

## O/W Emulsion에 의한 연어-칼시토닌 포함 PLGA 나노입자 제조공정 연구

김동환, 황선경, 김아영, 김강민, 강호경<sup>1,\*</sup>, 강재선, 최광진  
 인제대학교 제약공학과, <sup>1</sup>(주)셀메디신  
 (pegchoi@inje.ac.kr<sup>\*</sup>)

**A study on preparation process of salmon calcitonin-incorporated PLGA nano-particles based on O/W emulsion**

Dong-Hwan Kim, Sun-Gyung Hwang, Ah-Young Kim, Kang-min Kim<sup>1,\*</sup>, Ho-Kyung Kang, Jae-Sun Kang, Guang-Jin Choi  
 Nano-process Lab. Dept of Pharmaceutical Engineering, Inje University., <sup>1</sup>Cell-Medicine. Corp.  
 (pegchoi@inje.ac.kr<sup>\*</sup>)

## 서론

칼시토닌(calcitonin; CT)은 32개의 아미노산으로 구성된 환형(cyclic) 폴리펩티드이다. 칼시토닌은 칼슘의 항상성을 조절하는데 매우 중요한 역할을 담당하고 뼈의 재용해(bone resorption)를 방지하는 생체 호르몬이다.[1] 칼시토닌은 사람, 돼지 등 포유동물의 갑상선 뿐만 아니라 어류, 조류, 등의 새후선(ultimobranchial gland)에서도 분비된다. 칼시토닌의 종류로는 연어 칼시토닌, 뱀장어 칼시토닌, 사람 칼시토닌, 돼지 칼시토닌이 있으며 사람이나 돼지 칼시토닌 보다는 연어와 뱀장어 칼시토닌의 효능이 훨씬 높은 것으로 알려지고 있다.[2]

뼈를 파괴시키는 파골세포(osteoclast)의 활동을 억제시킴으로써 상대적으로 조골세포(osteoblast)의 활동이 늘어나 골량(bone mass)이 증가하게 된다. 골다공증을 가진 여성에 대한 임상 실험, 즉 연어에서 추출한 칼시토닌의 치료 효과는 척추 뼈와 장골의 골량 증가가 사용한 약의 양에 비례하여 매우 유의한 결과를 나타내었다. 일반적으로 2년을 사용할 경우 약 2%의 골량 증가를 나타낸다고 한다. 칼시토닌에 의한 골다공증 치료 요법은 30년 이상의 치료경험을 통해서 위험한 부작용이 전혀 없고 다른 질병의 치료와 병행할 수 있는 가장 안전하고 효과적인 방법이라고 할 수 있다.[3,4,5]

본 연구에서는 최종목표인 연어칼시토닌 경구투여용 제제를 만들기 위한 선행연구로서 칼시토닌을 생분해성고분자인 PLGA에 nanoencapsulation 시켜 그 물리화학적 특성을 확인하고 encapsulation시 연어칼시토닌의 encapsulation efficiency 를 증가시키는데 그 목적이 있다.

## 실험

### 실험재료

연어칼시토닌(salmon calcitonin; sCT)은 Bachem사에서 구입하여 사용하였다. PLGA는 Boehringer-Ingelheim사에서 제조된 PLGA-503H를 사용하였다. 그리고 계면활성제로서 PVA(polyvinyl alcohol, Mw 1500)는 Junsei사에서 구입 사용하였다. 나머지 용매들은 모두 HPLC 분석용 등급을 구입하여 전처리 없이 사용하였다.

PLGA/sCT의 disperse phase(oil phase)의 제조. methanol 300 $\mu$ l에 sCT를 녹인다. 그리고 dichloromethane 20ml에 PLGA 200mg을 녹이고 이용액에 앞서 준비된 sCT-methanol용액

을 혼합하여 잘 섞는다. 이렇게 섞인 혼합용액은 나중의 emulsion에서 disperse phase인 oil phase를 구성하게 된다. sCT를 함유하지 않은 methanol을 사용·비교하였다.

