

경구용 항원 수송체 모델로서 폴리락티드-글리콜리드 마이크로스피어의 입자도 조절

송일용 · 송세현 · 송우현 · 조성완 · 최영욱[†]

중앙대학교 약학대학
(1999년 8월 22일 접수)

Particle Size Control of Poly(Lactide-co-Glycolide) Microspheres for Oral Antigen Delivery Systems

Il Yong Song, Seo Hyun Song, Woo Heon Song, Seong Wan Cho and Young Wook Choi[†]

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

(Received August 22, 1999)

ABSTRACT—Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) microspheres containing ovalbumin (OVA) as a model protein drug were prepared by double emulsification method, and various conditions such as mixing rate, volume of outer phase and isopropyl alcohol concentration in outer phase during secondary emulsification were observed to control the size of microspheres. In addition, entrapment efficiency of OVA and protein denaturation were also evaluated. As the rate of stirring was increased, the size of particles was decreased. But excessive stirring increased the particle size of microspheres. In a preparation condition of small volume of outer phase, the particle size was decreased but the entrapment efficiency was increased. Adding isopropyl alcohol to outer phase decreased the size of particles, but increased the entrapment efficiency. Microparticles should have smaller size than 10 μm to be uptaken by Peyer's patch in small intestine. High speed of mixing and relatively small volume of outer phase are needed to reduce the size. In addition, appropriate amount of isopropyl alcohol in outer phase also plays an important role in size reduction of PLGA microspheres.

Keywords — Poly(lactide-co-glycolide), Double emulsification, Microsphere, Ovalbumin, Particle size

마이크로스피어 시스템은 약물의 방출을 조절하고, 열, 광, 습기 등의 환경, 경구투여시 위산 또는 위장관 효소, 또는 주사투여시 생체내의 약물대사기관 또는 세포 등에 의한 약물의 분해를 막으며, 미립자의 크기를 조절하거나 표면을 수식하여 약물을 표적화수송하는 등의 목적으로 연구되고 있다. 특히 경구용 백신 수송체 모델로서 마이크로스피어 시스템을 이용할 경우 항원이 위산과 펩신 등의 위장관효소 등에 의해 변성되고 분해되는 것이 방지되고, 항원을 위장관에서 Peyer's patch(PP)로 표적화하여 수송할 수 있어 항원의 흡수를 촉진시키며, 강한 면역 반응을 유도하는 장점을 가질 뿐만 아니라, 항원의 방출을 적절히 제어하여 효과적인 면역반응을 유도할 수 있게 된다.¹⁻⁴⁾ 그러나, 크기가 10 μm 이하인 입자들만이 경구투여시 장관에서 포획되는 것으로 받아들여지고 있다.²⁾ 특히 크기가 5~10 μm 정도 되는 입자는 위장관의 PP에 포획된 후, 그곳에 머무르면서 항원

을 방출하며, 1~5 μm 정도의 크기를 갖는 입자의 일부가 PP에서 뿐만 아니라 비장이나 림프절에서도 발견되어, 결국 마이크로스피어의 크기를 적절히 조절함으로써 전신면역과 분비면역을 동시에 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁾

Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA)는 FDA에서 생체적합성과 생분해성이 유일하게 인정된 고분자로서 copolymer의 비율과 분자량의 조절에 따라 그 생분해 기간 및 약물의 방출을 조절할 수 있고, PLGA의 소수성으로 인해 PP부위의 M세포에 의해 비교적 양호하게 포획되며, 고분자의 adjuvant 활성 등에 의해 항원의 효과를 높일 수 있는 장점이 있어 단백질 함유 미립자 제조에 가장 많이 사용되는 합성 고분자중 하나이다.⁵⁾ 많은 마이크로캡슐화 기술 중에서 water-in-oil-in-water (W/O/W) 이중 유화법이 PLGA 마이크로스피어 내로 단백질과 백신을 봉입하는 방법으로 가장 널리 사용되고 있다.⁶⁻⁸⁾

이중 유화법을 이용하여 PLGA 마이크로스피어 제조시 입자도 조절에 관한 논문이 많이 보고되고 있다. 고분자 용액중 디클로로메탄의 양을 감소시키거나 PLGA의 농도를 증

