CLEAN TECHNOLOGY, Vol. 12, No. 2., June 2006, pp. 53~61.

초임계 PGSS 법을 이용한 Poly(lactide-co-glycolide)와 단백질의 마이크로복합체 제조에 관한 연구

송은석, 정헌섭†, 이한호, 김재덕†, 김화용, 이윤우*

서울대학교 화학생물공학부
151-742 서울시 관악구 신림9동 산 56-1

†한국과학기술연구원 청정기술연구센터
136-791 서울시 성북구 하월곡동 39-1

(2006년 1월 9일 접수 2006년 6월 20일 채택)

The Production of Protein-loaded Poly(lactide-co-glycolide) Microparticles using Supercritical Carbon Dioxide

Eun-Seok Song, Heon-Seop Jung†, Hanho Lee, Jae-Duck Kim†, Hwayong Kim, Youn-Woo Lee*

School of Chemical and Biological Engineering & Institute of Chemical Processes, Seoul National University, San 56-1, Sillim-dong, Gwanak-gu, Seoul, 151-744, Korea

†Clean Technology Research Center, Korea Institute of Science and Technology
39-1 Hawolgok-dong, Seongbuk-gu, Seoul, 136-791, Korea

(Received for review January 9, 2006; Revision accepted June 20, 2006)

요 약

생분해성 고분자인 Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)와 약물 단백질로 약물 중합체를 만들기 위하여 초임계 나노 입자 제조 공정중 하나인 PGSS법을 이용하여 연구를 수행하였다. 초임계 이산화탄소에 의해서 고분자 PLGA의 유리전이온도(T_g)를 강하시켜 가소화시키면서 단백질을 용기 내에서 혼합하였다. 고분자 PLGA에 캡슐화 된 단백질의 입자를 얻기 위해 고압 용기에 들어있는 시료를 노즐을 통하여 대기압으로 이산화탄소를 분사시켰다. 입자의 형태, 입자 크기 그리고 크기 분포에 대한 영향을 알아보기 위해서 고압 용기 안에서 초임계 이산화탄소를 이용하여 공정변수들을 조작함으로서 PGSS 실험을 하였다. 입자는 거칠고 불규칙하며 표면에 기공이 생성되었음을 확인하였다. 제조된 입자의 크기와 크기분포는 과포화도, 핵 생성시간 등으로 설명하였다. 제조된 입자 내의 protein의 활성도 저하는 거의 없었다.

주제어 : 초임계 이산화탄소, 락타이드-글리콜라이드 공중합체, 단백질 약물, 기체포화용액에 의한 입자제조, 가소화, 캡슐화

Abstract－A PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) process designed to generate nano-particles using supercritical fluids has been conducted for the fabrication of Poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles that encapsulate a protein drug. It is demonstrated that the polymer and the dry powder of a protein can be mixed under supercritical carbon dioxide conditions and that the protein component retains its biological activity. In this experiment, the mixture of polymer which is plasticized and dry powder protein was sprayed to form solid polymer that encapsulate the protein. It is found that supercritical fluid process give fine tuning of particle size and particle size distribution by simple manipulations of the process parameters. Porous

* To whom correspondence should be addressed.
E-mail: ywlee@snu.ac.kr

particles were formed with irregular shape. Protein encapsulated in the polymer was found to have enzymatic activity without significant loss of its initial value.

Key Words: Supercritical CO_2, Poly(lactide-co-glycolide), Particles from Gas Saturated Solutions (PGSS), Plasticization, Encapsulation

1. 서 론

제약 산업에서 기존에 사용되었던 약물투여 수단이나 약물의 안정성, 그리고 사용상 편의나 경제성이 문제화 되면서 약물 치료의 최적화를 표방하는 약물 송달 시스템이 탄생하게 되었다. 최대의 약효를 얻을 수 있는 효과적인 약물 송달 시스템을 개발하기 위해서 약물의 작용부위, 투여경로 및 약물이 작용부위에 도달하기 위해 통과하는 경로와 장애물 등에 대한 이해가 필요하다. 이상적인 약물투여 방법은 약을 적용한 즉시 약효가 나타나고, 치료기간 중 일정한 혈중농도를 유지하며, 치료 종료시 즉시 약효가 중단된 후 체내에서 제거되는 것이다.

의약제 개발 분야에 있어서 초임계 유체를 이용하는 방법은 이미 널리 알려져 있을 뿐 아니라 계면활성제와 의료제의 정제, 향유/향료 추출, 고분자 물질의 분획 (fractionation)과 화학 반응, 그리고 고분자 중합 등의 다양한 응용 분야들이 연구 되고 있다[1-2]. 특히 의약제 개발 분야에서는 초임계 분위기하에서의 침전과 결정화 공정에 대한 관심 높아지고 있으며 산업화가 진행 중이다. 또한 입자 생성과 공정상의 많은 제한성을 동시에 제거할 수 있는 단일 공정으로 미립자 제조와 입자분포도 제어에도 다양한 초임계 방법들이 소개되고 있다[3-6].

초임계 PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) 공정은 기존의 RESS (Rapid Expansion Supercritical Solution) 공정 [7-16]과 유사하다. 하지만, PGSS 공정 [17-21]의 경우 고분자 또는 단백질이 초임계 유체 내에서 모두 용해될 필요가 없다는 것이다. RESS 공정이 초임계 유체가 대상 고분자 혹은 단백질을 용해시키는 용매로 작용하여 단일상의 상태에서 노즐을 통해 팽창되어 입자를 얻는 방법이라면, PGSS 법은 초임계 유체가 대상 고분자의 유리전이 온도를 강하시켜 그것을 가소화 (plasticization)/액화 (liquefaction) 시키는 방법이다. 가소화된 고분자 내부에 초임계 유체가 포화되어 있으며, 내부로의 단백질 주입 (impregnation)이 가능하게 된다. 따라서 PGSS 공정에서의 초임계 유체는 용매의 역할이 아닌, 고분자 내에 포화되어 있는 용질의 역할을 수행하고 있다. 노즐을 통한 급격한 팽창으로 혼합 압력용기 안에 가소화 되어 있던 고분자들은 재고형화/재결정화 되고, 고분자 내부에 있던 초임계 유체 역시 감압되어 기화되면서 재고형화 된 입자들 표면에 작은 기공들을 형성케 한다[22-23].

본 연구의 목적은 PGSS 공정으로부터 생성된 입자 크기, 입자 크기 분포도, 생성된 복합체 내의 단백질의 활성도를 알아보고 시간의 흐름에 따른 단백질 활성도 변화를 제어하는 원인을 규명하기 위하여 PGSS 공정을 수행하는 것이다.

