약제학회지(2001), 제 31 권 제 3 호
J. Kor. Pharm. Sci., Vol. 31, No. 3, 191-196 (2001)

폴리락티드-글리콜리드 마이크로스피어에 봉입된 단백질의 항원성 평가

송세현 · 조성완 · 신택환 · 윤미경 · 최영욱†
중앙대학교 약학대학
(2001년 8월 21일 접수)

Antigenicity of Protein Entrapped in Poly(lactide-co-glycolide) Microspheres

Seh Hyon Song, Seong Wan Cho, Taek Hwan Shin, Mi Kyoung Yoon and Young Wook Choi†
College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea
(Received August 21, 2001)

ABSTRACT–Biodegradable polymeric microspheres were studied for their usefulness as carriers for the delivery of vaccine antigens. However, protein antigen could be denatured during microencapsulation processes due to the exposure to the organic phase and stress condition of cavitation and shear force. Therefore this study was carried out to re-evaluate the degree of protein denaturation during microencapsulation with poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) copolymer. PLGA microspheres containing ovalbumin (OVA), prepared by W/O/W multiple emulsification method, were suspended in pH 7.4 PBS and incubated with shaking at 37.5°C. Drug released medium was collected periodically and analyzed for protein contents by micro-BCA protein assay. In order to evaluate the protein integrity, release medium was subjected to the analyses of SDS-PAGE and size exclusion chromatography (SEC). And enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was introduced to measure the immunoreactivity of entrapped OVA and to get an insight into the three-dimensional structure of epitope. The structures of entrapped protein were not affected significantly by the results of SDS-PAGE and SEC. However, immunoreactivity of released antigen was varied, revealing the possibility of protein denaturation in some microspheres when it was evaluate by ELISA method. Therefore, in order to express the degree of protein denaturation, antigenicity ratio (AR) was obtained as follows: amount of immunoreactivity of OVA/total amount of OVA released × 100(%). ELISA method was an efficient tool to detect a protein denaturation during microencapsulation and the comparison of AR values resulted in more accurate evaluation for immunoreactivity of entrapped protein.

Keywords–OVA, PLGA microsphere, Protein denaturation, SDS-PAGE, SEC, ELISA, Antigenicity ratio

폴리락티드-글리콜리드(PLGA) 마이크로스피어는 항원을 미립자내에 봉입함으로써 단백질의 안전성을 향상시킬 수 있고, 방출을 제어 할 수 있으며, 마이크로스피어 자체가 adjuvant로 작용하여 면역 증강 효과를 나타낼 수 있는 장점 때문에 많은 단백성 약물이나 항원의 전달 시스템에 있어서 널리 연구되어져 왔다.[1,2]

PLGA 고분자를 사용하여 항원을 봉입시키는 방법으로는 상유도물질을 사용하여 coacervate를 형성함으로써 제조하는 상분리법(phase separation), 고분자와 항원이 혼화된 용액을 급속하게 분무하여 신속히 건조하여 제조하는 분무건조법(spray drying), 다중유제를 제조한 후 유기용매를 증발시킴으로써 제조하는 용매증발법(solvent evaporation) 그리고, 유기용매를 추출함으로써 더 신속하게 제조할 수 있는 용매추출법(solvent extraction) 등이 있는데,[1] 이중 w/o/w 다중유화법이 널리 사용되고 있다. 그러나, w/o/w 다중유화법으로 항원을 PLGA 고분자에 봉입하는 동안 항원은 cavitation, 열, 유기용매 또는 전단력 등의 환경에 노출되기 때문에 안전성에 영향을 받을 수 있다.[3-5] 특히 제조과정 중 1차유제를 만드는 과정에서 유기용매와의 접촉이 가장 큰 문제점으로 보고되고 있다.[6,7] 유기용매가 단백질 불안정화에 기여하는 원인을 보면, 우선 물과 섞이는 유기용매의 경우 이 유기용매와 단백약물이 든 수상이 만나게되면 유기용매가 수상으로 이동하여 수상의 이온 강도가 변화하게되며 이로 인해 단백질의 소수성 부분이 노출되어 단백질에 유기용매가 결합하게 된다.[8] 이로 인해 물에 녹아있던 단백질은 난용성이 되어 침전하게 된다.[9] 물에 잘 섞이지 않는 유기용매의 경우 유화과정으로 인해 수상 속의 단백질과 유상이 만나게 되면 두 물질간의 소수성 상호작용이 생성되게 되고 이 상호작용으로 인해 단백질 분자가 수상-유상의 계면에서 열리게 되고 퍼지게 되는 구조적 변화가 일어나 변성과 단백질 침전이 일어나, 생리활성 및 면역활성을 잃게 된다.[5] 이러한

