한국생물공학회지 제17권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 1, 33-37(2002)

PLGA 미립구로부터 PEGylated G-CSF의 서방성 방출

임 형 권 · 이 시 욱 · 강 관 엽 · [1]박 태 관 · †정 경 환
(재)목암생명공학연구소, [1]한국과학기술원 생물과학과
(접수 : 2001. 12. 8., 게재승인 : 2002. 1. 18.)

Sustained Release of PEGylated G-CSF from PLGA Microsphere

Lim, Hyung-Kwon, Si-Wook Lee, Kwan-Yup Kang, Tae Gwan Park[1], and Kyung-Hwan Jung†
Mogam Biotechnology Research Institute, 341 Pojung-Ri, Koosung-Eup, Yongin, Kyonggi-Do 449-910, Korea
[1]Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
.(Received : 2001. 12. 8., Accepted : 2002. 1. 18.)

To improve *in vitro* release kinetic of G-CSF in PLGA microsphere, G-CSF was PEGylated with methoxy polyethylene glycol-aldehyde (mPEG-aldehyde, MW 5000). The majority of G-CSF was mono-PEGylated and it was characterized using SDS-PAGE, HPLC, and peptide mapping. The PLGA microencapsulation with the native, or PEGylated G-CSF was performed using W/O/W method, where the encapsulation efficiency was high. For the high loading of G-CSF to microsphere, G-CSF and PEGylated G-CSF were concentrated and then verified the protein stability using native gel and gel filtration chromatography. In comparison with native G-CSF, PEGylated G-CSF was released during the extended period and its maximum amount of released G-CSF was also increased.

Key Words : G-CSF, PEGylation, PLGA microencapsulation, Sustained release

서 론

최근 생물 공학의 발전에 따른 세계 생물의약품 시장의 규모는 기하급수적으로 증가하는 추세이다. 본 연구의 모델 단백질인 granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)는 항암 보조치료제로서 화학요법 후 감소할 수 있는 호중구 세포(neutrophil)의 증식인자이다(1). G-CSF는 최근 4년간 연간 평균 약 10억 달러 정도가 판매되고 있는 세계 10대 생물의약품 중의 하나로서 현재 가장 성공적으로 실용화된 생물의약품으로 평가 받고 있다. 그러나 G-CSF가 치료용으로 인체에 투여 되었을 때, 반감기가 3.5시간 정도로 매우 짧고, 그로 인해 약 2-3주간 매일 투여 해야 하는 문제점이 있으며 이에 따르는 경제적 부담도 크다고 알려져 있다(2). 이러한 문제점을 해결하기 위하여 G-CSF 제제 대한 약물 전달 체계가 요구되고 있으며, 현재 미국의 제약 회사인 Amgen에서도 차세대 G-CSF 제제로서 G-CSF에 polyethylene glycol (PEG)을 붙여 체내에서의 반감기를 증가시킨 PEGylated G-CSF를 개발하여 최근 허가를 완료한 것으로 알려져 있다(3,4). 생물공학 기술의 개발 속도 및 단백질 및 펩타이드 계통의 의약품 시장의 성장을 고려할 때 단백질 및 펩타이드 계통의 의약품 증가와 더불어 범용적으로 사용될 수 있는 단백질 및 펩타이드 항암제의 약물전달 체계의 개발은 매우 절실하다. 그 중의 한 가지 방법으로서 생분해성이 있으며 인체에 무해한 고분자 poly-lactide-co- glycolide (PLGA)를 담체로 하고 한 번의 투여로 약물이 서서히 방출되는 약물전달 체계가 활발히 연구되고 있다(5-8).

PLGA 미립구를 이용한 약물 방출시 가장 문제점이 되는 것은 제조 과정 중이나 방출 시 단백질이 안정하지 않으면 단백질이 변형되어 서로 뭉쳐서 방출이 이루어 지지 않는 점이다(9-11). 이는 단백질의 종류에 따라서도 다르게 나타나는 특성이다. G-CSF의 경우도 중성 pH에서 단백질의 뭉침 현상이 확연하다. 이를 해결하기 위하여 PEG를 접합시키는 것은 구조적으로 수용액 상태에서 용해도를 증가시킴으로써 단백질의 안정성증가에 기여할 것으로 생각된다(12). 본 연구에서는 PEGylation으로 G-CSF의 안정성을 확보한 후 생분해성 중합체인 PLGA를 이용한 미립구 형성 방법을 이용하여 G-CSF의 서방성 제제를 개발하고자 하였다.

