

음이온성 유화제로 수식된 폴리락티드/글리콜리드 공중합체 나노 입자와 백신의 결합성

최민수 · 박은석* · 지상철* · 신병철†

한국화학연구원 나노생체재료팀, *성균관대학교 제약학과
(2004년 4월 28일 접수 · 2004년 5월 20일 승인)

Binding of Vaccine and Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanoparticle Modified with Anionic Surfactant

Min Soo Choi, Eun Seok Park*, Sang Cheol Chi* and Byung Cheol Shin†

Advanced Materials Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, 100 Jang Dong, Yuseong, Daejeon 305-343, Korea

*College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-467, Korea

(Received April 28, 2004 · Accepted May 20, 2004)

ABSTRACT—Recently, studies on intranasal mucosa delivery of influenza vaccine have been actively developed because of lack of pain and ease of administration. We studied on preparation of nanoparticle delivery system using biodegradable polymer as a poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) and their binding characteristics with vaccine. Three kinds of PLGA nanoparticles were prepared by spontaneous emulsification solvent diffusion (SESD) method using sodium dodecyl sulfate and sodium laurate as an anionic surfactant and Lutrol F68 (polyethylene glycol-block-polypropylene glycol copolymer) as a nonionic surfactant. The 5-aminofluorescein labeled vaccine was coated on the surface of nanoparticles by ionic complex. The complexes between vaccine and nanoparticles were confirmed by change of the size. After vaccine coating on the surface of anionic nanoparticles, particle size was increased from 174 to 1,040 nm. However the size of nonionic nanoparticles was not more increased than size of anionic nanoparticles. The amount of coated vaccine on the surface of PLGA nanoparticles was 14.32 µg/mg with sodium dodecyl sulfate, 12.41 µg/mg with sodium laurate, and 9.47 µg/mg with Lutrol F68, respectively. In conclusion, prepared nanoparticles in this study is possible to use as a virus-like nanoparticles and it could be accept in the field of influenza vaccine delivery system.

Key words—PLGA, Nanoparticle, Influenza vaccine, Anionic surfactant

최근 생명 과학분야와 의료기관의 연구자들은 급만성 전염성 질환의 원인이 대부분 기관지, 소화기, 비뇨생식기 등의 점막조직을 통하여 감염되고 있다고 예측하고 있으며 따라서 점막유도능력이 탁월한 백신의 개발에 관심이 집중되고 있다. 백신의 점막유도 방식 중, 코 내부점막을 통한 약물의 전달은 점막 면역 후에 다른 면역을 유도하여 백신이 보다 쉽고 빠르게 전달될 수 있으며 면역효능이 높은 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 뿐만 아니라 기존의 백신전달방법에 비하여 다양한 연령층에서 사용이 용이하고 분무형이기 때문에 주사기의 사용이 필요 없어 주사를 두려워하는 사람들에게 고통 없이 투여가 가능한 장점이 있다.^{3,4)} 코 점막을 이용하여 체내로 전달되는 백신에는 대표적으로 인플루엔자 바이러스가 있으며, 이 백신은 살아있는 것과 죽어있는 것으로 분류된다. 살아있는 바이러스를 이용한 백신으로는 코에 뿌리는 Flumist가 잘 알려져 있다.⁵⁾ 그러나 일반적으로 살아있

는 바이러스를 사용할 경우 인체 내 면역성은 우수하지만, 바이러스의 특성이 잠재되어 안전성이 낮다는 문제가 계속해서 제기되고 있는 실정이다. 한편, 죽은 인플루엔자 바이러스를 사용할 경우에는 체내에서 면역력은 낮아지지만 안전성은 향상된다는 보고가 있다.^{6,7)} 이러한 생체 내 면역력과 안전성의 장단점을 지니고 있는 백신의 면역력을 증대시키기 위한 방법으로서 백신을 여러 가지 운반체에 결합시켜 면역력과 전달 효율을 상승시키는 방법이 개발되고 있으며 대표적인 운반체의 보조제로서 면역자극복합체(immunity-stimulating complex, ISCOMs), 키토산, HTL subunit, 리포솜(liposome), 마이크로입자 그리고 나노입자 등이 이용되고 있다.⁸⁻¹²⁾ 특히 백신을 결합하는 마이크로 입자나 나노입자의 소재로써 이용되는 폴리(DL-락타이드-co-글리콜라이드) (poly(DL-lactide-co-glycolide), PLGA)는 우수한 생체적합성과 생분해성을 갖는 장점이 있어서 백신 전달체로써 연구가 활발히 진행 중이다.¹³⁻¹⁶⁾ 한편, 효과적인 PLGA 나노입자의 제조방법으로는 소금 제거방법, 유화중발법, 자발적 유화확산법 등이 있다.¹⁷⁾

