

## 용액분산촉진 초임계 공정을 이용한 라이소자임 나노 입자의 제조 및 그 특성

김동현 · 박희준 · 강선호 · 전승욱 · 김민수 · 이시범 · 박정숙 · 황성주<sup>†</sup>

충남대학교 약학대학

(2005년 2월 5일 접수 · 2005년 3월 4일 승인)

### Preparation and Characterization of Lysozyme Nanoparticles using Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluid (SEDS) Process

Dong Hyun Kim, Hee Jun Park, Sun Ho Kang, Seoung Wook Jun, Min-Soo Kim, Sibeum Lee, Jeong-Sook Park and Sung-Joo Hwang<sup>†</sup>

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

(Received February 5, 2005 · Accepted March 4, 2005)

**ABSTRACT** – The micron or nano-sized lysozyme as a model protein drug was prepared using solution enhanced dispersion by supercritical fluid (SEDS) process at various conditions (e.g., solvent, temperature and pressure) to investigate the feasibility of pulmonary protein drug delivery. The lysozyme particles prepared were characterized by laser diffraction particle size analyzer, scanning electron microscopy (SEM) and powder X-ray diffractometry (PXRD). The biological activity of lysozyme particles after/before SEDS process was also examined. Lysozyme was precipitated as spherical particles. The precipitated particles consisted of 100 – 200 nm particles. Particle size showed the precipitates to be agglomerates with primary particles of size 1 – 5  $\mu\text{m}$ . The biological activity varied between 38 and 98% depending on the experimental conditions. There was no significant difference between untreated lysozyme and lysozyme after SEDS process in PXRD analysis. Therefore, the SEDS process could be a novel method to prepare micron or nano-sized lysozyme particles, with minimal loss of biological activity, for the pulmonary delivery of protein drug.

**Key words** – Supercritical fluid, Solution enhanced dispersion by supercritical fluid (SEDS), Lysozyme, Nanoparticle, Pulmonary delivery

경계 투여는 경구 투여보다 약물의 효과 발현이 신속하고, 주사를 맞는 고통을 덜어주는 등 여러 방면에서 장점을 가진다. 또한 경구나 주사로 투여하기 어려운 약물의 대안적인 흡수경로로 생각할 수 있다.<sup>1)</sup> 일반적으로 단백질이나 펩타이드 같이 분자량이 크고 3차원 구조를 갖는 약물은 위장관이나 피부로 전달하여 흡수시키기 어렵다. 단백질 약물을 경구로 투여하는 경우에는 위산과 단백 분해효소 등에 의해 단백질의 활성이 소실 될 수 있으므로 이에 대한 방어기전을 갖추어야 한다. 또한 방어기전을 갖추었다 하더라도 단백질은 위장관 막으로 흡수되기가 쉽지 않다. 그러나 폐의 경우에는 세포막이 얇기 때문에 흡수가 용이하다.<sup>2)</sup> 폐를 통한 약물 수송의 효율을 높이기 위해서는 1 – 5  $\mu\text{m}$  사이의 질량 기준 공기 역학 직경(mass mean aerodynamic diameter, MMAD)과 좁은 입자 크기 분포의 미세입자가 요구되어 진다.<sup>3)</sup> 이보다 더 작은 입자는 다시 날숨으로 나올 수 있고

반면에 이보다 더 큰 입자는 기도나 기관지에 걸려 폐포까지 전달되기 어려운 경우가 많다.<sup>4)</sup> 이런 크기 분포를 가지는 입자를 만들기 위한 많은 시도가 있었다.

그러나 흔히 사용되는 분쇄 공정인 분무건조법(spray drying method), 분쇄법(milling method), 제트 분쇄법(jet mill), 동결 건조 등은 입자가 변성되거나 넓은 입자 크기 분포를 가지게 되며, 구형의 입자를 얻기 어렵고 안정성에 문제를 가지는 등 여러 가지 한계점을 가진다.<sup>5)</sup> 따라서 이번 연구의 목적은 이런 문제점들에 대한 대안으로써 초임계 이산화탄소를 이용하여 경계 투여에 적합한 라이소자임 나노입자를 제조하는 것이다.

