% (v/v) 첨가된 pH 5.0의 50 mM 아세트산 나트륨 완충용액 (sodium acetate buffer solution)을 1.0 mL/min의 유속으로 사용하였으며, 젬시타빈의 함량은 미리 작성된 검량 곡선을 이용하여 분석하였다.

제조된 미립자 중 봉입된 약물의 상대적인 양을 분석하기 위하여 약물 함량 (drug loading) 및 봉입효율 (encapsulation efficiency)을 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{약물함량} = \frac{\text{제조된 미립자에 함유된 약물의 양}}{\text{제조된 미립자의 총량}} \times 100$$

$$\text{봉입효율} = \frac{\text{실제 약물 함유율}}{\text{이론적 약물 함유율}} \times 100$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. MPEG-PLLA의 특성

L-lactide의 개환중합을 통해 합성된 MPEG-PLLA의 조성비와 분자량 및 분자량 분포도는 <sup>1</sup>H NMR과 GPC를 이용하여 측정하였으며, 이를 정리하여 Table 1에 나타냈다. MPEG-PLLA 블록 공중합체에서 MPEG와 PLLA의 조성비는 <sup>1</sup>H NMR 스펙트럼에서 MPEG의 -CH<sub>2</sub>- 그룹과 PLLA의 -CH<sub>3</sub> 그룹을 나타내는 3.64 ppm과 1.58 ppm 피크의 면적비로부터 계산하였다. <sup>1</sup>H NMR 피크 면적 적분값과 GPC 분석을 통해 얻어진 각각의 분자량은 비슷한 값을 가지고 있었다. GPC 분석 결과 합성된 고분자는 전체적으로 1.4-2.25의 넓은 분자량 분포도를 가지고 있었다.

### 3.2. 내부수상 부피의 영향

W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub> 다중유화법을 이용한 젬시타빈 함유 MPEG-PLLA 미립자 제조에서 있어 내부수상 (W<sub>1</sub>)의 변화에 따른 입자 형태 및 봉입률 변화에 대한 영향을 알아보기 위해 유상의 부피, 고분자 농도 및 약물 농도를 각각 10 mL, 1.5 (w/v), 4 (w/v)으로 고정하고 실험을 수행하였다. 내부수상의 부피는 0.25, 0.5, 1 mL를 사용하였으며, 고분자는 앞서 합성한 MPEG-PLLA (5-45)를 이용하였다.

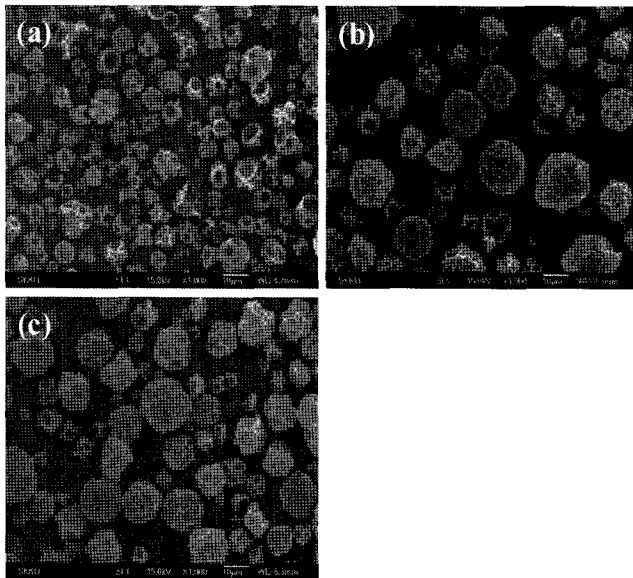
내부수상 변화에 따라 제조된 입자의 SEM 사진을 Fig. 1

**Table 1.** Molecular weight distribution and PEG/PLLA ratio of three different MPEG-PLLA diblock copolymers used in this study