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

가시킴에 입자도가 증가한다고 보고되고 있으며, 주원인으로 고분자 용액의 점도 상승으로 인한 작은 유적의 형성에 어려움을 들고 있다.⁹⁻¹²⁾ 또한, 고분자 용액에 아세톤을 보조 용매로 사용할 경우 입자도가 감소하였고, 약물함량이 증가하였다.¹²⁾ 그러나, PLGA의 copolymer의 비율, 분자량 등은 입자도에 영향을 주지 않았다.⁹⁾ Jeffery 등¹³⁾은 ovalbumin (OVA)을 봉입한 PLGA 마이크로스피어의 제조시, 내부수상층의 OVA의 농도 또는 내부수상의 용적이 증가할수록 입자도와 봉입률이 증가함을 밝혔다. Jeffery 등⁹⁾은 또한 사용되는 최외상의 용적에 비례하여 입자도가 감소하며, 교반속도 증가시에도 입자도가 감소하나 교반 지속시간에는 별다른 영향을 받지 않는다고 보고하였으며, 다중유적의 안정화제로 쓰이는 PVA의 최외상층 농도를 1%에서 10%까지 증가시킬 때 평균입자경이 감소함을 발견하였다. Arshady¹¹⁾는 PVA, methyl cellulose와 같은 수용성 고분자들을 최외상의 안정화제로 첨가할 경우 최외상의 점도가 증가하여 유적간의 합일과 coagulation이 방지된다고 하였다. 그러나, 이러한 점도의 증가는 교반에너지에 저항하는 힘을 주어 오히려 수용성 고분자의 첨가로 인해 평균 입자도가 증가될 수도 있다.

본 연구에서는 위에서 말한 여러 가지 입자도 결정요인 중 비교적 예측가능성이 뛰어나며 입자도에 직접적인 영향을 주는 2가지 요소로서 최외상의 용적과 2차 유화시 교반속도를 변화시켜 입자도를 조절하였으며, 제조된 PLGA 마이크로스피어의 봉입률 변화 및 입자의 외관형태 변화를 살펴보고자 하였다. 그리고, 용매추출법에 의한 마이크로스피어 제조시 최외상에 isopropyl alcohol의 첨가에 따른 입자도 변화를 관찰하여 W/O/W 유화법에 의한 PLGA 마이크로스피어 제조시 최외상의 조성 및 용적을 변화시킴으로써 입자도를 조절할 수 있음을 발견하였다.

실험방법

시약 및 기기

고분자로는 75:25 PLGA (poly[D,L lactide-co-glycolide], Mw 75,000~120,000, Aldrich, USA)를, 모델 약물로는 OVA (ovalbumin, chicken egg, grade V, Sigma, USA)를 사용하였다. 내부수상의 단백질 안정화제로는 PVP K-25 (polyvinylpyrrolidone K-25, Mw 30,000, ISP, USA)를, 고분자 용액의 계면활성화제로 Span 60 (Junsei, Japan)을, 외부수상의 안정화제로 PVA (poly[vinyl alcohol], Mw 30,000~70,000)을 사용하였다. 고분자의 용매로는 디클로로메탄 (HPLC grade, Fisher, USA)을 SDS (sodium dodecyl sulfate, Approx 99%)는 Sigma, USA에서 구입하였으며, 항균물질로

는 sodium azide (Junsei, Japan)을 사용하였다. 단백질 정량은 Pierce사의 micro-BCA assay reagent kit를 사용하였다.

실험시 사용된 교반기는 Servodyne Mixer Head (Cole-Parmer Instrument Co, model 50000-30)와, sonicator (Vibracell, Sonics & Materials, USA), 자석 교반기 (04644-series, Cole-Parmer, USA)를 사용하였다. 원심분리기로는 고속 원심분리기, Centrikon T-324 (Kontron ins., Germany)를 사용하였다. UV/VIS 흡광분석기는 Varian, Australia를 사용하였으며, 주사전자현미경 (Scanning electronic microscope)은 JEOL 35CF (USA)를 사용하였다. 입자도 분석기는 Master Sizer/E (Malvern Ins., UK)를 사용하였다. 동결건조기로는 BETA-A, Martin Christ Co., Germany를 사용하였다. 전기영동기기는 Mini-Protean II (Bio-Rad, USA)를 사용하였다. Size exclusion column으로는 Hewlett Packard사의 Zorbax GF-250 column (내경 9.4 mm, 길이 25 cm, 공경 4.5 μm)을, HPLC system으로는 TSP Spectra system (pump: P4000, detector: UV1000, interface: SN4000, integrator: PC 1000, USA)을 사용하였다.