**PVA의 continuous phase(water phase)의 제조.** 계면활성제로서 PVA를 1%(w/v)의 농도로 3차증류수에 용해하여 continuous phase인 water phase를 제조한다.

#### sCT incorporated PLGA nanoparticle의 제조

4°C로 냉각된 상태의 continuous phase(PVA 1% 수용액)를 500ml 비커에 넣은 후 homogenizer를 이용하여 10,000 rpm으로 교반시킨다. disperse phase를 syringe에 넣은 후 26 gage needle(inside diameter  $\approx 240\mu\text{m}$ )로 syringe pump를 이용하여 일정한 속도로 continuous phase가 담긴 비커내에 투입하였다. disperse phase가 모두 투입된 후 약 1~2분간 추가 교반시킨 후 evaporator로 유기용매를 모두 제거한다. 이후 남은 용액을 centrifugation하고 4°C deionized water로 washing 을 2회 반복한다. washing이 끝난 결과물은 동결건조 시켜 최종 결과물을 얻었다. 이렇게 얻어진 결과물은 SEM으로 입자의 형상 및 크기를 관찰 하였고, HPLC로 PLGA내에 sCT의 함량을 분석 하였다.

#### 결과 및 고찰

Fig.1은 sCT를 포함하지 않은 PLGA nano-particle의 제조공정 흐름도이다. 이 실험에서는 syringe pump의 flow rate에 변화를 두어 각각 생성되는 입자들의 모양의 확인하기 위해서 실시하였다.

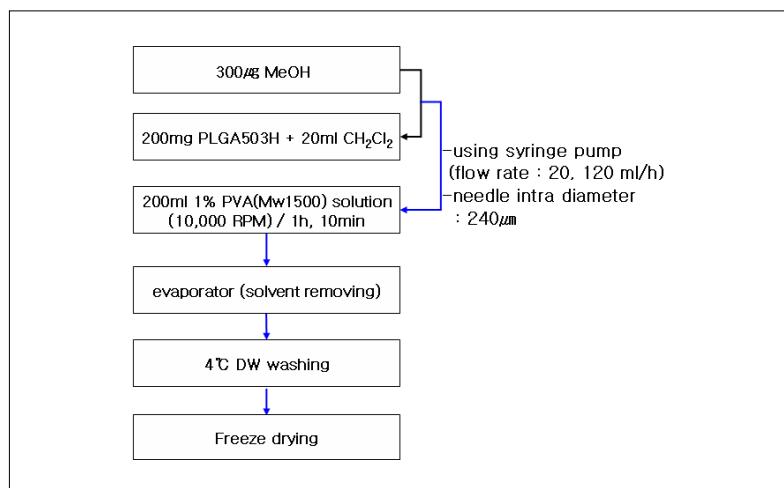


Fig.1. sCT를 포함시키지 않은 PLGA nanoparticle 제조 방법.