† 본논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)820-5609, e-mail : ywchoi@cau.ac.kr

봉입된 단백질의 변성여부평가에는 SDS-PAGE, size exclusion chromatography(SEC), isoelectric focusing(IEF), Circular dichroism(CD) 등이 이용되어 왔다.[10,11] 또한, ELISA를 이용하여 봉입된 항원의 변성을 측정하는 방법[12]과 봉입된 항원의 방출을 나타낼 때 ELISA를 이용하는 방법[13]이 보고되고 있다.

본 연구에서는 모델항원으로 OVA를 사용하여 다양한 종류의 PLGA 마이크로스피어를 제조하고 봉입된 단백질의 항원성을 평가하였다. 먼저 기존에 송 등[14]이 보고한 방법으로 10 μm 이하의 마이크로스피어를 제조하여 봉입된 항원의 안전성을 SDS-PAGE 및 size exclusion chromatography를 이용하여 평가하였으며,[11] 항원-항체반응인 ELISA를 이용하여 면역활성을 지닌 단백질을 정량적으로 평가할 수 있었기에 간략히 소개하고자 한다.

실험방법

재료 및 기기

고분자로는 50:50 PLGA(poly[D,L lactide-co-glycolide], M.W. 50-75 kDa, Aldrich, U.S.A.)와 75:25 PLGA(M.W. 75-120 kDa, Aldrich, U.S.A.)를, 모델약물로는 OVA (ovalbumin, chicken egg, grade V, Sigma, U.S.A.)를 사용하였다. 단백질 안정화제로는 PVP K-25(polyvinylpyrrolidone K-25, ISP, U.S.A.)와 PVA(poly[vinyl alcohol])를 고분자 용액의 계면활성화제로 Span 60(Junsei, Japan)을 사용하였다. Primary anti-ovalbumin으로서 monoclonal anti-chicken egg albumin(ovalbumin, mouse IgG1 isotype)을 Sigma (U.S.A.) 로부터 구입하였으며, HRP(horse radish peroxidase)-conjugated anti-mouse IgG는 Pierce(U.S.A.)에서 구입 사용하였고, 발색시약으로 tetramethylbenzidine(TMB)은 Bio-Rad(U.S.A.)로부터 구입하여 사용하였다. 기타 용매 및 시약은 모두 특급의 것을 구입하여 사용하였다. UV/VIS 흡광분석기는 Varian(Australia)을 사용하였고, 동결건조기로는 BETA-A(Martin Christ Co., Germany)를 사용하였다.

PLGA 마이크로스피어의 제조

마이크로스피어의 제조는 이미 보고[14-16]한 바 있는 W/O/W 다중 유화법과 solvent extraction 방법을 이용하였으며, 유기용매로서 디클로메탄 및 에칠아세테이트를 사용하여 아래와 같은 조건에서 실시하였다.

디클로로메탄을 이용한 미립자(MS-DCM)의 제조 – 모델항원인 OVA(30 mg/ml)와 단백질 안정화제로 2% PVP-K25를 함유하는 내부수상과 중간유상으로 고분자인 75:25 PLGA (60 mg/ml)를 함유하는 디클로로메탄 용액을 probe sonicator (Vibracell, Sonics & Materials, U.S.A.)를 이용하여 1차 유제를 형성시킨 후 5% IPA를 함유하는 수용액을 최외상으로 하여 이차유제(W/O/W)를 형성시킨 후 미립자를 고화시켜 제조하였다. 제조 중 sonication amplitude와 최외상 용적을 변화시켜 미립자의 입자도를 조절하였다. 또한 위의 방법으로 내부수상에 단백질 안정화제인 PVP-K25를 함유하지 않은 미립자를 제조하였다.

