

초임계 유체를 이용한 PLGA 입자 제조에 첨가제가 미치는 영향

정인일* · 함승주* · 임교빈 · 유종훈†

수원대학교 화학공학과, *연세대학교 화공생명공학과
(2011년 4월 19일 접수, 2011년 6월 24일 수정, 2011년 7월 26일 채택)

Effect of an Excipient on the Formation of PLGA Particles Using Supercritical Fluid

In-Il Jung*, Seungjoo Haam*, Giobin Lim, and Jong-Hoon Ryu†

Department of Chemical Engineering, The University of Suwon, Gyeonggi-do 445-743, Korea

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

(Received April 19, 2011; Revised June 24, 2011; Accepted July 26, 2011)

초록: 본 연구에서는 초임계 aerosol solvent extraction system(ASES) 공정을 이용하여 poly(lactic-co-glycolic acid)(PLGA) 미립자를 제조하기 위해 첨가제로 hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD)를 사용하였으며, HP- β -CD의 첨가량이 PLGA 입자의 형상에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 항암제인 파클리탁셀이 봉입된 미립자를 제조하여 HP- β -CD의 함량에 따른 약물 방출 특성의 변화를 고찰하였다. PLGA(75:25)의 경우 HP- β -CD를 고분자 중량 대비 약 40%까지, PLGA(50:50)의 경우 약 30%까지 첨가하였을 때 미립자가 형성되었으며, HP- β -CD의 첨가량이 이보다 더 적은 경우에는 PLGA가 필름 형태로 형성되었다. 파클리탁셀이 봉입된 PLGA/HP- β -CD 미립자의 경우 HP- β -CD의 함량이 증가함에 따라 더 빠른 속도로 약물이 방출됨을 확인할 수 있었다.

Abstract: In this study, we employed hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD) as an excipient to produce poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) fine particles by a supercritical fluid process, called aerosol solvent extraction system (ASES), and investigated the effect of HP- β -CD content on the morphology of the particles. The influence of HP- β -CD on the drug release characteristics of paclitaxel-loaded PLGA particles was also evaluated. Fine particles were obtained when the HP- β -CD content in PLGA/HP- β -CD mixtures was greater than 40% and 30%, respectively, for PLGA(75:25) and PLGA(50:50), whereas a film-like precipitate was obtained for lower HP- β -CD content. The release rate for paclitaxel loaded PLGA(75:25)/HP- β -CD particles was found to increase with HP- β -CD content.

Keywords: supercritical fluid, PLGA, cyclodextrin, fine particles, paclitaxel.

서 론

약물의 부작용을 줄이고 효능 및 효과를 극대화하기 위한 방법으로 약물을 고분자와 함께 침전시켜 나노 및 마이크로 단위의 크기를 가지는 입자를 제조하여 이용하는 고분자 약물전달시스템(polymeric drug delivery system)에 관한 많은 연구가 진행되고 있다.¹⁻⁵ 이 중 약물의 지속성 방출 제는 주로 소수성 고분자에 약물을 봉입하여 약물의 방출 속도를 제어하는 기술로써 생체적합성과 생분해성을 가지는 고분자가 주로 이용되고 있다.

고분자 약물전달시스템의 제조에 이용되고 있는 합성 고분자로는 주로 poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ϵ -

caprolactone) (PCL), polyanhydride, poly(ortho ester) 등이 있다.³ 그 중에서 특히 lactide와 glycolide의 공중합체인 PLGA는 FDA (Food and Drug Administration) 승인을 받은 고분자로 생체적합성과 생분해성의 특성과 lactide와 glycolide의 중합비와 분자량에 따라 다양한 분해속도를 가지고 있어 가장 널리 이용되어지고 있다.^{6,7}

현재 널리 연구되는 고분자 약물전달시스템을 위한 나노 및 마이크로 입자의 제조 방법으로는 유화된 단량체를 중합하는 화학적인 방법과 단일 및 이중유화법, 용매증발법, 냉동건조법, 분무건조법 등의 물리적인 방법을 들 수 있다. 이들 기존 방법은 고분자의 물에 대한 낮은 용해도 때문에 methylene chloride와 chloroform과 같은 유기용매의 사용이 요구되며, 과량의 에너지 소비, 다량의 폐유기용매, 폐계면활성제 및 폐수의 배출로 인한 환경오염, 낮은 수율, 고비용, 열민감성 물질의 효능 감소, 단백질 의약품의 활성 감소, 물질 내의 잔류 유기용매 등 많은 문제점을 안고

†To whom correspondence should be accessed.
E-mail: jhryu@suwon.ac.kr

있다. 이러한 문제점들의 해결 방안으로 최근에 고분자 약물전달시스템을 위하여 지속가능한 환경친화적 대체 기술로서 초임계 유체(supercritical fluid)를 이용한 미립자의 제조 기술에 대한 많은 연구가 활발히 진행되고 있다.^{8,9}

초임계유체를 이용한 대표적 입자 제조 방법들로는 초임계유체를 용매, 역용매, 또는 용질로 이용하느냐에 따라 RESS (rapid expansion of supercritical solutions), SAS (supercritical antisolvent), PGSS (particles from gas saturated solutions) 공정으로 나눌 수 있다. 이들 방법 중 용질이 용해된 용매에 대해 초임계 유체가 역용매로 이용되는 SAS 공정이 가장 많이 이용되고 있으며, SAS 공정은 aerosol solvent extraction system (ASES) 또는 precipitation with a compressed antisolvent (PCA) 공정으로도 알려져 있다. 이 방법에서 입자는 용질이 용해된 용액을 미세 노즐을 통해 초임계 유체가 채워진 반응기 내부로 분사될 때 생성된 미세 액적과 초임계 유체간의 상호 물질전달에 의해 용매의 용질에 대한 용해도 감소를 통한 용질의 과포화 발생에 의해 제조되게 된다.

