

경구용 백신수송체용 GFP 함유 마이크로스피어의 제조 및 평가

장 혁 · 박종필 · 곽손혁 · 황성주[†] · 맹필재*

충남대학교 약학대학, *자연과학대 미생물학과

(2000년 9월 25일 접수)

Preparation and evaluation of GFP-containing microspheres for oral vaccine delivery system

Ge Jiang, Jong-Pil Park, Son-Hyok Kwak, Sung-Joo Hwang[†] and Pil-Jae Maeng*

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

*Department of Microbiology, College of Natural Science, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received September 25, 2000)

ABSTRACT—In order to design the oral vaccine delivery system, we prepared the alginate microspheres containing GFP (green fluorescent protein) as a model drug by spray method. To optimize the preparation conditions of microspheres, we investigated the effects of various parameters including nozzle pressure, nozzle opening angle, and concentrations of sodium alginate and calcium chloride. The prepared microspheres were evaluated by measuring their sizes, loading efficiency, and morphology. The particle size of microspheres was affected by the concentration of sodium alginate and calcium chloride, nozzle pressure, and nozzle opening angle. As the concentration of sodium alginate increased, GFP loading efficiency and particles size of microsphere also increased. However, it was observed to be difficult to spray the sodium alginate solution with concentration greater than 1.5% (w/v), due to high viscosity. The pressure over 3 kgf/cm² didn't affect the size of particles. As a result, the spraying method enabled us to prepare microspheres for oral vaccine delivery system. In this study, microspheres prepared with 1% (w/v) sodium alginate had greater loading efficiency and better spherical shape.

Keywords—Alginate microsphere, Oral vaccine, Spray method, GFP (green fluorescent protein),

현재 대부분의 백신은 주사로 투여되고 있다. 그 이유는 백신제제에 함유된 항원들은 입자이거나 분자량이 큰 펩타이드이기 때문에 특정 면역을 발현할 수 있는 부위로 잘 delivery되기 어렵기 때문이다. 이렇게 delivery가 잘 되지 않는 이유는 delivery되는 과정에서 자발적으로 분해가 되거나 효소적 분해 또는 흡수가 불량하기 때문이라고 보고되어 있다.^{1,2)} 또한 백신을 주사로 투여할 경우에는 체액성 면역 (humoral immunity)이 유도되는데 이렇게 유도된 항체들은 병원체의 주요 감염경로인 점막표면에 반드시 도달되지는 않는다. 이러한 점막에는 secretory IgA(sIgA)라는 항체 isotype이 존재하는데, 이 sIgA는 세균이나 바이러스 등이 점막에 부착하는 것을 방해하고, 숙주에 해로운 바이러스나 독소를 중화하는 역할을 한다. 이 점액성 면역(mucosal immunity)은 병원체의 침입시 면역학적으로 방어할 수 있는 최전선이며, 이와 같은 점액성 면역을 유도하기 위해서는 점막부위에 직접 항원을 투여해야한다.³⁾ 1995년에 백신을 10 μm

이하의 microsphere의 형태로 경구 투여할 경우 위장관에서 백신이 분해되거나 손상되지 않으면, Peyer's patch⁴⁾에 uptake 되어 점액성 면역을 유도할 수 있다는 사실이 보고되었다.^{5,6)} 경구용 백신 수송체를 개발하면 투여방법이 간편하여 시장성이 매우 증가하기 때문에, 기존의 백신을 경구용 제제로 개발하고자 하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있다.

이러한 장점으로 인하여 기존의 백신이나 새로운 백신을 경구용 백신으로 개발하고자 하는 연구가 미국, 영국을 비롯한 선진국에서는 활발히 진행되고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 국내에서도 경구용 백신 수송체를 개발하기 위한 연구를 활발하게 진행하고 있다.