MPEG-PLLA (x K-y K)	$M_n^a$ [g/mol]	$M_w^b$ [g/mol]	$M_n^b$ [g/mol]	PDI <sup>b</sup>	PEG : PLLA weight ratio <sup>c</sup>
1-45	50,100	74,700	33,800	2.21	2% : 98%
2-45	66,600	77,200	34,364	2.25	3% : 97%
5-45	50,000	64,500	45,900	1.40	10% : 90%

K: kg/mol. <sup>a</sup>Determined by <sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub>. <sup>b</sup>Determined by GPC in THF. <sup>c</sup>Calculated from ratio of the peak area

에 나타내었다. 그림에서 보는 바와 같이 제조된 입자들은 많은 기공 (pore)과 반구형 및 구형의 형태를 보였으며, 주름지고 함몰된 표면을 가지고 있는 것을 확인할 수 있다. SEM 사진 결과 내부수상의 부피 증가에 따라 제조된 입자의 크기는 증가하였다. 다공성 입자가 제조되는 이유는 다중 유화법에서 고분자가 용해된 유상은 내부수상과 외부수상의 중간에서 반투과 막과 같은 역할을 하고, 젬시타빈에 의한 내부수상과 외부수상 사이의 삼투구배 (osmotic gradient)가 발생하기 때문이다.



**Fig. 1.** SEM micrographs of gemcitabine-loaded MPEG-PLLA microparticles prepared with different volume ratios of internal water phase to oil phase: (a)  $W_1/O=0.25/10$  (v/v); (b)  $W_1/O=0.5/10$ ; and (c)  $W_1/O=1/10$ .

본 연구에서 사용된 젬시타빈의 경우 물에 녹아 염 형태로 해리되어 존재하거나 전하를 띄지 않고 유리염기 상태로 존재한다 [29]. 그래서 내부수상에 용해된 젬시타빈은 삼투압을 유발하여 외부수상의 물이 내부수상으로 투과하게 된다. 이로 인해 유상의 증발에 의한 고분자 침전 과정 중 외부수상의 물이 내부수상으로 투과되면서 생성되는 물의 흐름에 의한 경로가 생성되어 다공성의 입자가 제조되게 된다 [30].

더 적은 부피의 내부수상이 사용된 경우 반구형의 입자들이 더 많이 생성되었다. 이는 내부수상의 미세액적 크기가 삼투압차에 의해 외부수상이 내부수상으로 확산되어 1차 유화 액적의 크기와 유사하게 팽창함으로써 분산상의 안정

성이 감소하여 용매 제거 시 내부수상이 외부수상과 응집 (coalescence)되어 나타나는 현상이다 [31]. 또한, 주름지고 함몰된 표면이 생성되는 이유는 삼투압에 의해 외부수상이 내부수상으로 확산되어 침투하는 과정에서 MPEG-PLLA의 친수성인 MPEG 사슬이 외부수상의 흐름에 따라 재배열되기 때문이다 [32].

내부수상의 변화에 따라 제조된 입자의 젬시타빈 봉입률과 함유율 측정 결과를 Table 2에 정리하여 나타내었다. Table 2 (A1-3) 나타난 바와 같이 내부수상의 부피가 증가함에 따라 약물의 봉입효율과 함량이 증가하였다. 이는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 더 적은 부피의 내부수상을 가지는 경우 작고 반구형의 입자들이 더 많이 생성되는 것으로 미루어 보아 내부수상이 외부수상과 함께 합쳐지면서 1차 유화가 깨지는 비율이 증가하기 때문에 더 낮은 약물 봉입효율과 함량을 가지는 것으로 생각되어진다.