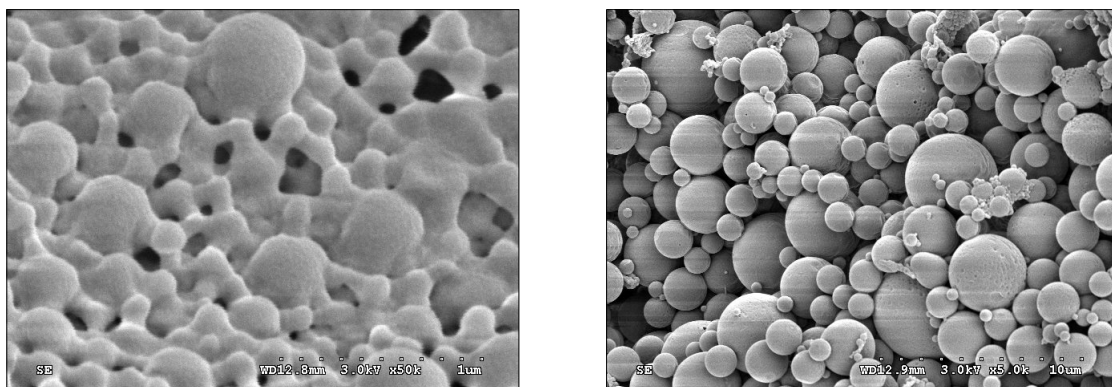


Fig.2. sCT를 포함시키지 않은 PLGA particle SEM image

Fig.2.는 sCT를 포함하지 않은 PLGA의 SEM image이다. 좌측의 그림은 syringe pump의 flow rate가 200ml/h이고 우측의 그림은 20ml/h이다. PLGA의 입자모양을 살펴보면 flow rate가 느린 우측의 그림이 particle의 모양이 더욱 sphere에 가깝고 또 입자들도 서로 뭉쳐지지 않고 떨어져 있는 것을 확인할 수 있다. SEM에 의한 입자의 크기는 약 1~10µm로 측정되었다.

Fig.3.은 sCT를 포함시킨 PLGA 입자의 제조공정 흐름도이다. Fig.1과 거의 동일하고 단지 sCT만 첨가 하여 실험을 실시하였다.

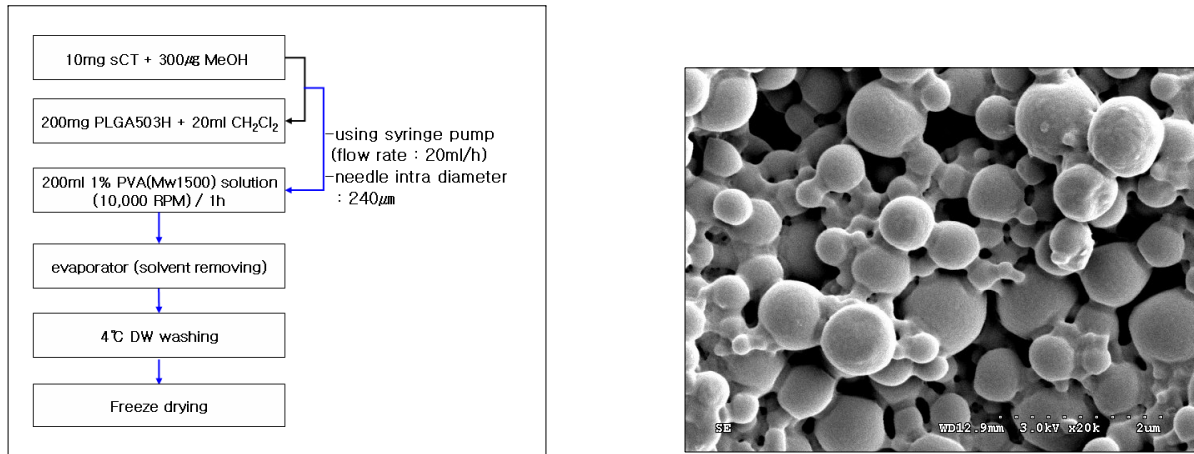


Fig.3. sCT를 포함시킨 PLGA particle의 제조방법 및 SEM image

Fig.3.의 좌측은 SEM image이다. 입자의 크기는 sCT가 첨가되지 않을 때와 거의 동일하게 구형에 가까운 미세입자가 생성되었음을 확인할 수 있었다.