백신으로 사용되는 항체는 제조과정 중에서 유기용매나 열에 의하여 활성을 잃을 수 있으므로, 봉입 효율이 높으면 Peyer's patch에 잘 uptake될 수 있는 microsphere형 백신 수송체의 제조방법을 개발하는 데는 많은 문제점이 있다. 더구나 백신은 주로 단백질로 되어 있어서, 일반 화학성분과는 달리 제조과정 중이나, 경구투여 후 흡수되는 과정에서 얼마나 titer가 잘 유지하는 지를 매번 확인하기 어렵다. 따라서, 예비 수송체 설계단계에서는 FITC¹¹⁾나 isotope¹²⁾ 등

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel: 042)821-5922, E-mail : sjhwang@cnu.ac.kr

으로 표지하여 model 항원으로 사용하고 있다. 그러나, 이들 model 항원은 손상을 받아도 흡광도나 radioactivity가 영향을 받지 않으므로 항원성을 정확하게 정량할 수 없다.

이 실험에서 사용된 녹색형광 단백질(GFP, green fluorescent protein)은 해파리가 만드는 단백질로서 자외선(λ_{max} 395 nm)을 받아 509-510 nm의 녹색 형광을 발산하는 분자량이 약 28,000 정도인 수용성 단백질이다. GFP를 model 항원으로 사용하는 이유는 정량하기가 용이하고, 제조 과정 중이나 위장관 내에서 구조가 파괴되어 손상을 받게 되면 형광을 나타내지 못하거나 흡수파장이 바뀌기 때문에 항원성을 정확하게 정량할 수 있으며, 분자량이 크기 때문에 봉입효율을 높일 수 있기 때문이다.¹³⁾ 또 한편 GFP를 model 항원으로 사용하여 경구용 백신수송체를 개발하고자 하는 연구는 아직 없었다. 그러므로 이 연구에서는 경구용 백신수송체를 개발하기 위한 연구의 일환으로 GFP를 model 항원으로 하여 입자크기가 10 μ m 이하인 경구용 microsphere의 제조 가능성을 알아보하고자 여러 가지 제조조건을 달리하여 제조된 microsphere의 크기, 모양 및 봉입효율을 평가하였다.

실험방법

시약 및 기기

사용된 시약은 알진산나트륨(Junsei Chemical Co. Ltd., Japan), 무수염화칼슘(Duksan Pure Chemical Co., Ltd. Korea), GFP(충남대학교 자연과학대학 미생물학과에서 공급 받음)을 사용하였다.

실험에 사용된 주된 기기로는 HS spray system (Koran), scanning electron microscope (ISI-SX-40, 주식회사 명석제작소, Japan), particle size analyser (Microtrac-X100, Microtrac®, Honeywell, USA), small high speed refrigerated centrifuge (Mega 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korean), fluorescent photometer (Jasco FP-750, Japan)를 사용하였다.

약물이 함유되지 않은 microsphere의 제조

제조과정 중에 항체에 손상을 줄 수 있는 유기용매나 열을 사용하지 않고 봉입 효율이 높으면서 Peyer's patch에 잘 uptake될 수 있는 10 μ m 이하의 microspheres형 백신수송체를 개발하기 위해 spray 방법을 사용하였다. Spray 방법은 1% 알진산 나트륨 용액 19 ml를 자석교반기로 일정한 속도로 교반 중인 염화칼슘용액 80 ml에 spray하여 microsphere를 제조하였다. 제조된 microsphere를 분리한 다음 에탄올로 세척하여 상온에서 건조하였다. 이러한 제조방법은 염화칼슘

용액 중의 Ca^{2+} 와 alginate 분자간의 상호작용으로 alginate 분자들이 가교되어 hydrogel을 형성하는 원리를 이용하였다.³⁾ 또한, 10 μ m 이하의 microsphere형 백신 수송체의 제조 최적조건을 얻기 위해서 microsphere의 특성에 영향을 줄 것으로 예상되는 조건들을 변화시키면서 아래와 같은 실험을 행하였다.

Nozzle의 압력 - Nozzle opening각도를 135도로 고정시킨 조건에서 nozzle의 분사압력을 각각 1, 2, 3 및 4 kgf/cm²로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

CaCl₂의 농도 - Nozzle pressure 3 kgf/cm²와 nozzle opening 각도를 135도로 고정시킨 조건에서 염화칼슘용액의 농도를 각각 3%, 5% 및 7%로 변화시키면서 microsphere를 제조하였다.