초임계 유체란 “임계 온도와 임계 압력 이상에서 있는 유체”로서, 다른 용매와는 달리 초임계 유체만의 독특한 성질을 지니는데 액체와 유사한 용매력, 기체와 유사한 확산력을 가진다. 또한 임계점 부근에서의 온도 및 압력의 작은 변화에도 유체의 밀도와 용매력에 큰 변화를 야기함으로써 간편한 공정상의 이점이 있다. 초임계 유체로서 이산화탄소가 가장 흔히 사용되는데 이는 이산화탄소가 무독성, 불연성, 산 가

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)821-5922, E-mail : sjhwang@cnu.ac.kr

겨, 적당한 임계 온도(31.1°C) 및 임계 압력(73 bar)을 가지고 있기 때문이다. 특히 잔존용매가 전혀 남지 않기 때문에 의약품, 향료, 식품공업등에서 많은 연구가 이루어지고 있다.<sup>6)</sup>

나노 입자를 제조하는 초임계 유체기술에는 초임계 유체를 용매로 사용하는가 또는 역용매로 사용하는가에 따라서 여러 가지 방법이 있다. 그 중 하나인 초임계 급속팽창법(rapid expansion of supercritical solution, RESS)은 나노 입자로 만들기를 원하는 용질을 초임계 유체에 용해 시킨 후 미세한 노즐을 통해 급속히 팽창시키면 초임계 유체가 기체 상태로 되는 과정에서 용질이 용해력을 잃게 되고 빠른 시간 내에 과포화 되어 용해된 용질이 석출되는 현상을 이용한 것이다. 이는 미세한 입자를 얻기 위한 매우 효과적인 방법이나 RESS법은 단백질이 이산화탄소에 용해도가 낮기 때문에 적용상의 한계점이 있다. 다른 한 방법은 나노 입자로 제조할 용질이 초임계 유체에 대한 용해도가 매우 낮을 경우에는 용질을 적절할 용매에 녹인 후 이를 역용매인 초임계 유체와 혼합 함으로서 용매의 용해력을 급격히 저하시켜 용액중의 용질을 석출시키는 원리를 이용한 공정이다. 이를 초임계 역용매 침전법(supercritical anti-solvent precipitation, SAS)이라고 한다. 이 연구에서는 SAS법 중의 일종인 용액분산촉진 초임계 (solution enhanced dispersion by supercritical fluid, SEDS)공정을 이용하였는데 이 기술은 coaxial nozzle을 통해 단백질 용액과 이산화 탄소를 침출조(vessel) 속으로 동시에 주입하는 것이다. 이는 단백질 용액과 이산화 탄소를 동시에 분사, 혼합해 주기 때문에 빠른 과포화와 입자 핵 형성으로 인한 미세하고 빠른 입자형성의 장점이 있다.<sup>7,9)</sup>

모델 단백질 약물로 라이소자임을 사용하였으며, 라이소자임은 어떤 종의 세균을 완전히 또는 급속히 용해하는 물질이고 이는 난백, 동물조직, 비점막, 침, 위액, 눈물, 유즙 등에 함유되어 있으며 침입세균으로부터 생체를 보호한다. 세균의 세포벽에 있는 다당류중의 N-아세틸무람산(N-acetylmuramic acid, NAM)과 N-아세틸글루코사민(N-acetylglucosamine, NAG) 사이의 β-1,4-글리코시드 결합을 가수분해하여 용균작용을 한다.<sup>10,11)</sup>

이 연구에서는 SEDS법을 이용하여 폐 흡입형 제제에 적합한 라이소자임 입자를 제조 할 수 있는가를 알아보았으며 온도, 압력, 용매조성과 같은 공정변수가 생성된 입자의 크기 및 구형성에 미치는 영향에 대하여 연구하였다.