PLGA 마이크로스피어의 제조

용매증발법에 의한 제조 - 우선 PVP K-25를 2% 함유하는 pH 7.4 등장 인산완충액 2 ml에 OVA 60 mg을 가해 용해시켜 내부수상을 제조한 후, 중간유상으로 0.1% Span 60을 함유한 디클로로메탄 10 ml에 PLGA 600mg을 가해 고분자용액을 제조한다. 제조된 내부수상 용액을 고분자 용액에 가하고 5분 동안 ice-bath상에서 자석 교반기로 교반 혼합한 후, 이를 다시 ice-bath 상에서 sonicator를 사용하여 2분 동안 240 watts로 유화시켜 W/O 형의 1차유제를 형성시켰다. 다음 10% PVA를 함유한 증류수 일정량을 최외상층으로 하여 실온에서 mixer head를 사용하여 정하여진 속도로 교반하면서, 형성된 W/O 유제를 서서히 가한 후 12시간 이상 교반하면서 용매를 증발시켜 입자를 고화시켰다. 초기에는 교반속도를 350 rpm으로 고정하고, 최외상층의 용적을 800 ml에서 100 ml까지 변화시키면서 입자를 제조하였다. 이후 실험에서는 최외상층의 용적을 100 ml로 고정하고 교반속도를 350 rpm에서 1500 rpm까지 변화시키면서 입자를 제조하였다. 고화된 마이크로스피어는 고속 원심분리기로 10,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 얻어내었고, 이를 증류수로 3회 세척한 후 동결건조하여 분말상의 미립자를 제조, 냉장보관 하였다.

용매추출법에 의한 제조 - 1차유제를 용매증발법에 소개된 방법과 동일하게 제조한 후 내부 유상의 디클로로메탄을 빠르게 제거하기 위해 최외상층에 isopropyl alcohol (IPA)

을 일정량 함유시킨 10% PVA 수용액을 사용하였다. 이때 최외상의 용적은 100 ml로 고정하였고 IPA의 함량을 5%에서 20%까지 변화시키면서 입자를 제조하였다. 용매추출법으로 용매를 제거하는 경우 입자가 빠르게 고화되므로 교반 시간을 줄여 4시간이상으로 조정하였다. 고화된 입자는 용매증발법에서의 동일한 방법으로 처리하였다.

입도의 분석

입도분석은 레이저 광회절법^{14,15)}을 이용하여 측정된 입자의 해석 파라미터로 부피-표면적 평균 입자경 (volume-surface mean diameter, d_{vs})를 사용하였으며, 이는 식(1)에 의해 구하였다. 이때 입자의 분산 매질로는 0.2% SDS를 함유한 증류수를 사용하였다.

$$d_{vs} = \frac{\sum nd^3}{\sum nd^2} \tag{1}$$

입도의 분포특성은 입자의 누적범위 10%에서 90%까지의 해당 입자도의 구간범위를 측정하였으며, 이 결과를 semi log paper에 표시하였다(Figure 1~3). 또한 전체에서 차지하는 10 μm 이하의 입자의 백분율을 구하여 경구용 미립자 수송체로서의 적합여부를 비교, 판단하는 지표로 삼았다.

OVA의 봉입률 측정

제조된 마이크로스피어 10 mg을 5% SDS를 함유한 0.1N-NaOH 용액 10 ml에 분산시켜서 마이크로스피어가 완전히 분해될 때까지 강하게 교반한 후 이 액 0.1 ml를 취해 micro-BCA 정량법을 실행하였다.^{16,17)} 이때, 수산화나트륨은 PLGA의 가수분해를 촉진시키며, SDS는 PLGA가 가수분해되는 동안 단백질을 완전히 녹이는 역할을 한다.¹⁸⁾ 이로부터 다음의 식(2)에 따라 미립자내의 봉입률을 산출하였다.

Loading efficiency (%)

$$= \frac{\text{actual protein loading (w/w\%)}}{\text{theoretical protein loading (w/w\%)}} \times 100 \tag{2}$$

단백질의 변성 평가

단백질의 변성 여부는 sodium dodecyl sulfate-poly (acrylamide) gel electrophoresis (SDS-PAGE) 및 size exclusion chromatography (SEC)를 이용하여 평가하였다. SDS-PAGE의 경우, 먼저 separating gel (10%)을 제조하여 주입한 후 겔을 30~60분간 굳힌다. 그리고 stacking gel을 제조하여 주입한 후 즉시 sample well comb을 stacking gel에 꽂는다. 겔이 굳은 후 표준 OVA, 미립자 내 봉입된 OVA, 분자량 기준물질들을 각각 완충액에 용해시킨 시료를 가하고 전

기 영동 시킨다. 전기 영동이 끝난 다음 coomassie brilliant blue로 단백질 띠를 염색하여 그 위치를 비교하여 응집 및 분리여부를 평가하였다. 이 실험에서는 1일째 방출된 OVA 용액을 시료로 사용하여 단백질성을 평가하였다. SEC는 칼럼내에 일정한 크기의 pore를 지닌 충전물이 있어 시료물질의 분자크기에 따라 이동속도가 다른 것을 이용한 분석법으로서, 단백질의 분해 및 응집을 평가할 수 있는 방법중 하나이다. 이 실험에서는 1일째 방출된 OVA 용액으로 H.P. Zorbax GF-250 column을 사용해 130 mM NaCl/20 mM Na_2HPO_4 (pH 7.0) 완충액을 이동상으로 하여 유속 1.0 ml/min, 파장 210 nm에서 TSP Spectra HPLC system의 조건에서 실행하였다.

