

이중유제법에 근거한 미립자 제조 공정 중 단백질의 분산매로의 전이 양상

조미현 · 최수경 · 사홍기[†]

대구가톨릭대학교 약학대학

(2004년 8월 5일 접수 · 2004년 10월 8일 승인)

Patterns of Protein Leaching to Dispersion Medium during W/O/W Double Emulsion-Based Microencapsulation Processes

Mihyun Cho, Sookyong Choi and Hongkee Sah[†]

College of Pharmacy, Catholic University of Daegu, Hayang-Up, Gyeongsan City, Gyeongbuk 712-702, Korea

(Received August 5, 2004 · Accepted October 8, 2004)

ABSTRACT—The objective of this study was to investigate the patterns of protein leaching to an external phase during an ethyl acetate-based, double emulsion microencapsulation process. An aqueous protein solution (lactoglobulin, lysozyme, or ribonuclease; W_1) was emulsified in ethyl acetate containing poly-*d,l*-lactide-*co*-glycolide 75:25. The W_1/O emulsion was transferred to a 0.5% polyvinyl alcohol solution saturated with ethyl acetate (W_2). After the double emulsion was stirred for 5, 15, 30, or 45 min, additional 0.5% polyvinyl alcohol (W_3) was quickly added into the emulsion. This so-called quenching step helped convert emulsion microdroplets into microspheres. After 2-hr stirring, microspheres were collected and dried. The degree of protein leaching to W_2 and/or W_3 phase was monitored during the microencapsulation process. In a separate, comparative experiment, the profile of protein leaching to an external phase was investigated during the conventional methylene chloride-based microencapsulation process. When ethyl acetate was used as a dispersed solvent, proteins continued diffusing to the W_2 phase, as stirring went on. Therefore, the timing of ethyl acetate quenching played an important role in determining the degree of protein microencapsulation efficiency. For example, when quenching was performed after 5-min stirring of the primary W_1/O emulsion, the encapsulation efficiencies of lactoglobulin and ribonuclease were 55.1 ± 4.2 and $45.3 \pm 7.6\%$, respectively. In contrast, when quenching was carried out in 45 min, their respective encapsulation efficiencies were 39.6 ± 3.2 and $29.9 \pm 11.2\%$. By sharp contrast, different results were attained with the methylene-chloride based process: up to 2 hr-stirring of the primary and double emulsions, less than 5% of a protein appeared in W_2 . Afterwards, it started to partition from W_1 to W_2/W_3 , and such a tendency was affected by the amount of PLGA75:25 used to make microspheres. Different solvent properties (e.g., water miscibility) and their effect on microsphere hardening were to be held answerable for such marked differences observed with the two microencapsulation processes.

Key words—Poy(*d,l*-lactide-*co*-glycolide), Microspheres, Protein delivery, Ethyl acetate, Microencapsulation

단백질 의약품들은 경구 투여되어졌을 때 아주 낮은 생체 이용률을 나타내며 체내에서 짧은 반감기를 보여준다. 그러므로 등속 정맥 주입, 피하 또는 근육주사 경로를 통한 반복투여가 필수적이다. 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 단백질을 체내에서 오랫동안 전달할 수 있는 미립자(microspheres) 전달시스템의 개발에 많은 관심이 집중되어져왔다.¹⁻⁶⁾ 여러 가지 고분자화합물들을 사용하여 미립자를 제조할 수 있지만, poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide)(PLGA 약자로 표현)가 가장 많이 쓰이고 있다. 그 주된 이유는 체내에서 가수분해되어 서서히 무독성 물질인 젖산 및 글리콜산으로 변화하기 때문이며 또한 미국 식품의약품안전청이 PLGA

고분자를 사용한 제형에 대하여 제품허가를 내어주기 때문이다. 미립자는 보통 마이크론 단위의 크기를 지니므로 인체에 근육 또는 피하 주사로 간단히 투여하는 것이 가능하다. 체내에 투여되어졌을 때, PLGA의 성상에 따라, 수 일 내지는 일 년 이상 지나서 완전히 분해되어진다.

마이크로캡셀화(microencapsulation)은 미립자 제형(microsphere dosage form)에 약물을 봉입시키는 제조공정을 지칭한다.⁷⁾ 여러 가지 기계적, 물리화학적 방법 중에서 수용성 의약품을 미립자에 봉입할 경우, 가장 널리 사용되어지는 방법은 이중유제 제조에 근거한 마이크로캡셀화(water-in-oil-in-water double emulsion-based solvent evaporation process)이다.⁸⁻¹³⁾ 그 제조 공정은 다음과 같이 아주 간략하게 정리, 소개할 수 있다. 첫번째, PLGA 고분자화합물을 이염화메틸린(methylene chloride)과 같은 유기용매에 용해시킨다. 수용

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 053)850-3612, E-mail : hsah@cu.ac.kr

액 의약품을 물에 녹인 연후에 두 액상을 호모저나이저와 같은 기계를 사용하여 유화(emulsification)시켜, 일차 유제(water-in-oil emulsion; primary emulsion)를 만든다. 일차 유제를 유화제를 포함하고 있는 수용액상에 다시 혼화하여 이차 혹은 이중 유제(water-in-oil-in-water double emulsion)를 형성한다. 이때 혼화 과정이 진행되어짐에 따라, 이염화메틸린 분자들은 소량이나마 물로 점진적으로 확산되고, 물에 용해된 분자들은 39°C라는 낮은 비등점 때문에 쉽게 공기로 증발되어진다. 이러한 과정이 되풀이되면서, 이염화메틸린이 유상으로부터 제거되고, 액상의 유제 방울이 고품의 미립자로 변환된다.