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 042)860-7223, E-mail : beshin@pado.kriict.re.kr

따라서 본 실험에서는 코 점막을 통한 백신의 운반체로써 죽어있는 인플루엔자 바이러스 백신을 PLGA 나노입자에 결합시켜 효율적인 백신 운반체로 제조하고자 하였다. PLGA 나노입자는 자발적 유화용매 확산(spontaneous emulsification solvent diffusion, SESD)법을 이용하여 제조하였으며 바이러스 백신이 나노입자에 결합되기에 최적의 조건을 제시하였다.

실험 방법

시약

분자량이 50,000~75,000이고 공동 단량체의 비율이 85:15인 PLGA는 Aldrich Chem.사 (WI, 미국)에서 구입하여 그대로 사용하였다. 유화제로 사용된 소듐 도데실 설페이트(SDS), 소듐 라우레이트(SL) 그리고 폴리에틸렌글리콜-block-폴리프로필렌글리콜 공중합체(Lutrol F68)는 Sigma Chem.사 (MO, 미국), Fluka Chemie.사 (Buchs, 스위스) 그리고 BASF Wyandotte사 (Ludwigshafen, 독일)에서 각각 구입하여 사용하였다. 나노입자에 코팅된 백신의 양을 측정하기 위하여 사용한 5-아미노플루오레세인은 Molecular Probes사 (OG, 미국)에서 구입하였다. N-하이드록시설포석신 이미드 소듐염 (sulfo-NHS)와 1-에틸-3-(3-디메틸아미노 프로필렌)카르보디이민 (EDC)은 Fluka Chem.사 (Buchs, 스위스)와 Sigma Chem.사 (MO, 미국)에서 각각 구입하여 사용하였다. 용매로 사용된 디메틸설포사이드 (DMSO)와 N,N-디메틸포름아마이드 (DMF)는 Sigma Chem.사 (MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액인 소듐 디카보네이트 (SBC)는 (주)동양화학 (Korea)에서, 포스페이트 살린 완충용액 (PBS)은 Aldrich Chem.사 (WI, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 백신은 인플루엔자 바이러스 (influenza hemagglutinin)를 (주)동신제약에서 공급받았다. 에탄올과 아세톤은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

PLGA 나노입자의 제조

PLGA 나노입자는 자발적 유화용매 확산법에 의하여 다음과 같은 과정을 통하여 제조되었다. 1% w/v의 PLGA 용액을 제조하기 위해 PLGA 50 mg을 아세톤과 에탄올이 6:4 인 용매 5 ml에 용해시켰다. 한편, 음이온성유화제인 SDS와 SL, 비이온성유화제인 Lutrol F68을 1, 2, 4, 8% w/v의 용액으로 제조하여 총량이 20 ml로 각각 제조하였다. 제조된 유화 용액에 초음파발생기 (Ultrasonicator, Model 500, Fisher scientific, USA)를 사용하여 초음파를 조사하면서 주사기를 사용하여 PLGA 용액을 서서히 첨가하였다. 초음파 분산과정을 마친 유화 용액은 증류수 70 ml를 첨가하여 희석한 후

한외여과 장치를 사용하여 희석용액이 25 ml이 될 때까지 정제하였고, 이 과정은 3회 반복하였다.

PLGA 입자의 크기와 제타포텐셜 측정

제조한 PLGA 입자의 크기, 분산도, 제타포텐셜과 이동도는 전기영동 광산란측정기 (Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)를 사용하여 측정하였다. 입자의 크기와 분산도는 제조한 PLGA 입자 용액 25 ml에서 0.5 ml를 증류수 2.5 ml로 희석하여 60°의 산란각과 25°C에서 측정하였다. 제타포텐셜과 이동도는 PLGA 입자 용액 25 ml 중 1 ml를 증류수 9 ml로 희석하여 25°C, pH 7에서 측정하였다.