**실험 방법**

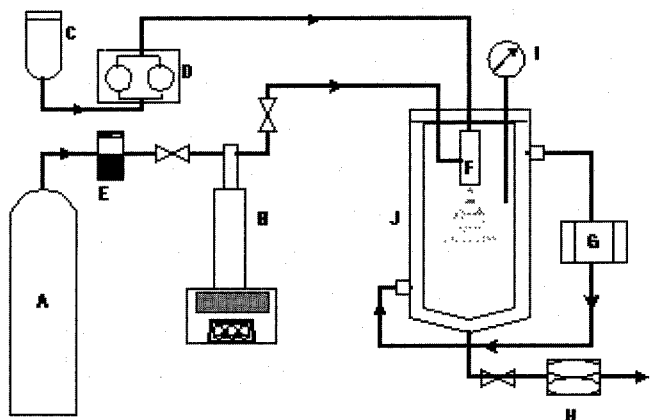
**시약 및 기기**

모델 단백질 약물로 사용한 lyophilized lysozyme from

chicken egg white와 단백질 활성연구를 위한 *Micrococcus lysodeikicus*는 Sigma (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. 용매로 사용한 dimethylsulfoxide (DMSO), 에탄올, 메탄올은 모두 Junsei Chemical Co., Ltd. (일본)로부터 구입하였다. 역용매로 99.9% 이상의 순도를 갖는 액체 이산화탄소는 한미가스(한국)에서 구입하였다. 기기로는 전자현미경(SEM; XL30SFEG, Philips, 네덜란드), 레이저 회절 입도 분석기(HELOS/RODOS, Sympatec GmbH, 독일), UV/VIS spectrophotometer(UV MINI-1240, Shimadzu, 일본), X-ray 회절 분석기(Model D/MAX-2200 Ultima/PC, Rigaku, 일본) 등을 사용하였다.

**실험장치 및 입자의 제조**

본 실험에 사용된 초임계 장치는 SEDS<sup>12)</sup> 방식의 장치를 사용하였으며 Figure 1에 간략히 실험장치의 구조를 나타내었다. 장치는 크게 세 부분으로 약물 입자를 얻기 위한 침출조(Particle formation vessel), 이산화탄소를 이송시키는 syringe pump, 단백질 용액을 이송시키는 HPLC pump로 구성된다. 이 이송 장치들은 침출조의 상층에 부착된 coaxial nozzle과 연결되며 액체 이산화탄소는 냉각기(cooler)를 지나면서 냉각·압축되어 지고 syringe pump를 통해 침출조내로 압축되어진다. 침출조의 온도는 순환식 항온조를 사용하여 원하는 공정 온도의 ±0.1°C 범위 내로 일정하게 유지되었다. 원하는 온도와 압력상태의 초임계 상태가 되면 이산화탄소와 라이소자임 용액을 일정한 속도로 coaxial nozzle을 통해 침출조내로 분사한다. 용액 주입시 침출조 내부의 압력은 BPR (back pressure regulator)에 의해 일정하게 유지되었다. 공정 조건과 용액 조성을 Table I에 나타내었다. 모든



**Figure 1**—Schematic diagram of the laboratory apparatus for SEDS process. (A: CO<sub>2</sub> storage tank, B: CO<sub>2</sub> pump, C: Drug solution, D: HPLC pump, E: CO<sub>2</sub> cooler, F: Nozzle, G: Heat circulator, H: Back pressure regulator, I: Pressure gage, J: Particle formation vessel)

**Table I—Experimental Conditions during SEDS Process, with  $D_{50\%}^a$  and Biological Activity (BA. %).**

Samples	Press (Bar)	Temp. (°C)	Solvent	$D_{50\%}^a$ (μm)	BA (%) (±S.D, n=3)
Raw Lysozyme				50.09	100
Lys 1	150	40	DMSO	1.62	86 ± 3.5
Lys 2	120	40	DMSO	2.10	81 ± 5.3
Lys 3	100	40	DMSO	2.27	59 ± 3.7
Lys 4	120	40	DMSO + EtOH	3.42	38 ± 0.5
Lys 5	120	40	DMSO + MeOH	4.17	94 ± 3.6
Lys 6	120	33	DMSO	4.11	98 ± 0.9
Lys 7	120	45	DMSO	1.93	64 ± 3.8

<sup>a</sup> $D_{50\%}$ : 50% of particles undersized

조건에서 이산화탄소 및 단백질 용액의 주입속도는 각각 30과 2.5 ml/min로 동일하게 하였다. 약물 용액 주입 후 침출조에 남아있는 잔류 용매를 제거하기 위하여 일정한 온도와 압력을 유지한 상태에서 침출조 용적의 20배에 해당하는 이산화탄소를 공급하였고 잔류 용매를 제거한 후, 침출조 압력을 대기압으로 서서히 감압한 후 입자를 포집하였다. 포집된 입자는 -18°C 냉동 보관하였다.