2. 이론적 배경

2.1 라이소자임의 특성 및 응용

라이소자임(lysozyme)은 페니실린을 발견한 플레밍이 1922년에 발견하였다. 그는 연골, 눈물, 난백 등에 어떤 종의 세균을 완전히 또한 급속히 용해하는 물질이 들어 있다는 것을 확인하고, 특히 직접 분리한 (isolation) 미크로코쿠스 리소데이크틱스 (Micrococcus lysodeiktics)라는 세균이 급속히 용해되는 것에 착안하여 이 물질을 라이소자임이라고 이름 붙였다. 1945년에는 달걀 난백에서 라이소자임의 결정을 얻었고, 1963년에는 1차 구조가 결정되었다. 달걀의 난백 라이소자임은 아미노산 잔기 (殘基) 129개로 구성되는 1개의 폴리펩티드 사슬로서 4개의 이황화결합 (S-S 결합)으로 다리결합이 되어 있다. 분자량은 14,000으로 등전점은 pH 11.0인 강염기성 단백질이다. 1965

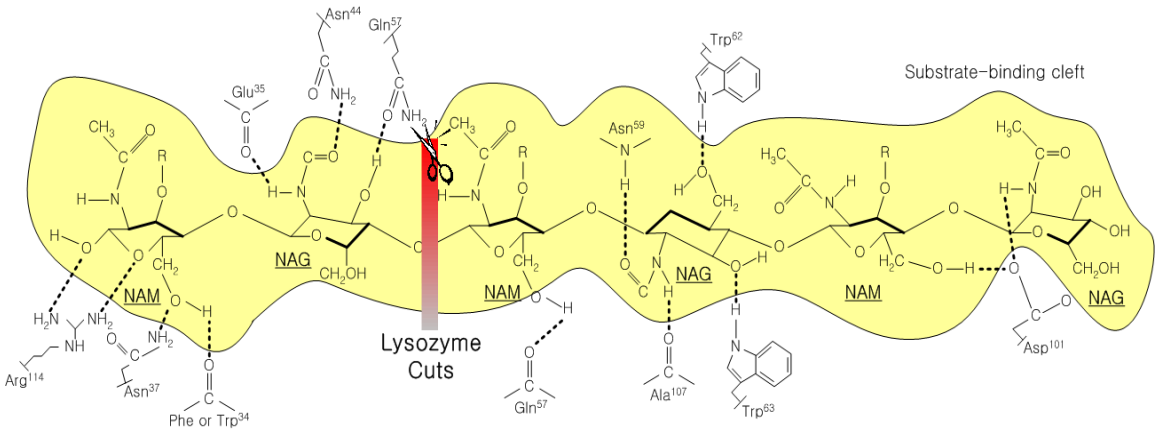


Figure 1. The lysozyme reaction.

년에는 필립스가 1.5 Å 분해능의 X선 해석에 의한 3차 구조 모델을 제출하였다 [24]. 라이소자임의 구조는 분자의 중앙에 길쭉하게 패인 곳이 있고 기질은 여기에 들어가 효소와 수소결합을 형성하여 유지되며, 당의 의자형 구조가 조금 일그러진다. β-1,4-글리코시드결합의 절단은 52번째의 아스파라트산 (Asp)과 35번째의 글루탐산 (Glu)의 곁사슬의 2개의 카르복시기의 공동작용에 의하여 이루어진다. 세포벽 외에 키틴 (NAG 중합체)이나 NAG 소중합체도 가수분해하며 전이효소 (轉移酵素)로서의 활성도 있다 (Figure 1). 라이소자임은 우유의 α-락트알부민 (아미노산 잔기 123)과 1차 구조가 매우 닮았으므로 같은 유전자로부터 복제된 것으로 생각된다.

라이소자임은 난백동물조직, 비점막 (鼻粘膜), 침, 위액, 눈물, 유즙 등에 함유되며, 침입세균으로부터 생체를 보호한다. 체내 혹은 달걀 등에서 추출된 라이소자임은 항박테리아 작용으로 인해 알레르기·피부염 치료제, 축농증·천식 등의 호흡기계 경구치료제와 진해거담제 등의 제약 분야에서 널리 사용되는 효소물질이다. 또한 항균작용으로 인해 현재에는 건축자재물과 인테리어 용품 등에 첨가되어 이용되기도 한다.

2.2 제형의 설계

약물의 체내 동태 즉 체내 이행과 변화는 복잡한 과정이지만 크게 흡수, 분포, 대사, 배설 등으로 나누어 해석할 수 있다. 약물은 체중, 연령, 성, 임신, 인종, 체온, 생체 리듬, 유전인자, 영양 상태, 약물 상호작용, 투여 제형 등에 의해 그 효과가 달라진다. 그러므로 약물의 기본적인 인체 흡수는 다음과 같이 약물의 고유 특성에 의해 영향을 받는다. 우선 약물 입자의 크기는 흡수에 크게 영향을 미친다. 미세화된 약물입자는 큰 표면적을 가지며 표면적이 클수록 용해속도가 커지면서 흡수는 빨라진다. 그러나 극단적으로 미세화된 분말은 표면에 공기가 흡착되어 유효표면적이 감소되므로 용해속도가 오히려 감소한다. 생체막의 성질이 지용성이므로 약물의 성질이 수용성 또는 지용성인지의 여부에 따라 약물의 수동확산과 그에 따른 흡수속도에 영향을 미친다. 또한 무정형 약물은 용해 시 결정의 격자 에너지를 극복할 필요가 없기 때문에 결정형에 비해 비교적 쉽게 용해, 흡수될 수 있다. 결정형 무수물의 경우 수화물보다 수중에서 용해 속도가 크며, 염 형태의 약물은 물에 쉽게 해리되어 비해리형의 산이나 염기보다 용해가 빠르다. 이와 같이 약물의 용해 및 흡수 특성에 영향을 미치는 매개변수를 조절하는 것이 약물 작용을 제어하는 중요한 수단이 된다.

약물 자체로의 투여는 심리적 요인에 의해 쉽게 이루어질 수 없기 때문에 약물을 중합체를 이용하여 제형의 형태로 설계, 제조하여 투여하는 방법이 사용되고 있다. 따라서 제형의 선택은 주어진 약물 요법의 임상 결과에서 약물의 선택만큼 중요한 인자일 수도 있다. 어떠한 약물의 경우에는 제형 혹은 그 제조법에 따라 인체 내의 흡수속도 혹은 흡수량이 2-5 배의 차이가 나는 경우도 있다. 특히 난용성 약물을 사용해서 제형화된 제품은 약물의 흡수가 생체 내로 원하는 만큼 이루어지지 않아 약물 효능 발현에 제한을 받게 된다. 이러한 문제점을 해결하고자 많은 연구자들이 노력한 결과의 하나로 약물의 크기를 나노 크기로 입자화 하여 경구제, 주사제 (정맥주사, 근육주사 등), 국소 투여뿐만 아니라, 나노 크기의 액상 분산체를 정제, 캅셀 등으로 제조하여 난용성 약물의 생체이용률을 증진시키는 연구가 진행되고 있다. 이러한 나노 크기의 결정체는 약물의 크기를 감소시킴으로써 실제 복용하였을 때 약물의 표면적이 상대적으로 증가되어 용해도가 증가되고, 약물의 흡수율을 증진시켜 생체 이용률의 향상을 꾀할 수 있다는 것이다.

