

PLGA 나노파티클의 Plasmid DNA 봉입: 폴록사머와 온도의 영향

박정숙[†] · 강현숙 · 류상화 · 명창선 · 황성주

충남대학교 약학대학

(2007년 1월 26일 접수 · 2007년 2월 14일 승인)

Encapsulation of Plasmid DNA in PLGA Nanoparticles: Effects of Poloxamer and Temperature

Jeong-Sook Park[†], Hyun-Suk Kang, Sang-Hwa Ryu, Chang-Seon Myung and Sung-Joo Hwang

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received January 26, 2007 · Accepted February 14, 2007)

ABSTRACT – Previously, we have reported that PLGA nanoparticles were prepared for sustained release of water-soluble blue dextran and the particle size, in vitro release pattern and encapsulation were modulated by varying polymers. This study was designed to encapsulate plasmid DNA in PLGA nanoparticles and to investigate the effect of polymers and temperatures. PLGA nanoparticles were fabricated with poloxamer 188 (P188) or poloxamer 407 (P407) by using spontaneous emulsification solvent diffusion method. As a model plasmid DNA, pCMV-Taq2B/IL-18 was encapsulated in PLGA nanoparticles. Then, the particle size, zeta potential and encapsulation efficiency of nanoparticles containing plasmid DNA were investigated. Particle sizes of PLGA nanoparticles prepared with P188 and P407 were in the range of 200-330 nm and 250-290 nm, respectively. Zeta potentials of nanoparticles were negative regardless of nanoparticle compositions. Encapsulation efficiency of P407 nanoparticles prepared at 30°C was higher than those at other preparation condition. From the results, the PLGA nanoparticles prepared with poloxamers at different temperature, could modulate the particles size of nanoparticles, and encapsulation efficiency of plasmid DNA.

Key words – PLGA nanoparticles, Poloxamer, Plasmid DNA, Encapsulation

유전자 치료 및 유전자 백신의 성공은 DNA를 표적 세포에 효과적으로 수송하고 보호할 수 있는 적절한 수송체의 개발에 의해 좌우된다. 널리 알려진 수송체 중 생분해성 고분자를 이용한 나노파티클은 주사제, 경구제 및 국소 투여제에 광범위하게 적용가능할 뿐만 아니라 다른 화학 조성물과 물리적 성질을 가진 고분자를 첨가하여 약물의 방출을 조절할 수 있다.¹⁾ 이들은 생리활성 물질의 효과를 증진시키고, 효소에 의한 분해를 감소시킬 뿐만 아니라 방출속도를 조절할 수 있다는 장점이 있다.²⁻⁴⁾ 또한 나노파티클은 입자크기가 작기 때문에 생물학적인 장벽을 극복하여 봉입된 약물 분자의 수송을 향상시킬 수 있다.

이러한 수송체를 사용하는 방법 중 하나가 고분자파티클에 DNA를 봉입하는 것이다. 특히 poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)를 이용한 거대 분자의 수송 및 방출제어에 안전하게 사용되었기 때문에 유전자 전달 시스템으로도 매우 유망

한 수송체이다.⁵⁾ 현재 PLGA 나노파티클에 plasmid DNA의 봉입이 가능하며, 실제로 유전자 백신에서 이들 PLGA 나노파티클을 사용함으로써 효과적인 면역반응을 얻을 수 있었다.^{6,7)} 최근, 나노파티클의 작은 입자크기를 이용하여 봉입된 분자의 수송을 향상시키는 것으로 알려짐에 따라 나노파티클 수송체에 대한 관심이 증가하고 있다. 특히, PLGA 나노파티클은 세포 내로 uptake된 후 endosomal compartment에서 신속하게 제거되므로,⁸⁾ 세포내 분포를 촉진하고 표적 조직으로의 지속적인 수송이 필요한 경우 매우 적절한 DNA 수송체로 생각된다. 또한 나노파티클은 마이크로파티클에 비해 transfection 효율이 우수하고, 이때 효율은 사용한 고분자의 분자량, 입자 크기, 표면 특성, 전하에 의해 영향을 받는다.^{9,10)}