### 3.3. 고분자 농도의 영향

약물함유 고분자 미립자 제조에 있어 유상의 고분자 농도는 입자 크기 및 봉입효율에 큰 영향을 미친다. 입자 제조 시 고분자 농도에 따른 영향에 대해 알아보기 위해  $W_1/O$ 의 부피비와 사용된 약물의 양을 각각 0.1과 40 mg으로 고정하고, 고분자 (MPEG-PLLA (5-45))의 농도를 1.5, 3.0, 6.0% (w/v)으로 변화시켜 고분자 농도 변화가 미립자의 형태와 약물 봉입효율 및 함량에 미치는 영향에 대해 조사하였다.

약물의 봉입효율은 Table 2 (A3, B4-5)에 나타난 바와 같이 고분자 농도 증가에 따라 증가하였다. 이는 더 높은 고분자 농도에서 더 높은 점도를 가지며, 유상의 DCM이 일정한 증발속도를 가질 때 더 높은 고분자 농도에서 더 빠른 과포화가 유도되어 고분자가 더 빠르게 고형화되어 내부수상이 밖으로 확산되는 것을 방해하기 때문이다. 즉, 유상은 내부수상이 외부수상으로 확산되는 것을 방지하는 반투막 역할을 하기 때문에 고분자 농도 증가에 의한 유상의 점도 증가와 빠른 고형화는 내부수상이 외부수상으로 확산되는 것을 방해하기 때문에 더 높은 농도에서 더 높은 봉입효율을 가지게 된다. 약물함량 감소는 상대적으로 고분자 투입량 증가에 따라 약물 투입비가 감소하여 초기 입자 제조 시 약물함량이 낮기 때문이다.

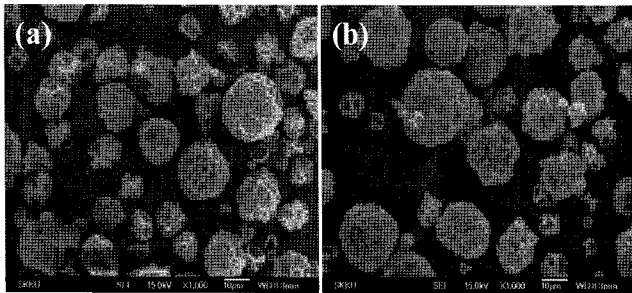
유상의 고분자 농도 변화에 따라 제조된 입자의 SEM 사진을 Fig. 2에 나타내었다. SEM 사진에서 볼 수 있듯이 입자의 크기는 유상의 고분자 농도 증가에 따라 증가하였다. 용매 증발법에 의해 생성되는 입자의 크기는 유상 액적 내 고분자의 농도가 증가할수록 액적 크기와 유사한 입자가 얻어지며,

**Table 2.** Summary of preparative conditions of gemcitabine-loaded MPEG-PLLA microparticles and their encapsulation efficiency

Exp. No.	Polymer types	Internal phase volume (mL)	Drug concentration (% w/v)	Polymer concentration (% w/v)	Organic solvent (DCM:EtAc)	NaCl concentration of external water phase (% w/v)	Drug loading	Encapsulation efficiency <sup>a</sup>
A1	MPEG-PLLA (5-45)	0.25	4	1.5	100 : 0	0	0.20 ± 0.004	3.15 ± 0.056
A2		0.5					1.00 ± 0.015	8.49 ± 0.125
A3		1.0					2.31 ± 0.172	10.94 ± 0.82
B1		3.0					1.46 ± 0.04	12.44 ± 0.37
B2		6.0					1.36 ± 0.07	21.79 ± 1.20
C1		90 : 10					0.82 ± 0.04	3.90 ± 0.27
C2		80 : 20					0.054 ± 0.01	2.56 ± 0.08
C3		70 : 30					0.39 ± 0.005	1.86 ± 0.03
C4		60 : 40					0.10 ± 0.006	0.47 ± 0.04
D1		MPEG-PLLA (2-45)					1.0	1.5
D2	1.0		6.72 ± 0.24	31.81 ± 1.15				
D3	2.0		7.81 ± 0.20	37.11 ± 0.93				
D4	3.0		2.77 ± 0.02	13.17 ± 0.08				
F1	0		1.80 ± 0.048	8.53 ± 0.23				
F2	1.0		10.23 ± 0.044	47.62 ± 0.21				
F3	MPEG-PLLA (1-45)	1.0	1.5	100 : 0	2.0	4.46 ± 0.172	22.0 ± 0.82	
F4					0	1.34 ± 0.023	6.36 ± 0.11	
F5					1.0	3.64 ± 0.112	17.30 ± 0.53	
F6					2.0	2.41 ± 0.112	11.46 ± 0.53	

<sup>a</sup>Theoretical drug loading: 21% (w/w).