이 시점에 이르러 언급하고 싶은 사실은 대부분의 마이크로캡셀화 공정 때 유기용매로서 이염화메틸린을 사용한다는 것이다. 이 용매가 가장 널리 쓰이는 이유는 다음과 같다: (a) 다양한 분자량의 PLGA가 이 용매에 아주 잘 녹는다; (b) 유제를 만들 때 사용하는 두상(two phases)은 서로 섞이지 아니하여야 한다는 일반적인 원리를 이염화메틸린이 훌륭하게 충족한다. 왜냐하면, 이염화메틸린의 물에 대한 용해도는 1.32 무게 %에 불과하기 때문이다; (c) 39°C라는 낮은 비등점 때문에 물에 확산되어진 소량의 이염화메틸린 분자들은 쉽게 대기로 증발된다. 그리하여 유제 방울이 미립자로 쉽게 변화하도록 도와준다. 하지만, 최근 들어 이염화메틸린의 독성과 관련된 논란이 증가하고 있다. 이염화메틸린은 확정된 발암물질이며, 지구의 오존층을 파괴시켜 심각한 환경 공해문제를 유발한다. 이러한 이유에서 미국 보건복지부 산하 Agency for Toxic Substances and Disease Registry에서 통제하는 '가장 해로운 38가지 물질 리스트'에 속해져 있다.¹⁴⁾ 두 번째로 언급하고 싶은 사실은, 이중 유제에 근거한 마이크로캡셀화 공정 중에서 단백질 수용액을 이염화메틸린에 유화할 때 야기되는 단백질 안정성 문제이다. 단백질이 물/이염화메틸린 계면에서 불안정화 되어지는 성상이 바로 미립자 제형을 사용하는 단백질 전달계를 성공적으로 개발하는데 가장 큰 걸림돌이 될 수 있다는 사실로 부각된 바가 있다.^{15,16)} 그러므로, 이중 유제 마이크로캡셀화 공정 기법에 따라 단백질을 PLGA 미립자에 봉입할 때에는 단백질 활성이 소실되거나, 단백질 변성으로 형성된 새로운 응집체에 의한 심각한 면역반응 발생가능성이 존재할 수도 있다.

이러한 상황 인식 하에 최근 이염화메틸린을 대체할 수 있는 보다 안전한 유기용매를 사용하여 단백질을 PLGA 미립자에 봉입하는 마이크로캡셀화 기법 개발에 많은 연구자들의 노력이 집중되고 있다. 그러므로 본 실험에서는 이염화메틸린을 대체할 수 있는 유기용매로서 최근 각광 받고 있는 에틸초산(ethyl acetate)를 사용하여, 모델 단백질인 β -

lactoglobulin, lysozyme, 그리고 ribonuclease을 PLGA 미립자에 봉입하는 제조공정의 개발에 역점을 두고자 하였다. 몇몇 연구진들이 에틸초산을 사용한 마이크로캡셀화 공정에 대한 연구결과를 보고한 바가 있지만, 미립자 형성 과정 및 미립자 완제품의 성상에 영향을 끼치는 제조공정 관련요인들에 대한 체계적인 연구는 미진한 상태이다.¹⁷⁻¹⁹⁾ 이러한 상황을 인식하여 에틸초산을 사용한 이중유제 마이크로캡셀화 기법에 근거한 PLGA 미립자 제조방법을 개발하고, 특히 제조 공정 중 단백질이 유제나 미립자로부터 분산매로 확산되는 기전을 규명하고자 하였다. 이러한 시도를 통하여 단백질 봉입율을 극대화시키는 방안을 모색하고자 하였다. 그리고 본 실험에 보고된 에틸초산을 사용한 마이크로캡셀화 공정을 종래의 이염화메틸린에 근거한 마이크로캡셀화 공정과 비교하여 주요 차이점을 도출하고자 하였다.

실험 방법

시약 및 기기

Lactide와 glycolide의 비가 75:25인 poly(*d,l*-lactide-co-glycolide)(클로르포름에서 측정된 inherent viscosity는 0.67 dL/g)는 Birmingham Polymers사(버밍햄, 알라바마주, 미국)로부터 구입하였다. 이하 본문에서는 이 고분자화합물을 PLGA75:25로 명명하였다. 미립자 제조 공정 시 유화제로 사용한 폴리비닐 알콜(분자량=25,000; 88 mol% 가수분해물)은 Polysciences사(워링턴, 펜실바니아주, 미국)로부터 구입하였다. 그리고 Sigma-Aldrich사(세인트루이스, 미주리주, 미국)로부터 본 연구에서 사용된 모델단백질인 β -lactoglobulin, lysozyme, 그리고 ribonuclease A를 구입하였다. 다이메틸 설펝사이드와 라우릴황산나트륨은 Fisher사(피츠버그, 펜실바니아주, 미국)에서 구입하였다. 사용한 단백질의 정량 분석을 위하여 Pierce회사(락포드, 일리노이스주, 미국)로부터 bicinchoninic acid(BCA) 단백질 분석시약(BCA reagents A와 B로 구성)을 구하였다.

Ethyl acetate를 사용한 미립자 제조공정

이중유제의 제조-30 mg의 단백질(lactoglobulin, lysozyme, 또는 ribonuclease)을 물 0.3 ml에 녹이고, 이와는 별도로 0.6 gram의 PLGA75:25를 에틸초산 6 ml에 녹였다. 단백질 수용액을 상기의 유기용매상에 10-mm shaft를 지닌 VirtiShear사의 호모저나이저로 16,000 rpm에서 1분간 유화시켜 1차 water-in-oil(W₁/O) 유제를 만들었다. 이를 즉시 분산매 43 ml(0.5% 폴리비닐 알콜 40 ml과 에틸초산 3 ml)으로 구성; W₂로 명명함)가 들어있는 250 ml 크기의 비이커에 유화시켜

water-in-oil-in-water($W_1/O/W_2$) 이중유제를 만들었다. 이때 두 상의 혼화를 위하여 마그네틱판 교반기(VWR사의 모델 400 HPS)를 사용해 450 rpm을 유지하여 주었다. 이렇게 형성된 이중유제를 5, 15, 30 또는 45분 동안 계속 교반시켰다. 이때까지의 공정을 단계 1(step 1)로 본문에서는 규정하였다.

에틸초산 퀘칭(Ethyl acetate quenching)- 일정시간 교반시킨 이중유제에 0.5% 폴리바이닐 알콜 수용액(W_3 이라 칭함) 100 ml을 가하여 이중유제에 있는 에틸초산을 W_3 으로 재빨리 추출함으로써 이중유제가 미립자로 경화되도록 해주었다. 에틸초산 추출 후에도 계속 미립자 현탁액을 1시간 동안 교반하였다. 여기까지의 공정을 단계 2(step 2)로 명명하였다.

미립자 경화- 위에서 얻은 미립자 현탁액을 여과하여 미립자를 취하고 이들을 다시 0.5% 폴리바이닐 알콜 수용액 100 ml에 재분산시켰다. 계속 1시간 동안 교반한 후(단계 3), 그리고 또 1시간을 더 교반한 후 미립자를 여과하여 취하였다(단계 4). 진공상태에서 12시간 동안 미립자를 건조시켰다.