†Corresponding Author : Mogam Biotechnology Research Institute, 341 Pojung-Ri, Koosung-Eup, Yongin, Kyonggi-Do 449-910, Korea
Tel : +82-31-260-9845, Fax : +82-31-260-9808
E-mail : khjung@greencross.com

재료 및 방법

재 료

G-CSF는 본 실험실에서 재조합 *Escherichia.coli*를 이용한 발효 및 정제를 통하여 공급하였다(13). Methoxy-polyethylene

glycol- aldehyde는 분자량이 5,000으로 Fluka에서 구입하였다. PLGA polymer는 monomer 비율이 50:50인 Boehringer Ingelheim (RG503, MW 38,000, Germany)를 사용하였다. Oil phase로 사용한 methylene chloride는 analytical grade로 Aldrich제품을 사용하였다. 그 외 다른 시약들은 Sigma-Aldrich 제품으로 사용하였다.

G-CSF의 PEGylation

10 mM sodium acetate buffer (pH 4.0)에 보관된 G-CSF, 22.55 mg을 시료로 하고 mPEG-aldehyde를 몰 비로 8배 첨가하여 pH 5.0, 4℃로 맞추어 실시하였다. 사용된 reductive agent인 $NaCNBH_3$는 linker로 사용된 mPEG-aldehyde 몰 비의 10배 만큼 첨가하여 24시간 반응시켰다(3). mPEGylated G-CSF는 HiLoad 16/10 SP-Sepharose HP column을 이용하여 분리하였다.

Polyacrylamide gel electrophoresis

G-CSF 및 PEGylated G-CSF의 특성 분석을 위하여 SDS-PAGE와 native gel을 이용하였다. Gel은 모두 Novex에서 구입한 4-20% gradient pre-casting gel을 사용하였다. 시료는 20 mL의 부피로 loading하였으며 120 V에서 2시간 동안 이동 시켰다. 자세한 순서는 Sambrook et al.(1989) 를 따랐다(14).

Gel filtration chromatography

Column 은 Tosoh TSK gel G2000SWXL (Japan)을 사용하였으며 mobile phase는 20 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl를 사용하였고 유속은 1.0 mL/min로 고정하였다. HPLC는 Gilson system을 사용하였고 시료는 일정하게 20 μL loading하였다.

Peptide mapping

0.25 mg G-CSF와 0.43 mg mono-PEGylated G-CSF를 urea (8M) 수용액, 100 μL에 분산시킨 후, 약 10분간 sonication하였다. 그 후, Tris-HCl (1 M pH 8.5), 10 μL와 Tris-HCl (10 mM pH 8.5), 10 μL에 EndoLys C (Boehringer Mannheim, Germany) 2.5 μg을 녹인 후, 증류수로 전체 부피를 200 μL로 맞추었다. 이 용액을 7시간 동안 상온에서 정치하였다. 이 후 100 mM DTT, 4 μL를 첨가하고, 다시 iodoacetic acid (100 mM) 22.77 μL를 첨가한 후, 60°C에서 1시간 동안 가열하였다. 상온으로 다시 식힌 후, 두 용액을 각각 Vydac C4 protein column을 이용하여 HPLC분석하였다

Microencapsulation

미립구 형성 방법은 W/O/W 방법으로서 Kim 등의 방법을 변형시켰다(11). 자세한 순서는 다음과 같다. G-CSF가 있는 수용액 (sodium acetate buffer pH 4.0 또는 0.04% tween 80과 5%(w/v) sorbitol이 포함된 sodium acetate buffer) 100 μL를 준비하고 2 mL의 methylene chloride와 0.6 mL의 acetone의 oil상에 100 mg의 PLGA를 녹였다. 위의 두 용액을 섞은 후 sonication하였다. 이렇게 형성된 emulsion을 30 mL의 5%(w/v) polyvinylalchol (Sigma)이 포함된 수용액으로 옮겨서 homogenizer (Silverson, model L4RT)로 7000 rpm, 1분 동안 2차 emulsion