제조된 제형으로부터 약물의 방출은 단순확산, 화학반응 그리고 용매에 의한 활성화 등에 의해 일어난다. 약물을 고분자 중합체를 이용하여 제형으로 제조, 방출하는 시스템은 Figure 2와

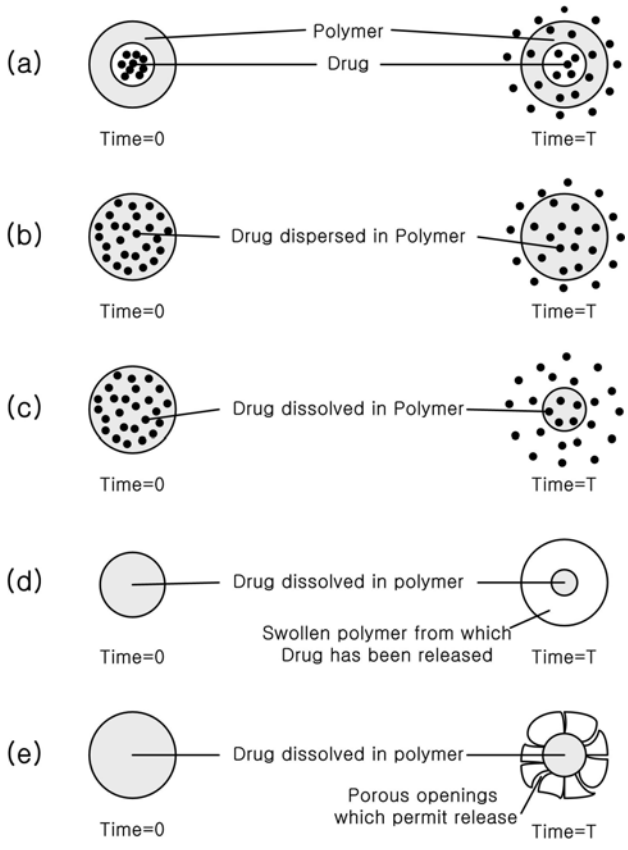


Figure 2. Different drug carriers.

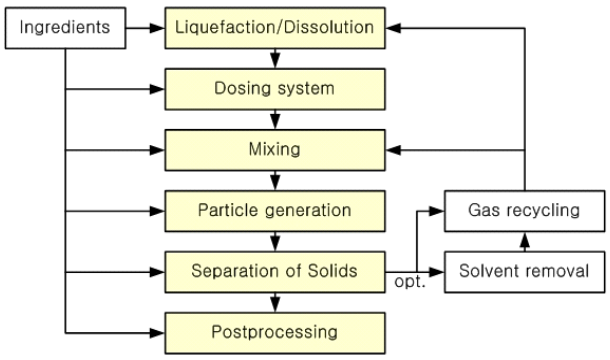


Figure 3. Block diagram for spray processes for particle generation.

같이 크게 5가지로 분류될 수 있다. (a)와 같이 약물을 고분자로 코팅한 시스템은 고분자 막을 통해 약물이 확산되고 이 과정이 율속 단계로서 약물의 지속적 방출을 만들기에 용이하다. 약물을 인체 내에서 생분해되는 고분자 매트릭스 내에 균일하게 분포되도록 만든 시스템 (b)는 약물의 확산에 의해 방출된다. (c)의 경우는 약물을 포함한 고분자가 화학적 작용에 의해 분해되면서 약물을 방출한다. (d)는 인체 내의 여러 용매에 의해 중합체를 팽윤하게 하여 삼투압 효과를 유발 약물을 방출하며, (e)는 물이 중합체 안으로 스며든 후 삼투압에 의해 세공을 형성하고 이 세공을 통해 약물을 방출하는 형태를 나타낸다.

2.3 초임계 유체 방법을 이용한 입자 제조

입자제조를 위해 필요한 고압 분사공정의 설계에 필요한 단위조작들은 분무건조 (spray drying), 분무재결정화 (spray crystallization) 등과 같은 기존의 저압 단위공정들과 흡사하다. 입자 제조에 필요한 각 단계의 공정을 Figure 3에 도식화 하였다. 공정의 타입에 따라 각 단계의 순서는 차이가 있을 수 있지만, 일반적으로 모든 고압의 초임계 공정들은 Figure 3에 표시된 단계들을 포함하고 있다[21].

입자화를 시키려는 원료 물질이나 혼합물은 액체 혹은 고체 상태로 존재할 수 있다. 고체 상태일 경우, 액상으로 변화시켜 분사 가능한 형태로 만들어 주는 것이 중요하다. 초임계 유체에 의한 직접 용해 후 분사 (RESS), 액체 용매 내에서 용해 후 분사 (Supercritical Antisolvent System, SAS), 초임계 유체에 의한 가소화 후 분사 (PGSS) 등이 그 대표적인 방법들이다.

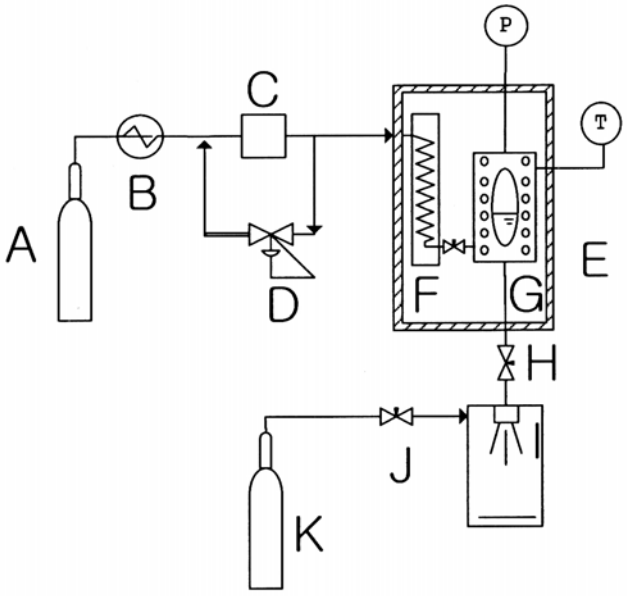
3. 실 험

3.1 실험 재료

PGSS 법을 통하여 단백질의 캡슐화(encapsulation)를 목적으로 사용한 생분해성 고분자와 단백질은 다음과 같다. 생분해성 고분자인 Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA, M.W.: 85,000-160,000)는 실험실에서 lactide와 glycolide를 50:50으로 중합/건조한 것을 사용하였고, 라이소자임(chicken egg white, 3x crystallized, dialyzed and lyophilized), Bovine Serum Albumin (BSA, fraction V, minimum 98% (electrophoresis)) 은 SIGMA사에서 제조한 것을 사용하였고 이산화탄소는 99.0%의 순도로서 협신 가스에서 구입하였다.