PLGA 입자의 표면 분석

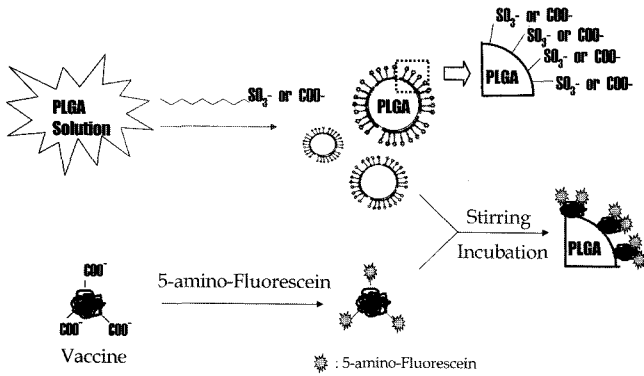
제조된 PLGA 입자는 동결건조기 (FD5505S, Ilshin Lab, Korea)에서 3일 동안 건조하였다. 건조된 음이온성과 비이온성 유화제로 코팅된 PLGA 입자와 제조된 PLGA 입자의 표면을 비교하여 분석하였다. 입자의 표면특성과 유화제의 코팅여부는 Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-IR, CT-06484, Spectra-Tech Inc., USA)와 Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA, MK2, VG scientific, United Kingdom)를 이용하여 확인하였다.

PLGA 입자에 백신 코팅

백신은 50 mM SBC 완충용액에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 후 2 mM EDC와 5 mM sulfo-NHS를 가하여 실온에서 15분간 교반하였다. 백신 용액에 5-아미노플루오레세인 (0.1 mg/ml DMSO, DMF)을 50 μ l 첨가하여 2시간 동안 4°C에서 교반하였다. 반응이 종료된 후, 백신과 결합하지 않은 5-아미노플루오레세인을 제거하기 위해 막투석(MWCO 3500)을 4°C에서 48시간 동안 실시하였다.

백신이 표면에 코팅된 PLGA 나노입자를 얻기 위해 각각의 유화제 (LS, SDS와 Lutrol F68)로 만들어진 PLGA 입자 수용액 (pH 7)에 백신을 서서히 첨가하면서 4°C에서 3시간 동안 교반하였다. PLGA 입자와 백신의 결합반응 과정에서 입자에 코팅되지 않은 잔류 sulfo-NHS, EDC와 5-아미노플루오레세인의 제거는 원심분리기 (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany)를 사용하여 13000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 분리된 용액의 상등액을 제거하고 PBS로 세척하였으며 이 과정을 3회 반복하였다. 제조한 음이온성 PLGA 입자에 백신이 코팅되는 과정은 Scheme 1에 나타내었다.

음이온성, 비이온성 입자와 백신간의 결합 여부는 전기영



Scheme I—Schematic illustration of PLGA nanoparticles coated with various surfactants and labeled influenza vaccine.

동 광산란측정기와 자외선 분광기(UV MINI 1240, Shimadzu scientific, Japan)를 이용하여 확인하였다. 자외선 분광기를 이용하여 제조한 각각의 음이온성과 비이온성 입자에 백신을 첨가한 후 450 nm의 파장에서 시간에 따라 광밀도를 측정하였다. 또한, 전기영동 광산란측정기를 이용하여 백신이 코팅된 PLGA 입자의 크기와 제타포텐셜을 측정하였다.

PLGA 입자의 형태

각각의 유화제로 제조된 PLGA 입자와 백신이 코팅된 PLGA 입자는 양면 테이프를 붙인 금속 디스크에 고정시킨 후 백금증착기 (Emscope, Model SC 500K, UK)를 이용하여 아르곤 기류 하에서 진공도 0.15 torr 및 6~7 mA의 조건으로 90초간 백금 코팅을 실시하였다. 백금 코팅된 입자들은 전자주사현미경 (Model S-2250N, Hitachi Co., Japan)을 이용하여 3 kV의 가속 전압 하에서 일정 배율로 확대하여 입자의 형태를 관찰하였다.

PLGA 나노입자에 코팅된 백신의 양 측정

PLGA 입자에 결합된 백신의 양은 백신 말단기에 도입한 5-아미노플루오레세인의 형광강도를 측정하여 정량하였다.¹⁸⁾ 형광강도는 형광분광광도계 (FM109530-33, Barnstead Co. USA)를 이용하여 방출파장 518 nm, 흡수파장 491 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

PLGA 나노입자의 크기와 제타포텐셜

Figure 1은 각각의 유화제의 농도를 1% w/v로 고정시킨 후 PLGA의 농도를 변화시켜 나노입자를 제조했을 때 입자 크기의 변화를 나타낸 것이다. 각각의 유화제의 농도가 1% w/v로 일정할 때 제조한 입자의 크기는 PLGA의 농도가 1,