에칠아세테이트를 이용한 미립자(MS-EA)의 제조 – 모델항원인 OVA(30 mg/ml)와 단백질 안정화제로 2% PVA를 함유하는 내부수상을 제조한 후, 중간유상으로 에칠아세테이트 5 ml에 50:50 PLGA 300 mg을 가해 고분자용액을 제조한다. 제조된 내부수상 용액과 고분자 용액을 homogenizer(X-520D, CAT, Germany)를 이용하여 5분 동안 13,000 rpm으로 교반하여 W/O형의 1차 유제를 형성시킨 후 최외수상으로 5% IPA를 함유하는 수용액에 가하여 이차유제(W/O/W)를 형성시킨 후 미립자를 고화시켜 제조하였다. 또한 위의 방법으로 내부수상 제조 시 PVA를 함유하지 않은 미립자를 제조하였다.

OVA의 봉입률 측정

제조된 미립자 10 mg을 5% SDS를 함유한 0.1N-NaOH 용액 10 ml에 분산시켜서 미립자가 완전히 분해될 때까지 강하게 교반한 후 3000 rpm으로 5분간 원심분리 하여, 상징액 0.1 ml를 취해 micro-BCA assay kit(Pierce, U.S.A.)를 이용하여, OVA를 정량하였다.[14,15] 이로부터 다음의 식 (1)에 따라 미립자내의 봉입률을 산출하였다.

$$\text{Loading efficiency (\%)} = \frac{\text{actual protein loading (w/w\%)}}{\text{theoretical protein loading (w/w\%)}} \times 100 \quad (1)$$

방출실험

0.02% sodium azide를 함유한 pH 7.4 등장 인산완충액 4 ml에 40 mg의 미립자를 분산시킨 후 37°C shaking incubator에서 250 rpm으로 교반하여 OVA가 방출되도록 한다.[16] 정해진 시간간격마다 검체를 채취한 후, microcentrifuge에서 12,000 rpm로 10분간 원심분리해 그 상징액을 취해 방출된 OVA를 micro-BCA assay와 ELISA로 분석하였다.

ELISA를 이용한 단백질 정량 – 우선 OVA 일정량을 pH 7.4 TBS(tris buffered saline)에 녹인 후, TBS로 희석하여 OVA를 0.5~2 μg/ml의 농도로 함유한 표준액을 만든다. Microtiter plate(Immuno Plate U96 Polysorp., Nunc, U.S.A.)의 well에 이 액 50 μl를 넣고 4°C에서 밤새 보관한 후

TBST(Tris buffered saline containing 0.05% Tween 20)로 두 번 세척한 후 건조시키고, 1% BSA를 함유한 TBS를 200 μl를 가한 후 37°C에서 2시간 방치한 후 TBST로 plate를 두 번 세척한 다음 건조시킨다. 다음 1:100,000으로 희석된 anti-OVA 희석액을 50 μl 가하고 37°C에서 2시간 방치한 후 TBST로 plate를 세 번 세척한 다음 건조시키고, 1:2000으로 희석된 HRP-conjugated anti-mouse IgG를 50 μl 가한 후 37°C에서 1시간 방치한 후, TBST로 다섯 번 세척한 후 건조시킨다. 다음 TMB를 50 μl 가하고 실온에서 10분간 방치시킨 다음 2M H2SO4 50 μl를 가하고 실온에서 20분 방치한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선을 작성한다. 한편, 방출실험을 통해 얻어진 검체를 검량선 범위인 0.5~2 μg/ml의 농도로 희석한 후 위의 방법으로 표준액 대신 사용하여 흡광도를 측정하여 단백질양을 정량하였다.