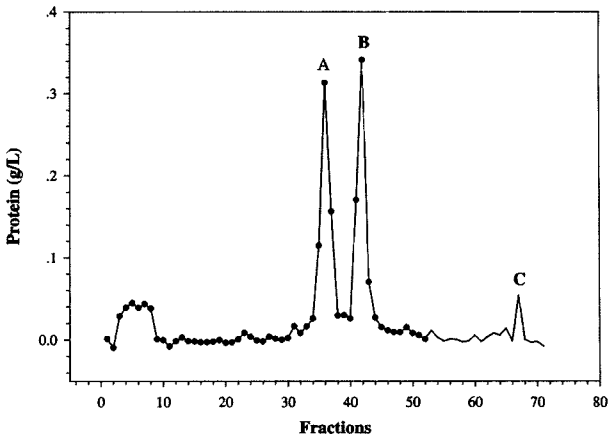

Figure 1. Chromatography for the purification of PEGylated G-CSF. A, PEGylated G-CSG; B, native G-CSF; C, A+B.

을 형성시켰다. Methylene chloride의 증발을 통한 추출은 400 mL의 증류수로 4시간 동안 진탕을 하면서 실시하였다. 형성된 미립구는 원심분리를 통하여 분리한 후 냉동 건조하여 다음 실험까지 4℃에서 보관하였다.

방출 거동 조사

냉동 건조된 미립구 30 mg을 150 mM NaCl이 포함된 phosphate buffer (pH 7.2) 2 mL에 넣었다. 37℃에서 stirrer로 진탕하면서 매 12시간 마다 1 mL의 상등액을 취하고 새로운 완충액 1 mL로 미립구를 다시 풀어주었다. 시료는 bicinchoninic acid (BCA, Sigma)을 이용한 방법으로 단백질 정량 하였다. 봉입율은 형성된 미립구 내의 단백질 loading양에 이론적인 단백질 loading양으로 나누어 그 비율을 백분율로 나타내었다.

결과 및 고찰

G-CSF의 PEGylation 및 분석

최종적으로 반응시킨 PEGylated G-CSF를 HiLoad 16/10 SP- Separose HP column을 이용하여 분리하고 회수하였다. 그 결과 A, B, C 3개의 분획을 얻을 수 있었으며(Figure 1) 각각을 SDS- PAGE로 분석한 결과 lane 4에서 PEG가 한 개 붙은 mono- PEGylated G-CSF를 얻을 수 있었다(Figure 2). PEGylation 최종 반응액 중 A 및 B분획을 chromatogram과 SDS-PAGE상에서 면적을 비교한 결과 PEGylation 반응정도는 약 50% 수준 이었다. 반응 조건 중에서 PEGylation 효율에 가장 영향을 미치는 인자는 mPEG-aldehyde 몰비와 pH이다. pH를 올릴수록 반응 수준은 높아지나 무작위 반응이 일어나기 쉽기 때문에 mono- PEGylation 되는 G-CSF의 비율이 떨어지며 pH를 낮추면 반대 현상을 예상할 수 있다. 따라서 반응 효율을 향상시키기 위해서는 pH와 같은 반응 조건을 최적화 하는 연구가 더 필요할 것으로 사료된다.

또한 분리된 mono-PEGylatd G-CSF를 EndoLys C Peptidase를 이용하여 반응시킨 후 reverse phase chromatography를 통하여 peptide mapping을 실시하였다. 그 결과 반응 전과 후의 peptide 패턴이 다르게 나타났으며 G-CSF가 정상적으로 PEGylated 됐음을 다시 한번 확인하였다(Figure 3).