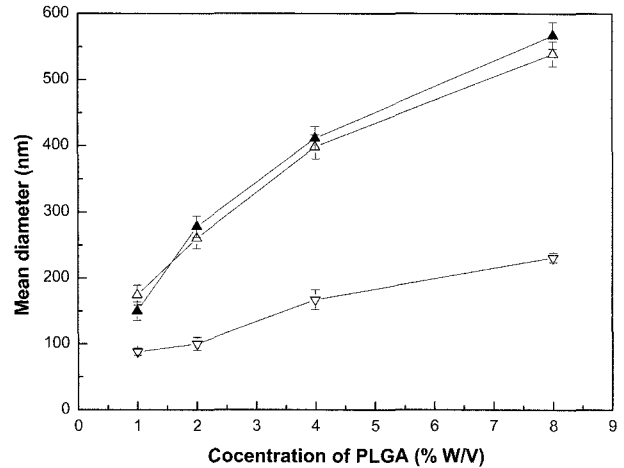


Figure 1—Mean diameter of 1% w/v surfactants coated PLGA nanoparticles with a variation of concentration of PLGA: (△) SDS coated PLGA nanoparticles, (▲) SL coated PLGA nanoparticles and (▽) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

Table I—Mean Diameter and Polydispersity of 1% w/v PLGA Nanoparticles with Various Surfactants

Concentration of surfactant (% w/v)	Mean diameter (nm)			Polydispersity		
	SDS	SL	Lutrol F68	SDS	SL	Lutrol F68
1	138.7	166.2	80.3	1.7	1.7	1.4
2	146.2	152.7	80.7	1.8	1.8	1.7
4	161.9	201.2	90.3	2.7	2.7	1.8
8	168.4	1035.5	88.4	2.9	3.6	1.1

2, 4, 8% w/v로 높아질수록 증가하였다. 자발적 유화용매 확산법에서 PLGA의 농도 조건은 입자크기에 영향을 주는 중요한 인자중의 하나로 알려져 있다.¹⁹⁾ PLGA의 농도가 증가할수록 입자의 크기가 뚜렷하게 증가하는 것은 유화제가 함유된 수용액 속에서 PLGA 용액이 분산될 때 PLGA의 농도 증가에 따라 형성된 에멀전 방울들의 밀도가 높아져서 입자간의 뭉침 현상이 일어나기 때문이다. 따라서 입자 크기와 수율은 PLGA의 농도에 의하여 조절할 수 있으며, 100~200 nm의 입자를 얻을 수 있는 최적의 농도 조건은 1% w/v PLGA 용액이었다.

Table I은 PLGA 용액의 농도를 1% w/v로 고정시키고 음이온성 유화제인 SDS와 SL, 비이온성 유화제인 Lutrol F68의 농도를 1, 2, 4, 8% w/v로 각각 변화시키면서 PLGA 입자를 제조하여 입자의 크기와 분포도를 비교한 결과이다. 1~4% w/v에서 SDS와 SL 그리고 Lutrol F68로 표면수식한 입자의 크기는 각각 140~170 nm, 160~200 nm 그리고 80~90 nm이었다. SL는 같은 음이온성인 SDS에 비하여 8% w/v이상에서 급격한 크기 증가를 나타내었다. 이들 유화제로 제조된 PLGA 입자들은 모두 유화제의 농도가 1~2% w/v

Table II—Zeta Potential and Mobility of 1% w/v PLGA Nanoparticles with Various Surfactants

Concentration of surfactant (% w/v)	Zeta potential (mV)			Mobility (cm ² /Vs, 10 ⁻⁴)		
	SDS	SL	Lutrol F68	SDS	SL	Lutrol F68
1	-74.5	-29.6	-8.1	-2.9	-2.2	-1.0
2	-87.4	-38.9	-13.1	-3.5	-2.9	-1.7
4	-91.5	-34.3	-14.3	-3.9	-2.5	-0.8
8	-100.3	-57.7	-14.5	-5.4	-4.3	-0.7

사이일 때 안정된 분포도를 나타내었다. 보고된 바에 따르면 유화제의 농도가 높을수록 제조된 입자의 크기가 작아지고 안정성도 증가하지만, 일정 농도 이상에서는 오히려 PLGA 입자 표면에 유화제의 과도한 마이셀이 형성되어 입자의 크기가 증가하는 것으로 알려져 있다.¹⁾ 따라서 1~2% w/v 사이의 유화제 농도 범위에서 유화제 농도 변화에 따른 입자 크기에 대한 영향이 가장 적은 것으로 나타났다. 즉, 사용된 유화제들이 1~2% w/v 농도 범위에서 에멀전 방울의 효과적인 분산과 안정성이 확보되었기 때문인 것으로 사료된다.