생분해성 고분자인 poly(L-lactide)(PLLA)는 SAS 공정을 이용한 미세입자의 제조에 많은 연구가 진행되어져 왔으나,¹⁰⁻¹² 대표적인 생분해성 고분자로 약물 전달체로 널리 이용되고 있는 PLGA의 입자 제조에 대한 연구는 극히 드물게 보고되고 있다. 이는 준결정성(semicrystalline) 고분자인 PLLA의 경우 초임계 역용매 내에서 빠르게 침전되기 때문에 입자 형성이 잘 이루어지나, 비결정성 고분자로 알려진 PLGA의 경우 초임계 이산화탄소에 의해 가소화되는 특성을 가지고 있어 초임계 역용매 내에서 유기용매와 초임계 이산화탄소의 혼합유체에 의해 가소화되어 빠르게 고형화되지 못하기 때문으로 알려져 있다.^{13,14}

앞선 연구자인 Gupta 등은¹⁵ SAS 공정에 초음파를 적용한 SAS-EM (supercritical antisolvent technique with enhanced mass transfer) 법을 이용하여 dexamethasone phosphate가 함유된 PLGA 입자를 제조하였으며, Pu 등은¹⁶ SEDS (solution enhanced dispersion by supercritical fluids)법을 이용하여 PLLA/PLGA 블렌딩을 통한 입자제조 연구를 수행한 바 있다.

본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 역용매로 이용하는 입자제조 방법 중 ASES법을 이용하여 PLGA 입자를 제조하기 위해 싸이클로덱스트린(cyclodextrins, CDs)을 첨가제로서 사용하였다. CDs는 6 내지 8개의 포도당분자들이 환상으로 연결되어 입체적 특이성을 지니는 거대 분자로 결합된 포도당 분자의 개수에 따라 α -, β -, γ -CD로 구분된다. 환상 고리구조를 지니는 CDs는 포도당 결합수에 따라 α -CD의 경우 4.7~5.3 Å, β -CD의 경우 6.0~6.5 Å, γ -CD의 경우 7.5~8.3 Å의 각각 다른 크기의 내부 공동(cavity)을 지니고 있다.

CDs의 내부는 수소결합과 에스테르 결합으로 인하여 소수성 특성을 가지며, 포도당의 외부로 노출된 C6 위치에 있는 수산기(hydroxy group)로 인하여 친수성의 성질 또한 지니고 있다. 이러한 구조적 입체 특이성과 친수성 및

소수성을 동시에 가지고 있는 성질로 인하여 다양한 소수성 물질과 포접복합체(inclusion complexation)를 형성하며, 식품, 화장품 및 의약품 등 다양한 산업분야에서 이용되고 있다.¹⁷

CD(host)와 포접복합체를 형성하는 소수성 외부물질(guest)은 CD 공동 내의 소수성 부분과 소수성-소수성 결합, van der Waals 결합, 수소결합 및 CD 공동 내의 고에너지 분자의 방출에 의한 에너지 감소 등의 작용 등의 효과로 포접복합체를 형성하게 된다.¹⁸

CD와의 포접복합체 형성은 물질의 안정성 향상 및 용해도의 증가 목적으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 이렇게 CD와 포접복합체를 형성할 수 있는 소수성 외부 물질은 저분자량의 약물, 염료, 단량체뿐만 아니라 고분자, 단백질, 펩타이드와 같은 고분자량의 물질도 포함한다. 특히, 선형 고분자인 PCL, PLLA, poly(ethylene glycol) 등의 고분자는 CD와 포접복합체를 형성하며,¹⁹⁻²¹ 최근에는 고분자와 CD의 포접복합체를 이용한 약물 방출 제어 연구와 약물과 CD 포접복합체를 고분자에 봉입하여 봉입률과 방출속도를 제어하는 연구도 진행되고 있다.²²⁻²⁴

이에 본 연구에서는 초임계 ASES 공정을 이용하여 약물전달체로 가장 많이 이용되고 있는 PLGA에 HP- β -CD를 첨가하여 미세입자의 제조에 대한 연구를 수행하였다. 35 °C의 온도와 8.5~15 MPa의 압력조건에서 실험을 수행하였으며, 두 종류의 PLGA에 대하여 HP- β -CD 첨가량 변화가 입자의 형상에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 항암제인 파클리탁셀이 봉입된 미립자를 제조하여 HP- β -CD 첨가량 변화에 따른 약물 방출 특성 변화를 고찰하였다.

실 험

재료. 본 연구에서는 두 종류의 PLGA(75:25)(L/G=75/25, inherent viscosity: 0.55-0.75 dL/g, Lactel Biodegradable Polymer, USA)와 PLGA(50:50)(L/G=50:50, Resomer® RG 504H, Mw 48000 Da, Boehringer Ingelheim, Germany)을 사용하였으며, hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD, Sigma-Aldrich, USA)은 4.0~6.0 범위의 hydroxypropyl group 치환도(degree of substitution)를 가지는 것을 사용하였다. 난용성 약물인 파클리탁셀(paclitaxel, Samyang Co., Korea)은 구입 후 추가적인 정제 없이 이용하였다. 초임계 유체로는 99.95%의 순도를 지니는 이산화탄소를 사용하였으며, PLGA와 HP- β -CD를 용해하기 위한 용매로 HPLC급의 N-methylpyrrolidone (NMP, Sigma-Aldrich, USA)와 dichloromethane (DCM, Fisher Scientific, USA)을 구입하여 더 이상 정제 없이 사용하였다.

부피 팽창도. 초임계 유체 ASES 공정을 이용한 미립자 제조 실험에서 용질의 용해에 사용되는 유기용매와 초임계 유체간의 혼화성(miscibility)은 중요한 변수이다. 유기용매와 초임계 이산화탄소의 상호 친화성 측정은 부피 팽창도 실험 방법을 이용하였다.²⁵ 일정 온도조건에서 이산화탄소 압력 증

가에 따라 나타나는 내부의 현상을 육안으로 관찰하기 위하여 사파이어 실린더를 사용하였으며, 유체들의 혼합성을 향상시키기 위하여 내부에 마그네딕바를 이용하여 교반하였다.

부피 팽창도 측정의 일정부피의 용매를 대기압 상태의 사파이어 실린더에 넣고 초기 높이를 기록한 후 이산화탄소를 가압하면서 수행되었다. 이산화탄소는 사파이어 실린더 내부에서 유기용매의 높이 변화를 더 이상 측정할 수 없을 때까지 가압되었으며, 이때 부피 팽창도는 약 800%를 나타내었다. 이산화탄소 가압에 따른 용매의 부피는 이산화탄소와 용매를 1시간 동안 교반하면서 평형상태를 유지한 후 그때의 압력과 높이를 측정하였으며, 일정 온도에서 압력에 따른 용매의 부피 팽창도는 아래 주어진 식으로부터 계산하였다.