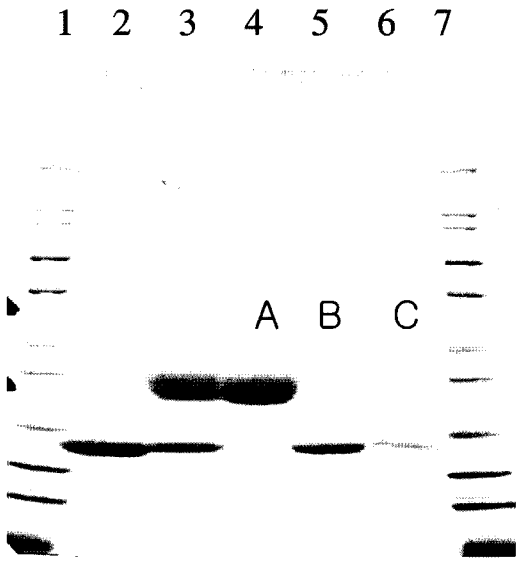

Figure 2. SDS-PAGE of fraction A, B, and C in Fig.1. Lane 1, 7, MW size marker; lane 2, G-CSF standard; lane 3, reaction mixture before separation; lane 4, fraction A; lane 5, fraction B; lane 6, fraction C.

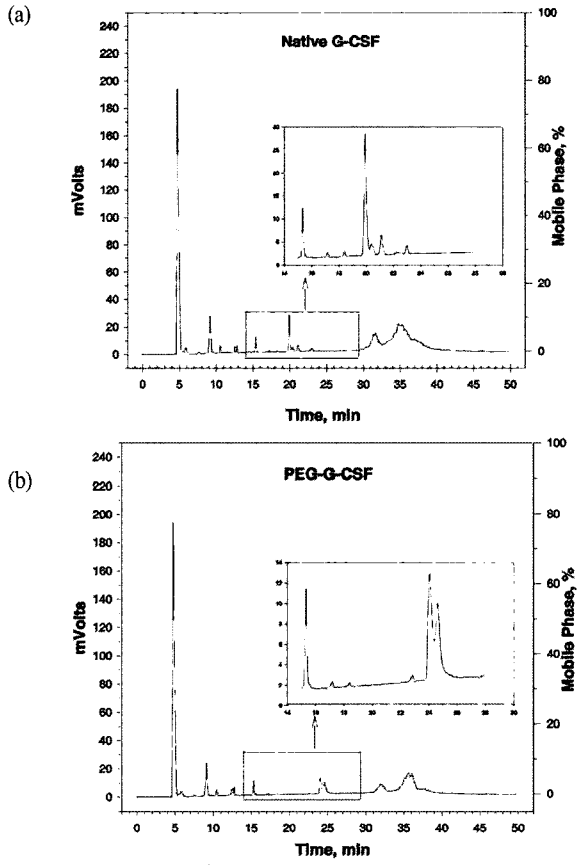

Figure 3. Peptide mapping using EndoLys C for the native G-CSF and PEGylated G-CSF. (a) Native G-CSF. (b) PEGylated G-CSF.

G-CSF및 PEGylated G-CSF의 PLGA microencapsulation

우선 PLGA를 이용한 W/O/W 형태의 미립구를 제조하기 위하여 기초적인 공정 최적화 실험을 모델 단백질인 bovine serum albumin을 이용하여 실시하였다. 여러 조건 중에서 유기용매의 부피(O)에 대한 internal aqueous phase 부피(W_1)의 비율이 단백질 봉입율에 미치는 영향이 가장 컸다. Table 1에서 보는 바와 같이 internal aqueous phase의 부피가 유기용매의 부피에 비해 낮을수록 높은 봉입율을 나타내었다. Table 1의 3의 조건으로 낮은 농도의 G-CSF와 PEGylated G-CSF를 PLGA로 microencapsulation하였다. 그 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 모든 시료에 있어서 평균 70% 수준의 봉입율을 보였으며 특히 첨가제 없이 sodium phosphate buffer에 녹인 PEGylated G-CSF의 경우 96%의 봉입율을 보였다.