Table II는 각각의 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 제타포텐셜과 이동도를 비교한 결과이다. 입자의 제타포텐셜은 음이온성 입자는 -30 ~ -100 mV이었고 비이온성 입자가 -8 ~ -15 mV의 범위를 나타내었다. 결과적으로 음이온성 유화제로 제조한 입자의 표면은 음전하로 하전되었으며, 비이온성 유화제로 제조한 입자는 약한 음전하로 하전되어 있음을 관찰하였다. 비이온성 유화제가 도입되어 약한 음전하를 띠는 PLGA 입자에 비해, 음이온성 유화제가 도입되어 카르복실기나 술폰기를 포함하는 PLGA 입자는 백신과 같은 단백질에 포함된 아민기와 이온 결합에 의하여 결합성이 증가하였다. 입자의 크기, 제타포텐셜과 이동도를 고려해 볼 때 1% w/v PLGA 용액과 2% w/v 유화제의 농도가 백신과의 결합성이 가장 적절한 것으로 관찰되었다. 또한 제타포텐셜과 이동도의 변화를 통해 비이온과 음이온으로 입자 표면이 수식된 PLGA 입자가 제조되었음을 확인할 수 있었다.

PLGA 입자의 표면 분석

Figure 2는 음이온성 유화제와 비이온성 유화제를 각각 사용하여 PLGA 입자를 제조한 후, 생성된 입자의 표면에 유화제가 코팅되어 있는지를 확인하기 위하여 ATR-IR spectroscopy를 이용하여 비교 분석한 결과이다. Figure 2의 (a)는 유화제를 사용하지 않은 PLGA 자체의 스펙트럼으로써, 1700 cm⁻¹ 부근에서 카르보닐 그룹의 C=O stretch 피크와 C-O stretch 피크를 보여주고 있다. (b)는 음이온성 유화제

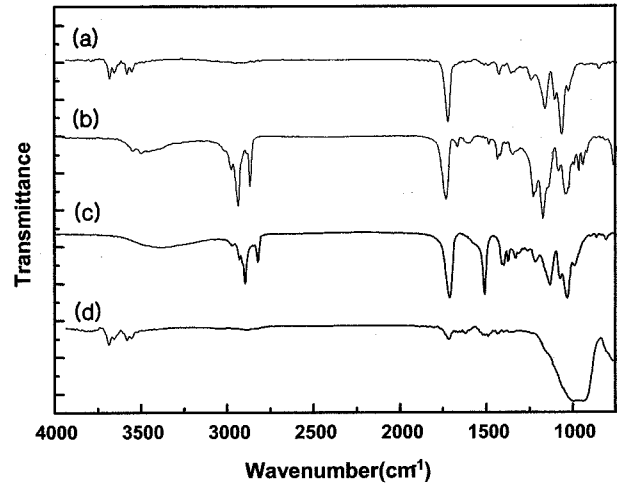


Figure 2—ATR-IR spectrum of PLGA nanoparticles was prepared by the SEDS method: (a) PLGA, (b) SDS coated PLGA nanoparticles, (c) SL coated PLGA nanoparticles and (d) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

SDS를 사용한 PLGA 입자의 스펙트럼 결과를 나타내고 있다. 1700 cm⁻¹ 부근에서 PLGA의 카르보닐 그룹에 의한 특성 피크, 유화제의 영향으로 1300 cm⁻¹ 부근에서 술폰기에 의한 S=O asymmetric stretch 피크와 3000 cm⁻¹ 부근에서 알킬 그룹에 의한 C-H 피크를 보여주고 있다. (c)는 음이온성 유화제 SL를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 스펙트럼으로써 유화제에 의한 1500 cm⁻¹ 부근에서 PLGA의 카르복실 그룹에 의한 특성 피크, 1700 cm⁻¹ 부근에서 카르보닐 그룹에 의한 특성 피크와 3000 cm⁻¹ 부근에서 알킬 그룹에 의한 C-H 피크를 모두 보여주고 있다. (d)는 비이온성 유화제, Lutrol F68을 사용하여 제조한 PLGA 입자의 스펙트럼 결과로서 1800 cm⁻¹ 부근에서 PLGA의 카르보닐 그룹의 피크가 약해지고 1000 cm⁻¹ 부근에서 Lutrol F68의 ether 그룹의 C-O stretch 피크가 강하게 나타나 있다. 즉, 음이온성 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 표면 분석 결과는 SDS의 S=O 피크와 SL의 COOH 피크가 나타남으로써 입자 표면에 유화제가 코팅되어 있음을 보여주었다. 또한, 비이온성 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 표면 분석 결과는 Lutrol F68의 특성 피크인 C-O 피크가 나타남으로써 입자 표면에 Lutrol F68이 코팅되어 있음을 보여주었다. 이와 같은 결과로 각각의 유화제가 PLGA 나노입자의 표면에 분포하여 수식되어 있는 것을 확인하였다.