단백질 정량

분산매($W_2 + W_3$)에 있는 단백질의 정량- 미립자 제조 공정 중 단계 1과 2시기에 분산매 2 ml을 취하였다. 나일론막 필터($0.45 \mu\text{m}$ 공극크기)를 통과한 여액 중 $30 \mu\text{l}$ 를 microplate well에 넣었다. 여기에 $200 \mu\text{l}$ 의 BCA 단백질 분석실험액(BCA 시약 A와 B를 50:1의 용적비율로 섞어 제조한 실험액)을 가하고 37°C 에서 2시간 방치하였다. Microplate reader (Bio-tek사의 모델 Elx 808)를 이용해 540 nm 에서 흡광도를 측정하여 단백질 양을 측정하였다.

PLGA75:25 미립자에 존재하는 단백질 정량- 단계 3과 4 공정 이후 얻은 미립자를 대상으로 미립자 내부에 있는 단백질의 함량을 측정하였다. 이때 기존의 문헌에서 발표된 방법에 따라 단백질 정량 실험을 실시하였다.²⁰⁾ 간략히 말하면, 건조된 미립자 시료 일부(15 내지 20 mg 내외)를 바이알에 넣었다. 여기에 다이메틸 설펡사이드 2 ml을 가하여 미립자를 녹인 후 0.5% 라우릴황산나트륨을 포함하는 0.05 N-NaOH 수용액 10 ml을 가하였다. 2시간 방치한 후 $30 \mu\text{l}$ 를 취하여 위와 동일한 방법으로 단백질 함량을 측정하였다.

단백질 봉입율

PLGA75:25로 만들어진 미립자에 봉입된 단백질 봉입율(encapsulation efficiency %)은 다음의 식으로 계산하였다: $100 \times (\text{미립자 mg당 봉입된 단백질 함량} / \text{PLGA75:25 mg당 사용된 단백질 함량})$.

이염화메틸린을 사용한 미립자 제조공정

Lysozyme 30 mg을 물 0.3 ml에 녹이고, 이의는 별도로 0.2, 0.3, 0.45, 0.6 또는 0.9 gram의 PLGA75:25를 이염화메틸린 6 ml에 녹였다. Lysozyme 수용액을 상기의 유기용매 상에 10-mm shaft를 지닌 VirtiShear사의 호모저나이저로 16,000 rpm에서 1분간 유회시켜 1차 W_1/O 유제를 만들었다. 이를 즉시 분산매인 0.5% 폴리바이닐 알콜 수용액 40 ml (W_2 로 명명함)에 유회시켜 $W_1/O/W_2$ 유제를 만들었다. 이때 두 상의 혼화를 위하여 마그네틱판 교반기(VWR사의 모델 400 HPS)를 사용해 450 rpm을 유지하여 주었다. 유회한지 5분이 경과하였을 때 0.5% 폴리바이닐 알콜 수용액 100 ml (W_3 으로 명명함)을 가하고 계속하여 교반시켜 주었다(이때 수용액을 가해준 이유는 이염화메틸린 퀘칭 목적이 아니라 에틸초산을 사용하는 마이크로캡슐화 공정 조건과 유사하게 설정하기 위해서였다). 그러면서 30, 60, 120, 180, 240, 그리고 300분이 지날 때 마다 여액을 취해 ($W_2 + W_3$) 상으로 빠져나온 lysozyme의 양을 앞서 언급한 단백질 정량방법에 따라 측정하였다.

PLGA75:25 미립자의 내·외부 형상 관찰

Hitachi 모델 E1030 ion sputter를 사용하여 미립자 시료를 100 nm 두께로 플라티늄 코팅하였다. 그 후에 Hitachi 모델 S-4100 전계방사형 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 사용하여 미립자 표면 형상을 관측하였다. 미립자 시료의 내부를 조사하기 위해서는 그들을 먼저 에폭시 수지(epoxy resin)에 고정시켜 자른 후 위의 조사를 재현하였다.

결과 및 고찰

물과 혼화되지 않는 이염화메틸린에 비하여, 에틸초산은 물에 대하여 8.7 무게 %의 용해도를 지닌다.¹⁷⁾ 이러한 에틸초산의 물에 대한 현저한 용해도를 이용해, 본 실험 조건 하에서, $W_1/O/W_2$ 이중유제를 만든 후 100 ml의 물(W_3)을 가하여 PLGA75:25가 녹아있는 에틸초산을 재빨리 ($W_2 + W_3$) 상으로 추출하였다. 이러한 용매 퀘칭기법을 이용하여 유제 방울(emulsion droplets)에 있는 에틸초산을 효과적으로 추출함으로써 미립자 경화를 유도하였다. 경화된 미립자를 회수 및 건조 목적으로 여과하는데까지 총 3 내지 4시간만이 소요되었다. 건조과정 후 미립자는 응집되어지지 않았으며 훌륭한 유동성을 보여주었다. Figure 1은 제조된 미립자의 외·내부 구조를 주사전자현미경으로 관찰한 결과를 보여준다.

에틸초산을 사용하는 본 미립자 제조 공정 단계마다

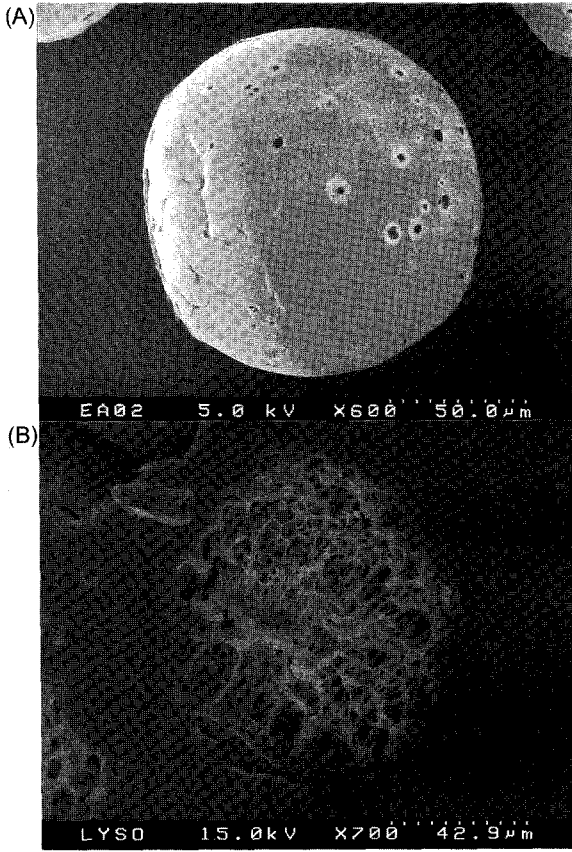


Figure 1—Typical SEM micrographs showing the (A) external and (B) internal structure of PLGA75:25 microspheres prepared by the ethyl acetate-based microencapsulation process (0.6 gram of PLGA75:25 was used to prepare the microspheres).