3.2 실험 장치

초임계 PGSS법을 이용한 생분해성 고분자에 의한 단백질 캡슐화를 수행할 실험장치는 자체적으로 설계 제작된 것을 사용하였다 (Figure 4). 초임계 PGSS법을 이용한 실험장치는 크게 혼합부, 이산화탄소 주입부, 채집부로 구성된다. 혼합용기는 SUS 316, 가로 115mm, 세로 110mm, 길이 255mm, 내경 10mm, 부피 80ml의 크기로 제작 되었다. 실린더에서 나온 이산화탄소는 저온항온조(RBC30, JEIO TECH)를 거치면서 고압 펌프 (high pressure pump, P-50, Thar)에 의해 공급된다. 또한 펌프로부터 나온 이산화탄소는 혼합용기로 공급되기 전에 예열기



A: CO_2 cylinder, B: Cooler, C: Pump, D: Back pressure regulator,
E: Heating chamber, F: Pre-heater, G: High pressure vessel with two sight glasses,
H: Ball valve, I: Nozzle, J: Collecting chamber, K: N_2 cylinder,

Figure 4. Schematic diagram for the supercritical fluid apparatus.

(direct ohmic heating, 1000W, 대풍 인더스트리)를 통과시켰다. 압력조절기 (back pressure regulator, 26-1721-24, TESCOM)를 통해 압력 조건을 조절, 설정하도록 하였으며, 압력 측정을 위하여 압력계 (pressure gauge, max=6000 psi, MILLIPORE)를 사용하였다. 온도 측정을 위하여 K-형 열전대 (K-type thermocouple)을 사용하였으며, 온도 기록계로는 YOKOGAWA사의 μR 100이 사용되었다. 모든 라인은 Swagelok 사의 고압용 튜빙 (외경 1/4 inch 또는 1/8 inch) 및 밸브 (V4LN-SS, 외경 1/4 inch 또는 1/8 inch, Parker)를 사용하였다. 0.06 inch의 내경을 갖도록 제작된 노즐을 통하여 입자를 분사시켰다. 마지막으로 분사된 입자들은 채집용기(아크릴 재질, 내경 100 mm, 외경 125 mm, 길이, 470 mm, 자체제작)에 모아졌다. 최종적으로 채집용기 끝부분에 종이필터 (직경 110 mm, Whatman)를 장착하였다. 제조된 입자의 건조를 위해 진공건조기(1400E, SHEL LAB)를 사용하였다.

3.3 실험 방법

초임계 PGSS법을 이용한 실험장치는 크게 세 가지로 구성된다. 첫째, 대상물질을 포함한 유기용매가 초임계 이산화탄소에 의해 생분해성 고분자의 가소화가 이루어져 단백질과의 혼합이 행해지는 혼합부가 있다. 혼합 용기 안에 일정량의 PLGA 와 약물 단백질인 라이소자임 또는 BSA를 각각 실험조건에 따라 혼합하여 넣는다. 둘째, 고압 펌프에 의해 이산화탄소가 시스템으로 공급된다. 이때 이산화탄소 실린더로부터 나오는 CO_2는 펌프로 공급되기 직전에 저온항온조를 거쳐 충분한 액화상태를 유지하도록 하여 펌프에서의 맥동현상을 제거하여 원활한 공급이

이루어지도록 하였다. 또한 펌프로부터 나온 이산화탄소는 침전기로 공급되기 전에 예열기를 통과시켜서 혼합 용기 내의 반응 조건 온도에 접근하도록 예열하여 공급되도록 하였다. 압력조절기를 통해 혼합기 안에 생분해성 고분자의 팽창(swelling) 정도에 따라 압력 조건을 조절, 설정하도록 하였다. 고분자의 유리전이온도(T_g)는 실질적으로 초임계 이산화탄소의 흡수에 의해 낮아지며 결과적으로 고분자의 팽창 (swelling)이 일어난다. Wissinger와 Paulaitis[25]는 이산화탄소의 농도가 증가함에 따라 PMMA나 PS 등의 고분자의 유리전이온도가 70 % 가량 감소함을 보고하고 있다. 한편, Allessi 등[26]은 초임계 상태의 이산화탄소 역시 PMMA와 PS의 유리전이온도를 감소시키는 효과가 있다고 보고하였으며 이는 4 MPa 부근에서 실험을 수행한 Wissinger와 Paulaitis[25]의 결과와 유사한 유리전이온도의 감소효과를 나타내었다. Wang 등[27]에 의하면 압력의 증가는 고분자의 자유부피를 감소시켜 유리전이온도를 증가시키는 효과가 있다고 하였으며 특히, 20 MPa 이상으로 압력이 증가하는 경우에는 이산화탄소의 효과를 상쇄시켜 이산화탄소 농도가 증가함에도 불구하고 유리전이온도가 다시 상승하는 실험결과를 보고하였다. 한편, 혼합기 내부에서 팽창된 생분해성 고분자는 단백질과 혼합되어 노즐을 통해 급격히 팽창되면서 분사된다. 마지막으로 고형화된 입자들은 채집부에 의해서 수거되며 이때 채집 용기의 끝부분에 최종적으로 종이필터를 장착하여 생성된 입자들을 손실 없이 수집하고자 하였다. 제조된 입자들은 37℃의 진공건조기에서 3시간 이상 건조되었다.

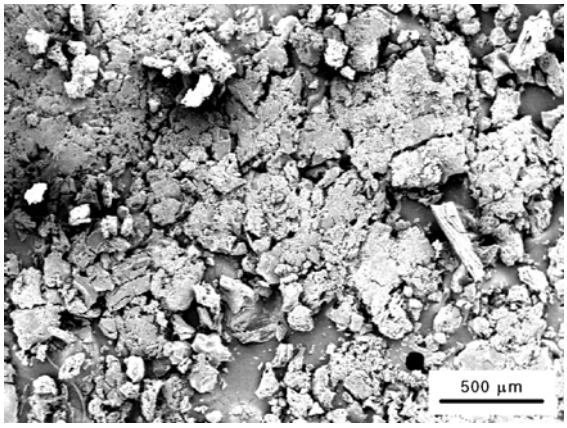
3.4 분석 방법

생분해성 고분자와 단백질 복합체의 입자 형태는 주사전자현미경 (scanning electron microscope, SEM, JSM 5410LV)에 의해 관찰되었으며, 미세입자는 이중 코팅된 접착 테이프 (double-coated adhesive tape)로 시편 홀더 (specimen holder)에 부착시켰다. 각 조건에서 얻어진 생분해성 고분자와 단백질 복합체의 미세입자 평균입자크기는 레이저 입도분석기 (particle size analyzer, PSA, Otsuka electronics ELS-800)를 사용하여 측정하였다. 이 입도분석기의 입자크기 및 입자크기분포 측정 방법은 입도분석기 내부의 전해질에 부유한 비전도도 입자에 의한 전기 저항의 변화에 의해 측정된다. 입자의 입도 분포에서 가장 큰 측정 오차의 원인으로는 입자의 분산성 (dispersion)과 견본 추출 (sampling) 등을 들 수 있는데 이러한 오차를 줄이기 위하여 용액을 약 3분간 초음파 처리 하여 응집체를 분산시킨 후 입도 분포를 측정하였다.