Nozzle opening 각도 - Nozzle pressure를 3 kgf/cm²로 고정시킨 조건에서 spray하는 nozzle의 opening 각도를 각각 90, 135 및 180도로 변화시키면서 microsphere를 제조하였으며, 제조조건을 Table I에 나타내었다.

GFP 함유 microspheres의 제조

앞의 실험을 통하여 최적의 nozzle 압력(kgf/cm²), 염화칼슘 농도 그리고 nozzle opening 각도를 각각 찾아내고 GFP를 model 항원으로 사용하여 알진산나트륨 농도를 변화시키면서 Table II와 같은 제조 조건으로 microsphere를 제조하였다. 제조방법은 1% 알진산나트륨용액 19 ml를 취하여 GFP (3.4 mg/ml) 1 ml와 혼합한 용액을 spray상으로 하였다. 500 ml beaker에 5% 염화칼슘용액 80 ml를 가지고 동시에 자석교반기로 일정한 속도로 교반하면서 spray 상을 spray하

Table I-Process Conditions of Microspheres Prepared with Sodium Alginate by Spray Method. Nineteen milliliters of 1% Sodium Alginate and 80 ml of Calcium Chloride Solution were Used In Each Batch

Sample	Nozzle pressure (kgf/cm ²)	Concentration of CaCl ₂ (%)	Nozzle opening angle
1-SAL	1	5	135°
2-SAL	2	5	135°
3-SAL	3	5	135°
4-SAL	4	5	135°
5-SAL	3	3	135°
6-SAL	3	5	135°
7-SAL	3	7	135°
8-SAL	3	5	90°
9-SAL	3	5	135°
10-SAL	3	5	180°

Table II—Process Conditions of GFP-containing Microspheres Prepared with Sodium Alginate by Spray Method

Sample	Concentration & volume of sodium alginate	GFP (3.4 mg/ml)	5%CaCl ₂	Nozzle opening angle	Nozzle pressure (kgf/cm ²)	Total volume
1-SAL0.5%	0.5%, 19 ml	1 ml	80 ml	90°	3	100 ml
2-SAL1.0%	1.0%, 19 ml	1 ml	80 ml	90°	3	100 ml
3-SAL1.5%	1.5%, 19 ml	1 ml	80 ml	90°	3	100 ml

여 microsphere를 제조하였다. 제조된 microsphere를 에탄올로 세척한 후 상온에서 건조하였다.

GFP 함유 microspheres의 입자크기측정

제조된 GFP 함유 microsphere를 5% 염화칼슘용액 일정량에 현탁시켜 particle size analyser를 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 분석결과는 number mean diameter (NMD)와 표준편차로 나타내었다.

GFP 함유 microspheres의 봉입효율측정

제조된 GFP 함유 microsphere의 현탁액을 3500 rpm에서 약 15 min간 원심분리하여 상층용액을 형광광도기로 excitation 파장 488 nm, emission 파장 510 nm에서 intensity를 측정하였다. 봉입효율(A)의 계산방법은 아래 식으로 계산한다. 여기서 C_S는 제조된 GFP 함유 microsphere 현탁액의 상층액 농도이고, 표준액은 3.4 mg/ml 농도의 GFP용액 1 ml를 5% CaCl₂ 100 ml에 희석한 용액(C_{ST}=34 µg/ml)을 사용하였다.

$$A(\%) = \frac{C_{ST} - C_S}{C_{ST}} \times 100$$

GFP 함유 microsphere의 morphology

입자의 morphology와 표면 구조를 검토하기 위하여 제조된 GFP 함유 microsphere를 주사형 전자 현미경으로 관찰하였다. 시료를 금 증착기(IB-3 ion coater)에 넣고 진공도 0.15 torr 및 고전압(800-1500V, 8 mM)하에서 5분간 순금으로 입자 표면을 피복하여 촬영용 시료로 하였다. 이 후 시료를 주사형 전자 현미경 본체 내에 고정시키고 15 kV에서 적당한 배율로 입자표면을 관찰하였다.

