

생분해성 폴리락티드/글리콜리드 미립구를 이용한 재조합 소 성장호르몬(rBST)의 지속성주사제 설계

전홍렬 · 이봉상 · 권도우 · 윤미경 · 전현주 · 신태환 · 최영욱[†]

중앙대학교 약학대학

(2002년 8월 2일 접수 · 2002년 8월 26일 승인)

Sustained Release Injectable of Recombinant Bovine Somatotropin in Biodegradable Poly(D,L-lactide-co-glyceride) Microspheres

Hong Ryeol Jeon, Bong Sang Lee, Dow Kwon, Mi Kyoung Yoon,
Hyun-Joo Jeon, Taek-hwan Shin and Young Wook Choi[†]

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

(Received August 2, 2002 · Accepted August 26, 2002)

ABSTRACT—In order to develop a sustained release formulation of bovine somatotropin (BST), which has been used to increase the body weight of oxen or the milk production of dairy cows, poly(D,L-lactide-co-glyceride)(PLGA) microspheres were made by W/O/W multiple emulsification method and solvent extraction method. Physical properties including particle size, drug entrapment, drug release, protein denaturation, and in vivo body weight increase in rats were characterized. The size of the microspheres was increased as the molecular weight of PLGA increased. When Span 65 and stearic acid during preparation were added, the size was decreased but the amount of surface protein was increased, resulting in a high loading efficiency, with fast release of BST from the microspheres. Aggregation or fragmentation of BST by SDS-PAGE during microsphere preparation and drug release study was not observed. Body weight of Sprague-Dawley's male rats was significantly increased after subcutaneous administrations of BST-loaded PLGA microspheres. There was a good correlation between in vivo weight gain and in vitro release rate of microspheres. PLGA microspheres with a high surface protein ratio could be a good candidate for the sustained delivery of BST.

Key words—Bovine somatotropin, PLGA, Microsphere, Drug release, Weight increase

Bovine Somatotropin(BST)은 191개의 아미노산으로 이루어진 단일 polypeptide chain으로 2개의 disulfide bond가 존재하며 분자량 21~22 KDa으로¹⁻³⁾ 소의 성장호르몬(growth hormone)으로도 알려져있으며, 소의 뇌하수체에서 정상적으로 분비되는 단백질 호르몬으로 소의 성장 및 대사를 포함하는 생리작용을 조절하는 기능을 주로 하고 있다. BST는 IGF-1을 매개로 하여 목적세포에서의 Somatotropin작용을 촉진하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 IGF-1은 근육 및 기타 다른 조직내에서의 아미노산흡수 및 단백질 합성을 자극한다. 그러므로 골격성장과 근육 양의 증가의 조합된 결과로 BST는 IGF-1을 통해서 간접적으로 동물의 체중증가에 영향을 주게되며,^{4,5)} 유즙분비에도 영향을 주어 젖소의 산유량을 증대시키기 위한 목적으로 사용된다.^{6,7)}

유전자 재조합기술의 발달에 의해 recombinant BST(rBST)

의 대량생산화가 가능해지면서 비육우의 육질개선 및 젖소의 우유생산량을 증가시키기 위해 여러종류의 rBST가 개발되었다. 우선 rBST에는 말단 아미노산 배열의 차이에 따라 4종의 BST, 즉 American Home Product의 'Somagrove', Pharmacia & Upjohn의 'Somavudove', Monsanto의 'Sometribove' 및 Elaco의 'Somidobove'등이 개발되었다.⁸⁾ 또한 이러한 BST의 analogue를 투여하기 위한 여러가지 제형 즉 용액, 오일성 현탁주사제,⁹⁻¹¹⁾ 고체형 이식정¹²⁾등이 개발되어 왔다. 그러나 이들 제제 중 현탁주사제의 경우 투여간격이 통상 2주 이하로서 비육우의 성장기간 및 젖소의 산유기간을 고려하였을 때 투여간격이 너무 짧으므로 그에 따른 낙농가의 경제적 부담이 커지게 되는 단점을 가지고 있다. 이 식정의 경우도 외과적 수술이 필요하므로 그에 따라 전문적인 지식을 가진 의사에 의해 시술되어야 하는 투여방법의 문제, 이에 따른 투여시간의 증가 및 비용의 증가등의 문제점이 제기되고 있다. 이에 본 연구에서는 소의 성장촉진과 산유량 증대에 사용되는 rBST의 지속성 제제를 개발하고자

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5609, E-mail : ywchoi@cau.ac.kr

생체적합성이 있고 생분해성 고분자인 PLGA를 이용하여 미립구를 제조하여 지속성모델시스템을 설계하고, 입도분포 및 약물의 봉입률, *in vitro* 방출특성, 미립자의 생분해성, 약물의 변성여부, 실험동물에서의 성장촉진효과 등을 종합적으로 평가하였다.

실험방법

재료 및 기기

고분자로는 50:50 PLGA(poly[D,L lactide-co-glycolide], MW. 45,000 Aldrich), 50:50 PLGA(poly[D,L lactide-co-glycolide], MW. 5,000, Wako)를, 대상약물로 recombinant bovine somatotropin(LGCI, Korea)을 사용하였다. 내, 외부 수상의 단백질 안정화제로는 PVA(poly[vinyl alcohol], MW. 13,000~23,000)를 사용하였다. 고분자의 용매로는 에틸아세테이트(HPLC grade, EM science, Germany)와 SDS(sodium dodecyl sulfate, Approx 99%, Sigma, U.S.A.)을 사용하였고, 단백질 정량은 protein assay kit(Lowry method, Sigma)를 사용하였다. SDS-PAGE에는 bromphenol blue, electrophoresis purity reagent(Bio-Rad, USA), 2-mercaptoethanol: electrophoresis purity reagent (Bio-Rad, USA), tris (hydroxymethyl aminomethane) (Bio-Rad, USA), glycine (Bio-Rad, USA), TEMED:,N,N',N'-tetramethylethylenediamine (Bio-Rad, USA), 40% acrylamide/bis solution 29:1 (3.3% C) (Bio-Rad, USA)등이 사용되었다. 기타 실험에 사용된 시약들은 특급 이상의 것을 사용하였다.