Table 1. Effect of aqueous volume ratio and acetone proportion in organic phase on encapsulation efficiency using BSA (10 mg/mL in PBS).

Batch no.	Aqueous volume ratio to organic solvent (W_1:O)	Acetone (%)	encapsulation efficiency (%)
1	1:4	0	~0
2	1:10	0	19.5
3	1:20	30	~100

Table 2. PLGA encapsulation of G-CSF and PEGylated G-CSF with low concentration.

Sample	Additives	Encapsulation efficiency (%)
500 μg/mL of G-SCF	5% sorbitol, 0.04% Tween 20	66
1.78 mg/mL of G-CSF	5% sorbitol, 0.04% Tween 20	47
430 μg/mL of PEGylated G-SCF	**mone**	**96**
430 μg/mL of PEGylated G-CSF	5% sorbitol, 0.04% Tween 20	67

농축된 G-CSF 및 PEGylated G-CSF의 안정성 조사

PLGA 미립구에 G-CSF의 loading 양을 늘리기 위해 G-CSF와 PEGylated G-CSF를 4~8 mg/mL로 농축한 다음 단백질 변형 여부를 native gel과 gel filtration chromatography로 확인하였다. 그 결과 gel filtration의 경우 단일 peak를 보였고(Figure 4) native gel 상에서는 윗부분이 끌리는 현상이 나타났지만 lane 4의 낮은 농도의 경우는 단일 밴드를 보였다(Figure 5). 따라서 농축 후 dimer형성 등과 같은 G-CSF의 물리적 변성은 일어나지 않았음을 확인하였다. 이들을 다시 상기의 조건으로 PLGA로 encapsulation하였으며 봉입율은 첨가제가 있는 조건에서 70%을 나타내었다 (Table 3).

농축된 G-CSF 및 PEGylated G-CSF의 PLGA 미립구의 *in vitro* 방출 test

CSF의 *in vitro* 방출 거동을 조사하기 위하여 pH 7.2인 PBS buffer에 냉동 건조된 G-CSF 및 PEGylated G-CSF가 봉

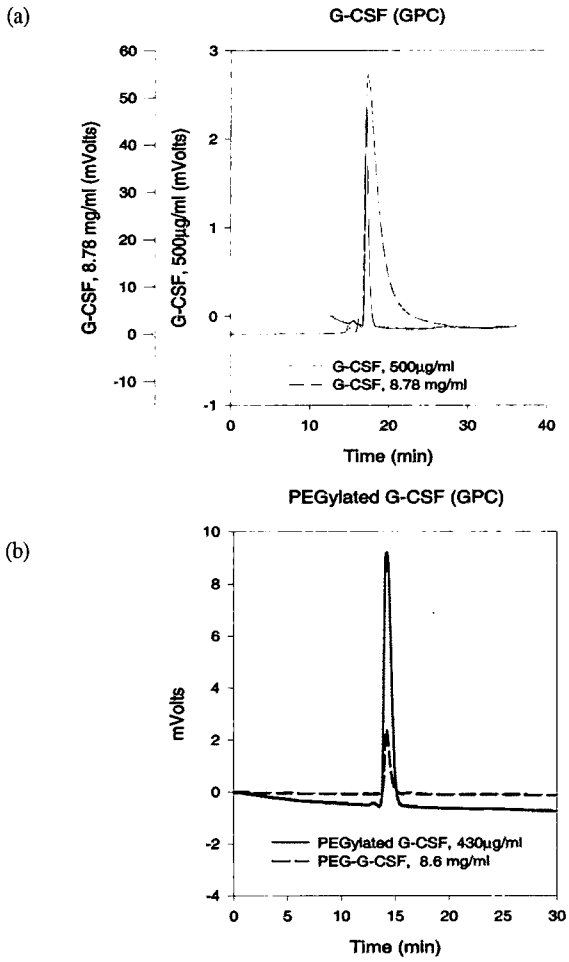

Figure 4. Gel filtration chromatography for the concentrated G-CSF and PEGylated G-CSF. (a) Native G-CSF. (b) PEGylated G-CSF.