부피팽창도(%) =

$$\frac{\text{주어진 압력에서 용매 부피} - \text{대기압 상태에서 용매 부피}}{\text{대기압 상태에서 용매 부피}} \times 100$$

미세입자 제조. 200 mg의 PLGA를 10 mL의 NMP에 용해한 후 다른 양의 HP-β-CD를 PLGA 용액에 첨가하여 50 °C의 초음파조에서 4시간 처리한 후 상온으로 냉각하였다. 유기용매로 사용된 NMP와 초임계 이산화탄소와의 혼합성을 향상시키기 위해 NMP와 동일량의 DCM을 첨가하여 혼합 용액을 제조한 후 ASES 방법을 이용하여 입자를 제조하였다. 이때 HP-β-CD는 고분자 중량 대비 30~200%의 범위로 첨가하였다.

본 연구에서 사용된 초임계 유체 ASES 입자 제조 장치의 개략도를 Figure 1에 나타내었으며, 그림에서 나타낸 바와 같이 ASES 장치는 액체 상태의 이산화탄소를 공급하기 위한 고압 펌프, 용액의 주입 및 분사를 위한 고압 정량 펌프 및 노즐, 입자 형성이 일어나는 고압 침전기, 입자 제조에 사용된 이산화탄소와 용매를 분리하기 위한 분리조 등으로 구성되어 있다. 입자 형성이 이루어지는 고압 침전기는 고압에서 견딜 수 있는 사파이어 윈도우를 장착하여 내부를 관찰할 수 있게 제작되었다.

액체 상태의 이산화탄소는 액체 고압 펌프(high pressure pump, EL-1, Lewa, Germany)에 의해 가압되기 전 캐비테이션(cavitation)을 방지하기 위해 0 °C 이하로 냉각되었으며, 고압 펌프에 가압된 이산화탄소는 후방압력조절기(back-pressure regulator, 26~1700, Tescom, USA)에 의해 요구되는 압력으로 조절되고 공정 온도로 예열된 후 고압 침전기의 상단으로 연속적으로 공급되어진다. 위에서 제조한 혼합 용액은 고압 주사형 정량펌프(high pressure syringe pump, 500D, Teledyne Isco, USA)에 의해 공급되고, 공정 온도로 예열된 후 침전기의 상단에 장착된 내경 127 μm 크기의 노즐을 통해 초임계 이산화탄소 상으로 연속적으로 액적(droplet)을 형성하면서 분사되어 입자를 형성하게 된다.

혼합용액을 공급하기 전에 침전기 내부를 정상상태로 유지하고 혼합용액의 공급 시 노즐 내에서 초임계 이산화탄소와 접촉을 통한 입자의 형성을 차단하기 위해 혼합용액을 공급하기 전 혼합용액에 사용된 순수한 용매를 공급

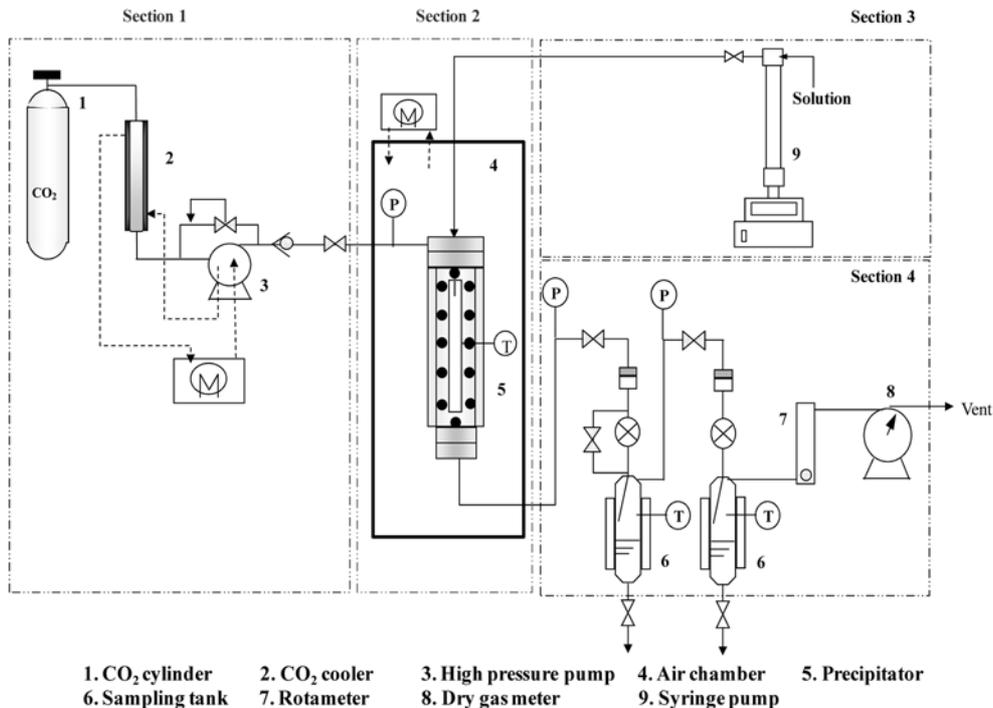


Figure 1. Schematic diagram of supercritical ASES apparatus.

하였으며, 혼합용액의 분사 후 노즐에 남아있는 혼합용액을 제거하기 위해 순수한 혼합용매 1 mL를 분사하였다. 용매의 분사 후 고압 침전기 및 생성된 입자 내에 잔류하는 용매를 제거하기 위해 30분 동안 순수한 초임계 이산화탄소를 연속적으로 공급하여 건조하였다. 건조 후 노즐에 남아 있는 용매가 감압 시 침전기 하단으로 떨어지는 것을 방지하기 위해 초임계 이산화탄소를 노즐을 통해 역류시켜 노즐에 남아있는 잔류 용매를 제거하였다.

침전기 하단에는 5 μm 의 공극을 지니는 금속 필터를 장착하여 형성된 입자들의 수집이 이루어지도록 하였다. 이때, 사용된 용매는 초임계 이산화탄소와 함께 침전기 이후에 구성되어진 용매 회수부에서 이산화탄소의 감압에 따라 자발적인 분리와 회수가 이루어지도록 하였다. 초임계 ASES 공정을 이용한 PLGA/HP- β -CD의 입자 제조를 위한 이산화탄소와 혼합용액의 유속은 20 g/min과 1 mL/min으로 고정하여 사용하였으며, 35 °C의 온도와 8.5~15 MPa의 압력조건에서 입자를 제조하였다.