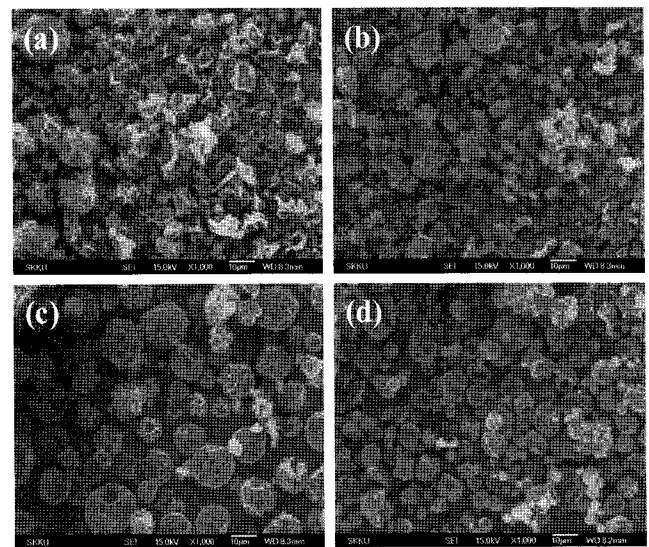
이와 반대로 고분자의 농도가 감소할수록 용매의 증발에 의해 액적이 수축하면서 고형화가 이루어지기 때문에 상대적으로 작은 크기의 입자가 제조된다 [31].



**Fig. 2.** SEM micrographs of gemcitabine-loaded MPEG-PLLA microparticles prepared with different polymer concentrations: (a) 3.0%, and (b) 6.0%.

### 3.4. 혼합용매의 영향

유상의 액적으로부터 용매의 빠른 제거는 고분자의 고형화 속도를 빠르게 하기 때문에 내부 수상에 용해된 약물이 외부 수상으로 빠져나가는 것을 방해하게 된다. 반대로 용매 제거 속도가 느릴 경우, 느린 고형화 속도로 약물이 외부 수상으로 확산되어 약물의 손실을 초래한다. 그러므로 유상의 액적으로부터 용매의 제거가 증발과 추출이 동시에 이루어진다면 더 높은 약물 봉입효율을 얻을 수 있다. 이에 본 실험에서는 유상의 용매를 증발과 추출이 가능한 용매를 혼합하여 그에 따른 영향에 대해 조사하였다.



**Fig. 3.** SEM micrographs of gemcitabine-loaded MPEG-PLLA microparticles prepared using different solvent compositions: (a) DCM/EtAc = 9/1 (v/v), (b) DCM/EtAc = 8/2, (c) DCM/EtAc = 7/3, and (d) DCM/EtAc = 6/4.