실험시 사용된 교반기는 Servodyne Mixer Head(Cole-Parmer Instrument Co., model 50000-30)와 호모게나이저(Ultraturax X-100, IKA), 자석 교반기(04644-series, Cole-Parmer, U.S.A.)를 사용하였으며, 진탕교반기(Genie-2, Scientific Industries, U.S.A.)를 사용하였다. 원심분리기로는 고속 원심분리기인 Centron T-324(Kontron Ins., Italy)를 사용하였다. UV/VIS 흡광광도계는 Varian(Australia)을 사용하였으며, 주사전자현미경(Scanning electronic microscope)은 JEOL 35CF(U.S.A.)를 사용하였다. 입자도분석기는 Master Sizer/E(Malvern Ins., UK)를 사용하였다. 동결건조기로는 Ecospin E314(Biotron, Korea)를 사용하였다. SDS-PAGE는 electrophoresis kit(Mini-Protean III, Bio-Rad, U.S.A.)를 사용하였다.

PLGA를 이용한 미립구의 제조

미립구의 제조는 PLGA 고분자를 이용한 마이크로캡셀과정에서 가장 널리 이용되고 있는 water-in-oil-in-water(W/O/W) 이중유화법 및 용매추출법을 이용하여 제조하였다.¹³⁾

선택한 수용성 용매에 BST를 50~100 mg/ml의 농도로 용해시켜 내부수상을 제조한 후(W1, internal aqueous phase), 중간유상으로 에틸 아세테이트에 PLGA를 가해 고분자용액을 제조하였다(O, oil phase). 제조된 내부수상 용액을 고분자 용액에 가하고 ice-bath상에서 homogenizer를 이용하여 5분동안 13,000 rpm으로 교반하여 W/O형의 1차 유제를 형성시켰다. 다음 이차수상으로 2.5% PVA(M.W. 13,000-23,000)를 함유한 증류수 20 ml를 자석교반기를 이용하여 600 rpm으로 교반하면서, 형성된 W/O 유제를 서서히 가해 이차유제(W/O/W)를 형성시켰다. 10분동안 교반 후 최외상으로 5% IPA를 함유하는 증류수 400 ml에 형성된 이차유제를 가하여 용매를 추출, 입자를 고화시켰다. 고화된 미립구는 고속 원심분리기로 10,000 g에서 10분동안 원심분리하여 얻어내었고, 이를 증류수로 3회 세척한 후 동결건조하여 분말상의 미립구를 제조하여 4°C에서 냉장보관하였다. 미립구는 사용된 PLGA의 분자량 및 첨가제에 따라 MS1, MS2, MS3, MS4로 분류하였으며, MS1은 분자량 5,000의 PLGA를, MS2는 45,000의 PLGA를 사용하였으며, 기타의 첨가제는 사용하지 않았다. 또한 MS3는 분자량 5,000의 PLGA를 사용하였고, 첨가제로서 Span 65를 PLGA 중량대비 1.0 w/w%의 비율로 외부유상에 첨가하였으며, MS4는 분자량 45,000의 PLGA를 사용하였고, 첨가제로서 스테아린산을 PLGA 중량대비 6.0 w/w%의 비율로 사용하였다.

미립구의 물리적 특성

입자도-입도분석은 광회절법을 이용하여 Master Sizer (Malvern Ins.)로 측정하였다. 소량의 제조된 미립구를 취하여 상온에서 200 rpm의 속도로 교반하면서 입도분포 및 입자경을 측정하였다. 이때, focal length는 100 mm, 300 mm 두종류를 사용하였으며 beam length는 2.4 mm의 조건에서 측정하였다. 입자의 분산 매질로는 0.2% SDS를 함유한 증류수를 사용하였으며, 입도분포의 해석은 부피-표면적 평균 입자경(d_{vs})을 비교하였다.

입자의 외관 관찰-제조된 입자의 외관은 주사전자현미경(SEM)을 사용하여 관찰하였다. 우선 제조한 미립구 소량을 취해 금 증착기(IB-3 ion coater)에 넣고 진공도 0.1 torr 및 고전압(800~1500 V, 8 mA)하에서 입자의 표면을 피복하여 SEM 본체에 장착하고 적절한 배율로 관찰하여 미립구의 형상 및 표면 상태를 비교 관찰하였다.

BST의 정량법-사용된 BST의 단백질 정량은 Lowry법에 따라 분석하였다. 우선 Bovine Serum Albumin(BSA) 일정량을 생리식염수에 녹인 후, pH 7.4 인산완충액으로 희석하여 5~80 µg/ml의 농도로 함유한 표준액을 만든다. 이 액 중

0.4 ml 취하여 Lowry Reagent Solution 0.4 ml을 가한 후 실온에서 20분동안 반응시킨 후, Folin & Ciocalteu's Phenol 시약 모액 0.2 ml을 가한 후 실온에서 30분동안 반응시킨 후, UV/VIS 분광광도계를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성하였을 때 높은 직선성(상관계수 0.9999)을 나타내었다. 한편, 약물함량시험 및 방출시험에서의 BST 단백질 정량은 표준액 대신 시료를 취하여 위와 동일한 방법으로 측정하였다.

미립구 표면의 표면단백질분석-SDS에 의한 표면단백의 분석은 기본적으로 음이온성 계면활성제가 단백질 분자의 소수성부분과 결합하여 단백질 분자를 unfold시켜서 extended polypeptide chain을 형성하게 하고 이로 인해 서로 결합하고 있던 다른 분자와 분리되는 현상에 근거를 두고 있다.¹⁴⁾ 미립구 3.0 mg을 정밀하게 칭량하여 2%(W/V) SDS 용액 1 ml에 재분산시킨 뒤 진탕교반기로 4시간동안 교반진탕한다. 검체를 3,500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상기의 정량법에 따라 BST의 농도를 정량하여 미립구 총무게에 대한 매질중 rBST의 총량으로서 표면단백량(μg/mg)을 구하였다.

미립구의 봉입률 측정-제조된 미립구 10 mg을 5% SDS를 함유한 0.1N-NaOH 용액 10 ml에 분산시켜서 미립구가 완전히 분해될 때까지 강하게 교반한 후 3,000 rpm에서 5분동안 원심분리하여, 상정액 중 0.4 ml를 취해 Lowry 법에 따라 BST량을 정량하였다. 이때, 수산화나트륨은 PLGA의 가수분해를 촉진시키며, SDS는 PLGA가 가수분해되는 동안 단백질을 완전히 녹이는 역할을 한다. 이로부터 다음의 식에 따라 미립구내의 단백질함량 및 봉입률을 산출하였다.