입자특성 분석. 초임계 ASES법을 이용하여 제조된 PLGA/HP- β -CD 입자의 회수율은 주입된 혼합용액의 부피와 농도에 따른 PLGA와 HP- α -CD의 무게에 대하여 침전기 내부에서 제조된 후 얻어진 무게의 비로 나타내었다. 제조된 입자의 크기 및 형상은 전계방출 전자현미경(field emission scanning electron microscopy, FE-SEM, JSM6700F, JEOL, Japan)을 통하여 관찰하였으며, 시차주사열량계(differential scanning calorimetry, DSC, DSC2010, TA Instrument, USA)를 이용하여 PLGA/HP- β -CD의 무게 비율 변화에 따라 제조된 입자에 대하여 20 °C/min의 속도로 30 °C에서 180 °C까지 가온하여 열적특성을 확인하였다.

분리효율 및 방출특성. 제조된 입자내 파클리탁셀 함량은 약 6 mg의 얻어진 미립자를 1 mL의 DCM에 완전히 용해시킨 후 15 mL의 acetonitrile:water(60:40, v/v) 용액을 첨가하여 혼합하여 측정하였다. 이 때 혼합용액은 2개의 층으로 분리되었으며, 분리된 각 용액층에서 일정한 양을 채취한 후 0.45 μm 실린지 필터를 이용하여 여과하여 제조된 입자 내 파클리탁셀의 함량을 측정하였다.

파클리탁셀 함량 측정은 high-performance liquid chromatography (HPLC, 600 Series, 717 Autosampler, Waters, USA)를 이용하였으며, Hypersil ODS-2 column(5 μm , 150 \times 4.6 mm, Thermo Electron, USA)을 분석 컬럼으로 사용하였다. 이동상으로는 acetonitrile, water, MeOH(58:37:5, v/v/v)의 혼합 용액을 1.0 mL/min의 유속으로 사용하였으며, 254 nm의 파장에서 자외선 검출기를 사용하여 파클리탁셀의 함량을 미리 작성된 검량곡선을 이용하여 분석하였다.

입자에 포함된 파클리탁셀의 *in vitro* 방출특성은 phosphate buffered saline contains 0.05% tween 20(0.01 M PBST, pH 7.4)을 이용하였다. 약 5 mg의 제조된 미립자를 10 mL의 PBST에 분산시킨 후 이 용액을 37.0 \pm 0.5 °C의 일정 온도로 유지하며 shaking incubator에 넣고 120 rpm으로 *in vitro* 방출 시험을 수행하였다. 일정 시간 동안 방출된 약물의 양을

측정하기 위해 약물이 방출된 PBST 용액 9 mL를 취하여 분석하였으며, 동량의 PBST를 추가로 첨가하여 동일한 조건을 유지하며 방출 시험을 계속하였다. 채취한 용액 중의 약물함량을 분석하기 위해 앞에서 언급한 방법의 HPLC를 사용하였다.

결과 및 토론

용매의 부피 팽창도. 본 실험에서 입자 제조에 사용된 50% NMP- DCM 용매와 역용매로 사용된 이산화탄소의 친화성을 평가하기 위해 35 °C의 온도에서 이산화탄소의 압력 증가에 따른 용매의 부피 팽창도를 측정하였으며, 그 결과를 Figure 2에 나타내었다. 그림에서 보듯이 35 °C의 온도에서 가압된 이산화탄소의 압력 증가에 따라 용매의 부피가 서서히 증가하였으며, 일정 압력 이상에서 급격히 상승한 것을 확인할 수 있다. 용매의 부피가 이산화탄소의 압력 증가에 따라 증가하는 이유는 더 높은 압력에서 용매에 용해되는 이산화탄소의 양이 증가하기 때문이다. 동일 온도와 압력조건에서 이산화탄소와의 친화력이 더 큰 용매일수록 더 많은 양의 이산화탄소가 용매에 용해되기 때문에 용매의 부피 팽창률이 더 크다. 실험 결과 동일 압력 조건에서 DCM이 NMP보다 더 높은 부피 팽창률을 보여주고 있으며, 이는 DCM이 NMP보다 이산화탄소와의 친화력이 더 크다는 것을 의미한다.

두 용매가 혼합된 혼합용매의 부피 팽창도는 두 용매 사이의 부피 팽창도를 보이고 있다. DCM에 NMP가 혼합된 경우 부피 팽창도는 더 낮은 부피 팽창률을 보이는 NMP 쪽으로 이동하는 것을 볼 수 있다. DCM의 경우 6.5 MPa 근처에서 800% 부피 팽창률을 보이나, 50% DCM-NMP의 경우 6.8 MPa 근처에서 800% 이상의 부피 팽창도를 나타내고 있다. 실험 결과로부터 혼합용매의 부피 팽창률은 혼합되는 두 용매의 혼합비에 따라 두 용매의 부피 팽창률

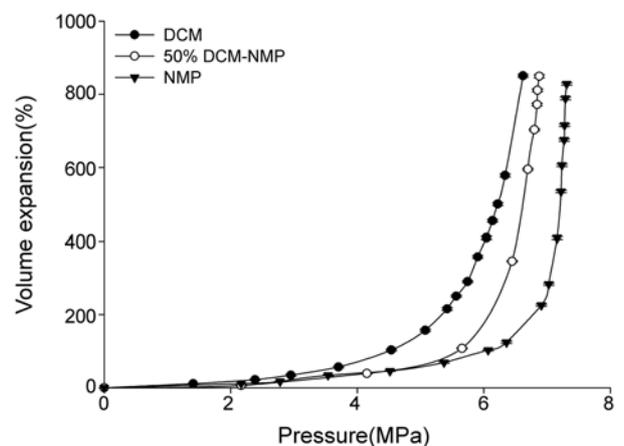


Figure 2. Variation in the volume expansion of DCM, 50% DCM-NMP and NMP with CO₂ pressure at 35 °C.

사이에서 변화할 것으로 예측되며, 미립자의 제조에 사용된 50% DCM-NMP 혼합용매는 8.5 MPa 이상의 압력조건에서 이산화탄소와 단일상이 형성됨을 확인할 수 있다.