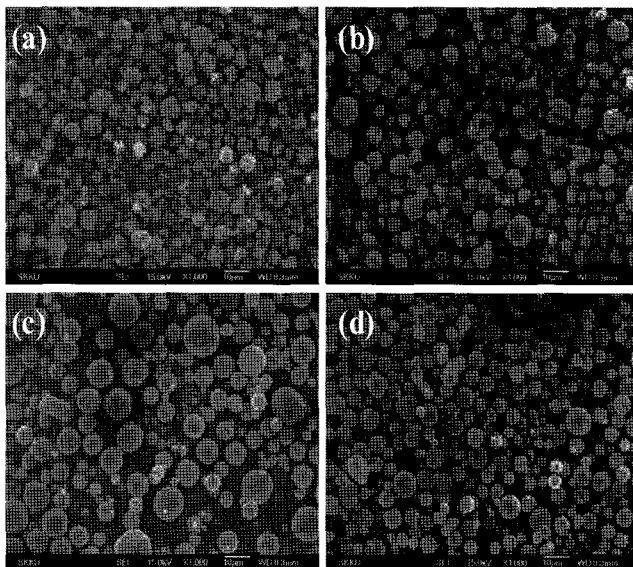
EtAc (물에 대한 용해도 = 8.7%, w/v)는 DCM (물에 대한 용해도 = 2.0%, w/v)에 비해 물에 더 높은 용해도를 가지고 있어 2차 유화 시 외부 수상으로 빠르게 추출되기 때문에 고분자 입자 제조 방법 중 용매 추출법에 많이 사용되고 있다 [33,34]. 본 실험에서는 DCM과 EtAc가 1 : 9, 2 : 8, 3 : 7, 4 : 6의 비율로 혼합된 용매 10 mL에 MPEG-PLLA (5-45)

150 mg을 용해시켜 입자를 제조한 후 두 용매의 혼합 비율에 따른 영향에 대해 검토하였다. 유상의 EtAc 함량 변화에 따라 제조된 입자의 SEM 사진을 Fig. 3에 나타내었다. 유상에 EtAc 첨가된 경우 첨가되지 않은 것에 비해 응집되고 불규칙한 형태의 입자들이 제조된 것을 볼 수 있다. 이는 액적으로부터 EtAc의 확산이 DCM의 급격한 증발과 동시적으로 이루어져 입자의 표면이 매끄럽지 못하고 미세돌기와 홈 등으로 이루어진 일그러진 형상의 입자를 제조하는 것으로 사료된다.

약물 봉입효율은 Table 2 (A3, C1-4)에서 보는 바와 같이 EtAc 첨가량 증가에 따라 감소하였다. 1차 유화의 형성 과정에서 EtAc의 첨가량이 높아질수록 상대적으로 물에 대한 혼합용매의 용해도가 높아지게 된다. 그래서 유상에 수상이 안정적으로 분산되지 못하고 유상에 부분적으로 용해되어 2차 유화과정에서 내부수상이 연속상인 외부수상으로 빠르게 확산되기 때문에 더 낮은 봉입효율을 갖게 된다.

### 3.5. 염의 영향

$W_1/O/W_2$  다중 에멀전에서 고분자가 용해된 유상은 내부수상과 외부수상 사이의 삼투압 발생에 의한 물질의 이동을 조절할 수 있는 반투과성 막과 같은 역할을 한다. 따라서 염의 농도차에 의한 삼투구배의 방향에 따라 내부 액적은 팽윤 또는 수축 할 수 있다. 본 연구에서 사용된 젬시타빈의 경우 물에 녹아 염 형태로 해리되어 존재하거나 전하를 띄지 않고 유리염기 상태로 존재한다. 내부 수상에 용해되어있는 젬시타빈의 농도가 증가 할수록 염의 농도가 증가하기 때문에 외부수상과 삼투구배가 증가하게 된다. 이는 내부 액적을 팽윤시키고 액적 간의 응집과 과도한 팽창을 발생시키기 때문에 중간의 유상이 파괴되고 결국 내부수상이 외부수상으로 방출되어 약물의 손실을 가져온다 [35]. 따라서 Fig. 1-2에서 보는 바와 같이 형태가 매우 불규칙하고 다공성을 가지는 입자가 제조되며, 제조된 입자는 낮은 봉입효율을 가지게 된다.