Protein entrapment(μg/mg)

$$= \frac{\text{Total amount of protein assayed } (\mu\text{g})}{\text{Amount of Microparticle } (\text{mg})} \quad (1)$$

Loading efficiency (%)

$$= \frac{\text{actual protein loading}}{\text{theoretical protein loading}} \times 100 \quad (2)$$

미립구의 방출시험-방출매질로서 0.02% sodium azide를 함유하는 pH 7.4 등장 인산완충액 5 ml에 60 mg의 미립구를 분산시킨 후 37°C 진탕교반기에서 250 rpm으로 교반하여 BST가 방출되도록 한다. 정해진 시간간격마다, 검체를 원심분리기에서 1,000 rpm로 10분간 원심분리해 그 상정액 2 ml을 취하고, 새로운 pH 7.4 인산완충액으로 보충해 주었다. 취한 검체는 상기의 분석법에 의해 BST를 정량하였다.

SDS-PAGE을 이용한 미립구에 봉입된 단백질의 변성확인-단백질의 변성 여부는 sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 이용하여 문헌에 소개된 방법에 의해 단백질의 응집 및 분리여부를 평가하였다.¹⁵⁾

제조공정중의 단백질변성을 평가하기 위해 상기의 미립구의 봉입률 측정항에 준하여 시료를 제조하였으며 경시변화에 따른 안정성의 경우 미립구의 방출시험항에 준하여 실시하되 보관 4주후에 미립구를 취하여 5% SDS를 함유한 0.1N-NaOH 용액 10 ml에 분산시켜서 미립구가 완전히 분해될 때까지 강하게 교반한 후 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 취하여 시료로 사용하였다.

미립구의 생분해성 평가-제조한 미립구 10 mg을 0.02% sodium azide를 함유하는 pH 7.4 등장 인산 완충액 2 ml에 현탁시키고, shaking incubator에서 37°C, 250 rpm으로 교반하면서 보관하였다. 정해진 시간간격으로 미립구를 취하여 여과하고 건조한 후 SEM을 사용하여 경시적인 입자 외관의 변화를 관찰하여 미립구의 생분해를 평가하였다.

수컷 흰쥐의 체중 증가에 의한 효능 평가

실험동물-생후 6주령인 Sprague-Dawley 계통의 특정병원체 부재(SPF) 수컷 흰쥐를 샴타코(경기도 오산시 서량동소재)에서 공급받아 23±3°C의 온도와 55±15%의 습도가 유지되는 동물사육실에서 사육하였으며 12시간 명암주기(08:00~20:00 light)와 150~300 Lux의 조도를 유지하였다. 사료는 샴타코 고품사료를, 음수는 정제수를 사용하였으며 모든 사육 기간동안 자유로운 급식 및 급수를 실시하였다.

흰쥐의 체중관찰-16G 바늘이 달린 일회용 주사기에 시험제제를 rBST가 30 mg되는 용량으로 시험 시작일 13:30시와 15:30시 사이에 음성 대조군을 제외한 나머지 처리군에 대하여 피하주사하였다. 투여 후, 모든 흰쥐를 개별적으로 사육할 수 있는 철망으로 된 케이지에 넣고 명/암 주기를 12/12시간(아침 8시 점등, 저녁 8시 소등)으로 하고 흰쥐의 건강 상태, 음수 및 먹이 섭취 상태를 1일 2회씩 모니터하고 매일 오전 9시~11시에 개개 흰쥐들의 체중을 측정하였다. 6주간 체중을 측정한 후 시험군에서의 체중증가에서 음성대조군의 체중증가를 뺀 순체중증가(Net Weight Gain : Wnet)를 식(3)에 의해 계산하였다.

$$W_{\text{net}} = (W_{\text{test,t}} - W_{\text{test,i}}) - (W_{\text{control,t}} - W_{\text{control,i}}) \quad (3)$$

여기서 $W_{\text{test,t}}$ 는 시험개시일의 시험군의 체중, $W_{\text{test,i}}$ 는 측정일의 시험군의 체중, $W_{\text{control,t}}$ 는 시험개시일의 음성대조군의 체중, $W_{\text{control,i}}$ 는 측정일의 음성대조군의 체중이다.

Table I—Physical characteristics of microspheres

Microspheres	Protein entrapment ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Loading efficiency (%)	Surface protein ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Particle size ($d_{v,50}$, μm)
MS 1	159.2 \pm 1.86	55.5 \pm 1.54	30.7 \pm 3.92	33.9
MS 2	168.1 \pm 1.94	58.4 \pm 0.97	28.4 \pm 0.48	368.2
MS 3	141.3 \pm 3.01	75.2 \pm 2.34	70.6 \pm 4.69	32.2
MS 4	167.5 \pm 2.88	72.8 \pm 2.06	62.4 \pm 5.41	71.1

MS 1 : PLGA (MW 5,000), MS 2 : PLGA (MW 45,000), MS 3 : PLGA (MW 5,000) + Span 65, MS 4 : PLGA (MW 45,000) + stearic acid. Further details are explained in the text.

결과 및 고찰

미립구의 입자도

미립구의 입자도는 PLGA의 분자량에 따라서 또한 첨가한 계면활성제에 따라 다양하게 나타났다(Table I). 그러나 BST의 용해보조제로 0.05% SDS를 함유한 PBS원충액을 대상으로 한 처방의 경우(데이터 미제시) 미립구가 제대로 형성되지 않았다. 이는 내상에서 BST의 함량을 높이기 위해 용해보조제로 사용한 SDS가 미립구를 형성하는데 사용되는 PLGA의 가용화제로 작용하여 미립구의 형성을 방해하기 때문인 것 같다.

De Rosa 등¹⁶⁾은 poloxamer 188, polysorbate 80, sorbitan monooleate 80(Span 80)등의 비이온성 계면활성제를 insulin이 봉입된 미립구 제조시 첨가할 경우 입자의 크기가 감소한다는 것을 관찰하고 계면활성제의 첨가에 의한 입자경의 감소는 primary emulsion의 크기를 결정하게 되는 O/W2 계면에 계면활성제가 존재하는 것에 의해 emulsion 입자의 크기가 감소한 것 같다고 언급하였다. 본 실험의 경우 분자량 5,000의 PLGA로 제조한 미립구의 경우 Span 65를 첨가한 미립구와 비교했을때 평균입자경은 약간 감소하였으며, 분자량 45,000의 PLGA로 제조한 미립구는 스테아린산을 첨가하고 분자량 45,000의 PLGA로 제조한 미립구에 비해 입자경이 각각 368.16 μm 와 71.12 μm 로 계면활성제의 첨가에 의해 입자경이 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 De Rosa 등¹⁶⁾등이 제시하고 있는 위의 이론을 뒷받침하는 결과로 사료된다. 그러나 Diaz등¹⁷⁾은 Tween 80 및 Span 60등의 계면활성제가 ¹²⁵I-bovine calcitonin를 봉입한 PLGA 미립구의 방출에 대한 연구에서 미립구제조시 Tween 80 및 Span 60등을 첨가할 경우 첨가하지 않은 대조군에 비해 입자경이 변화가 거의 없음을 관찰하여 본 실험결과와는 상반되는 결과를 보였다.