투입비의 영향. 일반적으로 초임계 이산화탄소는 고분자를 가스화시키는 가스제로서 작용하기 때문에 초임계 이산화탄소 하에서 고분자의 유리전이온도(glass transition temperature, T_g) 또는 녹는점(melting point, T_m)은 상압에서 보다 더 낮은 값을 가지게 된다. ASES 법을 이용하여 비결정성(amorphous) 고분자인 PLGA의 미립자 제조 실험을 수행한 결과 미립자를 회수할 수 없었으며, 소량의 생성된 입자들은 침전기 벽, 필터 위와 아래에 끈적끈적한(sticky) 상태로 붙어 있었다. 이러한 이유는 노즐을 통해 분무된 액적 내 고분자를 용해하기 위해 사용된 유기용매와 역용매인 초임계 이산화탄소의 혼합유체가 가스제(plasticizer)로 작용하여 고분자 사슬간의 상호결합력을 약화시켜 고분자의 침전이 이루어지지 못하도록 방해하기 때문이다. 즉, PLGA 매트릭스 내로 침투한 초임계 이산화탄소가 가스제 역할을 하여 고분자의 T_g 가 감소하게 되며, PLGA 매트릭스 내로 침투한 초임계 이산화탄소와 잔류하는 용매가 PLGA 매트릭스에서 분리되지 않고 잔류하기 때문에 빠르게 고체화되지 못하고 끈적끈적한 상태로 존재하게 된다.¹⁴ 반면, Marco and Reverchon의²⁶ 연구 결과에서 결정성인 CD는 초임계 ASES 법에 의해 입자들이 잘 제조되는 것을 확인할 수 있다.

본 실험에서는 PLGA의 미립자를 제조하기 위해 HP- β -CD를 첨가제로서 첨가하여 초임계 ASES법을 이용하여 미립자 제조에 대한 실험을 수행하였다. 초임계 ASES 공정을 이용한 미립자 제조 실험에서 이산화탄소를 초임계 유체로 사용하였으며, 35 °C, 10 MPa의 온도, 압력 조건에서 20 g/min의 이산화탄소 유량, 1 mL/min의 용액의 유량을 고정하고 HP- β -CD를 PLGA 중량 대비 30%에서부터 200% 범위로 조절하여 미립자 제조에 관한 연구를 수행하였다.

Table 1에서와 같이 두 가지 PLGA 모두 HP- β -CD의 양이 증가할수록 회수된 미립자의 양은 증가하는 경향을 보이는 것을 확인할 수 있다. HP- β -CD가 PLGA 대비 20% 이하로 첨가된 경우 미립자는 제조되지 않았으며, 필터 위에 필름을 형성하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 첨가되는 HP- β -CD가 일정 비율 이하로 첨가된 경우 먼저 침전이 이루어지는 HP- β -CD의 양이 감소하여 유기용매와 초임계 이산화탄소의 혼합유체에 의해 가스화되는 PLGA 영역이 증가하여 고체화가 잘 이루어지지 않기 때문으로 사료된다.

HP- β -CD 첨가량에 따른 미립자의 형성에 있어서 PLGA (50:50)의 경우 HP- β -CD를 고분자 중량 대비 약 30%까지, PLGA(75:25)의 경우 약 40%까지 첨가하였을 때 미립자가 제조되었다. 초임계 이산화탄소는 PLGA에 용해되어 고분자를 가스화시키는 특성을 가지고 있다. 고분자내 이산화탄소의 용해도는 고분자와 이산화탄소의 상호 친화력보다 고분자의 자유부피(free volume)에 더 큰 영향을 받기 때문에 PLGA에 용해되는 이산화탄소의 양은 PLGA 중 glycolide

Table 1. Summary of Preparative Conditions of Various PLGA Particles and Their Recovery

Polymer	Feed ratio ^a	T (°C)	P (MPa)	Shape	Particle recovery (%)	Drug recovery (%)	
PLGA (50:50)	1:2	35	10	aggregated particles	82.7	-	
	1:0.7				81.9	-	
	1:0.4				83.9	-	
	1:0.3				31.3	-	
	1:0.2			film	-	-	
PLGA (75:25)	1:2	35	10	aggregated particles	85.4	-	
	1:0.7				79.5	-	
	1:0.4			65.7	-		
	1:0.3			film	-	-	
PLGA (75:25)	1:0.7	35	13	aggregated particles	8.5	34.0	
					15	84.0	-
					15	81.9	-
PLGA (75:25)	1:2 ^b	35	13	aggregated particles	83.2	55.4	
	1:4 ^b				83.5	65.0	
	1:8 ^b				84.3	70.1	

^aWeight ratio of PLGA:HP- β -CD. ^bMolar ratio of paclitaxel:HP- β -CD.

부분이 증가함에 따라 감소하게 된다.²⁷ 따라서 glycolide의 함량이 더 높은 PLGA(50:50)의 경우 고분자에 용해되어 고분자 사슬들을 가스화시키는 이산화탄소의 양이 더 적기 때문에 초임계 이산화탄소를 이용한 입자제조 공정에서 첨가제인 CD 양이 상대적으로 적게 투입되더라도 미립자가 형성될 수 있는 것으로 사료되며, 이에 대한 자세한 이론적 규명을 위해서는 추후 좀 더 구체적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Figure 3에서는 PLGA/HP- β -CD의 투입비 변화에 따라 제조된 미립자의 SEM 사진을 보여주고 있다. SEM 사진에서 보는 것과 같이 생성된 단위 입자의 경우 매우 작은 크기를 가지고 있으나 서로 연결된 네트워크 형태를 가지고 있음을 확인할 수 있다. 이러한 현상은 HP- β -CD의 양이 감소함에 따라 더욱 뚜렷하게 나타났다. 단위 입자들이 서로 연결된 네트워크 형태의 미립자를 이루는 것은 유기용매와 초임계 이산화탄소의 혼합유체에 의해 PLGA가 빠르게 침전되지 못하고, 침전된 미립자 중 PLGA가 혼합유체에 의해 다시 가스화되어 주위 미립자와 합쳐지기 때문이다.