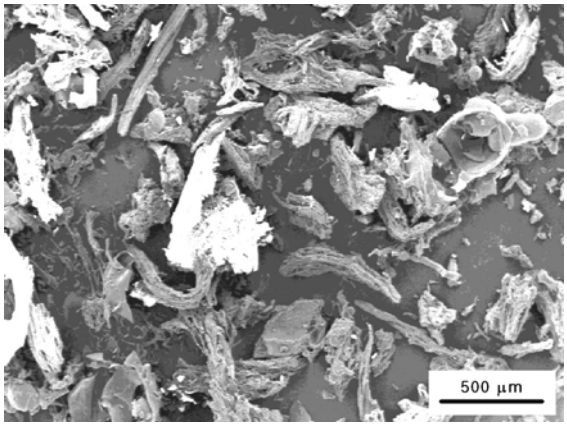
복합체 내 단백질 활성화도 및 활성화도 지속시간 검사는 라이소자임 검사 키트 (lysozyme assay kit, Sigma)를 구입한 후, kit내의 형광물질 (fluorescence substrate)를 이용하여 표준 라이소자임 (standard lysozyme)의 활성화도를 측정한 후 샘플을 동일한 방법으로 측정, 비교하여 상대적인 활성화도를 측정하였다. 또한 샘플을 동일 온도, 압력 조건에서 일정시간 배양시킨 후, 다시 활성화도를 측정하여 그 지속 시간을 측정하였다.

4. 결과 및 고찰

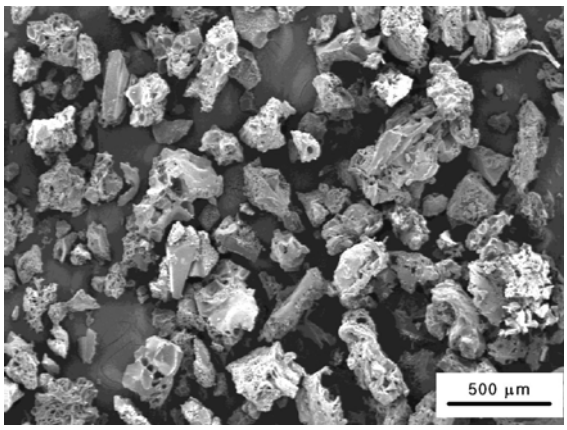
PGSS 법을 이용한 고분자 Poly (lactic-co-glycolic acid) 와 단백질 라이소자임의 마이크로 복합체 제조에 있어서 실험 장치를 직접 제작하여 진행하였다. 공정변수의 영향을 알아보기에 앞서 기존의 처리되지 않은 (raw) PLGA, PGSS 공정에 의해



Raw PLGA



Processed PLGA



Processed PLGA and Lysozyme

Figure 5. SEM photographs of raw PLGA, processed PLGA and processed PLGA-lysozyme particles at 38℃, 20 MPa, 0.83 wt% solutes (PLGA+lysozyme) in $scCO_2$, 0.06" nozzle diameter and 9cm nozzle-valve distance.

제조된 PLGA와 PGSS 공정에 의해 제조된 PLGA-라이소자임 복합체 입자들의 모양과 크기 변화를 SEM 분석을 통해 비교하였다. Figure 5에서 보듯이 입자화 공정을 거치지 않은 raw PLGA 입자들은 특정한 모양이 없는 전형적인 무정형(amorphous) 고분자의 모습을 보여주고 있다. PGSS공정을 거친 PLGA입자의 경우 침전기 내부에서 가소화 된 후, 강한 압력에 의하여 노즐을 통해 분사되었지만, 실험 조건에서 단백질과 고분자를 같이 넣어준 실험과 순수 고분자로만 진행된 생성된 입자들의 모양은 아주 상이하다. 단백질을 함유하고 있지 않은 순수 PLGA 입자들은 불규칙한 섬유 (fiber) 형태의 모양을 띄고 있는 반면에 단백질 라이소자임을 포함한 PLGA입자들은 상대적으로 규칙적이며 구형인 모습이다. 입도분석기를 통해 평균

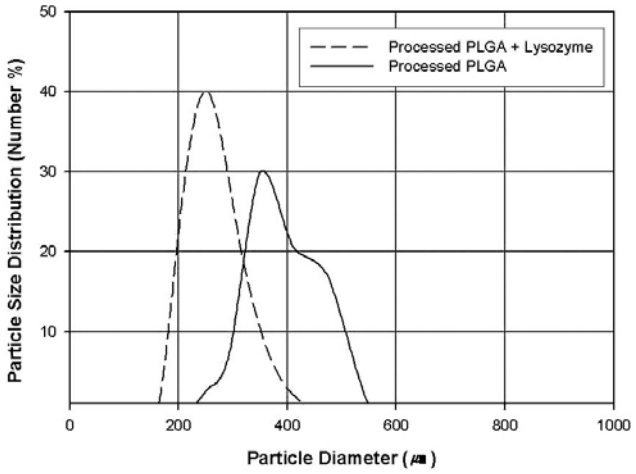


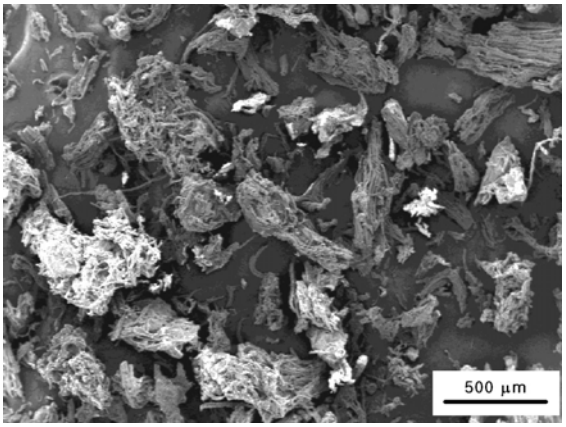
Figure 6. Particle size distribution of processed PLGA and processed PLGA-lysozyme.