또한 Blanco와 Alonso¹⁸⁾는 bovine serum albumin 및 lysozyme을 분자량 10 KDa과 34 KDa의 PLGA를 이용하여 PLGA 미립구를 제조시 poloxamer 188과 poloxamer 331

등의 첨가제의 영향을 연구한 실험에서 두 계면활성제가 미립구의 입자경에 영향을 주지 않았으며 입자경은 polymer의 고유점성도에 큰 영향을 받는다고 하였는데 이는 점도가 높은 polymer 용액이 유화시키기 어렵기 때문이라고 보고하였으며, Ravivarapu 등¹⁹⁾은 분자량이 다른 PLGA 고분자를 혼합하여 제조한 PLGA 미립구의 펩타이드의 방출에 대한 영향을 연구하면서 각각의 제조군에서 polymer의 농도를 조절하여 점도를 동일하게 함으로 유사한 평균입자경을 갖는 미립구를 제조하여 Blanco와 Alonso¹⁸⁾가 제시한 내용을 뒷받침하는 결과를 보고하였다. 본 실험에서도 점도가 낮은 저분자량(MW 5,000)의 PLGA로 제조된 미립구가 점도가 높은 고분자량(MW 45,000)의 PLGA로 제조된 미립구에 비해 입자경이 작은 미립구가 형성되어 고분자의 고유점성도가 입자경에 영향을 준다는 Blanco 등의 실험결과를 뒷받침하는 결과를 나타내었다.

외부형상

SEM을 통해 미립구의 표면을 관찰한 결과 분자량 5,000으로 제조한 미립구(MS 1)는 표면이 매끄러웠고, 분자량 45,000으로 제조한 미립구(MS 2)는 표면이 거칠고, 다수의 pore가 형성되었다. Span 65를 첨가한 미립구(MS 3)는 다른 미립구에 비해 평균입자경이 작고(20 μm) 표면도 매끄러웠지만 입도분포가 넓은 경향을 가지고 있었다. 스테아린산을 첨가한 미립구(MS 4)의 경우 입도분포가 균일하였지만, 표면은 약간 거친 경향을 나타내었다.

De Rosa 등¹⁶⁾은 insulin을 봉입한 PLGA 미립구에 비이온성 계면활성제를 co-encapsulation하였을 때의 영향에 대하여 연구하였다. 이 연구에서 sorbitan monooleate(Span 80)을 유상에 첨가하여 제조한 미립구의 크기 및 외부형상이 매우 불규칙하며 core가 빈 형태의 미립구가 관찰되었다고 보고하였다. 이는 본실험에서 Span 65를 첨가한 미립구(MS 3)의 외부형상과 유사한 양상을 나타내는 것으로, Span 65의 HLB 값이 Span 80의 HLB 값과는 차이가 있지만, 두 계면활성제의 소수성 성질에 의해 유사한 결과가 나온 것으로 보인다.

미립구의 봉입률

미립구의 단백질량 및 단백질봉입율은 계면활성제를 첨가하지 않은 미립구는 약 160 µg/mg의 단백질량과 약 55~60%의 단백질봉입율을 나타내었다. 계면활성제를 첨가할 경우 단백질량은 140~170 µg/mg, 단백질봉입율은 약 75%를 나타내었다(Table I).

Diaz 등¹⁷⁾은 Tween 80 및 Span 60을 첨가하여 제조한 ¹²⁵I-bovine calcitonin의 PLGA 미립구의 봉입율 및 평균입자경이 첨가제를 첨가하지 않은 미립구에 비해 유의성은 없으나 소폭상승한 것을 관찰하여 본 실험 결과와 유사한 결과를 나타내었지만, 다른 약물을 사용한 경우 계면활성제의 첨가에 의해 봉입율이 감소하는 경향을 나타낸다는 상반된 보고도 있다.^{16,18)} 이는 봉입되는 약물의 물리화학적인 성질이 약물의 봉입율에 영향을 줄 수 있음을 의미하는 것이라고 사료된다.

표면단백의 양 및 PLGA미립구로부터 BST의 방출

미립구 표면에 존재하는 표면단백의 양은 계면활성제의 첨가에 의해 유의성있게 증가하였다(Table I). 또한 계면활성제를 첨가하지 않고 제조한 미립구(MS 1, 2)로부터 BST의 방출율은 측정 30일후에도 모두 5%를 넘지 못하였다. 그러나 계면활성제로 Span 65를 PLGA 중량의 1.0%로 첨가한 미립구(MS 3)은 방출시험개시 10일후에 약 16%의 방출율을 보였고 30일 경과 후에는 48%가 방출되었다. PLGA 중량대비 5.8%의 스테아린산을 첨가하여 제조한 미립구(MS 4)의 경우 방출시험개시 10일 후에 약 7.8%, 30일 경과후에 약 24.1%의 방출율을 보여, Span65를 첨가한 미립구에 비해 낮은 방출양상을 나타내었다(Figure 1).

De Rosa 등¹⁶⁾은 insulin을 봉입한 PLGA 미립구의 성질에 비이온성 계면활성제를 co-encapsulation하였을 때의 영향에 대한 연구에서 poloxamer 188, polysorbate 20, sorbitan monooleate 등의 비이온성계면활성제의 첨가시 미립구 표면에 존재하는 insulin의 양이 첨가제가 없는 미립구에 비해 많으며, 방출시험결과에서도 표면단백의 양이 많은 미립구의 초기방출이 더 크다는 것을 관찰하였고 이는 계면활성제 첨가로 인하여 미립구의 입자경이 감소한 것과 계면활성제에 의해 미립구 matrix의 친수성이 증가하여 미립구내로의 수분의 유입이 빠르게 되어 인슐린의 방출속도가 증가한 것이라고 제시하였다. 본 실험에서는 Span 65를 첨가한 미립구의 경우 스테아린산을 첨가한 미립구에 비해 표면단백의 양은 유사하나 방출이 더 빠르게 되는 것을 관찰하였는데, 이는 Span 65가 스테아린산보다 친수성이므로 미립구내로의 수분유입이 Span 65를 첨가한 미립구에서 더 빠르게 진행되