결과 및 고찰

최외상용적의 영향

2차 유화시 교반속도를 고정시키고 최외상의 용적을 감소시켜 입자를 제조하면 입자경이 줄어드는 경향을 보였다(Figure 1). 이는 교반속도가 같을 때 최외상의 용적이 줄어들게 되면 단위용적당 받는 교반 에너지가 증가하게 되고, 이에 따라 다중유적이 고루 분산하게 되어 최종 제조된 입자경이 감소되었던 것으로 사료된다. 또 다른 가능성으로는, 제조시 최외상의 용적의 감소로 인해 상대적으로 내상용적이 증가하게 되고, 이 때문에 용액의 점도가 상승하게 되어 입자간의 합일기회가 줄어들어 입자도가 감소하게 됨을 들 수 있다. 그러나 O/W 유화법으로 PLGA 마이크로스피어를 제조했던 Jeffery 등⁹⁾에 의하면 내부 유상과 최외상 간의 상용적비의 변화로 인한 입자도의 감소는 관찰할 수 없던 것으로 보아 후자의 원인에 의한 영향은 비교적 적은 것으로 생각된다. PLGA 미립자의 제조 조건이 실험실마다 달라

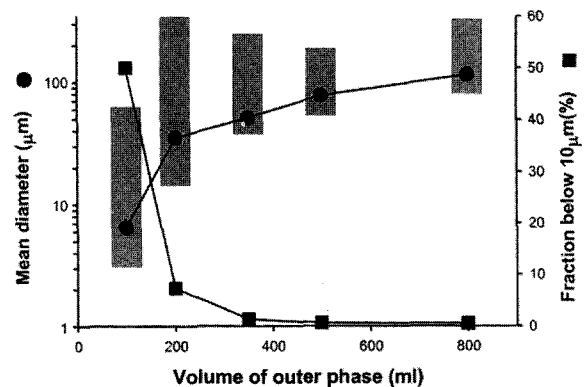


Figure 1-Effect of volume of outer phase on the particle size of microspheres. Shaded area represents the ranges of 10 to 90% particle size in log-normal distribution.

생성되는 입자경의 직접비교는 힘들으나, 같은 실험실적 조건 이라면 2차 유화시 최외수상의 용적을 줄이면 줄일수록 PLGA 마이크로스피어의 평균입자경은 감소하게 된다. 그러나, 최외수상의 용적이 충분하지 못할 경우 W/O 유적이 안정화되지 못하고 전상이 일어날 수 있다. 본 연구에서는 최외수상의 용적을 100 ml로 하였을 때 평균 입자경이 6.45 μm 로서 제조된 입자의 약 50%가 10 μm 이하의 입도를 가지므로 이하의 실험에서는 최외수상의 용적을 100 ml로 고정하여 실험하였다.

교반속도의 영향

교반속도를 350 rpm에서 1000 rpm으로 증가함에 따라 그 평균 입자경이 3.03 μm 까지 줄어들고 10 μm 이하 입자의 비율이 71.3%까지 증가하였다. 그러나, 1500 rpm으로 교반하였던 경우 평균입자경이 3.77 μm , 10 μm 이하의 비율이 68%로 교반속도 1000 rpm일 경우보다 오히려 입자도가 증가하였다(Figure 2). Simple mixer를 사용하여 PLA 마이크로스피어 제조시, 교반속도와 제조된 입자의 입자경을 비교한 Benita 등¹⁹⁾의 연구에 따르면 교반속도를 100 rpm에서 450 rpm까지 증가시 평균입자경의 감소를 보였으나, 그 평균입자경의 감소폭은 점차 줄어드는 경향을 나타내었다. 예로서 교반속도가 150 rpm에서 250 rpm으로 증가시키는 입자도가 289.9 \pm 88.3 μm 에서 102.5 \pm 25.1 μm 로, 350 rpm에서 450 rpm으로 증가시키는 입자도가 71.0 \pm 16.6 μm 에서 58.2 \pm 15.6 μm 로 감소하여, 입자도 감소의 폭이 1.8 $\mu\text{m}/\text{rpm}$ 에서 0.13 $\mu\text{m}/\text{rpm}$ 으로 적어졌다. 이는 450 rpm이상의 과도한 교반속도 하에서는 입자도의 감소경향이 없어지거나, 오히려 평균입자경이 증가할 수 있다는 가능성을 나타내었다. 통상의 경우 입자도의 조절을 위해 교반속도를 증가시키게 되나, simple mixing을 2차 유화법으로 사용한 본 연구에서는 교반속도 증가에 의한 입자도 조절에 한계가 있었