**전자현미경 관찰**

제조된 입자는 전자현미경을 사용하여 외형과 표면상태를 관찰하였다. 시료는 양면테이프를 붙인 금속판 위에 흘날리듯이 뿌려 고정시키고, 금 증착기를 사용하여 아르곤기체 상태에서 1분 30초간 백금 코팅을 실시하였다. 코팅이 끝난 시료는 전자현미경에 안착시키고 10 kV의 전압하에서 배율을 조절한 후 관찰하였다.

**레이저 회절 입도 분석기를 이용한 라이소자임 입자의 입도 분석**

입자의 크기 및 분포는 레이저 회절 원리를 이용한 레이저 회절 입도 분석기를 사용하였다.

분산 방식은 건식 유동기류분산 식을 사용하였고 분산압력은 5.5 bar로 동일하게 하였다. 광원은 He-Ne laser tube를 사용하였고 55%의 feed rate로 약 10초간 측정하였다.

**라이소자임의 생물학적 활성 측정**

라이소자임의 활성은 Verhamme 등<sup>14)</sup>이 보고한 방법에 따라 라이소자임의 용균작용에 의해 나타나는 세균 세포벽의 N-아세틸글루코사민과 N-아세틸무라믹산 사이의 β-1,4-글리코시드 결합의 가수분해 정도를 측정하여 평가하였다. 세균 회석액은 0.05 M pH 7.2 인산 완충액 100 ml에 *Micrococcus lysodeikicus* 20 mg를 넣어 제조하였고 라이소자임용액은 0.05 M pH 7.2 완충액 10 ml에 각 조건 하에서 생성된 라

이소자임 3 mg을 넣어 제조하였다. Cuvette에 세균 회석액 2 ml와 라이소자임용액 20 μl를 넣은 후 완충액을 가해 초기 흡광도 0.8 ± 0.010로 맞춘 후 UV/VIS spectrophotometer를 이용하여 450 nm에서 5분 동안 걸쳐 감소된 흡광도를 측정하여 용균 속도를 산출하였다. 각 실험조건에서 제조된 라이소자임과 초임계 공정을 거치지 않은 라이소자임의 흡광도 감소치를 비교 평가하였다.

**X선 회절분석기를 이용한 라이소자임 결정성 분석**

X선을 주사하여 일어나는 회절 현상을 이용하여 결정 구조를 분석하는 장비인 X-ray 회절 분석기를 사용하여 SEDS 공정 전후 라이소자임 입자의 결정성을 비교 분석하였다.

시료들은 5~60° angle zoom 범위에서 40 kV 및 45 mA로 측정하였다.

**결과 및 고찰**

**전자현미경**

원료물질 라이소자임과 라이소자임을 SEDS 공정으로 제조한 나노입자의 전자현미경 사진을 Figure 2에 나타내었다. Figure 2에서 보는 바와 같이 SEDS공정 전과 후의 라이소자임 입자는 그 입자의 크기나 형태에서 큰 차이점을 보인다. 처리전의 라이소자임 원료물질의 입자크기는 수십 마이크로 미터임에 비하여 SEDS 공정으로 제조된 라이소자임 입자는 모두 수십 내지 수백 나노 미터 크기로 크게 줄어든 것을 알 수 있고 입자의 모양도 구형성이 증가된 것을 관찰할 수 있다.

**분체상의 입자 크기 분포**

Table I과 Figure 3 및 4에 레이저 회절 입도 분석의 결과를 나타내었다. 이 세 결과를 보면 SEDS공정을 거친 라이소자임은 흡입형 제제에 적당한 입자 크기를 나타냄을 알