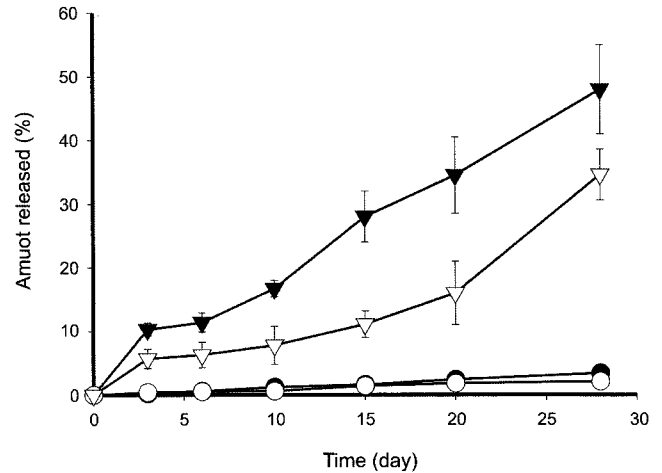


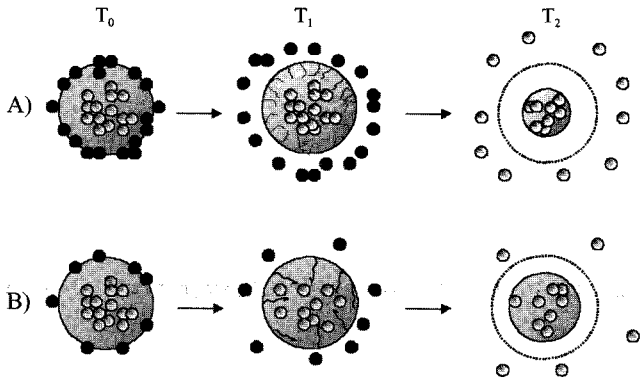
Figure 1—BST release profile from different PLGA microspheres. ●: MS1, ○: MS2, ▼: MS3, ▽: MS4.

기 때문에 방출이 빠르게 진행된 것으로 사료된다. 또한 BSA 및 lysozyme을 PLGA 미립구에 봉입시 poloxamer 188과 poloxamer 331등의 첨가제의 영향을 연구한 경우 표면단백의 양을 측정하지는 않았지만 계면활성제를 첨가한 미립구의 초기방출이 더 높다는 결과를 관찰하였고¹⁸⁾ Diaz 등¹⁷⁾이 Tween 80 및 Span 60을 첨가하여 제조한 ¹²⁵I-bovine calcitonin의 PLGA 미립구의 방출에서도 첨가제에 의해 초기방출이 증가한다는 것을 관찰하여 첨가제에 의해 방출이 증가한 본 실험결과와 유사한 결과를 나타내었다.

표면단백은 미립구 제조과정 중 계면활성제 첨가로 인해 계면에 단백질이 다량 존재하게되고 이들이 계면활성제와 함께 미립구의 최외상으로 이동하게 되어 표면단백이 형성된다. PLGA 미립구의 분해경로는 1) initial burst로 표면 단백질의 방출에 의해 일어나며, 2) lag phase로 PLGA의 에스테르결합의 분해에 의해 분자량이 감소하며 분해가 일어나며, 3) faster continuous release로 small soluble oligomeric fragment가 생성되어 약물방출이 빨라지고 계속적으로 생분해가 일어나 완전히 가용화되는 단계를 거쳐 분해되는 것으로 알려져 있다. 표면단백은 위의 단계에서 첫 번째 단계의 속도를 촉진시킨다. 따라서 다음 단계로의 이행이 빨라지고 결과적으로 미립구의 분해속도를 빠르게 한다. 미립구의 단점중의 하나가 초기방출이 낮다는 점인데 표면단백의 존재로 이러한 문제점을 보완할 수 있을 것으로 사료된다(Scheme I).

SDS-PAGE를 이용한 단백질변성 측정

제조된 미립자의 방출실험을 통해 정해진 시간 간격마다 취해진 검체를 전기영동하여 검체에 함유된 봉입 단백질의 변성여부를 평가하였을 때, 방출시험에서 얻어진 검체의 봉



Scheme I—Influence of surface protein on degradation of microsphere (● : surface protein ○ : core protein). T₀, T₁ and T₂ represent the initial, intermediate and terminal stages as a function of time course. The line in T₁ stage represents the microporous channel, which is generated by the release of surface protein from the microsphere.
 A) PLGA microspheres with high surface protein ratio, showing faster release and rapid degradation.
 B) PLGA microspheres with low surface protein ratio, showing slower release and late degradation.

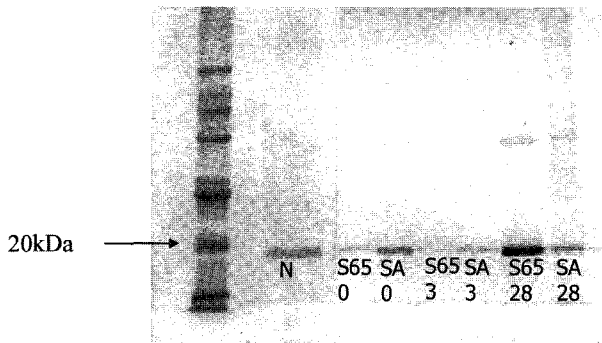


Figure 2—10% Polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) visualized by silver staining.
 N : native BST, S65 : MS3, SA : MS4.
 Numbers at bottom line represent days of BST release.

입단백질은 제조전의 BST와 비교하여 모두 같은 위치에서 밴드를 나타내었다. 이 결과로 미립구의 제조과정에서 봉입된 BST가 제조과정이나 방출과정에서 단백질의 분자량에 변화가 없음을 알 수 있었다(Figure 2).

그러나 방출실험기간이 통상 비육우나 젖소에 투여하기 적절하다고 생각되는 기간인 80일 보다는 짧았으며, 생체조직내와 유사한 조건하에서의 안정성실험에 대한 조건확립 및 좀더 안정적인 제제설계가 요구된다.