압력의 영향. 35 °C의 온도 조건에서 PLGA(75:25)/HP- β -CD를 1:0.7의 비율로 고정하고 8.5, 10, 13, 15 MPa의 압력 변화에 따른 입자 형성에 대한 영향을 검토하였다. 사파이어 윈도우가 장착된 관찰창을 통해 노즐을 jet

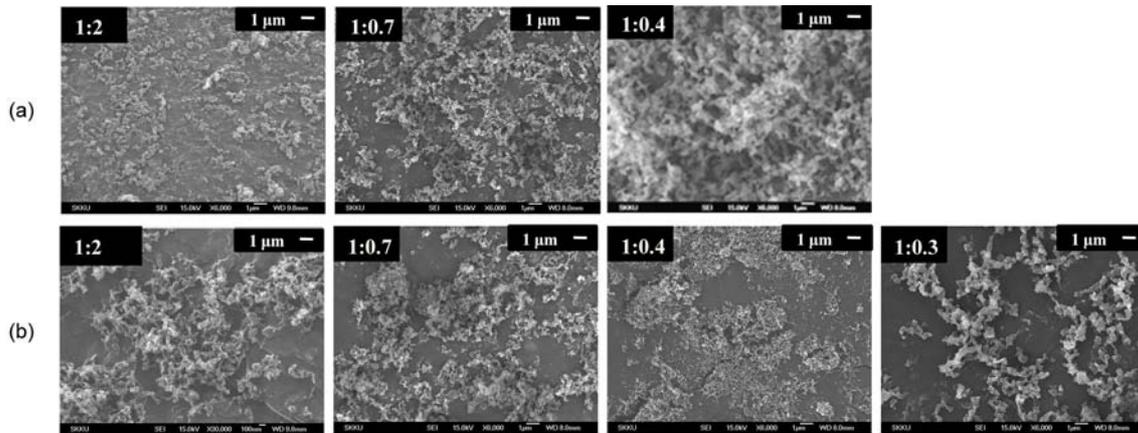


Figure 3. SEM micrographs of the ASES-processed particles with different feed ratios of PLGA/HP- β -CD: (a) PLGA(75:25); (b) PLGA(50:50).

breakup (노즐 끝에서 액체가 분무될 때 액적(droplet)이 형성되는 시점)을 관찰하였다. 그 결과 8.0 MPa 이하의 압력조건에서는 혼합용액이 노즐을 통해 분사될 때 jet breakup이 발생하지 않았으며, 8.5 MPa 이상의 압력조건에서 노즐을 통한 분무 시 jet breakup이 일어나 액적이 형성되는 것을 확인할 수 있었다.

Table 1에서 보는 바와 같이 미립자의 회수율은 8.5 MPa에서는 34%로 낮게 나타났으며, 10 MPa 이상의 압력조건에서는 약 80% 이상의 입자 회수율을 얻을 수 있었다. 이는 낮은 압력 조건(8.5 MPa)에서 초임계 이산화탄소가 가지는 밀도가 낮아 용매를 빠르게 추출하지 못하고 상대적으로 초임계 이산화탄소 대비 용매의 비율이 높아 PLGA/HP- β -CD의 과포화가 느리게 진행되어 빠르게 침전이 이루어지지 못하고 침전기 하단의 필터를 통해 밖으로 배출되는 양이 많아 낮은 회수율을 가지게 된다. 반면 10 MPa 이상의 압력조건에서는 초임계 이산화탄소 밀도 증가로 PLGA/HP- β -CD가 더 빠르게 침전되기 때문에 회수율이 증가하게 된다.

10 MPa 이상의 압력 조건에서 압력이 증가함에 따라 미립자 회수율은 큰 차이가 없었으며, 이를 통해서 35°C 공정 온도에서 압력이 10 MPa 이상인 경우 PLGA/HP- β -CD의 침전이 침전기 내부에서 이루어 짐을 알 수 있다. 압력 변화에 따라 제조된 미립자 형태는 SEM 분석을 통해 관찰하였으며, 이를 Figure 4에 나타내었다. 그림에서 나타낸 바와 같이 제조된 미립자 형태는 압력 증가에 따라 큰 차이가 없었으며, 작은 단위 입자들이 서로 엉겨 큰 미립자를 형성하고 있음을 확인할 수 있었다.

물리화학적 특성 분석. 원료물질 상태의 PLGA와 HP- β -CD와 ASES 공정에 의해 제조된 PLGA/HP- β -CD 입자의 열적 특성을 DSC를 이용하여 분석하였으며, 그 결과를 Figures 5, 6에 나타내었다. 그림에서 보여주는 바와 같이 PLGA의 T_g 는 PLA의 비율이 더 높은 PLGA(75:25)가 PLGA(50:50)보다 더 높은 값을 가지고 있음을 확인할 수 있다. HP- β -CD의 경우 매우 넓은 온도 범위에서 흡열피크를 보여주고 있으며, 이러한 현상은 HP- β -CD 내에 수

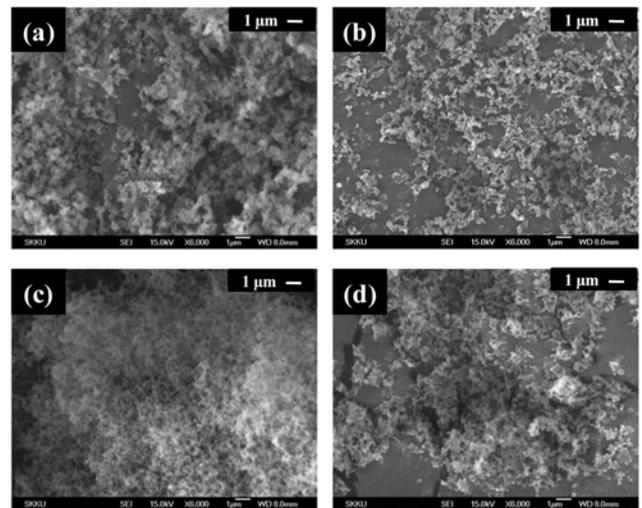


Figure 4. SEM micrographs of various ASES-processed PLGA(75:25)/HP- β -CD(1:0.7) particles prepared at different pressures: (a) 8.5; (b) 10; (c) 13; (d) 15 MPa.

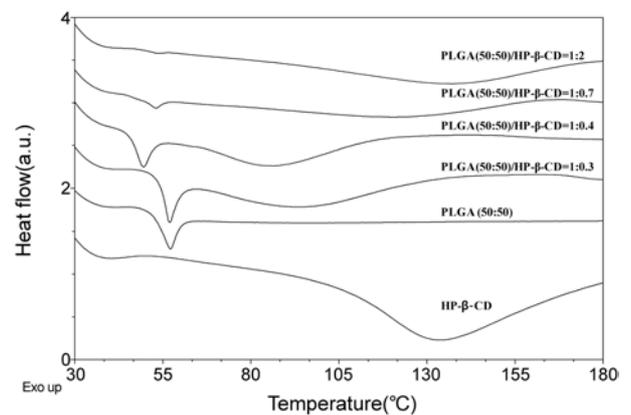


Figure 5. DSC thermograms of HP- β -CD, PLGA(50:50) and ASES-processed PLGA(50:50)/HP- β -CD particles prepared using different feed ratios.