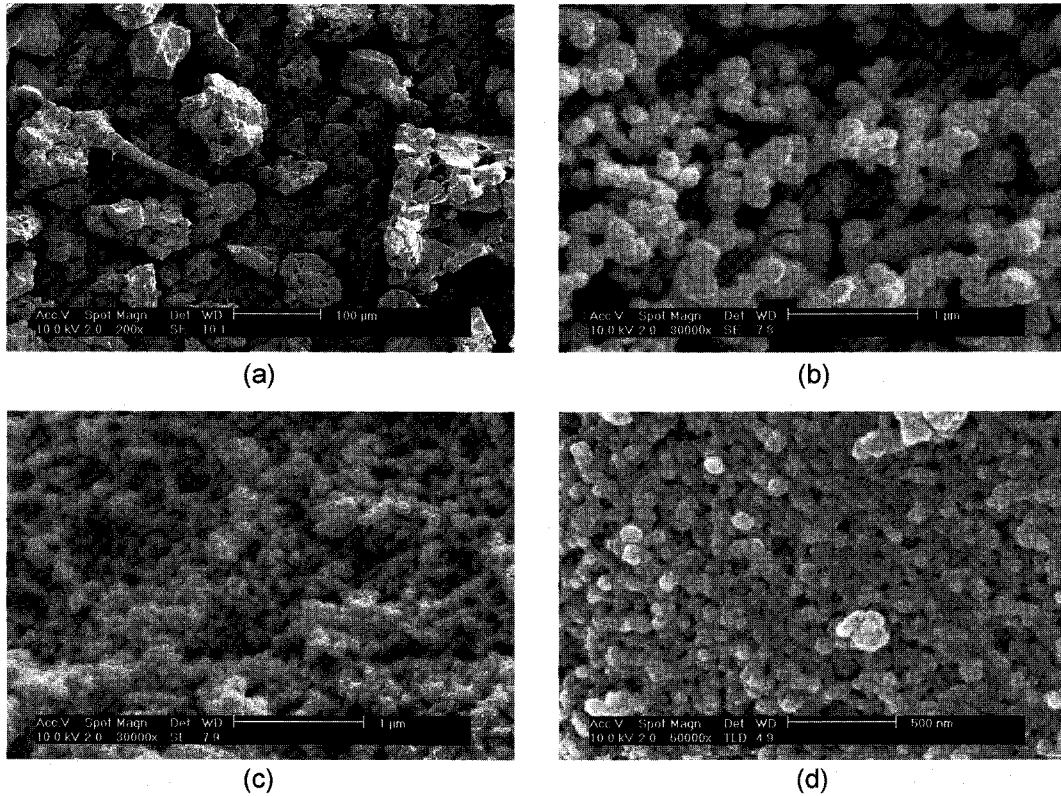


Figure 2—SEM photomicrographs of lysozyme before/after SEDS process; (a) raw lysozyme; (b) 120 bars, 40°C and DMSO; (c) 120 bars 40°C and DMSO/MeOH; (d) 120 bars, 35°C and DMSO.

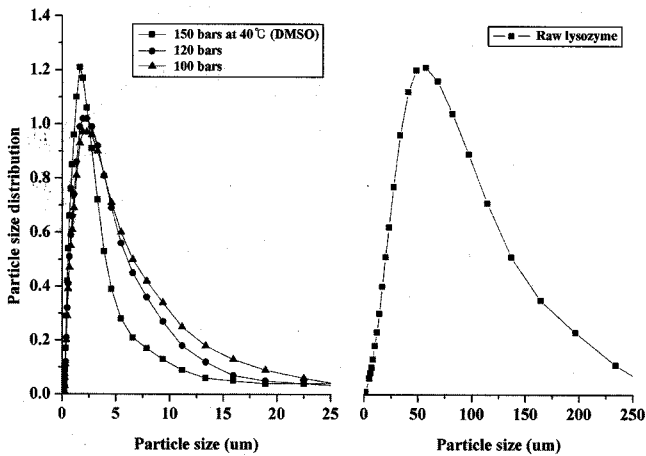


Figure 3—Particle size distribution of lysozyme after/before SEDS process at different pressure.

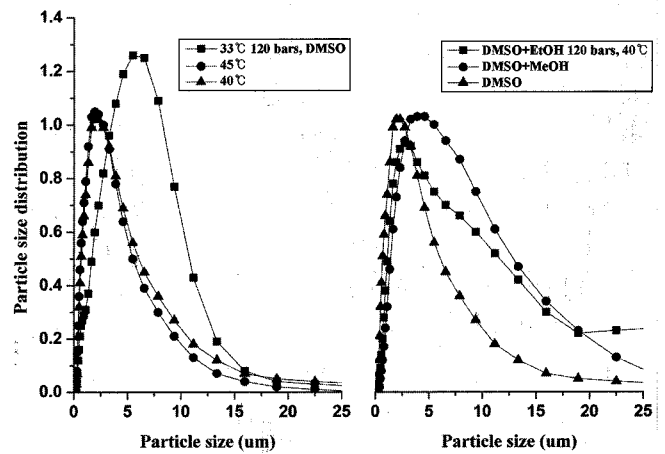


Figure 4—Particle size distribution of lysozyme precipitated from different solvents (left) and at different temperature (right).