lysozyme이 W_1 에서 외상으로 어떻게 전이되는지를 체계적으로 규명하고자 하였다. 첫 번째로, 0.6 gram의 PLGA75:25를 사용하여 미립자를 제조하는 과정 중, 에틸초산 퀘칭 실시 바로 전(단계 1)까지 W_1 에서 W_2 로 확산되는 lysozyme의 양을 측정하였다. 재미있는 사실은, $W_1/O/W_2$ 이중유제를 5, 15, 30 또는 45분 동안 교반하는 사이 단백질은 W_1 상에서 W_2 상으로 계속 확산되는 경향이였다. $W_1/O/W_2$ 이중유제를 5분간 교반하였을 때에는 $7.4 \pm 5.0\%$ 의 lysozyme이 분산매로 확산되었다. 하지만, 교반시간을 15, 30, 그리고 45 분으로 늘렸을 때 확산되어 소실되는 lysozyme의 양은 12.5 ± 4.9 , 26.3 ± 8.3 , 그리고 $52.0 \pm 5.3\%$ 로 점점 증가되었다. 그러므로 퀘칭 실시시간이 lysozyme이 분산매인 W_2 상으로 확산되는 정도에 영향을 미치며, $W_1/O/W_2$ 이중유제에 대한 퀘칭 실시 시기를 앞당길수록 단백질 봉입을 측면에서 유리할 것이란 것을 추론할 수 있었다. 두 번째로, 에틸초산 추출 후에도 계속 미립자 현탁액을 1시간 동안 교반한 후(단계 2)에 수상으로 전이된 lysozyme의 양을 측정하였다. 그리고 미립

자 현탁액을 여과하여 미립자를 취하고 이들을 다시 0.5% 폴리비닐 알콜 수용액 100 ml에 재분산시켜 1시간 동안 교반한 후(단계 3), 그리고 또 1시간을 더 교반하여 여과 채취한 후(단계 4) 미립자에 존재하는 lysozyme의 양을 각각 측정하였다. 이 모든 결과를 나타내는 Figure 2를 요약하자면, 에틸초산 퀘칭을 늦게 실시하면 할수록 lysozyme의 봉입율은 감소되며, 또한 퀘칭에 의하여 유제방울이 미립자로 경화되어질지라도 미립자 내부에 있는 lysozyme이 ($W_2 + W_3$) 상으로 계속 확산된다는 것이었다.

Lysozyme 대신 lactoglobulin을 대상으로 실험하였을 때에도 앞에서 언급한 유사한 결과가 관측되었다(Figure 3). $W_1/O/W_2$ 이중유제를 제조한 직후 5분간 교반하는 동안에 10.6

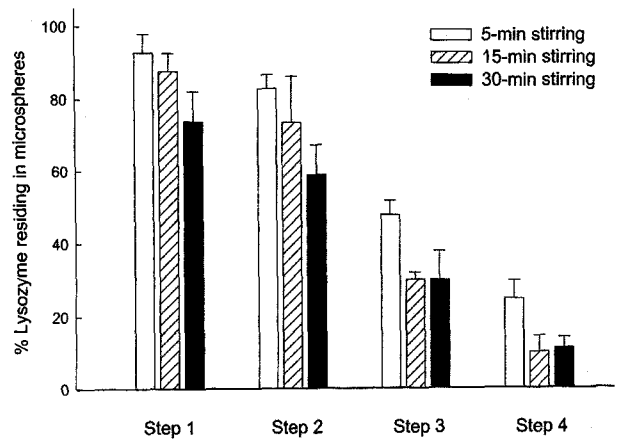


Figure 2—Percentage of lysozyme residing in the PLGA75:25 microspheres during the whole microencapsulation process. Before the onset of ethyl acetate quenching, the $W_1/O/W_2$ emulsion was stirred for 5, 15, or 30 min.

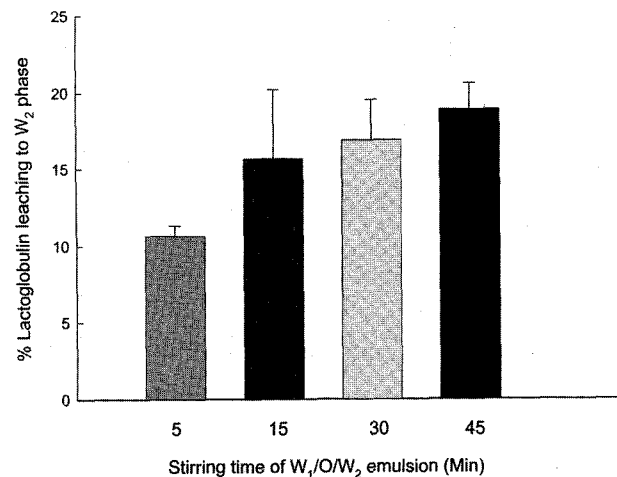


Figure 3—Percentage of β -lactoglobulin that partitioned to the W_2 phase by the end of step 1. After the $W_1/O/W_2$ emulsion was stirred for 5, 15, 30, or 45 min, its amount present in the W_2 phase was determined.

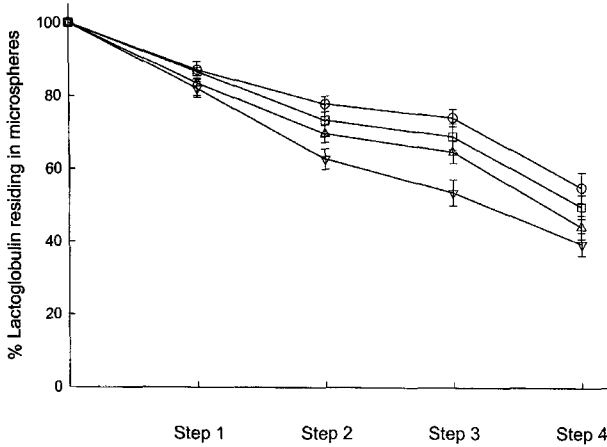


Figure 4—Percentage of β -lactoglobulin residing in the PLGA75:25 microspheres during the whole microencapsulation process. Before the onset of ethyl acetate quenching, the $W_1/O/W_2$ emulsion was stirred for (○) 5, (□) 15, (△) 30, or (▽) 45 min.