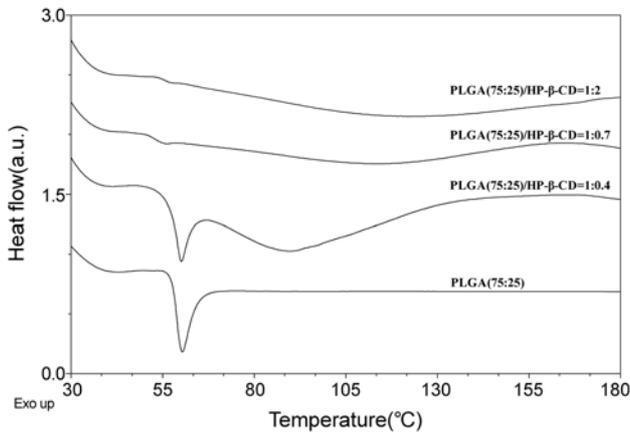


Figure 6. DSC thermograms of unprocessed PLGA(75:25) and ASES-processed PLGA(75:25)/HP- β -CD particles prepared with different feed ratios.

화물의 형태로 존재하는 물이 빠져나가면서 나타나는 CD의 전형적인 특성이다.²⁸

ASES법으로 제조된 PLGA/HP- β -CD 입자의 열분석 결과 두 종류의 PLGA 모두 T_g 는 첨가되는 HP- β -CD의 양이 감소함에 따라 감소 후 증가하는 경향을 보였다. 또한 PLGA (50:50)의 경우 HP- β -CD가 고분자 대비 30%, PLGA(75:25)의 경우 40%가 첨가되었을 때 PLGA 본래 T_g 값을 가지고 있었으며, 그 이상으로 HP- β -CD가 첨가된 경우에 PLGA의 T_g 값은 감소하였다. HP- β -CD의 첨가량에 따라 PLGA의 T_g 가 감소하는 이유는 HP- β -CD가 PLGA 사슬간의 상호작용을 방해하기 때문으로 설명할 수 있다.²¹ 즉 첨가된 HP- β -CD가 가소제 역할을 하기 때문에 PLGA의 T_g 가 감소하게 된다. PLGA의 T_g 흡열피크 크기는 HP- β -CD의 투입 양 감소에 따라 증가하였으며 이는 상대적으로 고분자의 양이 증가하였기 때문이며, 이러한 결과로부터 HP- β -CD의 첨가 비율이 감소하더라도 PLGA가 소실되지 않고 투입되는 일정 비율로 남아있음을 확인할 수 있다.

약물 방출 특성. CD는 다양한 물질과 포접복합체를 형성할 수 있는 특징을 가지고 있어 다양한 분야에서 연구되어 왔다. 특히 난용성 약물과 포접복합체 형성을 통해 약물의 용해도를 개선할 수 있어 난용성 약물의 가용화를 위한 전달체로서 널리 이용되고 있다. 파클리탁셀의 경우 대표적인 난용성 약물로 물에 대한 낮은 용해도로 인해 제한적으로 사용되어져 왔으며, CD와 포접복합체 형성을 통해 용해도의 개선이 이루어진 연구결과가 앞서 발표된 바 있다.^{29,30}

이에 본 연구에서는 앞서 제조한 HP- β -CD/PLGA(75:25) 입자가 난용성 약물의 가용화와 방출 특성에 미치는 영향에 대해 알아보기 위해 파클리탁셀을 선택하여 실험을 수행하였다. 약물 함유 고분자 미립자는 35 °C, 13 MPa의 온도, 압력 조건에서 200 mg의 PLGA(75:25)와 파클리탁셀 20 mg을 사용하였으며, HP- β -CD는 파클리탁셀 물 대비 2, 4, 8로 첨가하였다. Figure 7에서는 파클리탁셀이 함유된 PLGA

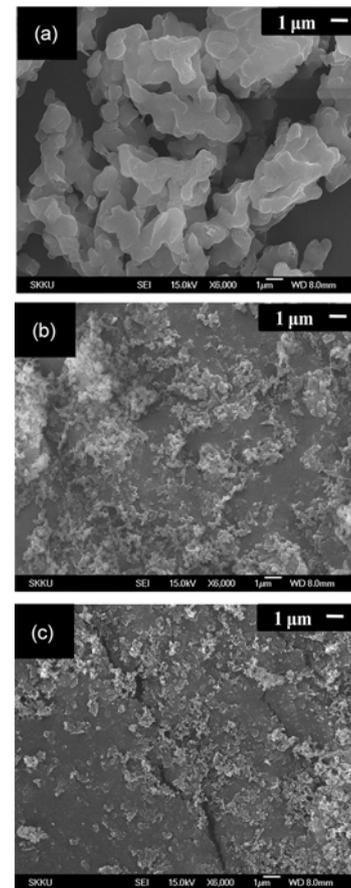


Figure 7. SEM micrographs of various paclitaxel-loaded PLGA (75:25)/HP- β -CD particles prepared with different molar ratios of paclitaxel/HP- β -CD at 35 °C and 13 MPa: (a) 1:2; (b) 1:4; (c) 1:8.

(75:25)/HP- β -CD 미립자의 주사전자 현미경 사진을 보여 주고 있다. 제조된 미립자는 앞서 제조된 PLGA(75:25)/HP- β -CD의 입자와 큰 차이를 보이지 않았으며, 매우 작은 단위 입자들이 서로 엉겨 미립자를 형성하고 있었다.

ASES 공정을 통해 파클리탁셀이 함유된 PLGA(75:25)/HP- β -CD 미립자를 제조하여 약물 회수율과 약물방출 특성에 대해 조사하였다. Table 1에 나타난 바와 같이 ASES 공정을 통해 제조된 미립자 회수율은 약 83%이었으며, 파클리탁셀의 회수율은 55%에서 70%로 HP- β -CD의 양이 증가함에 따라 증가하였다. 이는 파클리탁셀이 HP- β -CD와 포접복합체를 형성하기 때문에 HP- β -CD의 양이 증가함에 따라 포접복합체를 형성하는 파클리탁셀의 비율이 증가하여 더 높은 약물 회수율을 보이는 것으로 볼 수 있다.