유전자 수송에 대한 또 다른 접근법은 폴록사머와 같은 양친성 고분자를 사용하여 DNA와 상호작용하도록 하여 유전자 발현을 촉진하는 것이다.¹¹⁾ 이러한 결과는 고분자와 plasmid DNA 사이의 복합체 형성에 기인하며, 양하전된 고분자가 음하전된 고분자보다 transfection 효율이 높게 나타

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)821-5932, E-mail : eicosa@cnu.ac.kr

났다.¹²⁾

최근 plasmid DNA를 PLGA 나노파티클에 봉입한 연구에서 제조 온도를 30°C로 일정하게 고정하였으나,¹³⁾ PLGA 나노파티클 제조 온도는 파티클 형성에 영향을 주어 결과적으로 파티클의 내부 구조와 봉입된 단백질의 방출속도에 차이를 줄 수 있다.¹⁴⁾ 따라서 본 연구에서는 선행연구를 통해 블루 텍스트란의 방출 패턴 조절에 적합한 PLGA와 폴록사머의 조성을 선정하여 plasmid DNA가 봉입된 나노파티클을 여러 온도 조건에서 제조하여, 입자 크기, 제타전위 및 봉입효율에 미치는 폴록사머와 온도의 영향을 평가하였다.

실험 방법

시약 및 기기

본 실험에서 poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA, 50:50 Resomer[®] RG 503, MW 40,000~75,000)는 Boehringer Ingelheim(Germany)의 제품을 사용하였으며, 폴록사머 188과 407은 BASF(Germany)의 제품을 구입하였다. 기타 용매와 시약은 시판 제품 중 시약급 이상을 사용하였다. 나노파티클의 제조 및 평가를 위해 evaporator(KU-LNW, Sunil Instrument Co., Ltd., Korea), ultra speed centrifuge(XL-80, Beckman Int., USA), freeze dryer(MD-FDU-540, Toyko Rikakikai Co. Ltd., Japan), UV spectrometer(UV-VIS mini-1240, Shimadzu, Japan), scanning electron microscopy(SEM, XL 30SFEG, Philips, Netherlands) 등을 사용하였다.

Plasmid DNA

모델 plasmid DNA로 pTaq2B/IL-18을 함유하는 E. coli 균주의 단일 콜로니를 LB plate로부터 따서 항생제가 첨가된 LB배지 5~10 mL에 넣어주고 37°C에서 300 rpm으로 8시간 정도 교반하면서 배양한 다음, LB배지를 1/500~1/1000으로 희석한 후 37°C에서 300 rpm으로 16시간 정도 교반하면서 배양하였다. 얻어진 배양액을 4°C에서 6000 rpm으로 15분간 원심분리 한 후 QIAGEN Mega-Prep kit으로 plasmid DNA를 정제하였다. Plasmid DNA의 농도는 260 nm의 파장에서 흡광도를 측정하여 산출하였다.

PLGA와 폴록사머를 사용한 나노파티클의 제조

PLGA와 폴록사머(188 또는 407)의 중량비를 50:50으로 정하여 용매환산법으로 나노파티클을 제조하였다.⁵⁾ PLGA 50 mg과 폴록사머 50 mg을 2 mL의 ethyl acetate에 녹인 후, 200 µg의 plasmid DNA가 포함된 수용액(1 mg/mL) 200 µL를 가하여 1분간 진탕혼합하였다. 제조한 에멀전을 교반하