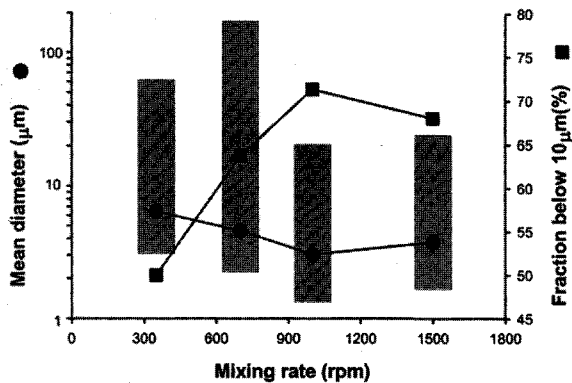


Figure 2-Effect of mixing rate on the particle size of microspheres. Shaded area explained in Figure 1.

다. 이러한 결과를 simple mixing 이외의 다른 2차 유화법 예를 들면 homogenization등⁹⁾에서의 경우까지 확대해석 하는 것은 약간 무리가 있는 듯 하다. 그러나, 어떠한 2차 유화법을 사용한 경우든지 2차 유화조건이 과도한 경우 W/O 유적을 불안정화 시켜 전상 등을 일으킬 수 있어 결과적으로 봉입률 등에 영향을 미치게 되기 때문에, 교반속도의 증가 이외의 다른 입자도 조절법의 연구가 필요할 것으로 사료된다.

용매추출법에서 Isopropyl alcohol의 영향

최외상에 5% IPA를 첨가하여 용매추출법으로 입자를 제조하였을 때 그 평균 입자경이 4.47 μm 로 동일 조건의 용매증발법으로 제조한 입자의 평균입자경 6.45 μm 보다 작게 나타났다. 동일 조건에서 최외수상에 IPA의 농도를 더욱 증가시키면 따라 그 평균입자경은 점차 감소하여 최외수상 중의 IPA 농도가 10에서 15%인 경우 3.67 μm , 20%경우 2.42 μm 로 나타났다. 특히, 20%의 경우는 10 μm 이하의 입자분율은 75.9%까지 증가하였다(Figure 3, 4). 통상의 용매추출법에서는 1차유제를 IPA가 첨가되지 않은 외부수상에서 일정시간 교반하여 W/O/W 유제를 안정화시킨 후, IPA가 첨가된 수용액에 안정화된 액을 첨가하여 입자를 제조하는 것이 일반적이다. 그러나, 본 연구에서는 1차유제를 처음부터 IPA가 첨가된 외부수상에 가함으로서 W/O/W 유제를 안정화시키는 단계를 생략하였다. 기존의 문헌 중 IPA의 최외수상 중 농도에 의한 입자도 조절에 관한 보고를 발견하지 못하였으나, Pavanetto 등²⁰⁾은 약물과 poly(D,L-lactide)를 함유한 디클로로메탄 용액을 내상으로 하고 0.02% Tween 20을 함유한 glycerol을 외상으로 하여, 13,500 rpm에서 homogenizer로 교반하여 O/W 유제를 형성시킨 후 용매 증발로 형성시킨 입자와 형성된 유제를 외상과 동량의 15% IPA 용액에 첨가하여 용매 추출로 형성시킨 입자를 비교하여, 후자 쪽 입자가 평균입자경이 더 작고 입도분포가 균일하였다고 보고하였다. Niwa 등¹²⁾의 실험에서 O/W 유화법을 통한 PLGA 마이크로스피어의 제조시 물에 섞이지 않는 디클로로메탄 또는 클로로포름 등을 고분자의 용매로 한 유상에 아세톤을 보조 용매로 첨가할 경우 유상과 수상의 계면장력이 저하되어 입자도가 큰 폭으로 감소된다고 보고하였다.

본 연구에서 사용된 IPA도 수상과 유상에 모두 용해되는 물질이기 때문에 W/O/W 계면에서 디클로로메탄과 수용액 간의 계면장력을 낮추어 이로 인해 입자도가 감소되는 것으로 추정되었다. 또한, IPA는 W/O 유적에서 디클로로메탄을 빨리 제거해 다중유적이 충돌할 수 있는 시간을 단축시켜 입자도를 감소시키는 것으로 해석될 수 있다. 실제로 W/O