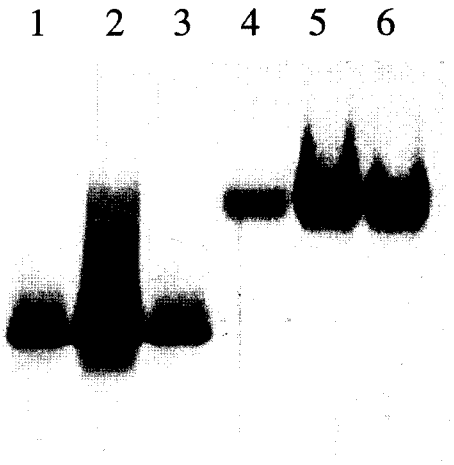

Figure 5. Native gel electrophoresis for the concentrated G-CSF and PEGylated G-CSF. Lane 1, G-CSF 500 μg/mL; lane 2, G-CSF, 6.47 μg/mL; lane 3, G-CSF, 8.78 mg/mL; lane 4, PEGylated G-CSF, 430 μg/mL; lane 5, PEGylated G-CSF, 4.86 mg/mL; lane 6, G-CSF, 8.60 mg/mL.

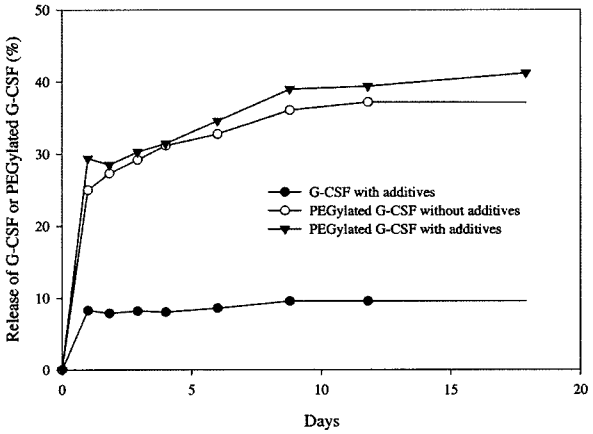

Figure 6. *In vitro* release kinetics of G-CSF and PEGylated G-CSF from PLGA microsphere. Additives contained 5% sorbitol and 0.04% tween 20 as a stabilizer in the aqueous phase (W_1).

입된 PLGA 미립구를 각각 15 mg/mL 농도로 풀고 37℃ 에서 방출된 단백질을 정량하였다. Figure 6에서 보는 바와 같이 PEGylated G-CSF의 경우 G-CSF보다 더 빠른 속도로 방출이 진행되었으며 약 20일 이상 방출이 지속되었다. 또한 최종 방출비율은 약 40% 수준이었다. 이는 G-CSF의 경우 14일 경과 후 8% 정도가 방출된 것에 비하여 4배 이상 증가한 결과이다.

이의 원인은 두 가지 측면으로 생각할 수 있다. 첫째는 PEG가 유기용매로 사용된 methylene chloride에 대하여 용해성이 있기 때문에 미립구 표면의 pore형성을 촉진시켜 방출을 빠르게 할 수 있고 두 번째는 PEGylation으로 인하여 단백질의 안정성이 증가 함으로써 미립구 내의 불용성 침전물의 형성을 막고 native G-CSF에 비해 지속적으로 방출이 되었을 가능성이다. 결과적으로 이 연구를 통하여 G-CSF의 PEGylation 조건을 확립하였고, PLGA 미립구에서 native G-CSF 보다 나은 방출 거동을 보이는 점을 확인하였다.

요 약

PLGA 미립구로부터 G-CSF의 방출 거동 양상을 향상 시키기 위하여 G-CSF를 분자량 5000인 methoxy polyethylene glycol-aldehyde로 PEGylation 시켰다. 대부분의 G-CSF는 mono-PEGylation 되었으며, 이를 SDS-PAGE, HPLC, 및 펩타이드 지도 분석을 통해 확인하였다. W/O/W 방법을 사용하여 G-CSF 및 PEGylated G-CSF의 PLGA 미립구를 제조하였으며, 이때 봉입율은 높은 상태였다. 미립구내로 더 많은

Table 3. Encapsulation of concentrated G-SCF and PEGylated G-CSF with PLGA.

