

플루란 아세테이트 미립구를 이용한 단백질 전달 시스템 개발

나 건[†] · 최후균^{*}

가톨릭대학교 생명공학부 생명공학전공, *조선대학교 약학대학
(2006년 3월 25일 접수 · 2006년 4월 12일 승인)

Development of Protein Delivery System using Pullulan Acetate Microspheres (PAM)

Kun Na[†] and Hoo-Kyun Choi^{*}

Division of Biotechnology, The Catholic University of Korea, 43-1 Yokkok 2-dong,
Wonmi-gu, Bucheon, Gyeonggi-do 420-743, Korea

^{*}College of Pharmacy, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Dong-gu, Gwangju 501-759, Korea

(Received March 25, 2006 · Accepted April 12, 2006)

ABSTRACT – The aim of this study was to develop new protein/peptide depot system instead of poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres. Pullulan was chemically modified by the addition of acetic anhydride (pullulan acetate; PA) and then investigated as new depot system for protein/peptide delivery. PA microspheres (PAM) with lysozyme as a model protein were prepared by w/o/w double emulsion method. The microspheres had a mean size of 10-50 mm with a spherical shape. The size distributions reduced with increasing the degree of acetylation. The loading efficiency of lysozyme was also increased. Lysozyme aggregation behavior in the microsphere was monitored to estimate the change of protein stability during preparation step. The ratios of protein aggregation in PAMs are lower than that of PLGA microsphere, in particular, PA 5 showed lowest as about 16%. The result indicated that the increase of acetylation suppressed the aggregation of protein. The release profiles of lysozyme from PAMs were significantly different. High acetylation effectively improved lysozyme release kinetics by reducing initial burst release and extending continuous release over a period of time. To check the effect of preservation for structural stability of lysozyme, the activity of lysozyme released from PA 5 was also observed. The activity of lysozyme was maintained almost 100% for 25 day. Therefore, PAM may become to a useful carrier for delivery of protein/peptide drugs, if it will be supported by biocompatibility and biodegradability results.

Key words – Pullulan acetate, Protein stability, Protein aggregation, Lysozyme

단백질 또는 펩타이드 약물은 소량으로 뛰어난 효과를 볼 수 있고, 부작용이 적으며, 그 자체가 독특한 생리활성을 가지고 있어 의약품으로 다양하게 연구, 사용되고 있지만 짧은 반감기와 불안정성 때문에 투약에 있어서 적정 유효 농도의 유지가 힘들고, 만성질환 치료 시 자주 투약하여야 하는 어려움을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 다양한 방법이 연구되고 있는데 그 중 하나로서 서방성 방출 특성을 가지고 있으며 방출속도의 제어가 용이한 생분해성 미립구(biodegradable microspheres)의 연구가 활발하게 진행되고 있다.¹⁻³⁾

이들 미립구는 주로 생체적합성이 뛰어난 천연단백질인 알부민(albumin)이나, 또는 다당류인 덱스트란(dextran), 전분(starch)등을 사용하는 경우^{4,6)}와 생분해성이 뛰어난 합성고

분자인 poly(ϵ -caprolactone)(PCL), poly(lactide)(PLA), poly(glycolide)(PGA), poly(lactide-co-glycolide)(PLGA)⁷⁻¹¹⁾를 이용하는 경우 등이 있다. 일반적으로 단백질 약물을 봉입하기 위해 W/O/W방법을 사용하는데 이를 위해 고분자가 휘발성 용매에 용해되는 특성을 가지고 있어야 한다. 하지만, 천연 고분자의 경우 화학적 모사를 거친 후에도 휘발성 용매에 용해되는 특성을 갖는 경우가 거의 없어 W/O/W방법을 사용하여 단백질 약물을 봉입한 미립구를 제작하기가 쉽지 않다. 이에 비해 합성고분자의 경우 휘발성 용매에 잘 용해되며 에스터 결합(ester linkage)으로 이루어져 있어 인체내에서 생분해가 일어난다는 장점 때문에 천연고분자의 경우 보다 더 많이 연구되고 있다. 특히 합성고분자 중 PLGA의 경우 락타이드(lactide)와 글리코라이드(glycolide)의 비율에 따라 그 분해속도를 조절할 수 있으며¹²⁾ 미국 식품의약청(FDA)에서 인체 주입용으로 허가 받았다는 점 때문에 단백질 약물의 전달을 위해 특히 많이 연구되고 있다.