미립구의 생분해성 평가

미립구의 생분해성을 평가하기 위하여 미립자를 pH 7.4 등장 인산완충액에 보관하면서 경시적으로 미립자의 외부형

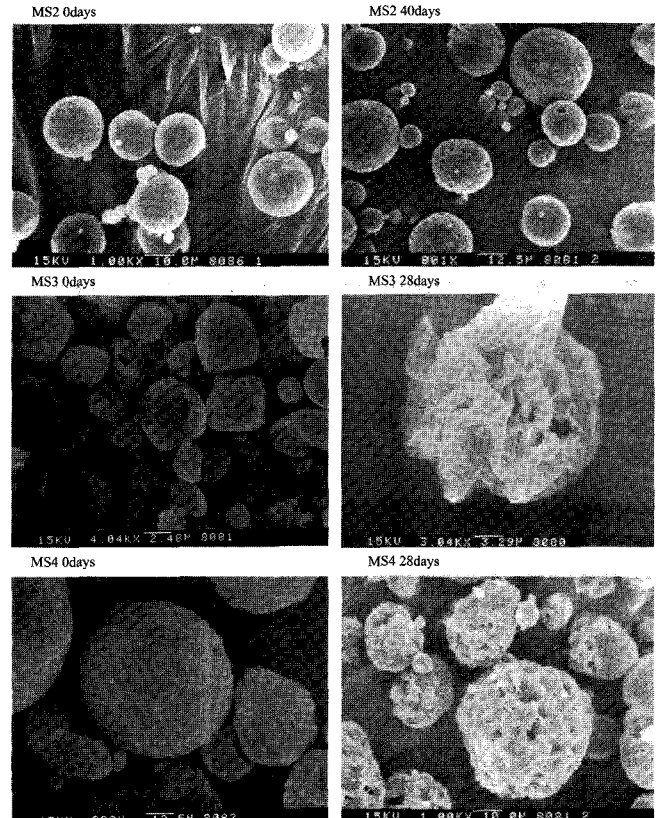


Figure 3—Biodegradation phenomena of different microspheres by SEM. The left column represents the time immediately after preparation, and the right column represents 28 days or 40 days after incubation in pH 7.4 PBS (A) : MS2, (B) : MS3, (C) : MS4, Abbreviations are explained in Table I.

상을 관찰하였다. 분자량 45,000의 PLGA로 제조된 미립구 (MS 2)는 40일 경과후에 표면에 소수의 pore가 형성되었지만 미립구의 형태를 그대로 유지하고 있었으나, Span 65를 첨가한 미립구(MS 3)의 경우 그 형태가 구형을 인식할 수 없을 정도로 분해되었고 표면에 많은 pore가 형성되었으며, 스테아린 산을 첨가한 미립구(MS 3)는 28일 경과후에 pore의 형성 및 미립구 표면의 부분적인 분해가 관찰되었으며 그 형태는 유지하고 있으나 미립구의 분해가 상당히 진행되었음을 관찰하였다(Figure 3). Span 65를 첨가한 미립구가 스테아린산을 첨가한 미립구에 비해 생분해가 빠르게 진행되는 것은 Span 65가 스테아린산보다 친수성이 더 높기 때문에 미립구 matrix의 친수성이 증가하여 미립구내로의 수분의 유입이 더 빠르게 되어 미립구의 생분해를 촉진하는 것으로 사료된다. 본 실험에 사용한 스테아린산의 경우 소수성 고분자로 분류되지만 분자내에 친수성의 특징을 나타내는 부위도 있다. 이러한 특성은 미립구에 무작위로 분포되어 있는 스테아린산이 방출매질 또는 체내에서 먼저 용해되고 그 자

리에 구멍(pore)가 형성되어 내부에 존재하는 약물이 보다 쉽게 방출될 수 있게 하는 것으로 사료된다. 그러나 계면활성제를 첨가한 PLGA 미립구의 생분해와 미립구로부터의 BST의 방출을 상호비교하여 보았을 때 계면활성제를 첨가한 미립구의 분해가 상당히 진행되었음에도 불구하고 BST의 방출이 상대적으로 낮다는 것을 관찰하였다. 이는 시험기간중 미립구의 파편에 BST가 흡착되었거나, BST가 분해되었기 때문에 방출율이 미립구분해정도에 비해 상대적으로 낮게 나타났다고 평가할 수 있다. 그러나 SDS-PAGE에 의한 단백질분석결과와 시험기간 중에 BST의 안정성이 유지되는 것으로 나타나므로 방출율이 낮은 이유는 미립구의 파편에 BST가 흡착되었기 때문이라고 사료된다.

In vivo에서의 효과

일반적으로 SD계열의 흰쥐는 생후 10주령까지 지속적으로 체중이 증가하는 것으로 알려져 있으며 이후 성장이 서서히 저하되는데 암컷 SD계 흰쥐의 경우 수컷 흰쥐에 비해 체중증가정도가 낮은 것으로 알려져 있으며, BST의 효과를 측정하는 방법으로 흰쥐에 BST를 투여하여 체중증가를 측정하는 방법이 이용되기 때문에 본 실험에서도 흰쥐를 사용하여 BST를 함유한 시험제제의 체중증가정도를 관찰함으로써 시험제제의 효과를 관찰하였다.^{20,21} 생리식염수만을 투여한 음성대조군과 시판중인 제제인 Boostin[®]을 투여한 양성대조군을 통해서 시험제제의 체중증가효과를 상대적으로 비교하였으며 전반적으로 시험제제에 의한 체중증가는 음성대조군에 비해 높게 나타났다(Table II).

음성대조군은 시험초기와 시험후기인 6주후의 체중차이가 평균 188.2 g이었으며 양성대조군의 경우는 217.4 g이었으나 양성대조군의 체중증가정도(W_{net})는 시험후 10일까지는 증가하는 반면 10일 이후에는 더 이상 증가하지 않고 정체되는 양상을 나타냈다. 이는 양성대조군의 경우 통상 14일에 한번씩 투여하는 제형으로 투여후 10일동안 BST의 방출이 모

두 일어나서 이러한 현상이 나타난 것으로 사료된다.

이미 보고된 문헌에서는 SD 계열의 암컷 흰쥐를 사용하여 토코페롤에 현탁시킨 BST의 체중증가효과를 관찰하였는데 이 경우 음성대조군에 비해 매우 높은 체중증가를 보였지만, 투여 7일정도가 경과하면 체중증가가 감소하며 시험군에 따라 더 이상의 체중증가가 나타나지 않는 경우도 발생하였다. 본 실험에 사용된 양성대조군의 제법은 WO 0170256의 특허에 준하여 제조된 것으로 실험동물에서는 암수의 차이가 있지만 체중증가의 양상은 유사하였다.²¹

PLGA 미립구의 경우 첨가제를 첨가하지 않고 제조한 PLGA 미립구인 MS1, MS2를 투여한 군은 생리식염수를 투여한 음성대조군과 유사한 체중증가반응을 보였으나, 음성대조군 보다는 그 증가정도가 조금 높았다. Span65를 첨가한 PLGA 미립구와 스테아린산을 첨가한 PLGA 미립구를 동량씩 혼합하여 투여한 MS5의 순체중증가(W_{net})가 가장 높았으며, 양성대조군 보다는 더 높고 지속적인 체중증가를 나타내었다. Span 65를 첨가한 PLGA 미립구의 경우 시험초기에 큰 체중증가를 보였고 시험 후기에 가면 음성대조군에 비해 더 이상의 체중증가가 이루어지지 않는다는 것을 관찰하였다. 또한 스테아린산을 첨가한 PLGA 미립구의 경우 시험초기에는 체중증가가 크지 않지만 점진적으로 체중증가가 일어나는 것으로 관찰되었다(Figure 4). 위의 실험결과, 순체중증가(W_{net})가 지속적으로 증가하는 것으로부터 제제에서의 BST의 방출이 지속적으로 일어난다는 것을 알 수 있었다.