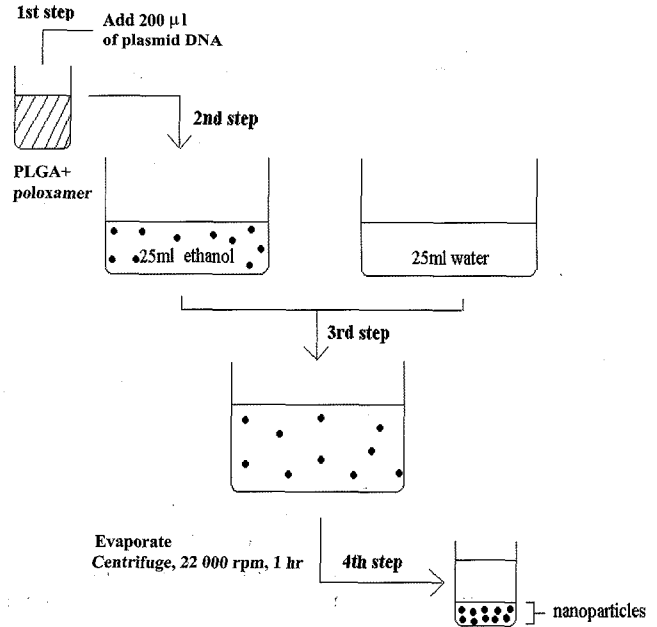


Figure 1—Schematic procedure for preparation of PLGA nanoparticles.

면서 에탄올 25 mL에 붓고 고분자 나노파티클의 형태로 급속히 침전시킨 다음, 증류수 25 mL로 희석하여 10분간 교반하였다. 진공 하에서 30°C, 40°C, 50°C의 각기 다른 온도에서 유기용매를 증발시키고 농축하였다. 분석을 위해 나노파티클을 22,000 rpm, 4°C에서 1시간 동안 원심분리한 후, 동결건조하였다. 동결건조 과정은 2단계로 이루어지는데 첫 번째 단계로 -34°C에서, 48시간 동안 건조시킨 후, 두 번째 단계로 25°C까지 온도를 점차 상승시켜 건조하였다.⁵⁾ 나노파티클의 제조과정은 Figure 1에 나타내었다.

나노파티클의 입자 크기 및 제타 전위 측정

나노파티클의 입자 크기 및 제타 전위는 광산란분광기(light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otsuka Electronics Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정 전 시료를 증류수에 균일하게 분산시켰으며, 3회 반복 측정한 결과의 평균값을 계산하였다.

Plasmid DNA의 봉입 확인 및 효율 측정

1% agarose gel을 제조하여 plasmid DNA가 봉입된 PLGA 나노파티클을 loading하고 전기영동을 하였다.

동결 건조한 나노파티클 5 mg에 증류수 1 mL과 클로로포름 1 mL을 가한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 용액을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후, 상정액의 흡광도를 측정하여 plasmid DNA의 봉입 효율을 계산하였다.

Table I—Effect of Poloxamer Type and Evaporation Temperature on Particle Size (nm) (Mean \pm S.D., n = 3)

Temperature	P188	P407
30°C	329.9 \pm 31.9	288.3 \pm 9.0
40°C	197.5 \pm 28.6	281.4 \pm 27.4
50°C	201.0 \pm 15.2	252.3 \pm 16.4

Table II—Effect of Poloxamer Type and Evaporation Temperature on Zeta-potential (mV) (Mean \pm S.D., n = 3)

Temperature	P188	P407
30°C	-30.1 \pm 5.5	-30.7 \pm 0.7
40°C	-36.0 \pm 2.2	-31.4 \pm 0.8
50°C	-29.3 \pm 8.7	-32.4 \pm 0.8