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)2164-4832, E-mail : kna6997@catholic.ac.kr

그렇지만, 이들 시스템의 성공 사례는 극히 한정되어 있는데 그 이유는 앞에서 말한 것처럼 이들 고분자가 모두 에스터 결합으로 이루어져 있어서 가수분해 시 많은 수소이온을 배출하기 때문이다. 배출된 수소이온은 미립구 안의 환경을 산성으로 만들어 단백질 및 펩타이드 약물의 변성(denaturation), 응집(aggregation), deamidation을 유도하여 약물의 안정성을 크게 손상시킨다.¹³⁻¹⁷ 따라서, 많은 연구자들은 이러한 미립구 안의 산성화를 억제하고자 다양한 시도를 수행하였는데, Schwendeman의 연구팀은 불용성인 수산화 마그네슘(magnesium hydroxide ($Mg(OH)_2$))을 제조과정 중에 넣어 PLGA의 분해시 나오는 수소를 중화시켜 미립구 안의 산성화를 억제함으로써 봉입된 단백질의 안정성을 증가시켰다고 보고하였고,¹⁸⁻²⁰ Bae 그룹에서는 PEG/poly(L-histidine) 이중블록공중합체를 첨가하여 봉입된 단백질의 활성을 유지하였다고 보고하였다.²¹ 하지만 이러한 연구는 또 다른 첨가제를 사용하여야 한다는 단점을 가지고 있어 실용성에 의문이 있다.

본 연구에서는 합성고분자가 갖는 단점을 극복함과 동시에 천연고분자의 단점인 W/O/W방법 사용시 휘발성용매에 대한 난용성 문제를 해결하기 위하여, 생체적합성이 좋고 생분해능을 가지고 있는 플루란 아세테이트(pullulan acetate)를 합성하여 미립구를 제조하였다. 그리고 여기에 모델 단백질인 라이소자임(lysozyme)을 사용하여 이 미립구의 단백질 전달체로서의 가능성 여부를 파악하였다. 플루란은 *Aureobasidium pullulans*에 의해 생산되는 포도당이 α -(1-4) 또는 (1-6)로 연결되어 있는 중성선형 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)로서 생체적합성이 뛰어나기 때문에 다양한 화학적 모사를 통하여 생체재료로 많이 연구되고 있다.²² 일본의 Sunamoto 그룹은 플루란에 콜레스테롤기를 도입하여 자기응집 나노입자를 제작한 후 이들의 물리생화학적 특성 연구를 수행한 바 있다.²³ Na 등은 플루란에 pH 민감성 물질인 설펜아미드(sulfonamide)를 접합시켜 암세포 주위의 pH에 민감한 pH 민감성 나노입자를 제조한 후, 이 나노입자와 암세포 사이의 상호작용이 pH에 따라 어떻게 변화하는지를 관찰하였고, 또한 항암제 방출 특성의 변화에 대해서도 보고하였다.²⁴⁻²⁷ 또한 Na 등은 간암 타겟팅을 위하여 플루란에 비타민을 접합시켜 나노입자를 제조하였는데 이 나노입자는 높은 간암 타겟팅 효과를 보였다.²⁸

본 논문에서는 다양한 정도로 아세트화된 플루란을 W/O/W방법을 이용하여 라이소자임이 봉입된 미립구를 제조한 후 라이소자임의 방출 특성과 방출된 라이소자임의 활성(activity)을 평가하였다.

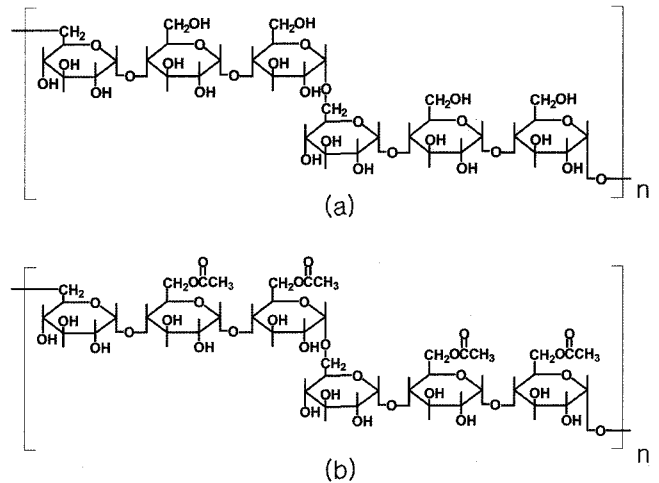


Figure 1—Chemical structures of pullulan (a) and pullulan acetate (b).

실험 방법

시약

플루란(Mw;100,000 Da)은 일본 Hayashibara사로부터 구입하여 사용하였고, 무수아세트산(Acetic anhydride), 피리딘(pyridine), 라이소자임(lysozyme) 등은 시그마(Sigma)사로부터 구입하여 사용하였다. 그 외 화학약품과 용매는 특별한 정제과정 없이 특급시약을 사용하였다.

플루란의 아세트화 (pullulan acetylation; PA)

플루란에 양친성을 도입하기 위하여 다음의 방법으로 아세트화(acetylation)를 시도하였다(Figure 1). 플루란 2g을 20 mL 포름 아미드에 넣고 50°C에서 강력하게 교반하여 용해시켰다. 그 용액에 피리딘 6 mL 와 무수아세트산(acetic anhydride) 3~15 mL 정도를 각각 첨가하여 54°C에서 48시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 용액은 물 200 mL에 침전을 잡은 후 여과하여 생산물을 회수하였다. 이러한 과정을 3회 이상 반복하여 불순물을 제거한다. 합성된 플루란 아세테이트는 FT-IR, NMR, GPC 등을 이용하여 치환도를 구하였다.