수 있다. 흥미로운 점은 전자현미경 사진에서는 SEDS공정을 거친 입자는 나노 단위의 입자크기를 나타내는데 반해 레이저 회절 입도 분석의 결과는 마이크로 단위의 입자크기를 보인다는 점이다. 이는 기존의 연구 결과에서도 보고되었다.<sup>15)</sup> 즉 각각의 나노 입자가 서로 응집되어 흡입형 제

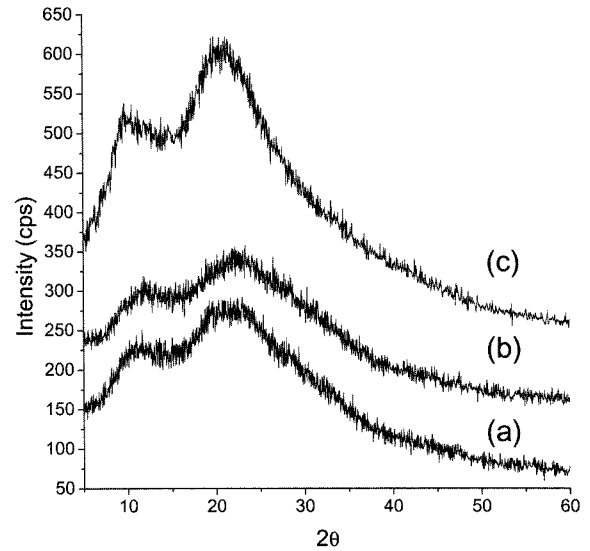
체에 적합한 크기(1–5 μm)의 입자가 생성된다. 폐포 표면에 도달한 마이크로 입자는 본래의 나노 입자로 분리됨으로써 보다 흡수가 용이해지고 이로 인하여 높은 치료효율을 나타낼 것으로 예상되어 진다.

조건에 따른 입자 변화양상을 보면 우선 압력변화에 따라

응집정도가 달라짐을 알 수 있었다. 시료 Lys 1, Lys 2 및 Lys 3의 레이저 회절 입도 분석 결과(Table I)를 보면 높은 압력의 SEDS공정에서 생성된 입자의  $D_{50\%}$ 가 더 작은 것을 볼 수 있다. 높은 압력 조건이 낮은 압력 조건보다 입자사이의 응집이 적게 일어난다는 것을 의미한다. 이는 압력이 증가하면 초임계 이산화탄소에 대한 용매의 용해도가 커져서 coaxial nozzle을 통해 용액을 분사 시킬 때 용질의 과포화 속도가 증가하므로 입자끼리 서로 응집하는 기회가 줄어들었기 때문이라 생각된다.<sup>16)</sup> 온도가 입자의 특성에 미치는 영향을 살펴보면 (Lys 2, Lys 6 및 Lys 7) 온도가 높아질수록  $D_{50\%}$ 가 더 작아짐을 볼 수 있다. 이것은 압력변화의 영향에 따른 입자크기 결과와 같이 온도가 높을수록 과포화도가 커지면서 분사 시 더 미세한 입자를 얻을 수 있고 초임계 이산화탄소의 빠른 용매확산 속도로 인해 입자의 핵 형성 속도가 빨라지고 그 결과 입자끼리 서로 응집하는 기회를 줄이기 때문이라고 생각되어 진다.<sup>17)</sup> 용매가 입자의 특성에 미치는 영향을 보면 Lys 2, Lys 4 및 Lys 5에서 보는 바와 같이 DMSO 단일용매, DMSO+EtOH, DMSO+MeOH 순으로 입자의 응집정도가 커짐을 알 수 있다. Lys 2 (DMSO 단일용매)의  $D_{50\%}$ 는  $2.10 \mu\text{m}$ 임에 반해 Lys 4 (DMSO+EtOH)의  $D_{50\%}$ 는  $3.42 \mu\text{m}$ , Lys 5 (DMSO+MeOH)의  $D_{50\%}$ 는  $5.63 \mu\text{m}$ 으로 DMSO 단일용매를 사용할 경우 가장 응집정도가 적었다. 에탄올과 메탄올 혼합용매의 사용은 입자생성시 입자간의 응집기회가 많아지게 하는 것으로 보인다. 혼합용매의 비율을 조절하면 입자 응집정도를 조절 할 수 있을 것이라고 생각된다.