$\pm 0.7\%$ 의 lactoglobulin이 W_2 상으로 전이됨에 반해, 교반시간을 45분간 지속하였을 때에는 수상으로 전이되는 lactoglobulin의 양은 $18.9 \pm 1.7\%$ 로 증가되었다. Figure 4는 각 단계별 마이크로캡셀화 공정 중 lactoglobulin이 수상으로 전이되는 정도를 나타낸다. Lactoglobulin의 봉입율은, 퀘칭 실시 시기에 따라, 39.6 ± 3.2 내지 $55.1 \pm 4.2\%$ 로 관측되었다. Ribonuclease를 대상으로 하여 앞의 실험을 반복하였을 때에도 갖 제조한 $W_1/O/W_2$ 이중유제를 교반시켰을 때 ribonuclease는 W_1 에서 W_2 수상으로 확산이 지속적으로 진행됨을 확인하였다. $W_1/O/W_2$ 이중유제를 5분간 교반하였을 때 $9.7 \pm 1.0\%$ 의 ribonuclease가 외상으로 확산되었는데, 교반시간을 30분으로 증가하였을 때에는 그 정도가 $15.0 \pm 1.0\%$ 로 늘어났다. 또한 퀘칭에 의해 유제방울이 미립자로 경화된 연후에도 ribonuclease는 계속 수상으로 확산되어 미립자내로의 봉입율이 저하되었다(Figure 5). Ribonuclease의 경우 관측된 봉입율은, 퀘칭 실시시기에 따라, 29.9 ± 11.2 내지 $45.3 \pm 7.6\%$ 로 측정되어졌다. 본 연구에서 보고된 단백질들의 봉입율은 기존의 문헌에 보고된 단백질 봉입율과 견줄 수 있는 수준임을 알 수 있었다.²¹⁾

여태까지 보고한 에틸초산을 사용하는 이중유제법에 근거한 마이크로캡셀화 공정이 기존의 이염화메틸린을 사용하는 이중유제법에 기초를 둔 마이크로캡셀화 공정과 어떤 차이점이 있는지를 조사하고자 하였다. 이를 위한 한 방편으로 이염화메틸린을 사용하는 마이크로캡셀화 공정 중 lysozyme이 수상으로 확산, 전이되는 정도를 관측하였다. Figure 6은 0.2 gram의 PLGA75:25를 사용하였을 때 lysozyme이 교반시간이 경과함에 따라 수상으로 전이되는 결과를 나타내고 있다. 앞서 언급한 에틸초산을 사용하는 마이크로캡셀화 공

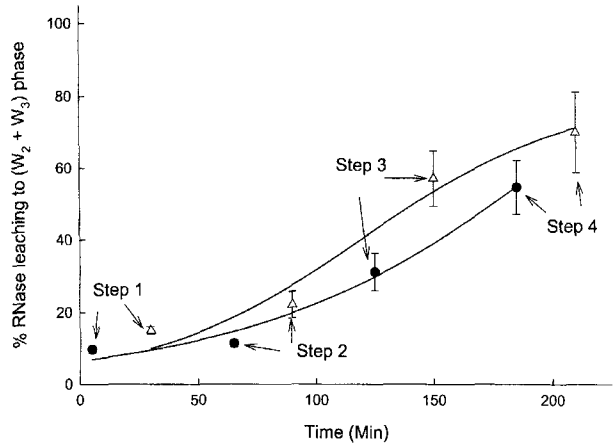


Figure 5—Percentage of ribonuclease diffusing to the (W_2+W_3) phase during the microencapsulation process. Microspheres were prepared by quenching the $W_1/O/W_2$ emulsions stirred for (●) 5 and (△) 30 min.

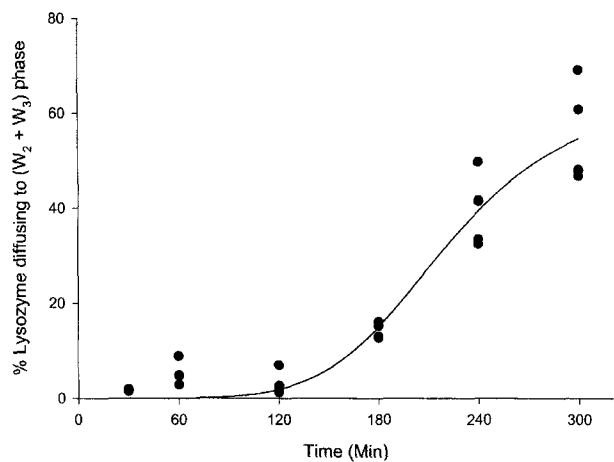


Figure 6—Percentage of lysozyme diffusing to the external aqueous phase during the methylene chloride-based microencapsulation process (0.2 gram of PLGA75:25 was used to prepare microspheres). Data were collected from four different batches.

정 결과들과는 상이하게도, 초기 120분간의 교반시간 중에 수상으로 전이되는 lysozyme의 양은 $2.9 \pm 2.4\%$ 에 불과할만큼 극히 미미하였다. 하지만 2시간의 지연시간이 경과한 연후에 lysozyme의 확산 정도는 현저히 증가되어 상당량의 lysozyme이 수상으로 확산되어짐을 알 수 있었다. 비슷한 양상들이 0.3, 0.45, 그리고 0.6 gram의 PLGA75:25를 사용하였을 때에도 관측되었다(Figures 7, 8, 그리고 9). 하지만, 재미있게도, 사용하는 PLGA75:25의 용량을 증가시키면 시킬수록 지연시간으로 간주될 수 있는 2시간이 지난 연후 수상으로 소실되는 lysozyme의 양은 현저하게 감소되었다. 예를 들어, 0.2 gram의 PLGA75:25를 사용하여 만든 이중유제를 5시간 교반하였을 때 $54.6 \pm 9.9\%$ 의 lysozyme이 수상으

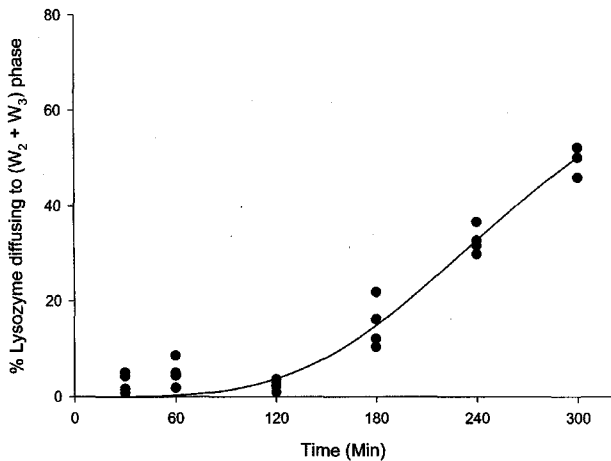


Figure 7—Percentage of lysozyme diffusing to the external aqueous phase during the methylene chloride-based microencapsulation process (0.3 gram of PLGA75:25 was used to prepare microspheres). Data were collected from four different batches.