결과 및 고찰

Microspheres 제조

이 연구에서는 microsphere 크기를 최소로 하는 제조 조건을 얻기 위해서 nozzle pressure, 염화칼슘 농도 그리고 nozzle opening 각도를 각각 변화시키면서 microspheres를

제조하였다. 제조된 microspheres는 particle size analyser를 이용하여 입자 크기를 분석하고 그래프로 나타내어 필요한 크기의 microspheres의 제조 조건을 얻어냈다.

Figure 1에서 보는 바와 같이 nozzle의 압력이 1, 2, 3와 4 kgf/cm²로 변화되면 제조한 microspheres의 NMD는 각각 11.3±0.569, 10.03±0.786, 7.12±0.456, 7.34±0.653 µm로 나타났다. 즉, 압력이 3 kgf/cm²일 때 입자 크기가 가장 작았으며, 압력이 증가할수록 입자크기가 작아졌지만 3 kgf/cm²부터 매 1 kgf/cm²씩 증가시켰을 때 입자크기가 더 이상 작아지지 않고 거의 일정하였다.

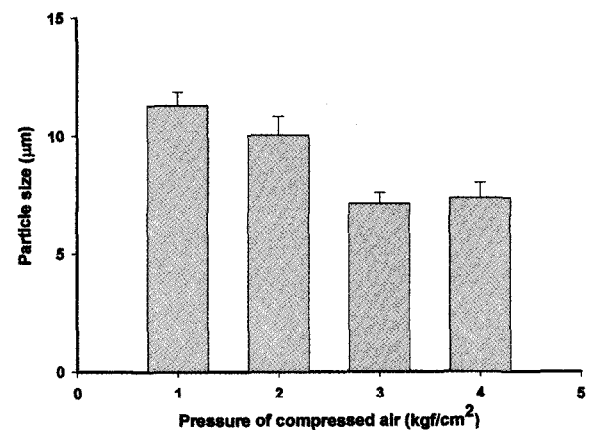


Figure 1—Influence of nozzle pressure on the size of microspheres (n=3, mean ± S.D.).

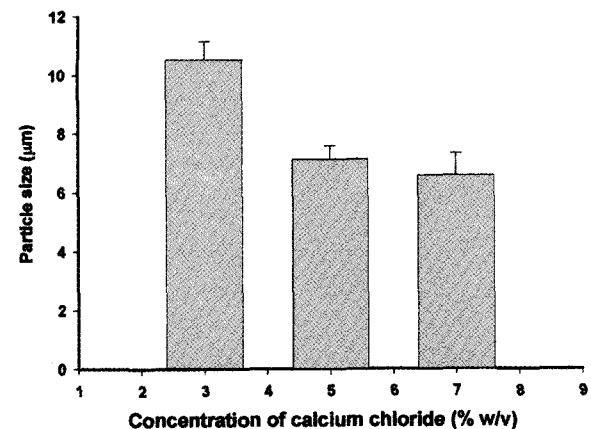


Figure 2—Influence of concentration of calcium chloride on the size of microspheres (n=3, mean ± S.D.).

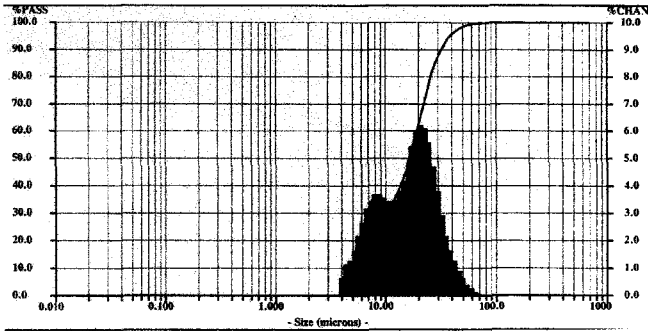


Figure 3—Particle size distribution on the volume basis of microspheres prepared with 8% (w/v) calcium chloride by using spray method.