In vitro 및 In vivo의 상관관계

rBST를 함유하는 PLGA 미립구를 투여한 흰쥐에서의 체중증가와 PLGA 미립구의 방출시험간의 상관관계를 조사하여 보았다. 각각의 PLGA 미립구 투여군에서의 누적체중증가와 PLGA 미립구의 방출시험결과를 회귀분석한 결과 체중증가와 방출율간에 직선성이 있음을 관찰하였다(Figure 5). 이 실험결과를 이용한다면 in vitro 방출시험을 통해서 in

Table II—Cumulative mean body weight gains(g) in rats after administration of various BST-containing formulations

Group	Time (Days)									
	1	2	3	6	9	15	21	28	35	42
Negative control ^{a)}	0.8	5.7	13.5	27.0	43.8	68.0	94.2	122.8	156.6	188.2
Positive control ^{b)}	11.0	20.8	28.9	51.7	83.3	101.0	128.3	155.5	185.2	217.4
MS1	4.2	10.6	18.4	35.1	54.2	75.0	104.9	136.1	172.4	208.0
MS2	1.4	7.1	13.5	28.6	47.9	73.6	98.3	127.2	162.0	195.9
MS3	15.7	32.4	42.6	62.6	79.7	109.5	138.5	165.7	202.1	239.0
MS4	11.2	17.1	22.3	37.2	57.3	88.3	125	154.7	191.3	228.5
MS3+MS4 ^{c)}	16.9	32.8	40.3	60.7	82.8	118.8	148.5	178.8	216.8	252.3

^{a)} saline solution administered, ^{b)} Boostin[®] suspension in tocopherol containing rBST 30 mg, ^{c)} combined dose of MS3 and MS4(1:1w/w). n=10

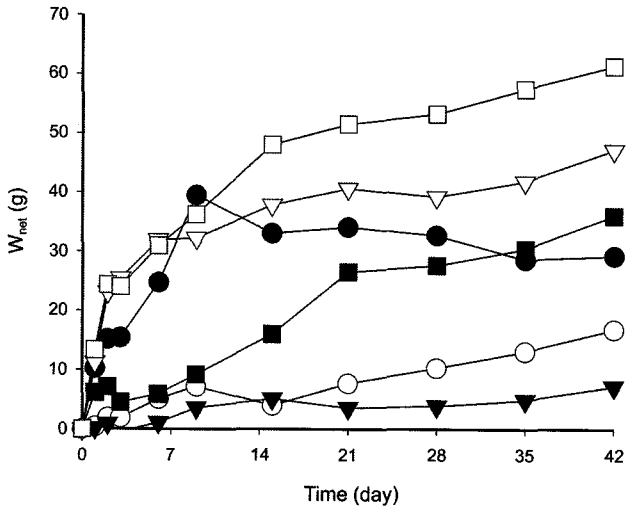


Figure 4—Mean net weight gain(W_{net}) in rats after subcutaneous administration of BST-containing PLGA microspheres and Boostin[®].
 ▼ : MS1, ○ : MS2, ▽ : MS3, ■ : MS4, □ : MS3+MS4(1:1), ● : positive control(Boostin[®]).

*in vivo*에서의 제제의 체중증가효과를 간접적으로 평가할 수 있을 것으로 사료된다.

본 시험에 사용된 제제는 최종용도가 비육우나 젖소에 적용하는 것으로 기존의 상용제제의 단점으로 지적되고 있는

투여빈도(1회/14일)를 줄이므로 낙농가의 불편을 줄이고 경제성을 높이기 위함이다. 그러나 본 시험에서는 소동물인 흰쥐를 사용하여 단기간에 BST가 봉입된 제제의 효과를 평가하기 위해 PLGA 미립구에 Span 65등의 계면활성제를 첨가하여 BST의 초기방출을 증가시켰고, BST의 초기 방출을 증가시키도록 설계된 미립구와 서서히 방출되도록 설계된 미립구를 혼합함으로써 BST의 방출양상을 조절하여 지속적인 체중증가를 관찰할 수 있었다. 본 시험결과 BST를 봉입한 PLGA 미립구는 PLGA의 분자량 조절 및 첨가제의 조절에 의해 BST의 방출조절이 가능하였고 본 실험을 기초로 하여 제제의 최종 적용대상인 비육우나 젖소에 적용하기 적합한 지속성이 부여된 주사제를 설계할 수 있으리라 사료된다.

결 론

BST를 생분해성 고분자인 PLGA를 사용하여 제조된 PLGA 미립구에서의 BST의 방출은 미립구제조에 사용된 PLGA의 분자량에 따라 방출이 조절될수 있으며 미립구 제조시 첨가되는 Span 65와 스테아린산에 의해 미립구표면의 표면단백의 양이 증가하였고, 방출이 조절될 수 있음을 확인하였다. 이는 Span 65 또는 스테아린산등의 계면활성제에