미립자에 봉입된 단백질의 변성 측정

SDS-PAGE를 이용한 분석 – Sodium dodecyl sulfate-polyacryl amide gel electrophoresis(SDS-PAGE, Mini-Protein II, Bio-Rad, U.S.A.)는 단백질이 분자량의 차이에 따라 겔을 이동하는 거리가 다른 것을 이용한 분석법으로서, 방법은 다음과 같다. 먼저 separating gel solution(10%)을 제조하여 gel caster에 주입한 후 겔을 30~60분간 굳힌다. 그리고 stacking gel solution(5%)을 제조하여 gel caster에 주입한 후 즉시 sample-well comb을 gel caster에 꽂아 굳힌다. 겔이 굳은 후 80 μl의 표준 OVA용액과 시료용액을 20 μl의 sample buffer와 섞어 5분간 100°C에서 가열한 후 그중 20 μl를 gel well에 loading 하고 전기 영동 시킨다. 전기 영동이 끝난 다음 coomassie brilliant blue로 단백질 띠를 염색하고 그 위치를 비교하여 응집 및 분리여부를 평가하였다. 시료는 방출실험 중 3일까지 얻어진 검체를 이용하였다.[11,14]

SEC을 이용한 분석 – SEC는 칼럼 내에 일정한 크기의 pore를 지닌 충전물이 있어 시료물질의 분자크기에 따라 이동속도가 다른 것을 이용한 분석법으로서, 단백항원의 분해 및 응집을 평가할 수 있는 방법중 하나이다. 칼럼은 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 방출실험을 통해 3일까지 얻어진 검체를 분석하였다.[11,14]

결과 및 고찰

미립자의 물리적 특성

미립자는 제조시 유기용매로서 디클로로메탄을 사용하여 제조한 PLGA 마이크로스피어(MS-DCM)와 유기용매로서 에칠아세테이트를 사용하여 제조한 PLGA 마이크로스피어(MS-EA)로 크게 나뉜다. MS-DCM의 경우 10~20 μm의 평균 입자경과 60~65%의 봉입효율을 나타냈고, MS-EA의 경우 25~45 μm의 평균 입자경과 13~20%의 봉입효율을 나타내어, 기존에 보고[14]한 제제들과 유사한 특성을 지녔다.

단백변성 평가

SDS-PAGE – MS-DCM과 MS-EA의 방출실험으로 얻어진 검체들은 제조 전 OVA와 비교할 때 모두 같은 위치에서 밴드를 나타내었다(Figure 1). 이 결과로 MS-DCM과 MS-EA에 봉입된 OVA가 제조과정이나 방출과정에서 단백질의 분자량에 변화가 없는 것으로 평가되었다.

SEC – SEC를 통해 단백질을 분석시 단백질의 분자량에 따라 monomer의 이동속도가 가장 느리며 dimer, trimer, multimer의 순서로 이동속도가 빨라진다. 미립자의 봉입 단

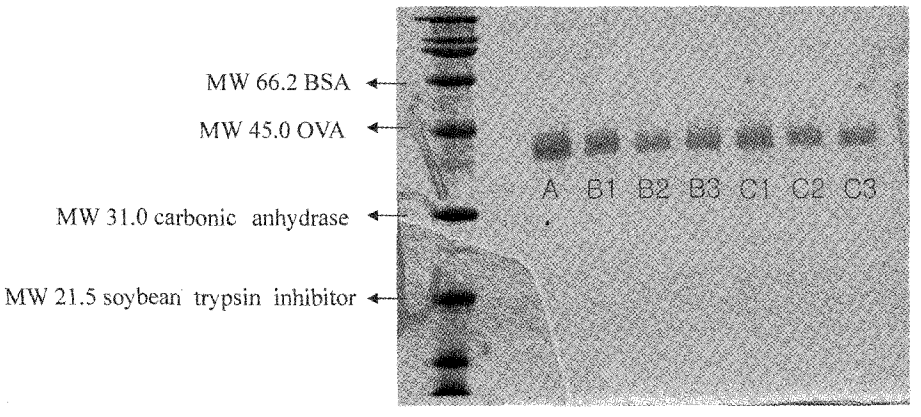

Figure 1–SDS-PAGE of native OVA(A), entrapped OVA in MS-EA(B) and entrapped OVA in MS-DCM(C). Numbers represent day(s) of drug release.