결과 및 고찰

PLGA 나노파티클의 입자 크기에 미치는 폴록사머와 온도의 영향

PLGA 나노파티클의 입자 크기에 미치는 폴록사머의 영향을 알아보기 위해, 폴록사머 188과 407 각각을 사용하여 plasmid DNA가 봉입된 나노파티클을 제조하였고, 입자 크기를 측정하였다. Table I에 나타난 바와 같이 30°C로 유기용매를 증발하였을 때, 폴록사머 188을 사용하여 나노파티클을 제조한 경우 입자 크기는 약 330 nm였고, 폴록사머 407을 사용하여 제조한 경우의 입자 크기는 약 290 nm였다. 그러나 폴록사머 종류에 따른 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 반면, 유기용매의 증발 온도를 각각 40°C와 50°C로 하였을 때, 폴록사머 188을 사용하여 제조한 나노파티클의 입자 크기가 폴록사머 407을 사용하여 제조한 경우보다 작았으며, 유의성 있는 차이를 나타내었다. 이는 폴록사머 407과 188에 존재하는 PEO 유도체의 양, 길이, 분자량에 따라 임계미셀온도와 표면장력이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다.¹⁵⁾ 이러한 특이적인 성질은 PEO 유도체와 plasmid DNA 사이에서 다른 상호작용을 유도하여 plasmid DNA와 폴리머 혼합물 사이의 유기적인 구조를 형성할 수 있을 것으로 사료된다.¹³⁾

또한 나노파티클 제조시 유기용매를 증발시키는 온도의 영향을 알아보기 위하여 30°C, 40°C, 50°C와 같이 온도 조건을 달리하여 나노파티클을 제조하였다. 폴록사머의 종류와 관계없이 증발 온도를 높여줌에 따라 입자 크기가 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 폴록사머 188을 사용한 경우 온도의 영향이 더욱 큰 것으로 나타났다. 본 실험 결과는 PLGA와 PVA를 사용하여 제조한 미립구의 경우에 제조 온도를 높여줌에 따라 입자 크기가 균일하고 작게 나타나는 결과¹⁴⁾와 유사하게 나타났다.

입자 크기는 다양한 제조인자에 의해 영향을 받을 수 있으며, 이 중 온도는 나노파티클이 형성되는 방법이나 속도에 영향을 미치기 때문에 제조 온도에 의해 나노파티클의 물리적 특성이 영향을 받을 것으로 예측할 수 있다.¹⁴⁾ 특히 입자 크기는 분해속도,¹⁶⁾ 봉입 및 초기 방출¹⁷⁾에 영향을 미칠 수 있기 때문에 입자 크기의 조절이 매우 중요하다.

PLGA 나노파티클의 제타 전위에 미치는 폴록사머와 온도의 영향

PLGA 나노파티클의 제타 전위에 미치는 폴록사머의 영향을 알아보기 위해, 폴록사머 188과 407 각각을 사용하여 plasmid DNA가 봉입된 나노파티클을 제조하고, 제타전위를 측정하였다. Table II에 나타난 바와 같이 30°C로 유기용매를 증발하였을 때, 폴록사머 188과 407을 사용하여 나노파티클을 제조한 경우 모두 제타전위는 약 -30 mV였다. 그러나 40°C로 제조조건을 변경할 경우 폴록사머 188은 약 -36 mV, 폴록사머 407은 약 -31 mV였고, 50°C로 온도를 높여서 제조할 경우 폴록사머 188은 약 -29 mV, 폴록사머 407은 약 -32 mV였다. 40°C에서 폴록사머 188을 사용한 경우를 제외한 모든 제조 온도 조건에서 나노파티클 제조에 사용한 폴록사머 종류에 따른 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다. 또한 같은 폴록사머를 사용한 경우에도 제조 온도에 의한 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이러한 현상은 나노파티클의 표면 특성은 제조방법(예; 분무건조법, 용매증발법 등)에 의한 영향을 많이 받으며 주어진 방법 내에서 조절가능한 변수에 대해서는 영향을 적게 받기 때문인 것으로 생각된다.¹⁸⁾