플루란 아세테이트 (PA) 미립구의 제조

먼저, 0.25 mL PBS(phosphate buffer saline (pH 5.1))에 라이소자임 (Sigma) 50 mg를 서서히 녹였다. 300 mg의 PA (acetylation degrees, 0.3, 0.7, 1.4, 1.7, 2.1)를 3.0 mL methylene chloride(MC)에 녹인다. PA가 녹아 있는 MC 용액상에 라이소자임이 녹아 있는 수용액을 넣은 뒤 15초간 격렬하게 vortex하여 W/O 상을 준비하였다. 준비한 W/O 용액을 20 wt% PVA/0.9 wt% NaCl 용액 1 L에 주입하여

미립구를 제조하였다. 원심분리법(2500 rpm 3분간)으로 입자를 회수하였다.

입자 형상 분석

제조된 미립구의 표면 분석은 전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM(JSM-5800, JEOL))을 이용하여 수행되었다. 먼저, 미립구를 메탈 스텐(metal stub) 위에 놓고 진공 상태에서 gold 코팅을 한 후 전자현미경 촬영을 진행하였다.

입자내 약물 봉입도 분석

제조된 미립구의 라이소자임 봉입률(lysozyme encapsulation%)을 측정하고자 다음과 같은 방법을 사용하였다. 20 mg (혹은 표준시료로 라이소자임 2.5, 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625 mg)을 6 M HCl 1 mL에 넣고 24시간 동안 37°C 100 rpm으로 shaking한다. 이후 1 M NaOH 6 mL에 넣고 24시간 동안 37°C 100 rpm으로 shaking한다. 50 mL의 라이소자임 용액을 96-well microplate로 옮긴 뒤, 4% (w/v) NaHCO₃(pH 9.0) 125 µL와 0.5%(w/v), 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonate(TNBS) 50 µL(hydrolysis에 의해 small fragments로 바뀐 free amino acid를 TNBS를 이용하여 정량하는 방법) 용액을 넣은 후 2시간 실온에서 incubation한 후에 λ = 450 nm에서 microplate reader로 분석한다.

불용성 라이소자임 응집도(Insoluble lysozyme aggregates) 분석

40 mg의 미립구를 1 mL의 methylene chloride에 녹인 후 30분간 교반한다. 5000 rpm에서 20분간 원심분리 후, 부유액을 제거한다. 침전물(protein)을 1 mL 10 mM phosphate buffer(pH 5.1)에 녹이며, 이때 녹지 않는 aggregates를 원심분리후 6 M urea를 포함하는 10 mM phosphate buffer (pH 5.1) 1 mL에 녹인다. 이후 위 용액을 1 mL 6 M HCl에 넣고 24시간 동안 37°C 100 rpm으로 shaking한다. 6 mL 1 M NaOH에 넣고 24시간 동안 37°C 100 rpm으로 shaking한다. 50 mL의 라이소자임 용액을 96-well microplate로 옮긴 뒤, 125 mL 4%(w/v) NaHCO₃(pH 9.0)과 50 mL 0.5%(w/v) TNBS 용액을 넣은 후 2시간 실온에서 incubation 한 후에 λ = 450 nm에서 microplate reader로 분석한다.

라이소자임 활성도 측정 (Lysozyme activity test)

2.3 mg/mL *Micrococcus lysodeikticus*(ATCC 4698) 세포 현탁액(66 mM phosphate buffer pH 6.2) 중 100 µL을 앞선 실험에서 얻은 시료 라이소자임 1 mL 중 150 µL (혹은 표준시료용액 0-1 mg/mL)와 섞은 후 450 nm에서 15초 간

격으로 4분간 시간에 따른 흡광도 감소를 조사한다. 얻어진 곡선의 선형 부분의 기울기는 표준시료의 기울기와 관계가 있다. 즉, 결과는 초기 kinetic rate로 표시가 된다(slope of the OD vs. time at t₅₀). 여기서 활성도는 각 샘플의 초기 기울기와 관계가 있다. 표준시료 라이소자임 농도별 초기속도에 대한 표준값을 정한 후, 각 표준시료 라이소자임의 초기속도는 활성도 100%을 의미한다. 각 측정 시료의 초기속도를 계산 후 표준시료 초기속도와 비교하여 상대적 활성도를 계산한다.

방출시험

각 PAM으로부터 라이소자임 방출 시험을 실시하였으며, 시험 방법은 다음과 같다. 미립구 20 mg을 3 mL PBS buffer(pH 7.4, 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 0.24 g KH₂PO₄, 1.81 g Na₂HPO₄ · H₂O, 0.5 g NaN₃, 0.1 g Tween-20, 1000 mL distilled water)에 suspension한 후 dialysis bag(MW cut off 300,000)에 넣고 37°C에서 shaking하면서 주어진 각 시간에 2 mL을 회수하고 fresh PBS buffer 2 mL를 첨가했다. 회수된 용액에 대해서 micro BCA reagent kit(각 reagent 주입 후 40°C에서 2시간 incubation, sensitivity range 20-2000 mg/mL, microplate reader; λ_{absorbance} = 562 nm)에 의해 분석했다.