Figure 2에서 보는 바와 같이 염화칼슘의 농도를 각각 3, 5 및 7%로 변화시키면서 제조한 microspheres의 NMD는 각각 10.53 ± 0.623 , 7.12 ± 0.456 과 $6.56 \pm 0.763 \mu\text{m}$ 로 나타났다. Figure 3에서는 8% 염화칼슘의 농도가 이용하여 제조된 입자 분포를 나타냈다. 이러한 결과를 보면 염화칼슘의 농도가 증가할수록 입자크기가 감소했지만 염화칼슘의 농도가 7% 이상에서는 응집된 microspheres가 많이 존재하였다. 여기서 입자 분포 곡선이 binodal 형태를 나타내는 것으로도 확인할 수 있었다. 또한 제조과정 중에 사용되는 3, 5 및 7% 염화칼슘용액에 GFP를 용해시켜 형광광도기로 emission 스펙트럼을 확인해본 결과 스펙트럼의 피크(510 nm)가 변하지 않는 것으로 보아 이 조건에서 GFP가 변성되지 않음을 알 수 있었다.

Figure 4에서 보는 바와 같이 nozzle opening 각도를 90, 135, 180도로 변화시키면서 제조한 microspheres의 NMD는 각각 6.17 ± 0.478 , 7.12 ± 0.456 $9.56 \pm 0.679 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 즉, nozzle opening 각도가 증가할수록 입자크기가 증가하였다.

따라서 본 실험조건에서는 nozzle의 압력은 3 kgf/cm^2 , 염

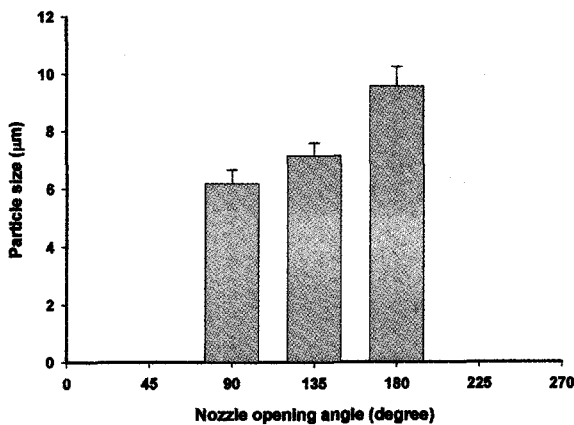


Figure 4—Influence of nozzle opening angle on the size of microspheres (n=3, mean ± S.D.).

화칼슘의 농도는 5%로 그리고 nozzle opening 각도는 90도를 최적의 제조 조건으로 선택하여 GFP 함유 microspheres를 제조하였다.

GFP 함유 microspheres의 평가

GFP 함유 microspheres의 크기 - GFP 함유 microspheres는 spray 방법을 이용하여 제조하였다. 제조된 microspheres의 현탁액을 일정량을 취하여 particle size analyzer를 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 알진산나트륨의 농도를 각각 0.5, 1, 1.5%로 제조된 GFP 함유 microspheres의 NMD는 각각 7.23 ± 0.563 , 8.16 ± 0.469 및 $9.45 \pm 0.356 \mu\text{m}$ 로 나타났다(Figure 5). 즉, 알진산나트륨의 농도가 증가할수록 입자 크기가 증가했지만 알진산나트륨의 농도가 1.5% 이상이면 알진산 나트륨용액의 점도가 높아져 spray 하기가 어렵고 입자크기는 $10 \mu\text{m}$ 보다 큰 입자도 상당수 있음을 알 수 있었다.

GFP 함유 Microspheres의 봉입율 - 제조된 GFP 함유 microspheres의 현탁액을 3500 rpm으로 약 15 min간 원심분리하여 분리된 상층액을 일정량을 취하여 그 즉시 형광광도기로 파장 Ex 488 nm, Em 510 nm에서 intensity를 측정하여 계산한 결과 Figure 6과 같았다. Figure 6에서는 보면 알진산나트륨의 농도가 0.5, 1.0 및 1.5%일 때 봉입효율은 $61.9 \pm 0.51\%$, $71.0 \pm 0.47\%$ 및 $81.3 \pm 0.65\%$ 로서 알진산나트륨의 농도가 0.5% 증가할 때마다 GFP의 봉입효율은 약 10%씩 증가하는 양상을 나타내었다. 또한, 건조된 microsphere 5 mg을 10 mM 구연산나트륨용액 100 ml에 가하여 1시간 동안 교반하여 microsphere를 녹인 다음 형광광도기로 스펙트럼을 관찰한 결과 피크(510 nm)의 모양이 변하지 않음을 확인할 수 있었으므로, 이 제조방법은 GFP가 변성되지 않는 안정한 방법이라고 생각된다.