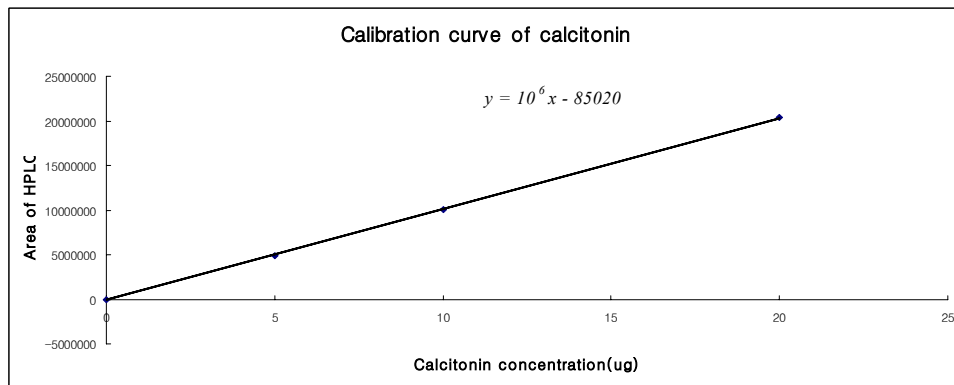


Fig.4. sCT의 정량선.

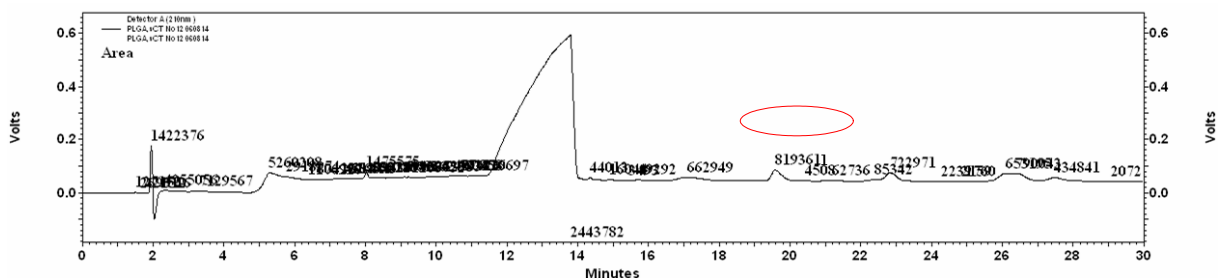


Fig.5. sCT가 포함된 PLGA particle의 HPLC 분석

Fig.4. 는 실험에 사용되었던 순수한 sCT를 HPLC를 이용하여 정량선을 그린 것이다. 위의 정량선을 이용하여 식을 구한다음 Fig.3. 방법에 의해 얻은 PLGA 입자의 25mg을 PLGA와 sCT를 모두 용해시키는 acetone 1ml에 용해시킨 후 HPLC로 분석한 결과(Fig.5.) sCT의 양이 약 450 $\mu$ g이 확인되었다.(PLGA:sCT=1:0.18)

## 결론

O/W emulsion을 이용하여 sCT가 포접된 PLGA 나노입자를 제조하여 본 연구의 최종적인 목표인 골다공증 치료용 sCT 나노경구제제를 제조하기 위한 1차연구로서 충분한 목표를 달성하였다. sCT가 포접된 PLGA 입자의 크기와 모양은 disperse phase가 continuous phase에 투입될 때의 속도에 크게 영향받는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구방법에 의한 sCT의 encapsulation efficiency는 약 36%로서 기존의 방법보다 향상되었음을 알 수 있었다.

## 참고자료

- [1] S. Patel, A.R. Lyons, D.J. Hosking, Drugs used in the treatment of metabolic bone diseases, *Drugs* 46 (1993) 594–617.
- [2] J.C. Stevenson, I.M.A. Evans, Pharmacology and therapeutic use of calcitonin, *Drugs* 21 (1981) 257–273.
- [3] R. Huwyler, W. Born, E.E. Ohanhaus, J.A. Fischer, Plasmakinetics and urinary excretion of exogenous human and salmon calcitonin in man, *Am. J. Physiol.* 236 (1979) E15–E19.
- [4] J. Hastewell, S. Lynch, I. Williamson, R. Fox, M. Mackay, Absorption of human calcitonin across the rat colon in vivo, *Clin. Sci.* 82 (1992) 589–594.
- [5] S.J. Milstein, E.N. Barantsevitch, V.A. Grechanovski, D.J. Sarubbi, pH-dependent microspheres from modified soybean protein hydrolysate, *J. Microencapsul.* 13 (1996) 651–665.