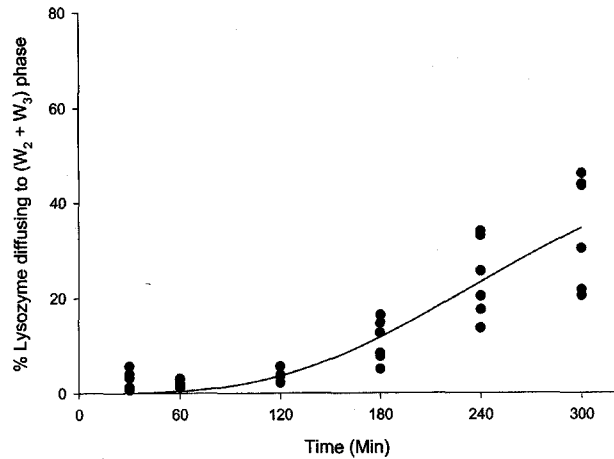


Figure 9—Percentage of lysozyme diffusing to the external aqueous phase during the methylene chloride-based microencapsulation process (0.6 gram of PLGA75:25 was used to prepare microspheres). Data were collected from six different batches.

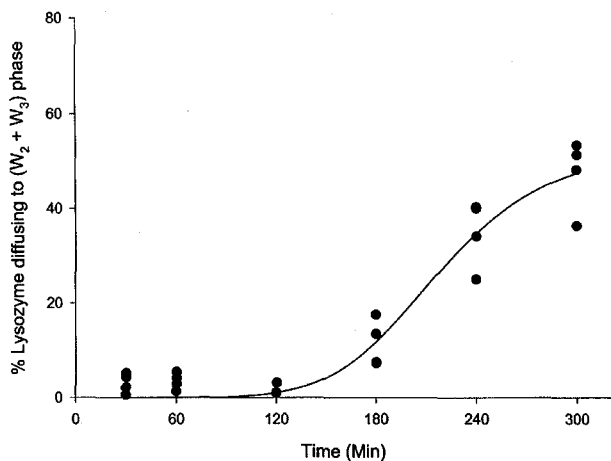


Figure 8—Percentage of lysozyme diffusing to the external aqueous phase during the methylene chloride-based microencapsulation process (0.45 gram of PLGA75:25 was used to prepare microspheres). Data were collected from four different batches.

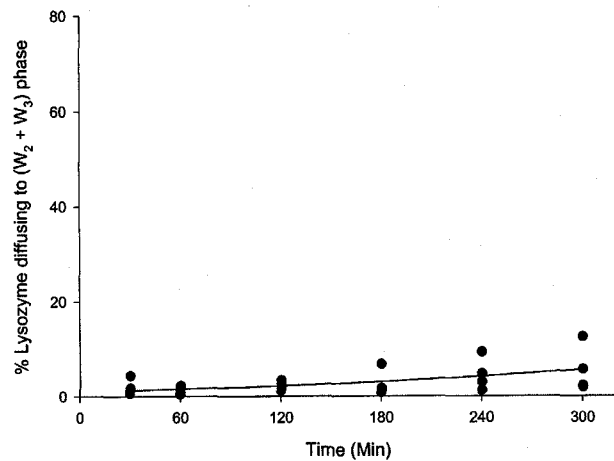


Figure 10—Percentage of lysozyme diffusing to the external aqueous phase during the methylene chloride-based microencapsulation process (0.9 gram of PLGA75:25 was used to prepare microspheres). Data were collected from four different batches.

로 소실되어진 반면에, 0.6 gram의 PLGA75:25를 사용하였을 때에는 그 정도가 $34.3 \pm 11.7\%$ 로 감소되었다. 더욱이, 미립자 제조를 위한 PLGA75:25의 사용량을 0.9 gram으로 증가하였을 때에는 미립자 제조과정 중 수상으로 전이되는 lysozyme의 용량은 극히 미미하였다(Figure 10). 이 경우 이중유제를 5시간 교반하였을 때 lysozyme이 수상으로 확산된 정도는 $5.5 \pm 4.9\%$ 에 불과하였다. 이 결과는 곧 0.9 gram의 PLGA75:25를 사용하여 미립자를 제조하면, 본 실험조건 하에서는, 거의 대부분의 단백질을 미립자에 봉입할 수 있다는 사실을 뒷받침하여 준다. 실제로 기존의 발표된 문헌에 따르면, 이염화메틸렌을 사용하는 이중유제법에 따라 높은 농도의 PLGA를 사용하여 미립자를 제조한 경우 높은 봉입율이

관측된다.²²⁾

이러한 결과들을 바탕으로 하여 다음과 같은 결론을 유도할 수 있었다: 에틸초산을 사용하는 경우 W_1 상에 존재하는 단백질은 에틸초산과 물의 현저한 혼합성에 의해 PLGA75:25가 녹아있는 유상(oil phase)을 통과하여 외상(W_2 와 W_3)으로 확산되는 경향을 보여준다. 그러므로 $W_1/O/W_2$ 이중유제에 대해 켄칭을 실시하지 아니하고 계속 교반하였을 때 시험한 모든 단백질들은 지속적으로 빠져나가는 현상을 보여주었다. $W_1/O/W_2$ 유제에 대하여 켄칭을 실시하여 유제입자들을 경화시켜 미립자로 변환시킨 후에도 단백질들은 계속 ($W_2 + W_3$)상으로 확산되어 분산매로 소실되는 경향을 보여주었다. 이러한 결과로부터 경화된 미립자 매트릭스는 단백