Table 1. Mean particle size and size distribution of processed PLGA and PLGA-lysozyme

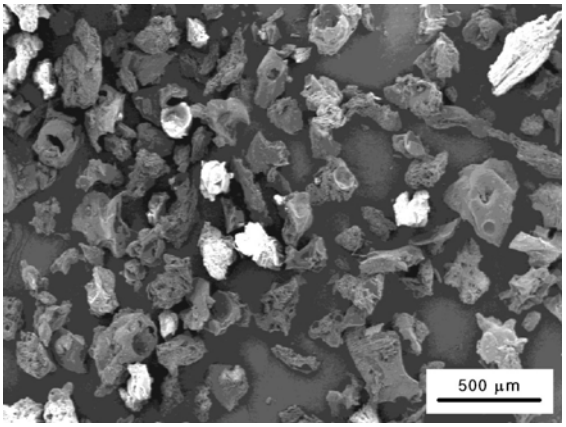
Temperature (℃)	Pressure (MPa)	Concentration		Nozzle Size (inch)	Distance between Nozzle and Valve (㎝)	Average Particle Size (㎛)	Particle Size Distribution (㎛)
		Solutes in $scCO_2$ (wt%)	Lysozyme in PLGA (wt%)				
38	20	0.83	0	0.06	9	357.720	349.300
38	20	0.83	30	0.06	9	322.938	254.758

Table 2. The effect of Lysozyme concentration on mean particle size and size distribution of PLGA-lysozyme

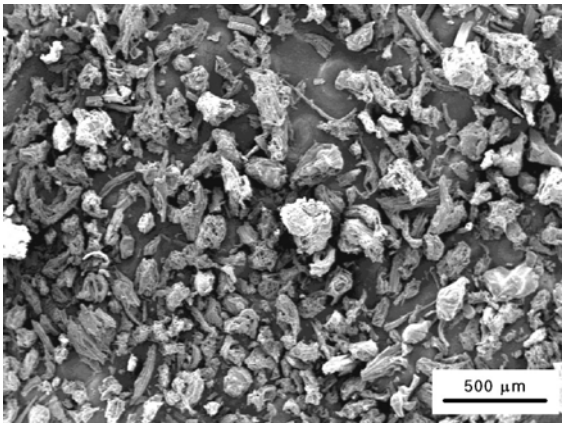
Temperature (℃)	Pressure (MPa)	Concentration		Nozzle Size (inch)	Distance between Nozzle and Valve (㎝)	Average Particle Size (㎛)	Particle Size Distribution (㎛)
		Solutes in $scCO_2$ (wt%)	Lysozyme in PLGA (wt%)				
38	25	0.74	5	0.06	9	384.201	347.843
38	25	0.74	10	0.06	9	291.058	277.258
38	25	0.74	30	0.06	9	104.209	95.471



5 wt%



10 wt%



30 wt%

Figure 7. SEM photographs of PLGA-lysozyme particles at 38℃, 25 MPa, 0.74 wt% solutes (PLGA+lysozyme) in $scCO_2$,0.06" nozzle diameter and 9cm nozzle-valve distance.

입자 크기 및 크기 분포도를 조사한 결과 (Table 1) PLGA-라이소자임 복합체가 더욱 작은 입자 크기와 좁은 분포도를 보이는 것으로 나타났다. 초임계 이산화탄소에 의하여 PLGA는 유리전이온도가 강하되어 가소화된 상태로 분사되며 재고형화 된다. 그러나 초임계 이산화탄소에 용해되지 않는 라이소자임은 그대로 방출되면서 재고형화 되는 PLGA 입자들 사이에서 분절현상을

발생시킨다고 사료된다. 때문에 비슷한 크기의 둥근 PLGA-라이소자임 입자들이 좁은 범위에 분포 되어 있는 현상을 Figure 5와 Figure 6은 보여주고 있다. 침전기 내부에 라이소자임이 얼마나 고르게 PLGA 에 분포되고 함께 분사되는지 여부가 입자의 평균크기 및 크기 분포도를 결정하는 결정적 요인이 된다.

Figure 7 은 PLGA에 대한 라이소자임 농도 비의 변화에 따른 입자 크기 및 모양을 나타낸 SEM 사진이다. 각 실험은 38℃, 25 MPa로 단백질의 변성 (denaturation)을 최소화하는 조건으로 설정하였으며, 용질이 수집용기 (collecting chamber) 내부로 분사가 잘 되도록 분사 노즐의 직경이 0.06 inch로 작게 제작하여 사용하였다. 노즐-밸브간 거리는 실험장치의 구조상 가능한 짧게 하여 9 cm로 하였으며 용질의 농도는 초기에 0.74 wt%로 만들어서 실험을 진행하였다. 제조된 입자 속에 라이소자임의 함량이 높을수록 입자 모양이 더욱 둥글어지고, 비교적 잘 분절되어 있는 것으로 관찰된다. 반면 단백질 라이소자임의 함량이 낮은 입자들은 섬유 (fiber) 형태의 불규칙적인 모양으로 나타나고 있다. 이것은 라이소자임을 혼합하지 않고 순수하게 고분자 PLGA로만 입자를 만들었을 때와 모양과 크기가 비슷하다 (Figure 8). 더욱 정확한 입자 크기 및 크기 분포도를 알아보기 위하여 입도분석기를 이용하였다. Figure 7과 Table 2에서 보듯이 PLGA에 대한 라이소자임의 농도가 높을수록 입자크기가 작아지고 있으며, Figure 8에서와 같이 크기 분포도는 좁아지는 것을 확인할 수 있었다. 특히 라이소자임의 함량이 전체 중량의 5wt%인 샘플인 경우 그 입자 크기는 매우 증가하였으며, 넓은 범위의 입자 크기 분포도를 가진 것으로 Figure 8에 나타나 있다.

이것은 위에서 언급한 것과 같이 라이소자임을 혼합하지 않고 고분자 PLGA로만 입자를 만들었을 때 나타나는 현상과 무관하지 않으며 Figure 5에서 보듯이 PGSS법으로 제조된 순수 PLGA의 입자들은 라이소자임을 혼합하여 제조된 입자들에 비

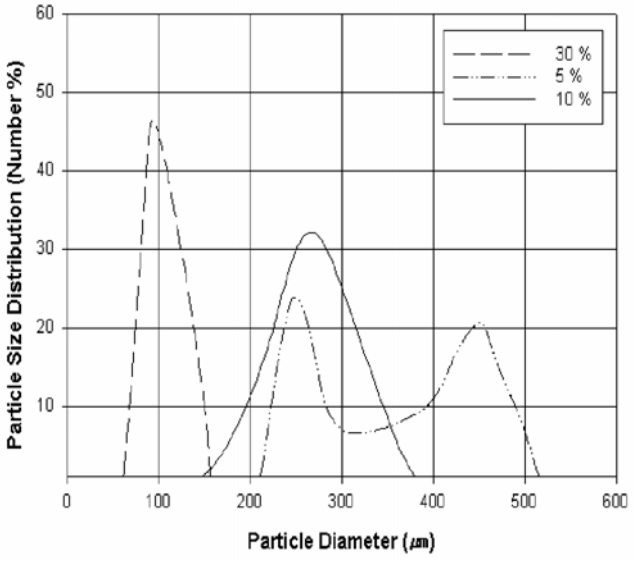
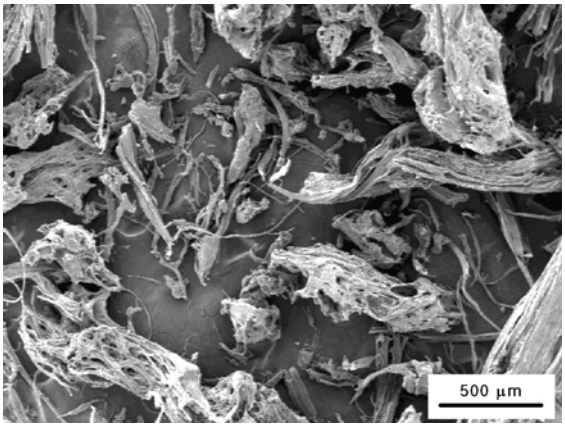
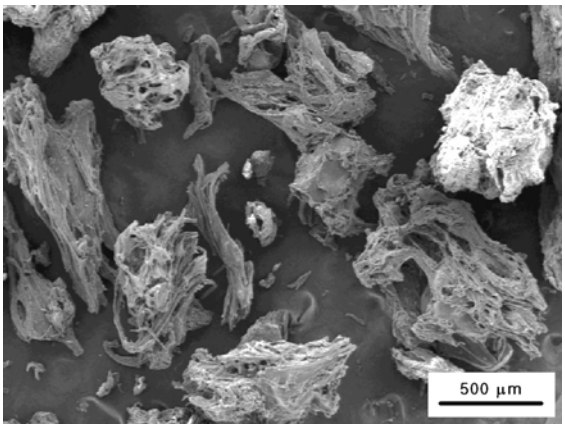