Table III은 ESCA를 측정하여 각각의 입자 표면에 존재하는 원소의 비율을 나타낸 결과이다. PLGA 나노입자는 O가 41.6%, C가 58.4%를 나타내고, SDS로 수식된 PLGA 나노입자는 O의 비율이 66.6%, C가 24.9%, Na가 4.3%, S가 4.2%로 나타났고, SL로 수식된 PLGA 나노입자는 O의

Table III—Surface Analysis of PLGA Nanoparticles with Various Surfactants

Peak	[AT]%			
	PLGA nanoparticles	SDS coated PLGA nanoparticles	SL coated PLGA nanoparticles	Lutrol 68 coated PLGA nanoparticles
O 1s	41.6	66.6	73.8	30.7
C 1s	58.4	24.9	26.2	70.0
Na 1s	—	4.3	—	—
S 2p	—	4.2	—	—

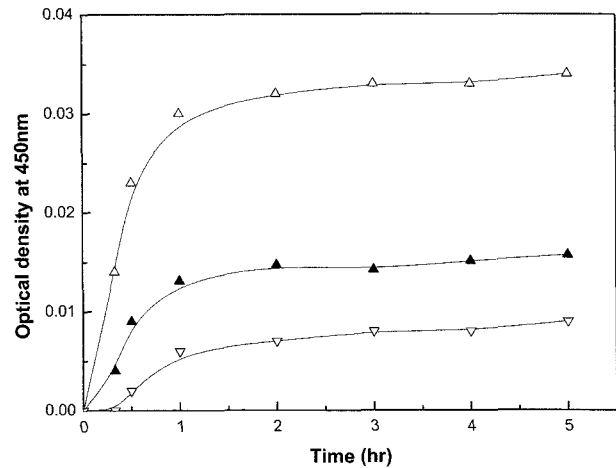
비율이 73.8%로 증가하고 C가 26.2%로 감소하는 경향을 나타내었다. Lutrol F68로 수식된 PLGA 나노입자는 O가 30.0%, C가 70.0%로 나타났다. SL로 표면 코팅된 나노입자는 표면을 주로 구성하고 있는 카르복실 그룹의 영향으로 O와 C의 상대적 비율이 변화하였으며, SDS로 코팅된 나노입자는 표면을 주로 구성하고 있는 술폰기에서 기인한 S의 원소들의 생성과 C와 O의 상대적 비율변화 결과로부터 PLGA 입자의 표면에 SDS와 SL가 코팅되어 있는 것을 관찰하였고 Lutrol F68은 알킬그룹에서 기인한 C의 증가결과로부터 입자 표면에 코팅되어 있는 것을 관찰하였다. 본 결과로부터 음이온성 유화제와 비이온성 유화제로 코팅된 입자의 표면은 음이온성 유화제와 비이온 유화제로 각각 코팅되어 있음을 확인하였다.

PLGA 입자와 백신 결합의 특성

Table IV는 SDS, SL 그리고 Lutrol F68으로 수식된 PLGA 입자에 백신을 결합시킨 후 입자의 크기와 제타포텐셜의 측정값이다. 백신이 SDS로 수식된 PLGA 입자의 크기는 270~350 nm이고 제타포텐셜은 -80~-100 mV로 관찰되었다. 또한, 백신이 코팅된 SL로 수식된 PLGA 입자의 크기는 170~1,040 nm이고 제타포텐셜은 -40~-80 mV로 관찰되었다. 반면에, 비이온성 입자의 크기는 89~93 nm이고 제타포텐셜이 -18~-25 mV로 관찰되었다. 따라서 Table I, II에서 관찰된 각각의 유화제로 수식된 PLGA 나노입자의 크기와 제타포텐셜의 결과보다 백신결합 후 나노입자의 크기가 증가하였고, 제타포텐셜은 감소하였다. 이러한 결과로

Table IV—The Change of Mean Diameter and Zeta Potential of PLGA Nanoparticles with Various Surfactants