Plasmid DNA의 봉입 효율

나노파티클에 봉입된 plasmid DNA를 agarose gel에 전기영동하여 봉입여부와 plasmid DNA의 손상여부를 확인하였다. 봉입되지 않은 naked plasmid DNA와 봉입된 plasmid DNA를 전기영동 하였을 때, 두 경우 모두 plasmid DNA의 isoforms인 supercoiled form과 open circular form을 확인할 수 있었다(Figure 2). 또한 나노파티클을 제조하는 과정에서 plasmid DNA가 분해되어 생성될 수 있는 linear form의 plasmid DNA가 전기영동 상에서 관찰되지 않았다. 이러한 결과들은 open circular form의 plasmid DNA가 PLGA 나노파티클의 제조과정을 통해 생성된 것이 아니며, 나노파티클의 제조과정, 폴록사머, 온도가 plasmid DNA의 안정성에 유의성 있는 영향을 주지 않음을 의미한다.¹⁹⁾

감압 하에서 동결건조한 나노파티클의 무게를 달아 콜로로포름에 용해시키고, 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 나노파티클 중의 plasmid DNA의 봉입 효율은 다음 식을 이

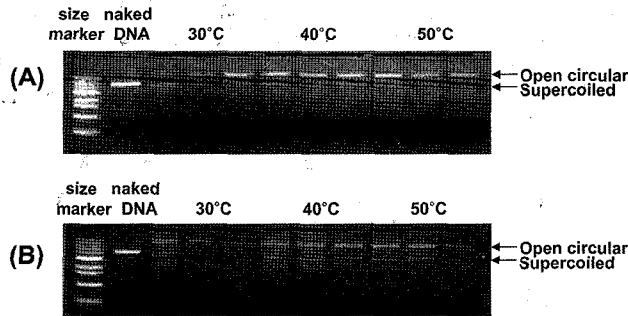


Figure 2—Gel electrophoresis of plasmid DNA encapsulated in PLGA nanoparticles. (A) PLGA/P188 nanoparticles, (B) PLGA/P407 nanoparticles.

Table III—Effect of Poloxamer Type and Evaporation Temperature on Encapsulation Efficiency (%) (Mean \pm S.D., n = 3)

Temperature	P188	P407
30°C	7.2 \pm 1.7	13.6 \pm 3.2
40°C	11.9 \pm 2.5	10.0 \pm 0.8
50°C	11.9 \pm 1.4	9.8 \pm 1.0

용하여 계산하였다.

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = \frac{\text{Amount of plasmid DNA within nanoparticles}}{\text{Theoretical amount of plasmid DNA loaded}} \times 100$$

30°C, 40°C, 50°C에서 제조한 나노파티클의 plasmid DNA 봉입효율은 폴록사머 188을 사용한 경우 7.2%, 11.9%, 11.9%였고, 폴록사머 407을 사용한 경우 13.6%, 10.0%, 9.8%였다(Table III). 본 실험 결과에서는 제조 온도 30°C에서 폴록사머 407을 사용하여 나노파티클을 제조한 경우의 봉입효율이 13.6%로 가장 높았으나, Csaba 등¹³⁾의 봉입효율보다 낮았다. 이는 봉입되지 않고 남은 supernatant에 있는 plasmid DNA를 측정하여 봉입효율을 산출하였기 때문에 Csaba 등의 봉입효율이 훨씬 높게 계산된 것으로 생각된다. 폴록사머 188을 사용한 경우의 봉입효율은 온도에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 폴록사머 407을 사용한 경우 용매 증발 온도가 높아짐에 따라 봉입효율도 감소하는 것으로 나타났다. 이는 50°C에서 제조된 나노파티클의 경우 유기용매의 빠른 증발에 의해 쉽게 수상으로 확산되어 입자크기도 작아지고 봉입효율도 낮아진 것으로 사료된다.²⁰⁾

결 론

본 실험의 결과는 PLGA 나노파티클 제조시 사용되는 폴

록사머와 제조온도를 변화시켜 plasmid DNA을 함유하는 나노파티클의 입자크기와 봉입효율을 조절할 수 있음을 보여주었다. 또한 PLGA 나노파티클로부터 plasmid DNA의 방출 실험을 보완하여 제조 온도의 영향에 관한 연구를 진행할 수 있을 것이다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-003-E00439).