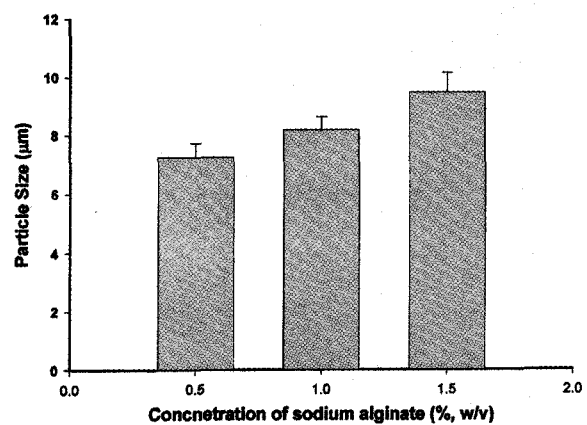


Figure 5—Influence of the concentration of sodium alginate on the size of microspheres (n=3, mean ± S.D.).

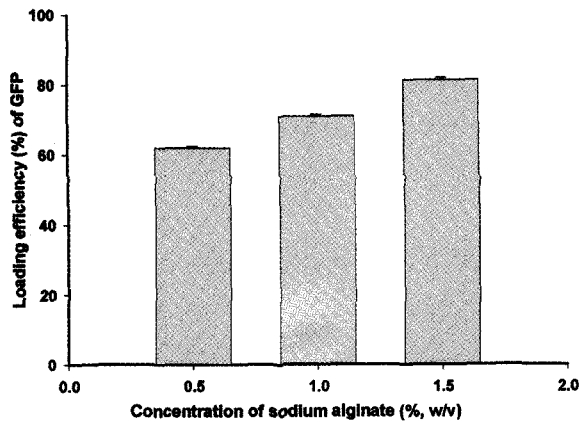


Figure 6-Influence of the concentration of sodium alginate on the loading efficiency of GFP in the microspheres (n=3, mean \pm S.D.).

GFP 함유 microspheres의 morphology - 1% 알진산나트륨을 사용하여 제조된 GFP 함유 microspheres를 주사형 전자 현미경으로 관찰하였다. Figure 7의 상단 사진은 3000배로 확대한 사진인데 형태는 약간 구형이고 입자크기는 약 10 μm 로 크기가 큰 microspheres의 사진이다. 아래 그림은 7000배 확대 사진인데 형태는 전자보다 sphericity가 더 좋고 크기는 약 3.0 μm 로 가장 작다. 따라서 본 실험에서 제조한 microspheres의 크기 범위는 약 3 μm ~10 μm 정도이었다. 결과적으로 이러한 spraying 방법을 이용하면 입자크기가 작고 봉입율이 높은 균일한 구형의 microspheres를 제조할 수 있다고 생각한다.

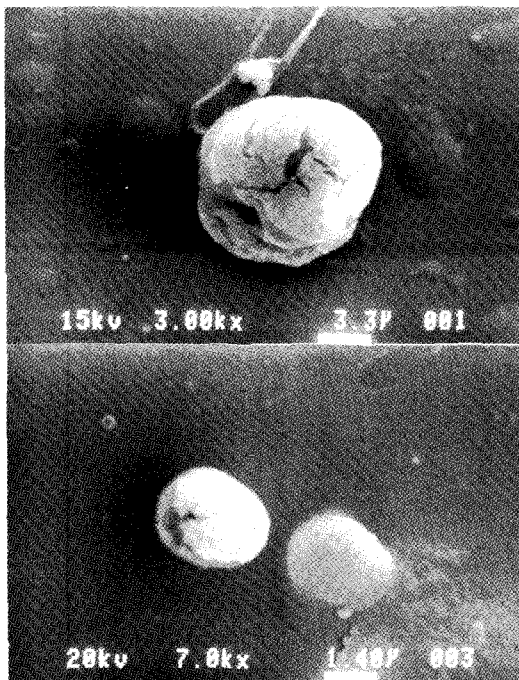


Figure 7-SEM of sodium alginate microsphere containing GFP.