결과 및 고찰

미립구 연구는 지난 10여 년 동안 꾸준히 연구되어 온 아주 매력적인 약물전달 방법 중의 하나이다. 특히, 단백질/펩타이드 약물의 경우에는 약물자체의 상업적 가치가 지대하기 때문에 많은 제약회사에서 상품화를 위한 다양한 연구를 시도하고 있으며, 이미 상품화 되어 블록버스터(blockbuster)의 반열에 오른 약품도 나오기 시작하였다. 하지만 사용된 미립구의 재질이 산가수분해(acid hydrolysis)라는 고유의 특성을 가지고 있기 때문에 봉입된 단백질 약물의 변성을 촉진하여 미립구의 상품적 가치를 감소시킨다. 본 연구에서는 이러한 단점을 극복하기 위하여 다당류의 일종인 플루란을 사용하여 미립구를 제조하여 단백질 전달을 시도 하였다. 하지만, 플루란은 수용성 고분자이기 때문에 그 자체만으로는 미립구의 제조에 사용할 수 없다. 따라서, 미립구 제작을 위하여 양친성을 부여할 수 있는 아세틸화가 필수적이다. Figure 2는 PA3의 ¹H NMR 결과이다. 1.8-2.2 ppm 사이에서 메틸그룹(methyl group)에 있는 수소(CH₃)의 화학적 이동(chemical shift)이 관찰되었다. 이는 플루란의 수산기(OH group)에 아세틸 그룹이 잘 결합되었다는 증거이다. 아세틸

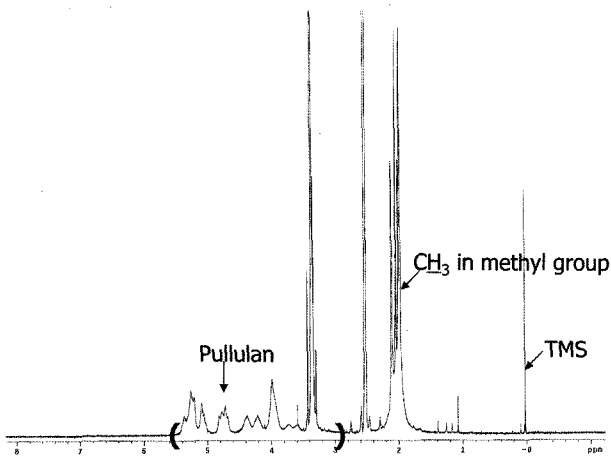


Figure 2-¹H-NMR spectrum of pullulan acetate 3 (PA3).

Table I-Loading Efficiency of Lysozyme in Pullulan Acetate Microspheres (PAMs)

Sample	^a Degree of acetylation	^b Lysozyme content ± S.D. (wt%)	^c Encapsulation ratio ± S.D. (wt%)
PA1	0.3	5.8 ± 0.64	59.6 ± 7.0
PA2	0.7	6.5 ± 0.63	64.6 ± 6.9
PA3	1.4	7.3 ± 0.75	76.6 ± 8.5
PA4	1.7	7.7 ± 0.95	78.7 ± 9.0
PA5	2.1	8.1 ± 1.12	80.0 ± 9.6

^aDegree of substitution of acetyl groups per anhydroglucose unit of pullulan (using ¹H-NMR and GPC).

^bLysozyme content was calculated as lysozyme weight/total weight × 100.

^cLysozyme encapsulation ratio was calculated as total loaded lysozyme weight/ initial lysozyme weight × 100.

화 정도는 Table I에 나와 있는 것과 같이 포도당 1분자당 0.3부터 2.1개까지 무수아세트산의 첨가 정도에 따라 다양한 정도를 보였다.

이렇게 합성된 5가지의 PA 시료들(PA1, 2, 3, 4, 5)은 W/O/W법을 이용하여 미립구 제조에 이용되었다. Figure 3은 전자현미경을 이용한 PA 미립자들의 표면을 관찰한 것으로, 모든 시료로부터 제조된 미립자의 모양이 구형을 이루고 있음을 보였다. 입자 크기는 PA1, 2, 3의 경우 5-50 μm 정도로 분포에서 높은 아세틸화 미립자(PA4,5)의 경우 10-50 μm 정도로 미립자의 크기 분포가 약간 좁아짐을 보였다. 특히 PA5의 경우 입자분포는 30-50 μm 정도였다. 이 결과들은 아세틸화가 커질수록 입자의 분포가 좁아짐과 동시에 작은 입자의 수가 줄어들었음을 의미한다. 앞에서 언급

한 것처럼 플루란은 친수성 고분자로서 아세틸화를 통하여 소수성(hydrophobicity)이 부여되었다. 따라서, 아세틸화 정도가 클수록 소수성을 보이며 용매(methylene chloride)에 더 잘 용해되는 특성을 가지고 있다. 이는 아세틸화 정도가 낮은 경우 용매인 methylene chloride에 대한 용해도가 낮아 부분적으로 녹지 않은 곳이 존재할 수도 있다는 것을 의미한다. 따라서, 용매의 증발 시 다른 PA 분자와의 상호작용(소수성 작용)이 충분치 않아 아주 다양한 크기의 미립자가 만들어 졌다고 생각한다.