**단백질 약물의 안정성**

일반적으로 단백질 약물은 제조과정 중에 활성이 소실 될 우려가 높으므로 안정성 평가를 위하여 단백질 활성 실험을 수행하였다. 단백질 약물인 라이소자임의 활성 실험 결과를 Table I에 나타내었다. 초임계 공정처리를 하지않은 라이소자임 원료물질의 활성을 기준(100%)으로 하여 압력, 온도, 용매변화에 따라 각 조건에서의 상대적인 활성도를 나타내었다. 압력변수에 따른 활성변화를 보면 압력이 높을수록 활성도가 높다는 것을 알 수 있다. 고압일수록 초임계 이산화탄소의 확산계수가 커지므로 용매인 DMSO내로 더 빠르게 침투할 수 있다. 확산정도가 충분하지 못하다면 초임계 이산화탄소에 대한 유기용매의 분산정도는 시간에 의존적일 수밖에 없다. 그래서 낮은 압력상태에서와 높은 압력상태를 비교하면 낮은 압력에서는 상대적으로 입자가 DMSO-rich phase에서 침전이 일어나기 때문에 단백질 변성정도가 더 클 것으로 생각된다.<sup>18)</sup> 단백질은 DMSO에 노출 시 단백질이



**Figure 5**—Powder X-ray diffraction pattern of lysozyme before/after SEDS process. (a) raw lysozyme, (b) at 40°C, 120 bars, and (c) at 45°C, 120 bars, DMSO.

차구조의 변이가 일어나기 때문이다.<sup>19)</sup> 이와 같은 이유 때문에 고압조건에서 단백질 활성이 더 좋은 결과를 나타내었다고 생각된다. 온도변수에 대한 단백질 활성을 살펴보면 온도가 높을수록 활성이 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이는 단백질이 열에 노출 시 변성이 일어나기 때문일 것으로 생각된다.<sup>20)</sup> 이와 같은 이유로 낮은 온도조건이 활성면에서 더 유리하다고 할 수 있다. 용매의 변화도 역시 활성에 영향을 주었다.<sup>21)</sup> DMSO와 에탄올의 혼합용매 사용은 38%의 낮은 활성을 나타냄에 반해 DMSO와 메탄올의 사용은 98%을 나타내 라이소자임 원료물질의 활성과 거의 유사함을 알 수 있었다. 이는 DMSO와 메탄올의 혼합 용매 사용시 초임계 이산화탄소와의 혼화성이 좋아져 잔류용매를 제거하기 위한 washing의 효율성을 높여 잔류 DMSO양을 최소화 하기 때문인 것으로 생각된다.

**X-ray 회절**

SEDS 공정을 거치지 않은 라이소자임과 SEDS공정을 거친 라이소자임의 PXRD결과를 Figure 5에 나타내었다. 두 경우 모두 완전한 무정형을 나타낸다. 이로서 SEDS 공정은 라이소자임의 결정성에 변화를 가져오지 않는다는 것을 알 수 있었다.

**결 론**

단백질의 흡입형 제제 개발 가능성을 알아보기 위하여 SEDS법을 사용하여 라이소자임을 미세입자로 제조하였다.

그 후 여러 방법의 분석을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

SEDS법으로 제조된 라이소자임 입자는 SEDS법으로 처리하지 않은 라이소자임에 비해 정상, 입자크기가 크게 변화한 것을 알 수 있었고 전자현미경과 레이저 회절 입도 분석 결과를 토대로 고찰해 보면, 나노 입자가 응집하여 흡입형 제제에 적합한 크기를 나타내었으며 그 응집 정도는 공정 변수(압력, 온도, 용매)에 따라 다른 것을 관찰할 수 있었다. 또한 공정 중의 안정성 시험 결과를 토대로 고찰해 보면, 단백질 활성은 높은 압력, 낮은 온도, DMSO와 메탄올의 혼합 용매의 조건에서 양호한 활성을 나타내었다. 라이소자임의 결정성은 SEDS처리 전후 모두 부정형임을 관찰할 수 있었다. 결론적으로 초임계 SEDS 공정은 라이소자임과 같은 단백질 약물을 흡입형 제제에 적합한 나노입자로 제형화 할 수 있다는 가능성을 시사한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 지역대학우수과학자지원연구사업(과제번호:R05-2003-000-10085-0)과 한국과학기술기획평가원 국가지정연구실사업(과제번호:M1-0302-00-0016)의 연구비 지원에 의해 이루어졌으므로 이에 감사 드립니다.