Figure 8. The effect of lysozyme concentration on PLGA-lysozyme particle size distribution.



5 wt%

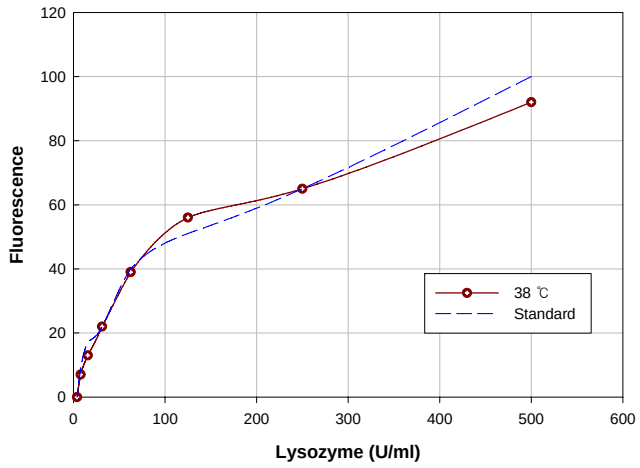


10 wt%

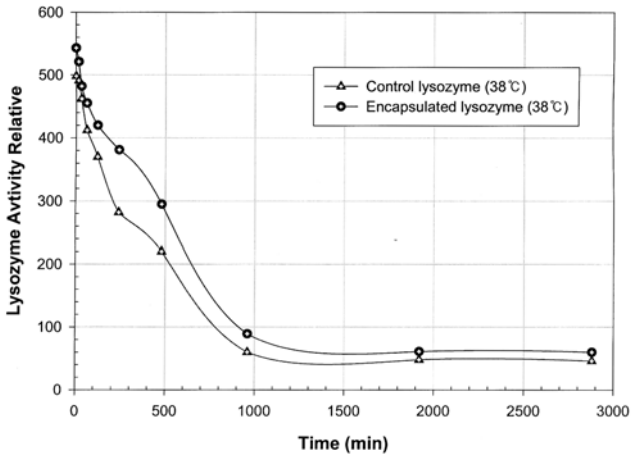
Figure 9. SEM photographs of PLGA-BSA particles at 38℃, 25 MPa, 0.83 wt% solutes (PLGA+BSA) in $scCO_2$, 0.06" nozzle diameter and 9 cm nozzle-valve distance.

하여 분절 현상이 적게 감소하였다. 초임계 이산화탄소에 의하여 가소화 (plasticized) 된 PLGA는 급격한 압력 강하로 재고형화 되면서 입자화 된다. 그러나 함께 혼합되어 있지만 초임계 이산화탄소에 용해되지 않는 라이소자임은 그대로 방출되면서 재고형화 되는 PLGA를 중간에서 분절시키는 역할을 수행하는 것으로 사료된다. 그러므로 라이소자임의 함량이 적은 샘플은 상대적으로 분절되는 가능성이 줄어들기 때문에 최종 생성된 입자들이 크고, 불규칙적인 섬유 형태로 나타나고 있다. 반면 라이소자임의 함량이 많을 때에는 초기 PLGA와 고르게 혼합되어 있을 확률도 높으며, 분사시 라이소자임의 영향으로 더욱 세밀하고 규칙적으로 분절되어 최종 입자 크기가 고르면서 작아지는 것으로 사료된다.

이러한 현상은 라이소자임 뿐 아니라 다른 단백질의 경우에도 마찬가지이며 PGSS법을 이용하여 BSA (Bovine Serum Albumin) 의 농도에 따른 PLGA와의 혼합체 제조 실험도 진행하였다. Figure 9의 SEM 사진에서 보듯이 전반적인 입자크기는 라이소자임을 사용한 경우에 비하여 크지만, BSA의 함량이 높은 샘플일 경우 역시 분절되는 현상이 강하게 생기는 것으로 관찰되었으며, 더욱 작은 입자 사이즈와 좁은 분포도를 보이고



(a)



(b)

Figure 10. PLGA particles encapsulating lysozyme, (a) protein activity at ambient condition. (b) protein activity on times.

있다. 초임계 이산화탄소에 의하여 가소화 된 후, 감압에 의하여 핵이 생성 되어 최종적으로 재고형화 되는 PLGA의 사이에서 BSA는 라이소자임과 마찬가지로 입자들을 고르게 잘라놓는 역할을 수행하게 되며, 그 농도가 높을수록 더욱 작고 둥근 형태의 입자들이 생성된다.

BSA는 라이소자임과 마찬가지로 입자들을 고르게 잘라놓는 역할을 수행하게 되며, 그 농도가 높을수록 더욱 작고 둥근 형태의 입자들이 생성된다.

Figure 10 (a)는 제조된 PLGA-라이소자임 복합체 내의 라이소자임의 활성화도를 그래프로 나타낸 것으로 표준 라이소자임과 비슷한 활성화도를 갖고 있는 것으로 보인다. Figure 10 (b)는 주위 온도가 37℃일 때 시간이 증가함에 따른 활성화 지속정도를 확인한 그래프이다. 각각 38℃에서 제조된 PLGA 입자와 PLGA-라이소자임 복합체를 사용하였으며 역시 유사한 활성화 지속정도를 가지고 있는 것으로 나타난다.

5. 결 론

1. 초임계 이산화탄소에 용해되지 않는 라이소자임은 그대로 방출되면서 재고형화 되는 PLGA 입자들 사이에서 분절현상을 발생시킨다고 사료된다. 전형적인 무정형 raw PLGA 입자들을 단백질을 함유한 조건과 함유하지 않은 조건에서 PGSS 공정실험을 하였다. 단백질을 함유하고 있지 않은 조건에서의 순수 PLGA 입자들의 경우에는 불규칙한 섬유 (fiber) 형태의 모양을 띄고 있다. 반면 단백질 라이소자임을 포함한 PLGA의 입자들은 상대적으로 규칙적이며 구형인 모습을 띄었다.