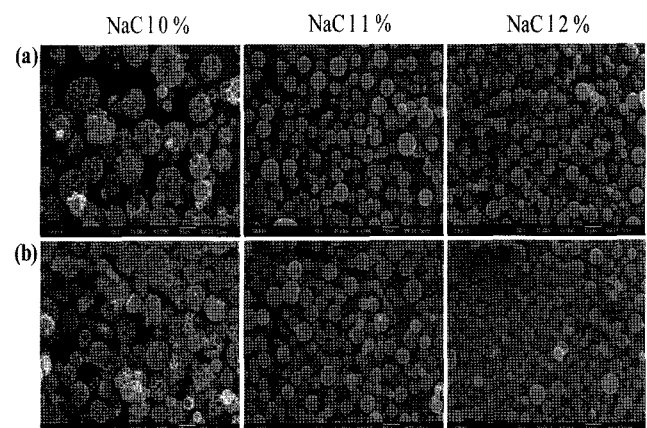
**Fig. 4.** SEM micrographs of gemcitabine-loaded MPEG-PLLA microparticles prepared using different NaCl concentrations in  $W_2$  phase: (a) 0.5% (w/v), (b) 1%, (c) 2%, and (d) 3%.

약물의 낮은 봉입효율을 개선하기 위해 외부수상에 염 (NaCl)의 첨가에 따른 영향에 대해 고찰하였다.  $W_1/O$ 의 부피비와 고분자의 양을 0.1과 150 mg으로 고정하고 외부수상의 NaCl 함량을 0-3% (w/v)까지 변화시켜 입자를 제조하였다. 그 결과 Table 2 (A3, D1-4)에 나타낸 바와 같이 NaCl을 첨가하지 않은 것에 비해 NaCl을 2% 첨가 시 약물 봉입효율이 약 4배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 NaCl의 첨가가 내부수상과 외부수상 간의 삼투압을 감소시켜 기공 생성을 감소시키기 때문이다. 또한 외부수상에 NaCl을 첨가하여 제조한 입자의 형태는 첨가된 양이 증가할수록 구형에 가까워지고, 매끄러운 표면과 기공의 수가 줄어드는 경향을 나타내었다 (Fig. 4).

### 3.6. MPEG 크기의 영향

앞서 실험한 결과에서 바탕으로 내부수상/유상 부피비와 고분자 농도를 0.1과 1.5% (w/v)로 고정하고 NaCl을 첨가하여, MPEG-PLLA 고분자에 대해 MPEG 함량에 따른 영향에 대해 고찰하였다. 고분자의 친수성 부분인 MPEG의 분자량 변화와 NaCl 첨가 비율에 따른 약물 봉입효율 변화는 Table 2 (A3, D1-4, F1-F6)에 나타내었다.

제조된 입자 형태는 SEM을 이용하여 관찰하였으며, 이를 Fig. 5에 나타내었다. 그림에서 보는바와 같이 외부수상에서 NaCl의 농도가 증가함에 따라 입자의 기공 수가 감소하고 입자 표면이 매끄러워지는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 반구형 형태의 입자 보다는 구형 입자가 제조되었으며, 입자의 크기 또한 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 앞서 설명한 바와 같이 내부수상에 용해된 젬시타빈 염에 의해 유발된 삼투압 차가 외부수상에 염의 첨가로 인해 감소하여 유화의 안정성이 증가하기 때문이다.



**Fig. 5.** Effect of MPEG block length and NaCl concentration on the morphology of MPEG-PLLA microparticles: (a) 2-45, and (c) 1-45.

외부수상에 첨가되는 NaCl의 양이 증가함에 따라 봉입효율은 MPEG 분자량 변화에 상관없이 증가하였다. 그러나 외부수상에 일정 농도 이상으로 염이 첨가된 경우 봉입효율은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 외부수상에 염의 첨가로 봉입효율이 증가하는 이유는 앞서 설명한 바와 같이 내부수상과 외부수상 사이의 삼투압 차가 감소하여 내부수상과

외부수상 사이의 물질 전달 효과가 감소고 유화가 더 안정한 상태를 유지하기 때문이다. 그러나 외부수상의 염 농도가 일정 농도 이상으로 증가할 경우 내부수상보다 외부수상의 염의 농도가 더 높아 내부수상이 외부수상으로 확산되기 때문에 봉입효율은 낮아지게 된다.