Concentration of surfactant (% w/v)	Mean diameter (nm)			Zeta potential (mV)		
	SDS	SL	Lutrol F68	SDS	SL	Lutrol F68
1	277.9	174.7	93.2	-82.4	-40.5	-18.5
2	285.4	260.2	88.5	-89.5	-41.8	-23.3
4	316.8	398.0	95.1	-93.1	-54.6	-24.4
8	350.2	1040.5	89.8	-99.9	-79.2	-25.4

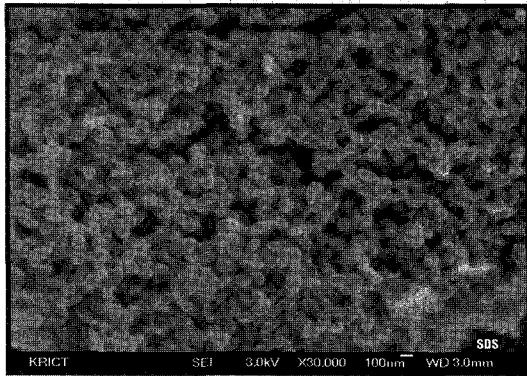
**Figure 3**—Optical density of vaccine on PLGA nanoparticles coated with various surfactants: (Δ) SDS coated PLGA nanoparticles, (\blacktriangle) SL coated PLGA nanoparticles and (∇) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

서 각각의 동일한 조건에는 PLGA 나노입자에 백신의 결합이 이루어진 것이라고 예측할 수 있다.

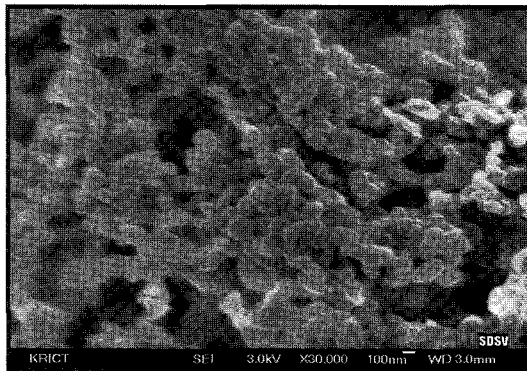
Figure 3은 음이온으로 수식된 입자와 백신의 결합 반응을 나타내고 있다. 음이온성 SDS로 표면 수식된 PLGA 입자와 백신을 반응시킨 용액은 1시간 이내에 광밀도가 0.03으로 급격하게 증가하였으며, 음이온성 SL로 표면이 수식된 PLGA 입자는 SDS로 표면 수식된 입자에 비하여 1/2의 광밀도 증가를 보였다. 그러나 비이온성 Lutrol F68로 수식된 PLGA 입자와 반응시킨 백신 용액은 시간이 지남에 따라 광밀도의 증가가 미비하였다. 이러한 결과는 SL의 말단기에 포함된 카르복실그룹이나 Lutrol F68으로 표면 수식된 입자에 비하여 상대적으로 큰 음전하를 갖는 SDS의 술폰기로 표면 수식된 입자가 백신과 결합성이 더 우수하다는 것을 나타내며, 높은 음전하로 입자의 표면이 수식되어 있는 경우 백신의 아민기와 강한 이온결합을 유도하여 광밀도를 증가시킨 것이라고 생각된다.

PLGA 입자의 형태

Figure 4는 PLGA 1% w/v PLGA 용액을 2% w/v SDS



(a)



(b)

Figure 4—Scanning electron microphotograph image of SDS coated PLGA nanoparticles (a) before and (b) after vaccine coating.

로 수식한 입자의 백신코팅 전후를 SEM으로 측정하여 나타냈다. (a)는 음이온성 유화제 SDS로 수식된 PLGA 입자의 백신코팅 전, (b)는 백신코팅 후의 입자의 형태이다. (a)는 Table I에서 측정된 결과와 마찬가지로 약 150 nm의 크기를 갖는 입자로 구성되어 있으며, 구형 모양을 관측할 수 있었다. 한편, (b)는 Table IV에서 측정된 결과와 마찬가지로 약 250 nm의 크기를 갖는 입자들로 구성되어 있었으며, 찌그러진 구형 모양을 관측할 수 있었다. 크기의 증가와 형태의 변화는 백신이 SDS로 수식된 PLGA 나노입자에 코팅된 것이라고 사료된다.