### 문헌

- 1) P.L. Smith, Peptide delivery via the pulmonary route: A valid approach for local systemic delivery, *J. Controlled Rel.*, **46**, 99-106 (1997).
- 2) A.J. Hickey, D.C. Thompson, Physiology of the airways: In A.J. Hickey, editor. *Pharmaceutical inhalation Aerosol Technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 61-82 (1992).
- 3) R.F. Service, Drug delivery takes a deep breath, *Science*, **277**, 1199-1200 (1997).
- 4) Gonda, Targeting by deposition: In AJ Hickey, editor, *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, Marcel Dekker, New York, pp. 1-27 (1992).
- 5) M.A. Winter, B.L. Knutson, P.G. Debenedetti and H.G. Sparks, Precipitation of protein in supercritical carbon dioxide, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 586-594 (1996).
- 6) B. Subramaniam, R.A. Rajewski and K. Snavely, Pharmaceutical processing with supercritical carbon Dioxide, *J. Pharm. Sci.*, **86**(8), 885-890 (1997).
- 7) J. Jung, M. Perrut, Particle Design using Supercritical Fluids: Literature and Patent Survey, *J. Supercrit. Fluids*, **20**, 179-219 (2001).
- 8) S. Yeo, G. Lim, P.G. Debenedetti, and H. Bernstein, Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent, *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 341-346 (1993).
- 9) M.H. Hanna, P. York, Method and apparatus for the formulation of particles using a supercritical fluid, *European Patent*, Patent No **706421B1** (1998).
- 10) K. Doring, P. Porsch, A. Mahn, O. Brinkmann, W. Gieffers, The non-enzymatic microbicidal activity of lysozyme, *FEBS Lett.*, **449**, 93-100 (1999).
- 11) H.R. Ibrahim, On the novel catalytically-independent antimicrobial function of hen egg-white lysozyme, *Nahrung*, **42**, 187-193 (1998).
- 12) M. Hanna, P. York, Method and apparatus for the formation of particles, Patent WO **95/01221** (1994).
- 13) H.K. Chan, A. Clark, I. Gonda, M. Mumenthaler, and C. Hsu, Spray dried powders and powder blends of recombinant human deoxyribonuclease for aerosol delivery, *Pharm. Res.*, **14**, 431-437 (1997).
- 14) D. Verhamme, J. Storck, L. Racchelli and A. Lauwers, Lysozyme(N-acetylmuramyl  $\beta$ (1-4) glycanohydrolase EC 3.2.1.17), *Int. J. Pharm.*, **2**, 168-171 (1988).
- 15) R. Thiering, F. Dehghani, A. Dillow, and N.R. Foster, The influence of operating condition on the dense gas precipitation of model proteins, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **75**, 12-24 (2000).
- 16) R.T. Bustani, H.K. Chan, F. Dehghani and N.R. Foster, Generation of micro-particles of proteins for aerosol delivery using high pressure modified carbon dioxide, *Pharm. Res.*, **17**, 1360-1366 (2000).
- 17) M.B. King, A. Mubarak, J.D. Kim, and T.R. Bott, The mutual solubilities of water with supercritical and liquid carbon dioxide, *J. Supercrit. Fluids*, **5**, 296-302 (1992).
- 18) E. Reverchon, A. Di Trollo, and S. Pace, Supercritical antisolvent precipitation of nanoparticles of superconductor precursors, *Ind. Eng. Chem. Res.*, **37**, 952-958 (1998).
- 19) M. Jackson, H.H. Mantsch, Beware of protein in DMSO, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1078**, 231-235 (1991).
- 20) D.A. Cowan, Protein stability at high temperatures, *Essays Biochem.*, **29**, 193-207 (1995).
- 21) D.P. Nesta, J.S. Elliott, and J.P. Warr, Supercritical fluid precipitation of recombinant human immunoglobulin from aqueous solution, *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 457-464 (2000).