MPEG 사슬의 길이가 증가할수록 동일한 외부수상의 염 농도 조건에서 더 높은 봉입효율을 얻었다. 이는 고분자내 MPEG 사슬의 분자량이 증가함에 따라 고분자내 친수성 부분이 증가하여 친수성 약물인 젬시타빈에 대한 친화력이 증가하기 때문에 더 높은 약물 봉입효율을 가지게 된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 다중유화법을 이용하여 항암제인 젬시타빈이 함유된 고분자 입자를 제조하였다. 젬시타빈의 경우 물에 염 형태로 해리되어 존재하거나 전하를 띄지 않는 유리염기 상태로 존재한다. 그로 인해 내부수상과 외부수상의 삼투구배에 의해 다공성의 불규칙한 입자들이 제조되었으며, 낮은 약물 봉입효율을 가지는 것을 확인할 수 있었다. 외부수상에 NaCl 염 첨가를 통해 기공이 감소하고 구형 입자들을 제조할 수 있었으며, 더 높은 약물 봉입효율을 얻을 수 있었다. 또한, MPEG-PLLA 고분자내 친수성 부분인 MPEG 사슬의 분자량 증가를 통해 더 높은 약물 봉입효율을 얻을 수 있었다.

#### 감사

본 연구는 차세대 성장 동력 바이오신약장기사업단의 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### References

- Dutt, M. and G. K. Khuller (2001) Sustained release of isoniazid from a single injectable dose of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles as a therapeutic approach towards tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17: 115-122.
- Amperiadou, A. and M. Georarakis (1995) Controlled release salbutamol sulphate microcapsules prepared by emulsion solvent-evaporation technique and study on the release affected parameters. *Int. J. Pharm.* 115: 1-8.
- Zhang, P., L. Chen, W. Gu, Z. Xu, Y. Gao, and Y. Li (2007) *In vitro* and *in vivo* evaluation of donepezil-sustained release microparticles for the treatment of Alzheimer's disease. *Biomater.* 28: 1882-1888.
- Abdel-Rahman, S. I., G. M. Mahrous, and M. El-Badry (2009) Preparation and comparative evaluation of sustained release metoclopramide hydrochloride matrix tablets. *Saudi Pharm. J.* 17: 283-288.
- 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.
- Persidis, A. (1999) Cancer multidrug resistance. *Nature Biotech.* 17: 94-95.
- Yeo, Y., N. Baek, and K. Park (2001) Microencapsulation methods for delivery of protein drugs. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 213-230.
- 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.
- Joo, H. J., I.-I. Jung, G. Lim, and J.-H. Ryu (2011) Production of gemcitabine-loaded poly (L-lactide acid) microparticles using supercritical carbon dioxide: Effect of process parameters. *Kor. Soci. Biotechnol. Bioeng. J.* 26: 69-77.
- 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. *Biomater.* 21: 2475-2490.
- Qiao, M., D. Chen, X. Ma, and Y. Liu (2005) Injectable biodegradable temperature-responsive PLGA-PEG-PLGA copolymers: Synthesis and effect of copolymer composition on the drug release from the copolymer-based hydrogels. *Int. J. Pharm.* 294: 103-112.
- Hagan, S. A., A. G. A. Coombes, M. C. Garnett, S. E. Dunn, M. C. Davies, L. Illum, and S. S. Davis (1996) Poly(lactide-poly (ethylene glycol) copolymers as drug delivery systems: 1. Characterization of water dispersible micelle-forming systems. *Langmuir* 12: 2153-2161.
- Chen, L., Z. Xie, J. Hu, X. Chen, and X. Jing (2007) Enantiomeric PLA-PEG block copolymers and their stereocomplex micelles used as rifampin delivery. *J. Nanopart. Res.* 9: 777-785.
- de Faria, T. J., A. M. de Campos, and E. L. Senna (2005) Preparation and characterization of poly (D,L-lactide) (PLA) and poly (D,L-lactide)-poly (ethylene glycol) (PLA-PEG) nanocapsules containing antitumoral agent methotrexate. *Macromol. Symp.* 229: 228-233.
- Matsushima, A., H. Nishimura, Y. Ashihara, Y. Yakata, and Y. Inada (1980) Modification of E. coli asparaginase with 2,4-bis (o-methoxypoly-ethylene glycol)-6-chloro-s-triazene (activated PEG2); disappearance of binding ability towards anti-serum and retention of enzymatic activity. *Chem. Lett.* 9:773-776.
- Hinds, K. D. and S. W. Kim (2002) Effects of PEG conjugation on insulin properties. *Adv. Drug Del. Rev.* 54: 505-530.
- Tsubery, H., M. Mironchik, M. Fridkin, and Y. Shechter (2004) Prolonging the action of protein and peptide drugs by a novel approach of reversible polyethylene glycol modification. *J. Biol. Chem.* 279: 38118-38124.
- Mangeold, C. (2001) Chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. *Semin. Oncol.* 28: 1-6.
- Locher, C., E. Fabre-Guillevin, F. Brunetti, J. Auroux, J. C. 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.