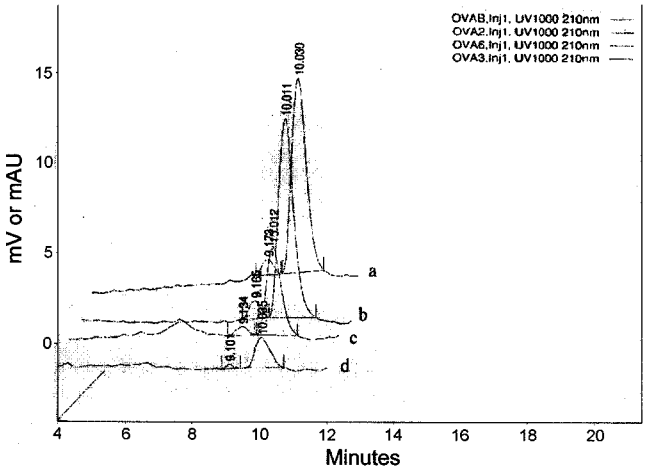

Figure 2–Size exclusion chromatograms of native OVA(a), entrapped OVA in MS-EA with stabilizer(b), entrapped OVA in MS-DCM with stabilizer(c) and entrapped OVA in MS-DCM without stabilizer(d).

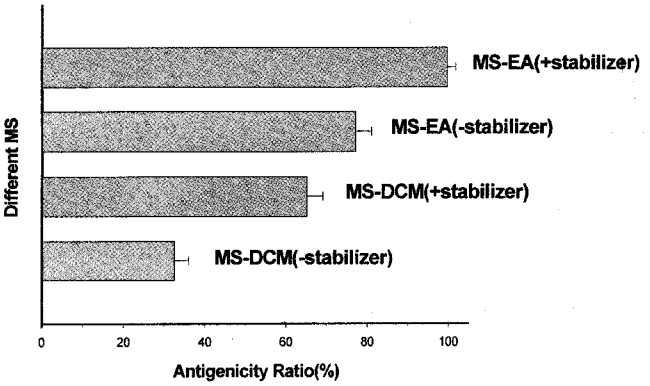

Figure 3–Effect of primary stabilizer on antigenicity ratio of entrapped OVA.

백질인 OVA의 경우, 제조전 OVA를 분석한 결과 dimer, monomer의 순서로 chromatogram에 나타났으며 지연시간(retention time)은 각각 약 9.1분과 약 10.0분이었다. 또한 dimer와 monomer의 chromatogram 면적비는 약 7:93이었다. 제조된 MS-DCM과 MS-EA의 방출실험으로 얻어진 검체를 분석하였을 때 모든 검체의 단백질의 지연시간은 dimer가 약 9.1분이었고 monomer가 약 10.0분으로 나타나 제조전 OVA의 지연시간과 같았으며 chromatogram상의 면적비도 동일하게 나타났다(Figure 2).

제조전 OVA와 비교 시 봉입된 단백질인 OVA에 응집(aggregation)이 일어나면 dimer의 면적비가 증가하고, 분해(cracking)가 일어나면 monomer의 면적비가 증가한다.[11] 그러나 미립자의 봉입된 OVA를 분석하였을 때, dimer와 monomer의 면적비가 변하지 않은 결과로 보아 단백질은 응집이나 분해가 없는 것으로 평가되었다.