Sample	Concentration (mg/mL)	Additives	Encapsulaion efficiency (%)
G-CSF	8.78	5% sorbitol, 0.04%, tween 20	100
PEGylated G-CSF	8.60	None	50.6
PEGylated G-CSF	4.86	5%, sorbitol, 0.04% tween 20	76.9

G-CSF를 봉입하기 위하여 액상의 G-CSF 및 PEGylated G-CSF을 농축하였고 native gel과 gel filtration 크로마토 그래피를 통하여 단백질이 안정함을 확인하였다. 이렇게 제조한 PLGA 봉입체의 *in vitro* 방출 거동을 조사한 결과 PEGylated G-CSF는 native G-CSF에 비하여 더 오랜 시간 동안 방출이 지속되었고 최대 방출량도 증가하였다.

감 사

본 연구는 산업자원부의 중기거점개발 사업 (고효율 항암제 전달체 개발)에 의한 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Cohen A. M., K. M. Zsebo, H. Inoue, D. Hines, T. C. Boone, V. R. Chazin, L. Tsai, T. Ritch, and L. M. Souza (1987), *In vivo* stimulation of granulopoiesis by recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**(8), 2484-2488.
2. Morstyn G., and T. M. Dexter (1994), Filgrastim (r-metHuG-CSF) in Clinical Practice, Marcel Dekker, USA,
3. Kinstler O. B., N. E. Gabriel, C. E. Farrar, and R. B. DePrince (1998), N-terminally chemically modified protein compositions and methods, U.S. Patent No. 5824784.
4. Kinstler O. B., D. N. Berms, S. L. Lauren, A. G. Paige, J. B. Hamhurger, and M. J. Treuheit (1996), Characterization and stability of N-terminally pegylated *rh*G-CSF, *Pharm. Res.* **13**, 996-1002.
5. Nam Y. S., S. H. Song, J. Y. Choi, and T. G. Park (2000), Lysozyme microencapsulation within biodegradable PLGA microsphere: urea effect on protein release and stability, *Biotechnol. Bioeng.* **70**, 270-277.
6. Jain R. A. (2000), The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, **21**, 2475-2490.
7. Tracy M. A., K. L. Ward, L. Firouzadadian , Y. Wang, N. Dong, R. Qian, and Y. Zhang (1999), Factors affecting the degradation rate of poly(lactide-co-glycolide) microspheres *in vivo* and *in vitro*, *Biomaterials*, **20**, 1057-1062.
8. Cleland J. L., and A. J. S. Jones (1996), Stable formulations of recombinant human growth hormone and interferon-γ for microencapsulation in biodegradable microspheres, *Pharm. Res.* **13**, 1464-1475.
9. Kim H. K., and T. G. Park (2001), Microencapsulation of dissociable human growth hormone aggregates within poly (D,L-lactide-co-glycolic acid) microparticles for sustained release, *Int. J. Pharm.* **229**, 107-116.
10. Pean J. M., F. Boury, M. C. V. Julienne, P. Menei, J. E. Proust, and J. P. Benoit (1999), Why Does PEG 400 co-encapsulation improve NGF stability and release from PLGA biodegradable microspheres, *Pharm. Res.* **16**, 1294-1299.
11. Kim H. K., and T. G. Park (1999), Microencapsulation of human growth hormone within biodegradable polyester microspheres:protein aggregation stability and incomplete release mechanism, *Biotechnol. Bioeng.* **65**, 659-667.
12. Diwan M., and T. G. Park (2001), Pegylation enhances protein stability during encapsulation in PLGA microspheres, *J. Contr. Rel.* **73**, 233-244.
13. Choi S.-J., D.-H. Park, S.-I. Chung, and K.-H. Jung (2000), Plasmid stability in long-term *h*G-CSF production using L-arabinose promoter system of *Escherichia coli*, *J. Microbiol. Biotechnol.* **10**(3), 321-326.
14. Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Second Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.