유적의 충돌이 예상되지 않는 조건, 즉 최외상의 용적이 내상의 용적에 비해 매우 크고 (최외상의 용적 500 ml, 이때 내부유상과 최외수상의 비는 1: 24), 교반이 격렬하지 않은 경우 (교반속도 350 rpm), 용매증발법에 의해 제조된 입자와 5% IPA 용액을 이용하여 용매추출법으로 제조된 입자를 비교한 결과, 그 평균입자경이 78.02 μm 에서 88.27 μm 로 증가하였다. 그러나, W/O 유적간의 충돌이 충분히 예상되는 조건, 즉 최외상의 용적이 내상에 비해 비교적 작은 조건 (최외상의 용적 100 ml, 이때 내부유상과 최외수상의 비는 약 1: 8)에서는 Figure 3에서 보는 바와 같이 그 평균입자경이 감소하였다. 누적 입도 10%에서 90%까지의 입자도 범위로 본 입도의 분포를 비교해 보면, 최외상중의 IPA 농도가 5%, 10%, 15%에서는 대략 2 μm ~20 μm 까지의 범위를 보였으나, IPA 농도가 20%일 경우는 그 범위가 1 μm ~37 μm 까지 넓어져 입자도 분포의 균일성이 다른 용매추출법으로 제조된 입자에 비해 떨어졌다. 제조시간의 면에서 용매증발법과 용매추출법을 비교해 보면 약 4시간정도 걸리는 후자가 전자의 방법에 비해 약 4배정도 시간을 단축할 수 있었다. 이상을 종합해 볼 때, 최외상에 IPA를 적절히 첨가하면 입자의 빠른 고화와 IPA의 O/W 계면에서의 계면활성작용으로 균일하고 작은 마이크로스피어를 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

봉입률 및 단백질 변성 여부의 평가

교반속도를 350 rpm에서 1500 rpm까지 증가시키며 제조한 입자들은 약 60%에서 67%의 봉입률을 나타내었으며, 이 범위에서의 교반은 봉입률에 큰 영향을 주지 못하는 것으로 판단된다. 최외상의 용적이 증가할수록 봉입률은 상대적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 예로서 최외상이 100 ml일 때 제조된 입자의 봉입률과 800 ml일 때의 봉입률을 비교

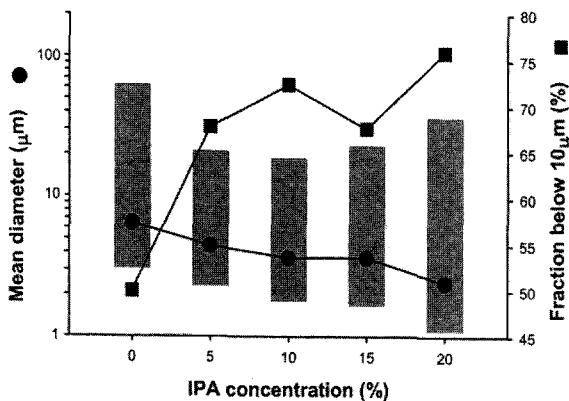


Figure 3-Effect of isopropyl alcohol (IPA) concentration in outer phase on the particle size of microspheres. Shaded area explained in Figure 1.

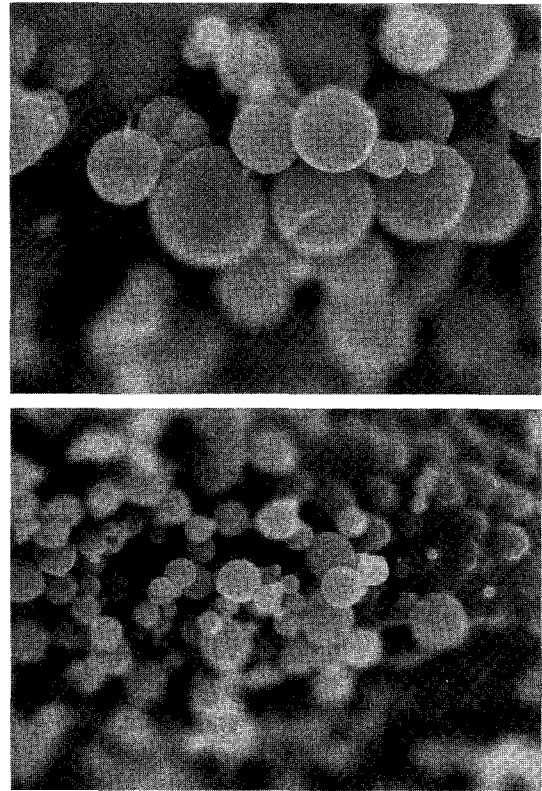


Figure 4-SEM of PLGA microspheres prepared by solvent evaporation (Top) and solvent extraction method (Bottom).

하면, 전자는 66.42%이었으나 후자는 53.04%로 약 13%가량의 감소가 있었다. 이는 늘어나는 최외상이 마이크로스피어의 제조시 OVA의 방출 매질로 작용하기 때문인 것으로 생각된다. 최외상에 IPA를 첨가하여 용매추출법으로 입자를 제조시 IPA의 최외수상중의 농도가 0%, 5%, 10%, 20%로 증가함에 따라 봉입률은 각각 66.42%, 71.33%, 74.95%, 79.15%로 증가하여 서로 비례적 관계가 있음을 관찰하였다. 최외수상에 IPA를 첨가하면 PLGA 입자가 빠르게 고화되면서 고화된 표면막이 봉입된 OVA에 대한 방출제어막으로 작용하기 때문인 것으로 사료된다. SDS-PAGE와 SEC를 이용한 1일제 방출되어 나온 OVA의 단백질 변성 여부를 평가한 결과, 봉입된 OVA의 단백질 변성의 어떠한 증거도 나오지 않았다(Figure 5, 6).