미립자에 봉입된 단백질의 항원성 평가

미립자의 방출실험 시 얻어진 동일 검체에 대해 얻어진 두 값, 즉 micro-BCA assay를 통해 얻어진 값과 ELISA를 통해 얻어진 값을 다음의 식 (2)에 따라 봉입된 단백질의 항원성(AR)을 산출하였다.

$$\text{Antigenicity Ratio (AR, \%)} = \frac{\text{amount of immunoreactive OVA (μg/ml) by ELISA}}{\text{total amount of OVA released (μg/ml) by micro-BCA}} \times 100 \quad (2)$$

봉입된 단백질이 항원으로 이용될 경우 단백질의 항원성은 매우 중요하다. 특히 미립자로부터 방출되어 항원이 면역활성을 나타내지 않을 경우 생체내에서 항원에 대한 항체가 생성되지 않으리라 생각된다. 항원의 면역활성은 항체와 결합하는 항원의 epitope 부분이 크게 관여하는데 이 부분이 변성되었다면 항원은 생체내에서 그 역할을 다하지 못하게 된다. 따라서 OVA의 면역활성을 측정하여 AR 값을 얻었을 때 그 값이 100%이면 방출된 OVA 전부가 면역활성을 유지함을 의미한다.

AR값을 구하였을 때, SDS-PAGE나 SEC의 분석결과에서 분자량의 변화나 응집 및 분해가 없었던 것으로 나타난 단백질이 AR 값의 감소를 보였다. 특히 MS-EA보다 MS-DCM이, 안정화제가 첨가된 MS보다 첨가되지 않은 MS에서 더 많은 AR값의 감소가 나타났다(Figure 3). 이는 1차 유제 형성시 사용된 유기용매의 차이와 유화법의 차이에 기인한 것으로 생각된다. 특히 유기용매의 다른 극성도(에칠아세테이트 : 0.62, 디클로로메탄 : 0.39)에 기인한 소수성의 차이로 인해 단백질과의 상호작용이 달라지기 때문에 제조시 사용된 오일상의 유기용매에 의한 차이로 나타난 결과로 분자량이나 응집 같은 1 · 2차원적인 구조 변성보다는 epitope 부분의 3차원적인 구조가 변화하여 면역활성이 변화한 것으로 사료된다.

단백질이 항원으로 인체내에서 작용할 경우 면역활성을 나타내는 부분인 epitope 부분은 3차원적 구조를 이루고 있는데 그 구조는 hydrogen bond, hydrophobic force, salt bridge로 이루어져 있다. 따라서 단백질이 유기용매와 접촉 시 그 소수성으로 인해 단백질의 3차원적 구조를 이루고 있는 hydrophobic force에 작용하여 구조변화를 가져올 수 있다(Figure 4). 이러한 사실로 미루어 사용된 유기용매의 소수성이 증가할수록 단백질의 면역활성 소실에 증가가 일어난 것으로 생각된다.

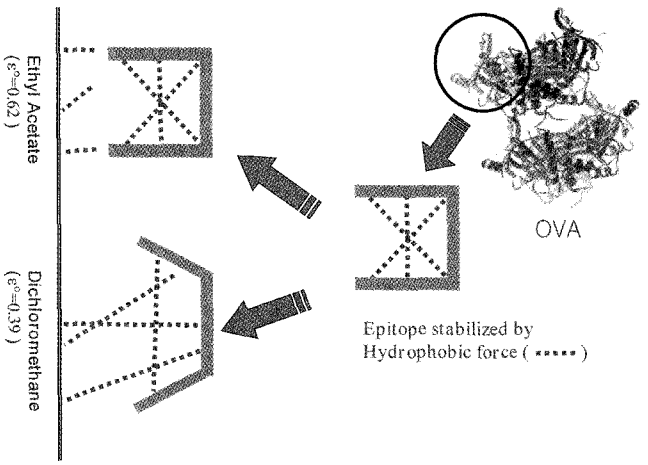

Figure 4–Schematic representation for the proposed mechanisms involved in immunoreactivity of entrapped OVA due to the polarity difference of the solvents used for microencapsulation.