결론

Spray method를 이용한 알진산나트륨 microspheres 제조의 최적조건을 얻기 위해서 본 연구에서는 nozzle의 압력, 염화칼슘의 농도 그리고 nozzle opening 각도를 변화시키면서 실험을 하였다. 그 중에서 최적 조건을 선택하여 GFP 함유된 microsphere를 제조하여 그에 대한 입자크기와 봉입율을 측정하고 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 경구용 백신수송체용 microspheres의 제조에 있어서 본 연구에서 사용한 spray method를 이용하면 유기용매를 사용하지 않고 microspheres를 제조할 수 있다
2. 알진산 나트륨농도를 1% (w/v)로 하였을 때 입자의 모양은 구형이었으며 입자크기의 범위는 3-10 μm 이었고, 봉입효율이 70% 이상으로 비교적 양호하였다.
3. 이 연구에서 사용한 방법은 GFP와 같은 단백질의 microsphere 제조용으로 안정한 방법이라 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음에 감사드립니다.

문헌

- 1) C. A. Gilligan and A. Li Wan Po, Oral vaccines : design and delivery, *Int. J. Pharm.*, **75**, 1-24 (1991).
- 2) C. A. Gilligan and A. Li Wan Po, Oral enteric vaccine-clinical trials, *J. Clin. Pharm.*, **16**, 309-335 (1991).
- 3) T. L. Bowersock, H. HogenEsch, M. Suckow, R. E. Porter, R. Jackson, H. Park and K. Park, Oral vaccination with alginate microsphere systems, *J. Control. Rel.*, **39**, 209-220, (1996).
- 4) F. L. Owen, N. F. Pierce, R. T. Apple and W. C. Cray, Jr., M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches : a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration, *J. Infect. Dis.*, **153**, 1108-1110 (1986).
- 5) M. R. Neutra, P. J. Giannasca, A. Frey, F. Zhou and K.T. Giannasca, Transport of antigens and microorganisms by M cell, *Proceedings of Mucosal Immunity : New Strategies for Protection Against Viral and Bacterial Pathogens, Keystone, CO, Jan 16-23, JI-002 232* (1995).
- 6) M. A. Jepson, N. L. Simmons, D. T. O'Hagan and B. H. Hirst, Comparison of poly (DL-lactide-co-glycolide) and polystyrene microsphere targeting to intestinal M-cells, *J. Drug Targeting*, **1**, 245-259 (1993).
- 7) P. G. Jenkins, K. A. Howard, N. W. Blackhall, N. W. Thomas and D. T. O'Hagan, Microparticle absorption from the rat

- intestine, *J. Control. Rel.*, **29**, 339-350 (1994).
- 8) J. Holmgren and C. Czerkinsky, Cholera as a model for research on mucosal immunity and development of vaccines, *Curr. Opin. Immunol.*, **4**, 387-391 (1992).
- 9) M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. Amidon and R. J. Levy, Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size, *Pharm. Res.*, **13**, 1838-1845 (1996).
- 10) S. M. Michalek, N. K. Childers, J. Katz, M. Dertzbaugh, S. Zhang, M. W. Russell, F. L. Macrina, S. Jackson and J. Mestecky, Liposomes and conjugate vaccines for antigen delivery and induction of mucosal immune responses, *Advan. Exp. Med. Biol.*, **327**, 191-198 (1992).
- 11) A. R. Brown, D. W. George and D. K. Matteson, Vaccinator device for delivering propellant-driven aerosols of streptococcus suis bacterin into the respiratory tracts of swine, *Vaccine*, **15**, 1165-1173 (1997).
- 12) P. Y. Kuo, J. K. Sherwood and W. M. Saltzman, Topical antibody delivery systems produce sustained levels in mucosal tissue and blood, *Nature Biotechnology*, **16**, 163-167 (1998).
- 13) F. G. Prendergast, and K. G. Mann, Chemical and physical of Aequin and the green fluorescent protein isolated from *Aequoea forskalea*, *Biochemistry*, **17**, 3448-3455 (1978).