파클리탁셀이 함유된 PLGA(75:25)/HP- β -CD 미립자를 이용하여 약물의 방출 특성에 대해 조사한 결과, Figure 8에서 보는 바와 같이 첨가되는 HP- β -CD의 양이 증가함에 따라 더 빠른 약물 방출 속도를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 앞서 언급한 것처럼 파클리탁셀이 HP- β -CD와

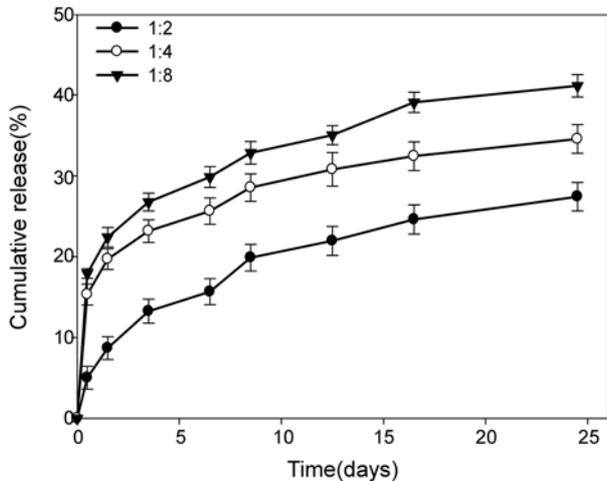


Figure 8. Drug release profiles of various paclitaxel-loaded particles prepared with different molar ratios of paclitaxel/HP- β -CD.

포접복합체를 형성하기 때문에 HP- β -CD의 첨가에 의해 파클리탁셀의 물에 대한 용해도가 증가하고 또한 HP- β -CD 양이 증가함에 따라 상대적으로 미세입자에 존재하는 HP- β -CD 양이 증가하여 입자의 친수성이 증가하기 때문에 더 빠른 약물의 방출 특성을 보이는 것으로 판단된다.

결론

약물의 지속성 방출 제제에 가장 널리 이용되고 있는 PLGA는 비결정성 특성과 낮은 T_g 를 가진다. 초임계 이산화탄소와 유기용매의 혼합유체는 가스제로서 고분자를 가소화시키는 특성을 가지고 있어 초임계 유체를 역용매로 이용하는 ASES 공정에서 PLGA의 입자 제조에 대한 어려움이 있어 왔다. 이에 본 연구에서 HP- β -CD를 첨가하여 PLGA와 함께 초임계 ASES법을 이용해 약물전달체로서 사용 가능한 PLGA/HP- β -CD의 미립자를 제조하였다. 또한 난용성 약물인 파클리탁셀이 함유된 미립자를 제조한 결과 파클리탁셀의 빠른 방출 속도를 얻을 수 있었다. HP- β -CD의 첨가를 통해 초임계 ASES 공정으로 PLGA를 기반으로 하는 미립자를 제조할 수 있었으며, 난용성 약물의 약물 방출 속도를 증가시킬 수 있었다.

감사의 글: 본 연구는 차세대 성장 동력 바이오신약장 기사업단의 연구비지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. G. S. Kwon, *Polymeric Drug Delivery Systems*, Taylor &

- Francis Group, Boca Raton, 2005.
- M. N. Kumar and N. Kumar, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **27**, 1 (2001).
 - J. H. Park, M. Ye, and K. Park, *Molecules*, **10**, 146 (2005).
 - J. M. Anderson and M. S. Shive, *Adv. Drug Del. Rev.*, **28**, 5 (1997).
 - K. E. Uhrich, S. M. Cannizzaro, R. S. Langer, and K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.*, **99**, 3181 (1999).
 - Y. Lu and S. C. Chen, *Adv. Drug Del. Rev.*, **56**, 1621 (2004).
 - S. Li, *J. Biomed. Mat. Res.*, **48**, 342 (1998).
 - D. I. Lee, Y. Ling, M. H. Sung, and I. H. Park, *Polymer (Korea)*, **31**, 168 (2007).
 - K. Mishima, *Adv. Drug Del. Rev.*, **60**, 411 (2008).
 - A. Breitenbach, D. Mohr, and T. Kissel, *J. Control. Release*, **63**, 53 (2000).
 - F. Miguel, A. Martín, F. Mattea, and M. J. Cocero, *Chem. Eng. Proc.*, **47**, 1594 (2008).
 - L. Y. Lee, C. H. Wang, and K. A. Smith, *J. Control. Release*, **125**, 96 (2008).
 - C. S. Connon, R. F. Falk, and T. W. Randolph, *Macromolecules*, **32**, 1890 (1999).
 - D. Liu and D. L. Tomasko, *J. Supercrit. Fluids*, **39**, 416 (2007).
 - A. J. Thote and R. B. Gupta, *Biol. Med.*, **1**, 85 (2005).
 - Y. Kang, G. Yin, P. Ouyang, Z. Huang, Y. Yao, X. Liao, A. Chen, and X. Pu, *J. Colloid Interface Sci.*, **322**, 87 (2008).
 - R. Challa, A. Ahuja, J. Ali, and R. K. Khar, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **6**, E329 (2005).
 - L. Liu and Q.-X. Guo, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, **42**, 1 (2002).
 - K.-M. Shin, T. Dong, Y. He, and Y. Inoue, *J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.*, **43**, 1433 (2005).
 - M. Ceccato, P. L. Nostro, and P. Baglioni, *Langmuir*, **13**, 2436 (1997).
 - D. M. Xie, K. S. Yang, and W. X. Sun, *Curr. Appl. Phys.*, **7S1**, e15 (2007).
 - X. Li and J. Li, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **86A**, 1055 (2007).
 - J. Li, X. Li, X. Ni, X. Wang, H. Li, and Z. Zhou, *Key Eng. Mater.*, **288**, 117 (2005).
 - M. Constantin, G. Fundueanu, F. Bortolotti, R. Cortesi, P. Ascenzi, and E. Menegatti, *Int. J. Pharm.*, **285**, 87 (2004).
 - R. Rajasingam, L. Lioe, Q. T. Pham, and F. P. Lucien, *J. Supercrit. Fluids*, **31**, 227 (2004).
 - I. D. Marco and E. Reverchon, *Powder Tech.*, **183**, 239 (2008).
 - O. R. Davies, A. L. Lewis, M. J. Whitaker, H. Tai, K. M. Shakesheff, and S. M. Howdle, *Adv. Drug Del. Rev.*, **60**, 373 (2008).
 - M. Türk, G. Uppel, M. Steunthaler, K. Hussein, and M. A. Wahl, *J. Supercrit. Fluids*, **39**, 435 (2007).
 - S. K. Dordunoo and H. M. Burt, *Inter. J. Pharm.*, **133**, 191 (1996).
 - T. Cserhádi, E. Forgács, and J. Holló, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **13**, 533 (1995).