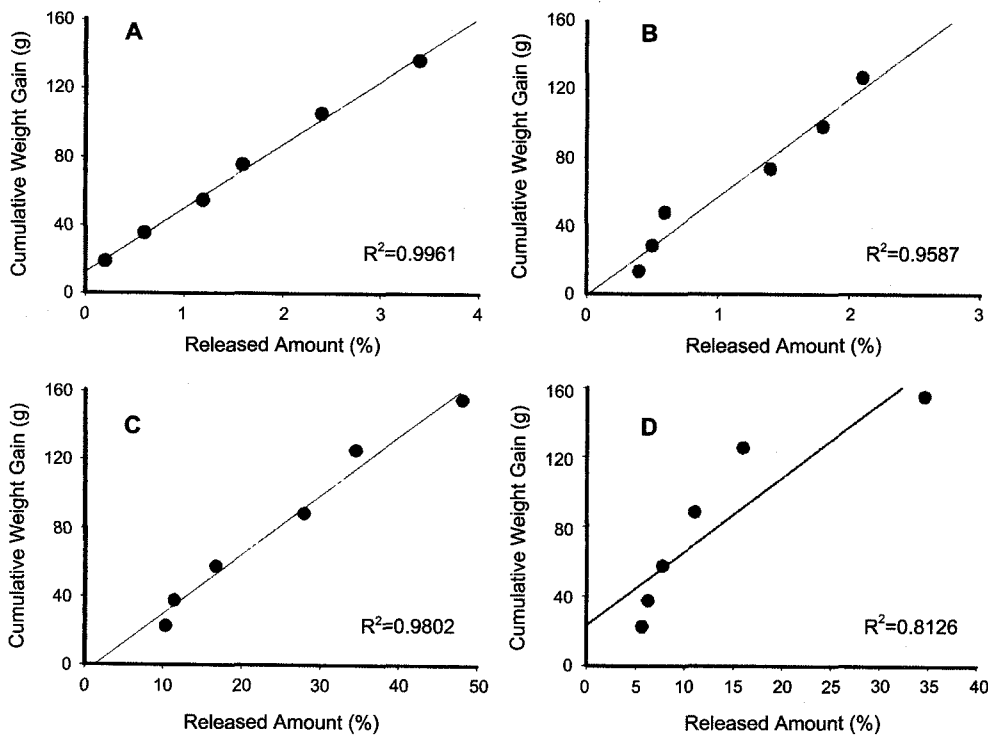


Figure 5—*In vitro-in vivo* correlation between released amount and cumulative weight gain in BST-loaded PLGA microspheres. A) MS1, B) MS2, C) MS3, D) MS4.

의해 미립구 표면에 표면단백의 증가에 의한 초기 방출의 증가 및 이로 인하여 생성된 pore에 의해 미립구의 생분해가 촉진되는 것으로 사료된다.

제조 직후 및 시험기간 동안의 BST의 응집이나 분해는 관찰되지 않았으며, *in vivo* 시험을 통해 BST를 함유한 PLGA 미립구의 흰쥐의 체중이 유의성있게 증가하였음을 확인하였고 체중증가와 방출시험 간에 상관관계가 있음을 관찰하였다. 이상의 결과를 종합할 때, 본 시험제제는 BST의 지속성주사제로서 충분한 응용가능성이 있으리라 사료된다.

감사의 글

본 논문은 보건복지부 신약개발지원사업 연구비(단독기초 : 과제번호 01-PJ1-PG3-21700-0009)의 일부 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) M. Wallis, The primary structure of bovine growth hormone, *FEBS Lett.*, **35**, 11-14 (1973).
- 2) J.A. Santome, J.M. Dellacha, A.C. Paladini, C. Pena, M.J. Biscoglio, S.T. Daurat, E. Poskus and C.E. Wolfenstein, Primary structure of bovine growth hormone, *Eur. J. Biochem.* **37**, 164-170 (1973).
- 3) L. Graf and C.H. Li, On the primary structure of pituitary bovine growth hormone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **56**, 168-175 (1974).
- 4) T.D. Etherton and D.E. Bauman, The biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.*, **78**, 745-761 (1998).
- 5) G.H. Breier, Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. *Domest. Anim. Endocrinol.*, **17**, 209-218 (1999).
- 6) D.E. Bauman, Bovine somatotropin and lactation; from basic science to commercial application, *Domest. Anim. Endocrinol.*, **17**, 101-116 (1999).
- 7) C.J. Peel and D.E. Bauman, Somatotropin and lactation. *J. Dairy. Sci.*, **70**, 474-486 (1987).
- 8) T.P. Foster, Somatotropin delivery to farmed animals, *Advanced Drug Delivery Rev.*, **38**, 151-165 (1999).
- 9) J.W. Mitchell, Prolonged release of biologically active somatotropin, *US Patent 5,013,713* (1991).
- 10) J.W. Mitchell, Methods of using prolonged release somatotropin compositions, *US Patent 5,086,041* (1992).
- 11) J.W. Mitchell, Prolonged release of biologically active somatotropin, *US Patent 5,411,951* (1995).
- 12) S. Calsamiglia, D.D. Hongerholt, B.A. Crooker and M.D. Stern, Effect of fish meal and expeller-processed soybean meal fed to dairy cows receiving bovine somatotropin (Somatitribove), *J. Dairy Sci.*, **75**, 2454-2462 (1992).
- 13) T.H. Shin., Initial antigen release from PLGA microspheres prepared by different formulation conditions, Graduate School, Chung-Ang University, 96th master thesis (2001).
- 14) A.G.A Coombes, E.C. Lavelle, P.G. Jenkins and S.S. Davis, Single dose polymeric microparticulate vaccine delivery systems: the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen, *Vaccine*, **14**, 1429-1438 (1996)
- 15) S.H. Song, S.W. Cho, T.H. Shin, M.K. Yoon and Y.W. Choi, Antigenicity of protein entrapped in Poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **31**, 191-196 (2001)
- 16) G.D. Rosa, R. Iommelli, M.I. La Rotonda, A. Miro and, F. Quaglia, Influence of the co-encapsulation of different non-ionic surfactant on the properties of PLGA insulin-loaded microspheres, *J. Control. Rel.*, **69**, 283-295 (2000).
- 17) R.V. Diaz, I. Soriano, A. Delgado, M. Llabres and C. Evora, Effect of surfactant agent on the release of ¹²⁵I-bovine calcitonin from PLGA microspheres: in vitro-in vivo study, *J. Control. Rel.*, **43**, 59-64 (1997).
- 18) D. Blanco and M.J. Alonso, Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide)microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **45**, 285-294 (1998).
- 19) H.B. Ravivarapu, K. Burton and P.P. DeLuca, Polymer and microsphere blending to alter the release of a peptide from PLGA microspheres, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 263-270 (2000).
- 20) E.P. Stanisiewski, J.F. McAllister, K.A. Ash, V.N. Taylor, D.D. Kratzer and J.W. Lauderdale, Production performance of dairy cattle administered recombinantly derived bovine somatotropin(USAN, Somavubove) daily: a dose range study, *Domest. Anim. Endocrinol.*, **11**, 239-260 (1994).
- 21) N.J. Kim and J.P. Ryoo, A somatotropin composition with improved syringeability, *WO 01/70256* (2001).