라이소자임의 봉입 및 방출 특성

본 연구에서는 PAM의 단백질 전달체로서 가능성을 알아보기 위하여, 모델 단백질로 라이소자임(lysozyme)을 이용하

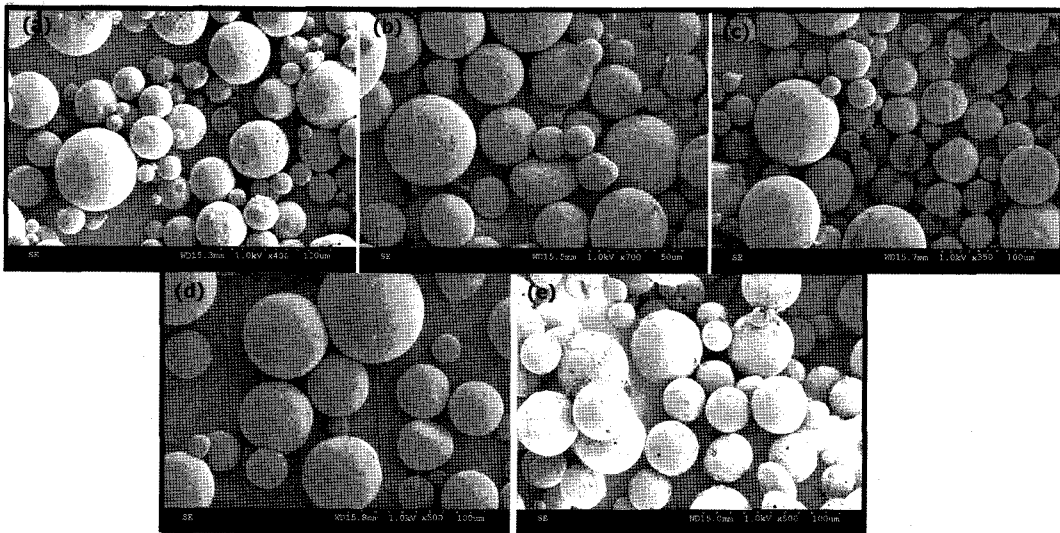


Figure 3-Scanning electron microscopic (SEM) photographs of PAM (a) PA 1, (b) PA 2, (c) PA 3, (d) PA 4 and (e) PA 5.

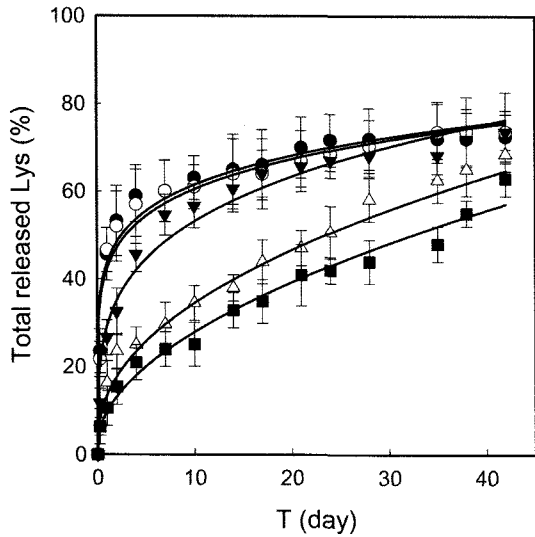


Figure 4—Lysozyme release kinetics from PA 1 (●), PA 2 (○), PA 3 (▼), PA 4 (△) and PA 5 (■) microspheres (n=5).

여 봉입률과 방출 특성에 관하여 조사하였다. PAM의 라이소자임 봉입률은 아세틸화 정도에 따라 차이가 남을 보였는데 PA1의 경우 가장 낮은 값을 보인 반면, PA5의 경우 가장 높은 봉입률을 보였다(Table I). 이는 아세틸화가 클수록 라이소자임의 봉입이 크다는 것을 의미한다. 이것은 W/O/W 방법을 이용한 미립자 제조과정에서 아세틸화가 클수록 용매가 증발할 때 완벽한 막을 만들어 단백질의 봉입에 유리하게 작용하였기 때문으로 사료된다. Figure 4는 PAM으로부터 라이소자임의 방출 특성을 보여 준다. 상대적으로 아세틸화 정도가 적은 PA 1, 2의 경우 약물의 초기 방출 정도가 약 45% 정도로 매우 크게 보이지만, 아세틸화 정도가 높은 PA 4와 5의 경우 10% 내외로 크게 감소함을 보였다. 이러한 낮은 초기 방출값은 PLGA 미립구의 경우에 비해서도 매우 낮은 값으로 단백질/셉타이드 약물의 전달체로서 가능성을 제시한다. 또한 PA 1, 2의 경우 방출 시작 10일 후 방출이 거의 중지한 것을 보였지만, PA 4와 5의 경우 꾸준히 방출이 지속되어 40일 동안 단백질의 방출이 계속 됨을 보였다. PLGA 미립구를 이용한 라이소자임의 방출이 거의 PA 1, 2 미립구와 유사한 경향성을 보이는 것을 감안하면, PA 4와 5 미립구는 단백질 약물의 방출을 충분히 조절할 수 있다는 관점에서 매우 고무적이라고 생각된다.