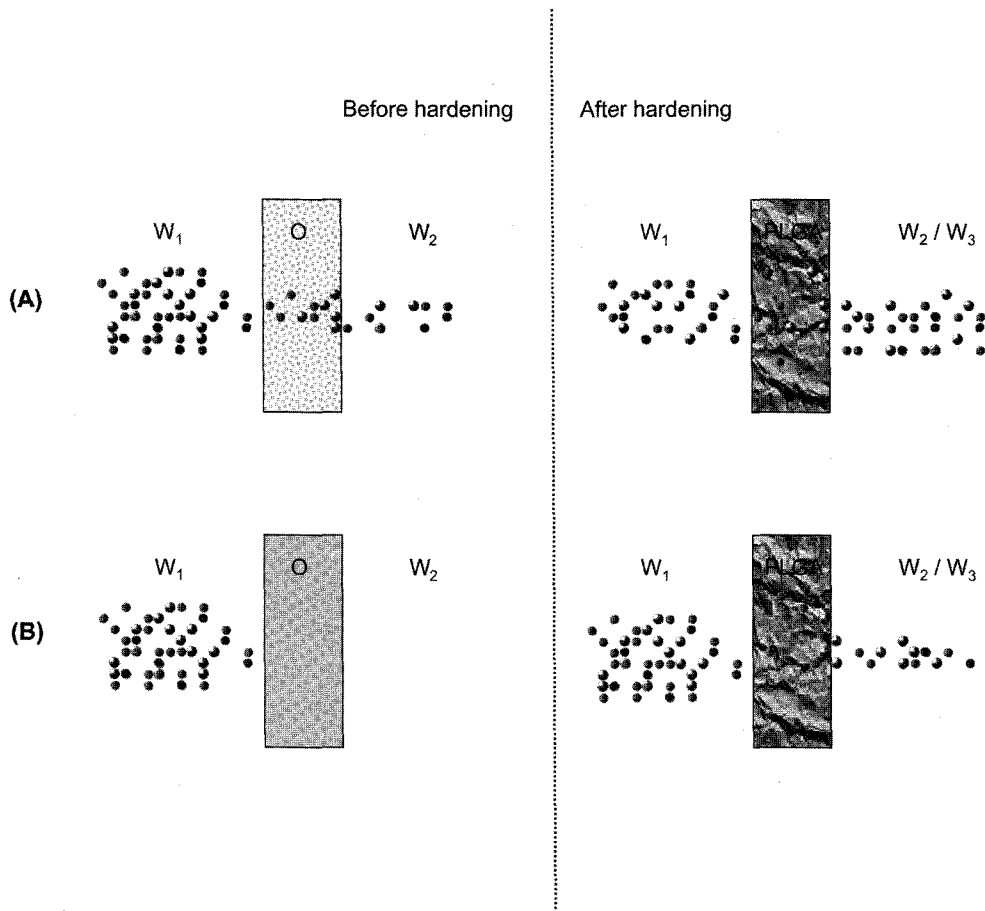


Figure 11—Schematic illustrations comparing the leaching patterns of a protein during (A) the ethyl acetate- and (B) the methylene chloride-based microencapsulation processes (filled circles represent protein molecules).

질이 통과할만한 충분한 기공(pores/microchannels)을 지니고 있다는 것을 증빙하여준다(Figure 11(A)). 하지만 이염화메틸린을 사용하였을 때에는 상기에서 언급한 현상과 상이한 현상을 보여준다. 이염화메틸린의 물용해성은 1 무게 %에 불과하기 때문에 물과는 거의 섞이지 않는다. 그러므로 $W_1/O/W_2$ 이중유제를 만든 연후에 2시간까지 지속적으로 교반하여도 W_1 상에 있는 단백질이 W_2 상으로 전이되는 정도는 극히 미미하다(Figure 11(B)). 하지만 교반시간을 연장할수록 물에 용해된 이염화메틸린 분자들이 물/공기 계면을 통해 증발함으로써 유상의 이염화메틸린이 물로 전이되고 다시 증발되는 과정이 반복된다. 이러한 과정이 되풀이되면서 유상에 있는 이염화메틸린이 감소되어 PLGA75:25 침전이 일어나는 임계시점에 도달하면 미립자 경화 현상이 발생하게 되는 것이다. 본 실험의 조건에서 얻어진 결과에 따르면 본격적인 미립자 경화가 일어나는 임계시간은 교반 개시 후 약 2시간으로 추정된다. 이 시점 이후에서는 PLGA75:25 고형화로 생성되는 미립자 매트릭스에 존재하는 기공(pores/micro-

channels)을 통하여 단백질은 본격적으로 분산매로 전이되기 시작하는 것이다(Figures 6-10). 이때 단백질 확산에 영향을 미치는 미립자 매트릭스의 기공 등의 성상은 미립자를 만들기 위해 사용한 PLGA75:25 총량에 의해 영향을 받는 것을 또한 알 수 있다. Figures 6과 10에 걸친 결과에서 나타나듯, 0.2 gram의 PLGA75:25를 사용하였을 때에는 임계시간이 지나고 나서 많은 양의 lysozyme이 미립자 내에서 분산매로 전이되어졌다. 하지만 미립자 제조를 위해 사용한 PLGA75:25 양이 증가될수록 매트릭스의 성상이 변화되어 임계시간이 지나 미립자로 변형된 연후에서도 단백질의 분산매로의 전이가 억제되어지는 것을 알 수 있다. 이러한 추정을 보다 확증하기 위해 다양한 용량의 PLGA75:25를 사용하여 제조한 미립자의 외상을 전자주사현미경으로 관측하였다(Figure 12): 0.2 gram의 PLGA75:25를 사용하여 제조한 미립자의 표면에서는 커다란 기공들이 관측됨에 반하여, PLGA75:25 용량을 증가할수록 그러한 기공들이 미립자 표면으로부터 사라짐을 볼 수 있었다.