참고문헌

- 1) S. S. Feng, Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy, *Expert Rev. Med. Devices*, **1**, 115-125 (2004).
- 2) J. Panyam and V. Labhasetwar, Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles, *Mol. Pharmaceut.*, **1**, 77-84 (2004).
- 3) A. Rosler, G. W. M. Vandermeulen and H. A. Klok, Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 95-108 (2001).
- 4) R. A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, **21**, 2475-2490 (2000).
- 5) S. H. Ryu, S. J. Hwang and J. S. Park, Sustained release of water-soluble blue dextran from PLGA nanoparticles, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **36**, 109-114 (2006).
- 6) D. H. Jones, S. Corris, S. McDonald, J. C. Clegg and G. H. Farrar, Poly(DL-lactide-co-glycolide)-encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration, *Vaccine*, **15**, 814-817 (1997).
- 7) M. L. Hedley, J. Curley and R. Urban, Microspheres containing plasmid-encoded antigens elicit cytotoxic T-cell responses, *Nat. Med.*, **4**, 365-368 (1998).
- 8) J. Panyam, W. Z. Zhou, S. Prabha, S. K. Sahoo and V. Labhasetwar, Rapid endo-lysosomal escape of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles: implications for drug and gene delivery, *FASEB J.*, **16**, 1217-1226 (2002).
- 9) S. Prabha, W. Z. Zhou, J. Panyam and V. Labhasetwar, Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **244**, 105-115 (2002).
- 10) S. Prabha and V. Labhasetwar, Critical determinants in PLGA/PLA nanoparticle-mediated gene expression, *Pharm. Res.*, **21**, 354-364 (2004).
- 11) P. Lemieux, N. Guerin, G. Paradis, R. Proulx, L. Chistyakova,

- A. Kabanov and V. Alakhov, A combination of poloxamers increases gene expression of plasmid DNA in skeletal muscle, *Gene Ther.*, **7**, 986-991 (2000).
- 12) A. Prokop, E. Kozlov, W. Moore and J. M. Davidson, Maximizing the in vivo efficiency of gene transfer by means of nonviral polymeric gene delivery vehicles, *J. Pharm. Sci.*, **91**, 67-76 (2002).
- 13) N. Csaba, P. Caamano, A. Sanchez, F. Dominguez and M. J. Alonso, PLGA : poloxamer and PLGA : poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery, *Biomacromolecules*, **6**, 271-278 (2005).
- 14) 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 double-emulsion solvent extraction/evaporation method, *J. Control. Release*, **69**, 81-96 (2000).
- 15) P. Alexandridis and T. A. Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloid. Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **96**, 1-46 (1995).
- 16) R. C. Mehta, R. Jeyanthi, S. Calis, B. C. Thanoo, K. W. Burton and P. P. DeLuca, Biodegradable microspheres as depot system for parenteral delivery of peptide drug, *J. Control. Release*, **29**, 375-384 (1994).
- 17) X. M. Deng, X. H. Li, M. L. Yuan, C. D. Xiong, Z. T. Huang, W. X. Jia and Y. H. Zhang, Optimisation of preparative conditions for poly-DL-lactide-polyethylene glycol microspheres with entrapped Vibrio Cholera antigens, *J. Control. Release*, **58**, 123-131 (1999).
- 18) P. Narayan, D. Marchant and M. A. Wheatley, Optimization of spray drying by factorial design for production of hollow microspheres for ultrasound imaging, *J. Biomed. Mater. Res.*, **56**, 333-341 (2001).
- 19) F. Mohamed and C. F. van der Walle, PLGA microcapsules with novel dimpled surfaces for pulmonary delivery of DNA, *Int. J. Pharm.*, **311**, 97-107 (2006).
- 20) X. Fu, Q. Ping and Y. Yao, Effect of formulation factors on encapsulation efficiency and release behavior *in vitro* of huperzine A-PLGA microspheres, *J. Microencapsul.*, **22**, 705-714 (2005).