25. Pasut, G., F. Canal, L. D. Via, S. Arpicco, F. M. Veronese, and O. Schiavon (2006) Antitumoral activity of PEG-gemcitabine prodrugs targeted by folic acid. *J. of Cont. Rel.* 127: 239-248.
26. Celanol, M., M. G. Calvagno, S. Bulotta, D. Paolino, F. Arturi, D. Rotiroti, S. Filetti, M. Fresta, and D. Russo (2004) Cytotoxic effects of Gemcitabine-loaded liposomes in human anaplastic thyroid carcinoma cells. *BMC Cancer* 4: 1-5.
27. Gang, J., S.-B. Park, W. C. Hyung, E. H. Choi, J. Wen, H.-S. Kim, Y.-G. Shul, S. J. Haam, and S. Y. Song (2007) Magnetic poly  $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles containing  $Fe_3O_4$  and gemcitabine enhance anti-tumor effect in pancreatic cancer xenograft mouse model. *J. Drug Targeting* 15: 445-453.
28. Lee, S. Y., S. H. Lee, and J. H. Kim (2000) Synthesis and characterization of linear and star-shaped poly (lactic acid) stereo-block copolymers. *Polymer (Korea)* 24: 638-645.
29. O'Donnell, P. B. and J. W. McGinity (1997) Preparation of microsphere by the solvent evaporation technique. *Adv. Drug Del. Rev.* 28: 25-42.
30. Mokleby, T. (2009) *Active loading of gemcitabine into liposomes*. Master Thesis. University of Tromsø, Tromsø, Norway.
31. Pistel, K.-F. and T. Kissel (2000) Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique. *J. Microencapsul.* 17: 467-483.
32. Rosca, I. D., F. Watari, and M. Uo (2004) Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation. *J. Contr. Rel.* 99: 271-280.
33. Wei, Q., W. Wei, R. Tian, L.-Y. Wang, Z.-G. and Sua, G.-H. Ma (2008) Preparation of uniform-sized PELA microspheres with high encapsulation efficiency of antigen by premix membrane emulsification. *J. Colloid Interface Sci.* 323: 267-273.
34. Meng, F. T., G. H. Ma, W. Qiu, and Z. G. Su (2003) W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effect of its diffusion rate on the characteristics of microparticles. *J. Control. Rel.* 91: 407-416.
35. Cohen-Sela, E., M. Chomy, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, and G. Golomb (2009) A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles. *J. Control. Rel.* 133: 90-95.