결 론

이중 유화법을 이용하여 PLGA 마이크로스피어를 제조시 2차 유화시 교반속도, 최외상의 용적, 최외상의 IPA의 농도 등이 입자도와 기타의 특성에 주는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었으며, 마이크로스피어에 봉입된

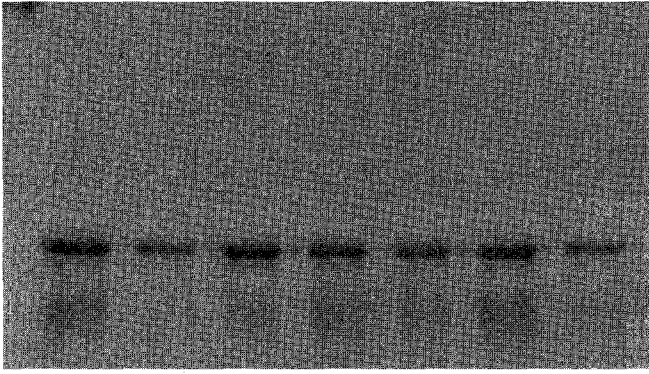


Figure 5-SDS-PAGE of released OVA and standard OVA: (1~8) for released OVA from microspheres prepared by different conditions; (9) for standard OVA

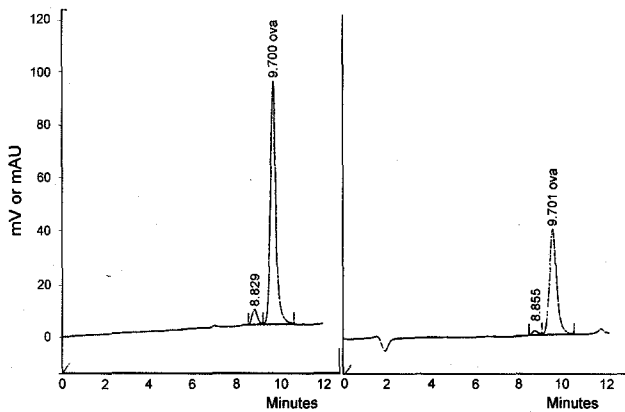


Figure 6-Typical size exclusion chromatogram of standard OVA (Left) and released OVA (Right).

OVA의 변성을 SEC와 SDS-PAGE로 조사한 결과 어떠한 변성의 증거도 찾을 수 없었다.

1. Simple mixing으로 2차 유화시 약 1000 rpm 정도의 속도에서 가장 작은 평균 입자경을 갖는 입자를 얻었다. 1000 rpm 이상의 과도 교반시 다중유적간의 충돌로 인해 입자의 크기는 오히려 증가하는 경향을 보였다.

2. 최외상의 용적을 감소시킴에 따라 제조된 입자의 평균 입자경이 줄고 봉입률은 높아졌다. 특히, 최외상의 용적을 100 ml로 하였을 때 10 μm 이하의 평균입자경을 갖고, 약 65%의 봉입률을 갖는 PLGA 마이크로스피어를 제조할 수 있었다.

3. 용매추출법으로 마이크로스피어 제조시 최외상중의 IPA 농도에 비례하여 제조된 입자의 평균입자경은 감소하고 봉입률은 향상되었으며, 신속한 PLGA 마이크로스피어의 제조가 가능하였다. 최적의 최외상 중 IPA농도는 10에서 15%로서 이 조건에서 평균입자경이 3.6 μm 정도이고 입도분포가 가장 균일한 입자를 제조할 수 있었다.