항원성을 도입한 방출양상의 해석

기존의 문헌[17,18]들에서는 주로 micro-BCA assay를 이용하여 미립자의 방출을 측정하였는데 이 경우 면역활성을 나타내지 못하는 단백질까지도 정량하게 된다. 따라서 정량된 단백질은 모두 면역활성을 지니는 것으로 해석되어 *in vivo* 효과를 예상하기 때문에 *in vitro*에서의 방출 양상과 *in vivo* 에서의 양상이 예상한 것과 다르게 나타날 수 있는 한계가 있었다. 본 연구에서는 변성되지 않고 면역활성을 나타내는 단백질만을 정량할 수 있는 ELISA 방법을 이용하여 방출양상을 측정하고 이를 micro-BCA assay를 이용한 방출양상과 비교함으로서 그 방법상 타당성을 살펴보고 단백질의 변성

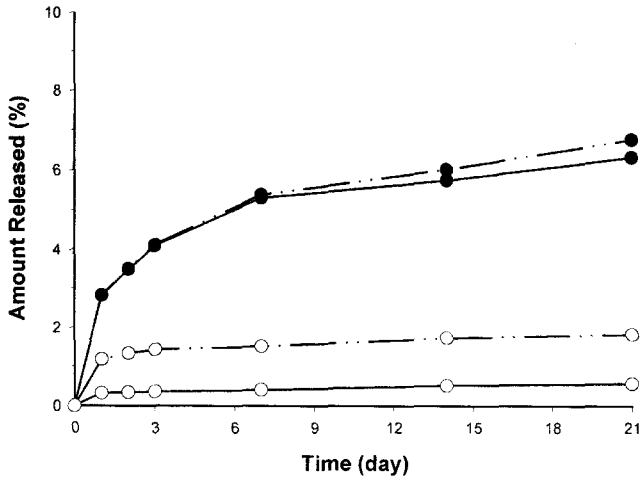

Figure 5–Comparative profiles for antigen release. Dash-dot-dot lines represent the conventional OVA release profile (by micro-BCA) and solid lines represent the immunoreactive OVA release profile (by ELISA). ●, microspheres prepared with stabilizer; ○, microspheres prepared without stabilizer.

여부를 예측하여 보았다.

Figure 5와 같이 내부수상에 안정화제를 첨가하여 제조한 경우 방출되는 OVA의 양이 안정화제를 첨가하지 않은 경우보다 많게 나타났다. 또한, 단백질 안정화제를 사용하지 않은 경우 micro-BCA assay와 ELISA를 이용한 방출 양상이 크게 차이를 보여 상당량의 OVA가 면역활성을 잃었으나, 단백질 안정화제를 사용한 경우는 그 양상이 유사하게 나타나 단백질이 거의 변성되지 않았음을 알 수 있다. 이와 같이 내부수상에 안정화제를 첨가하는 것이 OVA의 방출을 좋게 할 수 있고, ELISA를 이용하여 면역활성이 있는 OVA의 방출양상을 측정한다면 보다 *in vivo* 면역활성을 예측하기 쉬울 것이며 아울러 단백질의 변성 여부까지도 예측할 수 있을 것이다.

결 론

모델항원으로 ovalbumin을 이용하여 PLGA 마이크로스피어를 제조한 후, 방출실험을 통하여 얻어진 검체를 분석함으로써 봉입된 단백질에 대하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

제조된 미립자에 봉입된 단백질의 단백변성을 SDS-PAGE와 SEC를 통하여 분석한 결과 제조과정이나 방출과정에서 봉입된 단백질은 분자량의 감소와 응집 및 분해가 없었음을 확인하였지만, AR값을 통하여 평가한 결과 사용된 유기용매의 극성도 차이에 의해 MS-EA가 MS-DCM보다 더 많은 면역활성을 지닌 것으로 나타났고, 마이크로스피어 제조 시 사용된 단백질 안정화제는 AR값의 감소를 줄여 항원의 면역활성을 유지시키는 것으로 나타났다. 이러한 이유로 향후 PLGA 마이크로스피어의 약물 방출양상을 올바로 평가하기 위해서는 방출된 누적 단백질량으로서 표현하는 기존의 방법보다 면역활성을 지닌 항원의 방출량으로 표현하는 방법을 이용하는 것이 바람직하다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 보건복지부 보건의료기술 연구개발 사업 연구비(단독기초 : 과제번호 01-PJ1-PG3-21700-0009)의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사 드립니다.