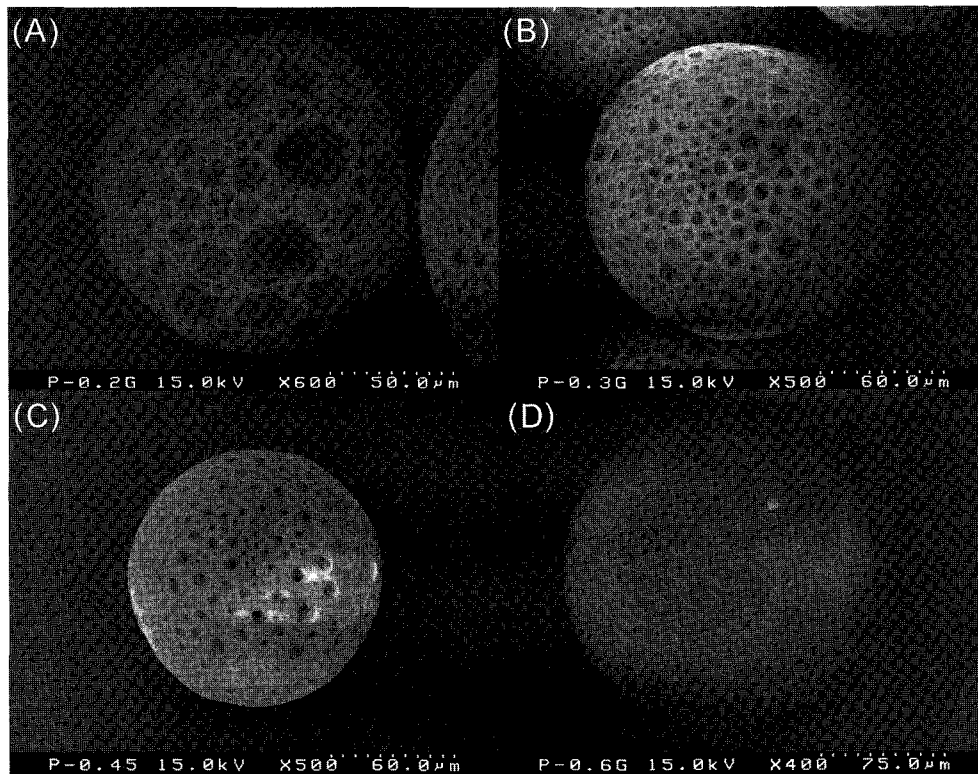


Figure 12—SEM micrographs of the external structures of the microspheres made of (A) 0.2, (B) 0.3, (C) 0.45 and (D) 0.6 gram of PLGA75:25. The methylene chloride-based microencapsulation process was used to prepare them.

결 론

본 연구에 보고된 실험조건 하에서 에틸초산을 PLGA75:25 용매로 사용하는 새로운 이중유제 마이크로캡셀화 공정을 통하여 미립자를 제조할 수 있었다. 보고된 각 제조공정 단계에서 단백질이 유제방울과 미립자로부터 수상의 분산매로 전이되는 정도를 체계적으로 보고하였다. 또한 에틸초산 켄칭 실시시기가 단백질 봉입율에 결정적인 영향을 미친다는 사실을 규명하였다. 그러한 결과들은 기존의 이염화메틸린을 사용하는 이중유제 마이크로캡셀화 공정에서 얻어지는 결과들과 차별성을 지니고 있음을 과학적으로 제시하였다. 본 연구결과, 에틸초산 켄칭 실시시기 등의 제조공정에 관련된 인자들과 PLGA75:25 사용량 등의 포물레이션 성상들을 최적화함으로써 미립자 성상 및 단백질 봉입율을 효과적으로 제어할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 KRF(R01-2001-041-F00304)의 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) A.M. Carcaboso, R.M. Hernandez, M. Ogartua, J.E. Rosas, M.W. Patarroyo and J.L. Pedraz, Potent, long lasting systemic antibody levels and mixed Th1/Th2 immune response after nasal immunization with malaria antigen loaded PLGA microparticles, *Vaccine*, **22**, 1423-1432 (2004).
- 2) B. Mandal, M. Kempf, H.P. Merkle and E. Walter, Immobilisation of GM-CSF onto particulate vaccine carrier systems, *Int. J. Pharm.*, **269**, 259-265 (2004).
- 3) G. Schwach, N. Oudry, J.P. Giliberto, P. Broqua, M. Luck, H. Lindner and R. Gurny, Biodegradable PLGA microparticles for sustained release of a new GnRH antagonist: part II. In vivo performance, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **57**, 441-446 (2004).
- 4) J. Panyam, M.M. Dali, S.K. Sahoo, W. Ma, S.S. Chakravarthi, G.L. Amidon, R.J. Levy and V. Labhasetwar, Polymer degradation and *in vitro* release of a model protein from poly(*d,l*-lactide-*co*-glycolide) nano- and microparticles, *J. Control Release*, **92**, 173-187 (2003).
- 5) M. Diwan and T.G. Park, Stabilization of recombinant interferon-alpha by pegylation for encapsulation in PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.*, **252**, 11-22 (2003).

- 6) F. Quaglia, G. De Rosa, E. Granata, F. Ungaro, E. Fattal, La Immacolata and M. Rotonda, Feeding liquid, non-ionic surfactant and cyclodextrin affect the properties of insulin-loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by spray-drying, *J. Control Release*, **86**, 267-278 (2003).
- 7) S. Benita, *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp. 1-631 (1996).
- 8) J. Wang and S.P. Schwendeman, Mechanisms of solvent evaporation encapsulation processes: prediction of solvent evaporation rate, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1090-1099 (1999).
- 9) N. Nagareya, T. Uchida and K. Matsuyama, Preparation and characterization of enteric microspheres containing bovine insulin by a w/o/w emulsion solvent evaporation method, *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1613-1617 (1998).
- 10) J.L. Chen, C.H. Chiang and M.K. Yeh, The mechanism of PLA microparticle formation by water-in-oil-in-water solvent evaporation method, *J. Microencapsul.*, **19**, 333-346 (2002).
- 11) 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).
- 12) K.J. Zhu, H.L. Jiang, X.Y. Du, J. Wang, W.X. Xu and S.F. Liu, Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique, *J. Microencapsul.*, **18**, 247-260 (2001).
- 13) N.B. Viswanathan, P.A. Thomas, J.K. Pandit, M.G. Kulkarni and R.A. Mashelkar, Preparation of non-porous microspheres with high entrapment efficiency of proteins by a (water-in-oil)-in-oil emulsion technique, *J. Control Release*, **58**, 9-20 (1999).
- 14) *Federal Register*, Notice of the revised priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles, pp. 61332-61335 (1997).
- 15) H. Sah, Protein behavior at the water/methylene chloride interface, *J. Pharm. Sci.*, **88**, 1320-1325 (1999).
- 16) H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J. Control Release*, **58**, 143-151 (1999).
- 17) H. Sah, Microencapsulation technique using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres, *J. Control Release*, **47**, 233-245 (1997).
- 18) K.S. Soppimath and T.M. Aminabhavi, Ethyl acetate as a dispersing solvent in the production of poly(*d,l*-lactide-co-glycolide) microspheres: effect of process parameters and polymer type, *J. Microencapsul.*, **19**, 281-292 (2002).
- 19) F.T. Meng, G.H. Ma, W. Qiu and Z.G. Su, W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles, *J. Control Release*, **91**, 407-416 (2003).
- 20) H. Sah, A new strategy to determine the actual protein content of poly(lactide-co-glycolide) microspheres, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 1315-1318 (1997).
- 21) S.W. Cho, S.H. Song and Y.W. Choi, Effects of solvent selection and fabrication method on the characteristics of biodegradable poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin, *Arch. Pharm. Res.*, **23**, 385-390 (2000).
- 22) G. Jiang, B.C. Thanoo and P.P. DeLuca, Effect of osmotic pressure in the solvent extraction phase on BSA release profile from PLGA microspheres, *Pharm. Dev. Technol.*, **7**, 391-399 (2002).