이상을 종합하면 이중 유화법으로 PLGA 마이크로스피어를 제조시 입자도를 줄이기 위하여 격렬한 2차 교반을 사용할 수 있으며, 이때 IPA을 최외상에 적당량 첨가하게 되면 제조시간 및 입자도를 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 봉입률을 높일 수 있어, 향후 미립자 수송체의 입자도 조절 방법에 이 결과를 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 논문은 1997년도 한국학술진흥재단 학술연구비 (1997-001-F00354)의 일부 지원에 의해 이루어졌으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) J. Mestecky, Z. Moldoveanu, M. Novak, W-Q Huang, R.M. Gilley, J.K. Staas, D. Schafer and R.W. Compans, Biodegradable microspheres for the delivery of oral vaccine, *J. Control. Rel.*, **28**, 131-141 (1994).
- 2) H.R. Bhagat, P.S. Dalal and R. Nellore, Oral Vaccination by microspheres : In *Microparticulated systems for the delivery of proteins and vaccines*, S. Cohen and H. Bernstein (Eds), Marcel Dekker, UK, pp. 381-399 (1998).
- 3) C. Thomasin, G. Corradin, Y. Men, H.P. Merkle and B. Gander, Tetanus toxoid and synthetic malaria antigen coating poly (lactide)/ poly (lactide-co-glycolide) microspheres : Importance of polymer degradation and antigen release for immune response, *J. Control. Rel.*, **41**, 131-145 (1996).
- 4) J.H. Eldridge, C.J. Hammond, J.A. Meulbroek, J.K. Staas, R.M. Gilley and T.R. Tice, Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissue I. Orally administered biodegradable microspheres target the peyer's patch, *J. Control. Rel.*, **11**, 205-214 (1990).
- 5) H. Sah, R. Toddywala and Y.W. Chien, Continuous release of protein from biodegradable microcapsules and *in vivo* evaluation of their potential as a vaccine adjuvant, *J. Control. Rel.*, **35**, 137-144 (1995).
- 6) R.C. Mehta, R. Jeyanthi, S. Calis, B.C. Thanoo, K.W. Burton and P.P. DeLuca, Biodegradable microspheres as depot system for parental delivery of peptide drugs, *J. Control. Rel.*, **29**, 375-384 (1994).
- 7) P.J. Watts, M.C. Davies and C.D. Melia, Microencapsulation using emulsification/ solvent evaporation : an overview of techniques and applications, *CRC. Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier. Syst.*, **7**, pp. 235-259 (1990).
- 8) J.P. Benoit, H. Marchais, H. Rolland and V.V. Velde, Biodegradable microspheres : advances in production technology : In *Microencapsulation : Methods and Industrial Applications*, S. Benita (Ed.), Marcel Dekker, New York, pp. 35-72 (1996).
- 9) H. Jeffery, S.S. Davis and D.T. O'Hagan, The preparation and

- characterization of poly (lactide-co-glycolide) Microparticle I : Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.*, **77**, 169-175 (1991).
- 10) C. Yan, J.H. Resau, J. Hewetson, M. West, W.L. Rill, M. Kende, Characterization and morphological analysis of protein-loaded poly(lactide-co-glycolide) microparticles prepared by water in oil in water emulsion technique, *J. Control. Rel.*, **32**, 231-241 (1994).
 - 11) R. Arshady, Preparation of biodegradable microspheres and Microcapsules 2. polylactide and related polyester, *J. Control. Rel.*, **17**, 1-12 (1991).
 - 12) T. Niwa, H. Takeuchi, T. Hino, M. Nohare and Y. Kawashima, Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method and the drug release behavior, *J. Control. Rel.*, **25**, 89-98 (1993).
 - 13) H. Jeffery, S.S. Davis and D.T. O'Hagan, The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) Microparticles II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil-in-water) emulsion solvent evaporation technique, *Pharm. Res.*, **10**, 362-368 (1993).
 - 14) R.C. Mehta, B.C. Thanoo and P.P. DeLuca, Peptide containing microspheres from low molecular weight and hydrophilic poly (d,l-lactide-co-glycolide), *J. Control. Rel.*, **41**, 249-257 (1996).
 - 15) M. Yeh, P.G. Jenkins and A.G.A. Coombes : Improving the delivery of microparticle systems using blends of poly (DL-lactide-co-glycolide) and poly(ethylene glycol), *J. Control. Rel.*, **37**, 1-9 (1995).
 - 16) D.T. O'Hagan, H. Jeffery and S.S. Davis, The preparation and characterization of poly (lactide-co-glycolide) microspheres : III. Microparticle/ polymer degradation rates and the *in vitro* release of a model protein, *Int. J. Pharm.*, **103**, 37-45 (1994).
 - 17) M. Yeh, S.S. Davis and A.G. Coombes : Improving protein delivery from microparticle using blends of poly (DL-lactide-co-glycolide) and poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) copolymer, *Pharm. Res.*, **13**, 1693-1698 (1996).
 - 18) M.S. Hora, R.K. Rana, J.H. Nunberg, T.R. Tice, R.M. Gilley and M.E. Hudson, Release of human serum albumin from poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *Pharm. Res.*, **7**, 1190-1194 (1990).
 - 19) S. Benita, J.P. Benoit, F. Puisieux and C. Thies, Characterization of drug-loaded poly (D,L-lactide) microspheres, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1721-1724 (1984).
 - 20) F. Pavanetto, B. Conti, I. Genta and P. Giunchedi, Solvent evaporation, solvent extraction and spray drying for polylactide microsphere preparation, *Int. J. Pharm.*, **84**, 151-150 (1992).