PA 4와 5 미립구의 방출 속도조절은 먼저 미립구 표면의 소수성에서 이유를 찾을 수 있다. 높은 아세틸화는 미립구 표면의 더 높은 소수화를 유도하였으며, 이것은 미립구 안으로 물의 침투를 억제하였을 것이다. 따라서, 확산에 의한 단백질 약물의 방출이 최대한 억제 되었다. 두 번째 이유는

PA의 수산기(OH)와 라이소자임의 아민기(NH₂) 사이의 수소 결합(hydrogen bonding)에서 그 이유를 찾을 수 있다. 라이소자임은 PAM에 분자수준으로 분산되어 고르게 분포한다. 이러한 분포는 PA와 라이소자임의 수소결합을 가능하게 하여 초기 방출을 줄이는 역할을 하였을 것으로 생각된다.

라이소자임의 안정도

본 연구에서는 미립구 안에 봉입된 라이소자임의 안정성을 두 가지로 분류하여 측정하였다. 첫 번째는 미립구내에 봉입된 단백질의 안정성이고, 두 번째는 방출된 단백질의 안정성이다. 첫 번째는 미립구 제조 시 생기는 문제점으로 단백질 약물이 유기용매와 접촉하면서 불용성 응집체(aggregate)로 변성되는 것을 의미하며, PLGA 미립구를 이용한 단백질 약물의 봉입에서 가장 큰 문제 중의 하나이다. 두 번째는 단백질이 활성의 손상 없이 미립구 안에 봉입되었더라도 미립구 안의 여러 가지 환경변화에 의해 활성을 잃게 되는 문제점을 가질 수 있다는 것이다. 이를 알아보기 위해 방출된 단백질의 활성을 측정하였다. Figure 5는 미립구 제조 시 라이소자임의 불용성화 정도를 보여 준다. PA1의 경우 약 23% 정도의 불용성화를 보였는데 이 수치는 아세틸화가 증가할수록 감소하였다. PA5의 경우 약 17% 정도로 상대적으로 가장 낮은 값을 보였다. 본 실험을 통계적 비교를 위해 유의성 test 결과 정규성 검증을 한 결과 정규분포를 따르고 있는 것을 확인했으며, PLGA에 대한 각 PA 샘플에 대한 2 sample t test 결과 PA1(P=0.028), PA2(P=0.004), PA3(P=0.005), PA4(P=0.002), PA5(P=0.002)로 모두 P<0.05로 유의적 차이가 있는 것을 확인할 수가 있었다. 또한

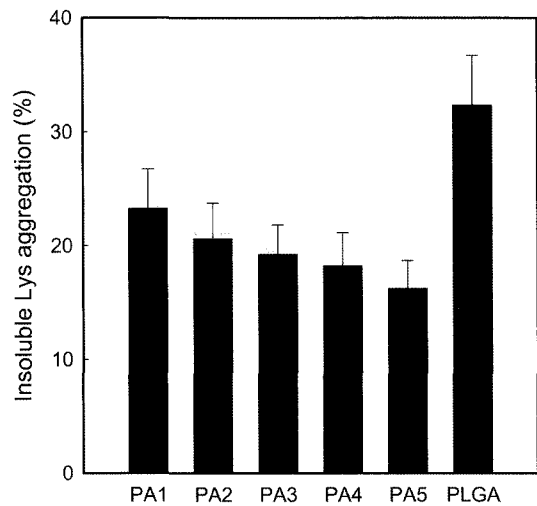


Figure 5—Insoluble lysozyme contents in PAM (control-PLGA (R503H) microspheres) (n=5).

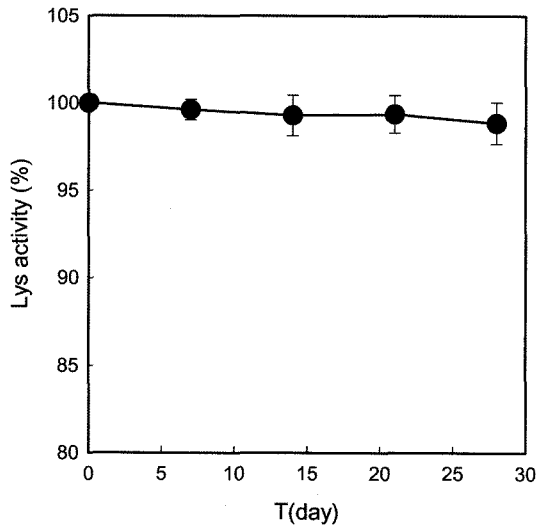


Figure 6—The activity of lysozyme released from PA 5 microspheres (n=5).