2. 제조된 입자 속에 라이소자임의 함량이 5 wt%에서 30 wt%로 높아질수록 입자 모양이 더욱 원형이 되고 잘 분절된다. 라이소자임의 함량이 많을 때에는 초기 PLGA와 고르게 혼합되어 있을 확률도 높으며, 분사시 라이소자임의 영향으로 더욱 세밀하고 규칙적으로 분절되어 최종 입자 크기가 고르면서 작아질 수 있다. 이러한 현상은 라이소자임뿐만 아니라 BSA (Bovine Serum Albumin)의 농도에 따른 PLGA와의 혼합체 제조 실험에서도 유사하게 나타났다.

3. PLGA-라이소자임 복합체에서의 샘플은 표준시료로 구입한 라이소자임과 비슷한 활성도를 갖고 있었으며, 입자로 제조된 이후 시간에 따른 활성 지속 정도도 비슷하였다.

즉, PLGA-라이소자임 복합체의 활성도는 공정 중에 변하거나 이상이 발생하지 않고 활성도를 지속 할 수 있음을 알 수 있다.

참고문헌

1. Pack, J. W., Kim, S. H., Park, S. Y., Lee, Y.-W., and Kim, Y. H., "Ring-opening polymerization of *L*-lactide and preparation of its microsphere in supercritical fluids," *Macromol. Biosci.*, **4**, 340-345 (2004).
2. Pack, J. W., Kim, S. H., Park, S. Y., Lee, Y.-W., and Kim, Y. H., "Effects of pressure and temperature on the kinetics of *L*-lactide polymerization in supercritical chlorodifluoromethane," *Macromol.*, **37,** 3564-3568 (2004).
3. Lee, Y.-W., "Design of particles using supercritical fluids," *HWAHAK KONGHAK*, **41**, 679 (2003).
4. Shekunov, B. Y. and York P., "Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design," *J. Crystal Growth*, **211**, 122-136 (2000).
5. Jung, J. and Perrut M., "Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey," *J. Supercrit. Fluids*, **20**, 179-219 (2001).
6. Fages, J., Lochard, H., Letourneau, J-J, Sauceau, M., and Rodier, E., "Particle generation for pharmaceutical applications using supercritical fluid technology," *Powder Technol.*, **141**, 219-226 (2004).
7. Matson D. W., Fulton, J. L., Petersen, R. C., and Smith, R. D., "Rapid expansion of supercritical fluid solutions: solute formation of powders, thin films, and fibers," *Ind. Eng. Chem.*

Res., **26**, 2298-2306 (1987).
8. Trk, M., Hils, P., Lietzow, R., and Schaber, K., "Stabilization of pharmaceutical substances by the Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS)," Proc. 6th Int. Symp. on Supercritical Fluids, Versailles, France, April 28-30, pp.1747-1752 (2003).
9. Kuwauk, X. and Debenedetti, P. G., "Mathematical modeling of aerosol formation by rapid expansion of supercritical solutions in a converging nozzle," *J. Aerosol Sci.*, **24**, 445-469 (1993).
10. Shaube, G. R., Brennecke, J. F., and McCready, M. J., "Radial Model for Particle Formation from the rapid expansion of supercritical solutions," *J. Supercrit. Fluids*, **8**, 318-328 (1995).
11. Reverchon, E. and Pallado, P., "Hydrodynamic modeling of the RESS process," *J. Supercrit. Fluids*, **9**, 216-221 (1996).
12. Reverchon, E., "Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nano-particles," *J. Supercrit. Fluids*, **15**, 1-21 (1999).
13. Tom, J. W. and Debenedetti, P. G., "Formation of bioerodible polymeric microspheres and microparticles by rapid expansion of supercritical solutions," *Biotechnol. Prog.*, **7**, 403-411 (1991).
14. Larson, K. A. and King, M. K., "Evaluation of supercritical fluid extraction in the pharmaceutical industry," *Biotechnol. Prog.*, **2**, 73-82(1986).
15. Ohgaki, K., Kobayashi, H., Katayama, T., and Hirokawa, N., "Whisker formation from jet of supercritical fluid solution," *J. Supercrit. Fluids*, **3**, 103-107 (1990).
16. Tom, J. W., Lim, G. B., Debenedetti, P. G., and Prudhomme, R. K., "Applications of supercritical fluids in the controlled release of drugs," ACS Symposium Series 514, American Chemical Society, Washington, DC, pp.238-257 (1993).
17. Whitaker, M. J., Howdle, S. M., and Shakesheff, K. M., "The production of protein-loaded microparticles by supercritical fluid enhanced mixing and spraying," *J. Contr. Rel.*, **101**, 85-92 (2005).
18. Hao, J., Whitaker, M. J., Wong, B., Serhatkulu, G., Shakesheff, K. M., and Howdle, S. M., "Plasticization and spraying of poly (*D,L*-lactic acid) using supercritical carbon dioxide: control of particle size," *J. Pharm. Sci.*, **93**, 1083-1089 (2004).
19. Michael, S. W., Howdle, S. M., and Shakesheff, K. M., "Incorporation of Proteins into Polymer Materials by a Novel Supercritical Fluid Processing Method," *Adv. Mater.*, **14**, 1802-1804 (2002).
20. Howdle, S. M. and Shakesheff, K. M., "Supercritical fluid mixing: preparation of thermally sensitive polymer composites containing bioactive materials," *Chem. Comm.*, 109-110 (2001).
21. Weidner, E., Petermann, M., and Knez, Z., "Multifunctional composites by high-pressure spray processes," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **7**, 385-390 (2003).
22. Kayrak, D., Akman, U., and Hortacsu, O., "Micronization of Ibuprofen by RESS," *J. Supercrit. Fluids*, **26**, 17-31 (2003).
23. Kappler, P., Petermann, M., and Weidner, E., "Size and morphology of particles generated by spraying polymer-melts with carbon dioxide," Proc. 6th Int. Symp. on Supercritical Fluids, vol. 3, Versailles, France, 2830 April, pp.1891-1896 (2003).
24. Blake, C. F., Koenig, D. F., Mair, G. A., North, A. T., Philips, D. C., and Sarma, V. R., "Structure of Hen Egg-White Lysozyme: A Three-dimensional Fourier Synthesis at 2 Resolution," *Nature*, **206**, 757761 (1965).
25. Wissinger, R. G. and Paulaitis, M. E., "Glass transitions in polymer/CO_2 mixtures at elevated pressures," *Pol. Sci. B*, **29**, 631-633 (1991).
26. Alessi, P., Cortesi, A., Kikic, I., and Vecchione, F., "Pasticization of polymers with supercritical carbon dioxide : Experimental determination of glass-transition temperatures," *J. Appl. Polym. Sci.*, **88**, 2189-2193 (2003).
27. Wang, W-C V., and Kramer, E. J., "Effects of high- pressure CO_2 on the glass transition temperature and mechanical properties of polystyrene," *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.*, **20**, 1371-1384 (1982).