문 헌

1) S. Cohen, H.Bernstein, Microparticulate systems for the delivery of protein and vaccines, Marcel Dekker, Inc., pp.

51-88 (1996).
2) M. Zahirul, I. Khan, J.P. Opdebeeck and I.G. Tucker, Immunopotentiation and delivery for antigens for single-step immunization : Recent trends and progress, *Pharm. Res.*, **11**, 2-11 (1994).
3) M. Morlock, H. Knoll, G. Winter and T. Kissel, Microencapsulation of rh-erythropoietin using biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide): Protein stability and the effect of stabilizating excipients, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **43**, 29-36 (1997).
4) J.L. Clenland and A.J.S. Jones, Stable formulation of recombinant human growth hormone and interferone- for microencapsulation in biodegradable microspheres, *Pharm. Res.*, **13**, 1464-1474 (1996).
5) M.C. Manning, K. Patel and R.T. Borchardt, Stability of protein pharmaceuticals, *Pharm. Res.*, **6**, 903-918 (1989).
6) R.S. Raghuvanshi, S. Goyal, O. Singh and A.K. Panda, Stabilization of dichloromethane-induced protein denaturation during microencapsulation, *Pharmaceutical development and technology*, **3**, 269-276 (1998).
7) H.K. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J. Control. Rel.*, **58**, 143-151 (1999).
8) S.P. Schwendenman, M. Cardamone, A. Klibanow and R. Langer, Stability of proteins and their delivery from biodegradable polymer microspheres:In *Microparticulate systems for the delivery of proteins and vaccines,* S. Cohen and H. Bernstein (Eds.), Marcel Dekker Inc., pp. 1-50 (1996).
9) T. Uchida and S. Goto, Oral delivery of poly(lactide-co-glycolide) microspheres containing ovalbumin as vaccine formulation: particle size study, *Biol. Pharm. Bull.*, **17**, 1272-1276 (1994).
10) T.J. Ahern, M.C. Mannig, *Statbility of protein pharmaceuticals part B*: *In vivo* pathway of degradation and strategies for protein stabilization, Plenum press, pp. 209-225 (1992).
11) G. Crotts and T.G. Park, Stability and release of bovine serum albumin encapsulated within poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles, *J. Control. Rel.*, **44**, 123-134 (1997).
12) Rajeev, S. Raghuvanshi, Sandhya Goyal, Om Sin, and Amulya K. Panda, Stabilization of dichloromethane-induced protein denaturation during microencapsulation, *Pharm. Dev. and Technol.*, **3**, 269-276 (1998).
13) Eszter Palinko-Biro, Gabor Ronaszeki, Hans P. Merkle, Bruno Gander, Release kinetics and immunogenicity of parvovirus microencapsulated in PLA/PLGA microspheres, *Int. J. Pharm.*, **221**, 153-157 (2001).
14) I.Y. Song, S.H. Song, W.H. Song, S.W. Cho and Y.W. Choi, Particle size control of poly(lactide-co-glycolide) microspheres for oral antigen delivery systems, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **29**, 315-321 (1999).
15) I.Y. Song, Oral protein drug delivery system with biodegradable polymer: properties of poly[lactide-co-glycilide] microspheres containing ovalbumin as a model antigen, *M.S. Thesis for pharmacy*, Chung-Ang University (1999).
16) 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).
17) A.G.A. coombes, E.C. Lavelle, P.G. Jenkins and S.S. Davis, single dose, polymeric, microparticle-based vaccines : the influence of formulation conditions on the magnitude and duration of the immune response to a protein antigen, *Vaccine*, **14**, 1429-1438 (1996).
18) H. Rafati, E.C. Lavelle, A.G.A. Coombes, S. Stolnik, J. Holland and S.S. Davis, The immune response to a model antigen associated with PLG microparticles prepared using different surfactants, *Vaccine*, **15**, 1888-1897 (1997).