PA1, PA2, PA3, PA4, PA5에 대해서는 one-way ANOVA 분석 결과 $P=0.009$ 로 각 개체간 차이가 있었으며, 세부적으로는, PA5에 대해서 PA1는 $P=0.024$, PA2는 0.016, PA3는 0.007, PA4는 0.215로 나타났음. 즉, PA5에 대해서는 PA4와 유의적 차이가 없으나, PA1, PA2, PA3에 대해서는 유의적 차이를 보였다. 이는 아세틸화가 높은 미립구일수록 라이소자임이 활성을 유지한 채 봉입된다는 것을 의미한다. PLGA 미립구의 경우 약 35-40% 정도의 불용성화를 보이는 것을 보면, PA 미립구가 라이소자임 봉입시 PLGA보다 훨씬 우수한 활성 유지도를 보인다고 할 수 있다. Figure 6은 PA5로부터 방출된 라이소자임의 활성을 측정하는 것이다. 라이소자임의 활성도는 25일 간의 방출기간이 지난 후에도 거의 100%를 유지함을 알 수 있었다. 이는 미립구안의 환경이 크게 산성으로 바뀌지 않았다는 것을 의미함과 동시에 단백질과 미립구 사이에 아실레이션(acylation)과 같은 화학적 공유결합이 존재하지 않았다는 것을 의미한다. 페레즈등²⁹⁾은 PLGA 미립구에 봉입된 라이소자임은 그 활성이 하루만에 약 43%로 감소하였다고 보고하였다. 이러한 보고와 비교했을 때 위의 결과는 PAM이 단백질 전달체로서 가능성이 높다는 것을 의미한다.

결 론

본 연구에서는 단백질/펩타이드 약물의 효율적인 전달을 위하여 기존의 PLGA 미립구가 갖는 단점들인 1) 큰 초기 방출, 2) 봉입 시 단백질 약물의 변성, 3) 산 가수분해에 의해 봉입된 단백질의 활성 손실이라는 문제점을 극복하고자

다당류인 플루란을 아세트화(PA)하여 미립구(PAM)를 제조하였다. PA는 휘발성 용매인 methylene chloride에 대해 용해도가 높아 W/O/W법을 이용한 단백질 약물전달체의 제조에 가능성을 가지고 있다. PA로부터 제조된 미립구(PAM)는 아세틸화가 증가할수록 균일한 입자 분포를 보였으며, 봉입효율 또한 증가하였다. 단백질 약물의 초기 방출은 미립구 제조의 성패를 좌우한다 할 수 있는데 높은 아세틸화를 갖는 PAM의 경우 10% 내외의 초기방출을 보였다. 또한 봉입된 단백질의 불활성 정도를 나타내는 불용성화 또한 높은 아세틸화 PAM에서 좋게 나타났다. 그리고 PA5에서 방출된 라이소자임은 거의 100%의 활성을 유지하였다.

상기의 결과들로 보아 PAM은 생체 적합성과 분해성에 관련된 연구 결과가 뒷받침되어야 하겠지만 단백질/펩타이드 약물의 전달을 위한 수송체로서 PLGA를 대체할 수 있는 매우 높은 잠재력을 가지고 있는 것으로 생각된다.

감사의 말씀

본 연구는 2006년도 가톨릭대학교 교비연구비에 의해 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) W.R. Gombotz and D.K. Pettit, Reviews: Biodegradable polymers for protein and peptide drug delivery, *Bioconjugation*, **6**, 332-351 (1995).
- 2) G. Crotts and T.G. Park, Review: Protein delivery from poly(lactic-co-glycolic acid) biodegradable microspheres: release kinetics and stability issues, *J. Microencapsul.*, **15**, 699-713 (1998).
- 3) J.A. Schrier and P.P. DeLuca, Recombinant human bone morphogenetic protein-2 binding and incorporation in PLGA microspheres delivery, *Pharm. Dev. Technol.*, **4**, 611-621 (1999).
- 4) H. Thakkar, R.K. Sharma, A.K. Mishra, K. Chuttani and R.R. Murthy, Albumin microspheres as carriers for the antiarthritic drug celecoxib, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **6**(1), E65-73 (2005).
- 5) B.W. Woo, G. Jiang, Y.W. Jo and P.P. DeLuca, Preparation and characterization of a composite PLGA and poly (acryloyl hydroxyethyl starch) microsphere system for protein delivery, *Pharm. Res.*, **18**, 1600-1606 (2001).
- 6) M.A. McDonald and K.L. Watkin, Investigations into the physicochemical properties of dextran small particulate gadolinium oxide nanoparticles, *Acad Radiol.*, **13**(4), 421-7 (2006).
- 7) J. Pan, F. Boury, M. Wenier-Julienne, P. Menei, J. Proust and J. Benoit, Why does PEG 400 co-encapsulation

- improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres, *Pharm. Res.*, **16**, 1294-1299 (1999).
- 8) T. Ehtezazi, C. Washington and C.D. Melia, First order release rate from porous PLA microspheres with limited exit holes on the exterior surface, *J. Control. Release*, **66**, 27-38 (2000).
 - 9) F. Boury, Tz. Ivanova, I. Panaiotov, J.E. Proust, A. Bois and J. Richou, Dilatational properties of adsorbed poly(D,L-lactide) and bovine serum albumin monolayers at the dichloromethane/water interface, *Langmuir*, **11**, 1636-1644 (1995).
 - 10) J. Goodwin, M. Braden, S. Downes and N.J. Marshall, Release of bioactive human growth hormone from a biodegradable material: Poly(g-caprolactone), *J. Biomed. Mater. Res.* **40**, 204-213 (1998).
 - 11) Y.Y. Yang, H.H. Chia and T.S. Chung, Effect of preparation temperature on the characteristics and release profiles of PLGA microspheres containing protein fabricated by double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release*, **69**, 81-96 (2000).
 - 12) J.L. Cleland, O.L. Johnson, S. Putney and A.J.S. Jones, Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres formulation development, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **28**, 71-84 (1997).
 - 13) J.L. Cleland, M.F. Powell and S.J. Shire, The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, **10**, 307-377 (1993).
 - 14) F.M. Richards. Protein stability: Still an unsolved problem, *Cellular and Molecular Life Science*, **53**, 790-802 (1997).
 - 15) S.D. Putney and P.A. Burke. Improving protein therapeutics with sustained-release formulations, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 153-157 (1998).
 - 16) W. Wang. Review: Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.*, **203**, 1-60 (2000).
 - 17) M. van de Weert, W.E. Hennink and W. Jiskoot. Review Article: Protein instability in poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles, *Pharm. Res.*, **17**, 1159-1167 (2000).
 - 18) J. Wang, B.M. Wang and S.P. Schwendeman. Characterization of the initial burst release of a model peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Control. Release*, **82**, 289-307 (2002).
 - 19) G. Zhu, S.R. Mallery and S.P. Schwendeman, Stabilization of proteins encapsulated in injectable poly(lactide-co-glycolide), *Nat. Biotechnol.*, **18**, 52-57 (2000).
 - 20) J. Kang and S.P. Schwendeman, Comparison of the effects of Mg(OH)₂ and sucrose on the stability of bovine serum albumin encapsulated in injectable poly(D,L-lactide-co-glycolide) implants, *Biomaterials*, **23**, 239-245 (2002).
 - 21) J.H. Kim, A. Taluja, K. Knutson, Y.H. Bae, Stability of bovine serum albumin complexed with PEG-poly(L-histidine) diblock copolymer in PLGA microspheres, *J. Control Release*, **109**, 86-100 (2005).
 - 22) Y. Xi, K. Tabata, M. Uno, T. Yoshimoto, Y. Kishida, Y. Sokawa and Ikada, Liver targeting of interferon through pullulan conjugation, *Pharm. Res.*, **13**, 1846-1850 (1996).
 - 23) T. Nishikawa, K. Akiyoshi and J. Sunamoto, Macromolecular complexation between bovine serum albumin and self-aggregated hydrogel nanoparticle of hydrophobized polysaccharide, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 6110-6115 (1996).
 - 24) K. Na, E.S. Lee and Y.H. Bae. Adriamycin loaded pullulan acetate/sulfonamide conjugate nanoparticles responding to tumor pH: pH-dependent cell interaction, internalization and cytotoxicity *in vitro*, *J. Control. Release*, **87**, 3-13 (2003).
 - 25) K. Na, K.H. Lee and Y.H. Bae. pH-Sensitivity and pH-dependent interior structure change of Self-Assembled Hydrogel Nanoparticles of Pullulan Acetate/Oligo(methacryloyl sulfadimethoxine) (PA/OSDM) Conjugates, *J. Control. Release*, **97**, 513-525 (2004).
 - 26) K. Na, K.H. Park, S.W. Kim and Y.H. Bae, Self-aggregated hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2), *J. Control. Release*, **69**, 225-236 (2000).
 - 27) K. Na and Y.H. Bae, Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from hydrophobized pullulan and sulfonamide conjugate; Characterization, aggregation and adriamycin release *in vitro*, *Pharm. Res.*, **19**, 681-688 (2002).
 - 28) K. Na, T.B. Lee, K.-H. Park, E.-K. Shin and H.-K. Choi. Self-assembled nanoparticles of hydrophobically-modified polysaccharide bearing vitamin H as a targeted anti-cancer drug delivery system, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, 165-173 (2003).
 - 29) C. Perez, P.D. Jesu's and K. Griebenow, Preservation of lysozyme structure and function upon encapsulation and release from poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres prepared by the water-in-oil-in-water method, *Int. J. Pharm.* **248**, 193-206 (2002).