PLGA 입자에 결합된 백신의 양

Figure 5는 음이온과 비이온으로 수식된 입자에 코팅된 백신의 양을 측정된 결과이다. 이때, 백신의 양은 형광분광광도계를 이용하여 측정하였다. SDS, SL와 Lutrol F68으로 수식된 입자는 각각 14.32 µg/mg, 12.41 µg/mg, 9.47 µg/mg의 백신이 코팅되어 있음을 확인하였다. Lutrol F68로 수식된 입자에 비하여 SDS와 SL로 표면 수식된 입자의 양을 증가시키면 코팅되는 백신의 양도 증가되는 것을 관찰할 수

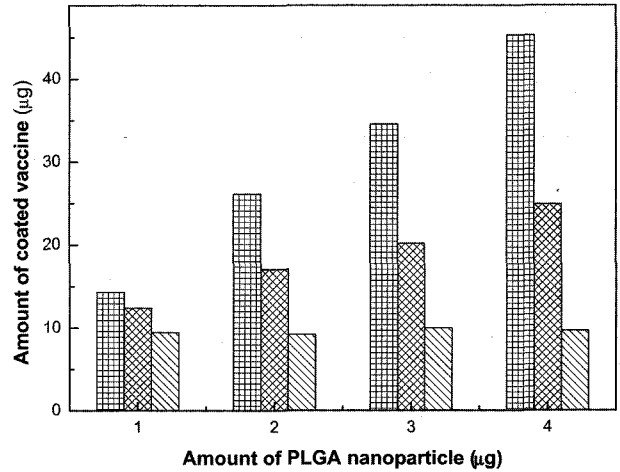


Figure 5—Amount of coated vaccine on the nanoparticles: (▣) SDS coated PLGA nanoparticles, (▤) SL coated PLGA nanoparticles and (▥) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

있었다. 한편, SDS와 SL로 표면 수식된 입자가 Lutrol F68으로 수식된 입자보다 코팅된 백신의 양이 증가하였다. 즉, 전하를 띠지 않는 비이온성 입자는 백신과 물리적 결합만을 통하여 코팅이 이루어진 것을 확인하였다. 그러나 표면에 음전하를 갖는 술포기나 카르복실기를 포함하고 있는 나노입자는 백신의 아민기와의 이온결합을 유도하여 결합력을 증가시킨 것으로 사료된다.

결 론

본 실험은 자발적 유화용매 확산법에 의해 제조된 음이온성 PLGA 나노입자와 백신의 결합성에 관한 것이다. PLGA 나노입자는 아민기를 가진 인플루엔자 백신의 결합을 유도하기 위해 음이온성 유화제인 SDS와 SL의 술포기와 카르복실기를 PLGA 나노입자 표면에 각각 도입할 수 있었다. 입자의 크기는 PLGA와 유화제의 농도, PLGA와 유화제의 비율에 따라 영향이 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 음이온성 유화제로 제조된 PLGA 입자에 백신을 결합시킨 경우 입자크기는 170~1,040 nm로 증가하였고, 비이온성 유화제를 사용한 경우 입자크기는 미세한 변화만 있었다. 한편, 각각의 유화제로 수식된 PLGA 나노입자의 제타포텐셜을 측정함으로써 백신과 결합력을 측정할 수 있었다. 비이온성에 비하여 음이온성 유화제로 제조된 PLGA 입자들의 표면에 결합한 백신의 양은 1.5~2.5배 이상 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과로 강한 음이온으로 수식된 PLGA 나노입자는 많은 백신을 결합할 수 있다는 것을 관찰하였고, 음이온으로 표면을 수식할 경우 생체 내 백신 전달체로서 활용이 기대되어 진다.

감사의 말씀

본 연구는 과학기술부 기능성 화합물질 개발사업과 정보통신연구진흥원 IMT-2000 출연금 기술개발지원사업(01-PJ11-PG9-01NT00-0003)으로 이루어진 것이므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) S.S. Davis, Nasal vaccines, *Advanced Drug Del. Rev.*, **51**, 21-42 (2001).
- 2) R. Glueck, Review of intranasal influenza vaccine, *Advanced Drug Del. Rev.*, **51**, 203-211 (2001).
- 3) C.W. Potter and R. Jennings, Intranasal immunization with inactivated influenza Vaccine, *Pharm. Sci. & Tech. Today*, **2**, 402-408 (1999).
- 4) T.G. Boyce and G.A. Poland, Promises and challenges of live-attenuated intranasal influenza vaccines across the age spectrum, *Biomedic. & Pharmacother.*, **54**, 210-218 (2000).
- 5) L.A. Jackson, S.J. Holmes, P.M. Mendelman, L. Huggins, I. Cho and J. Rhorer, Safety of a trivalent live attenuated intranasal influenza vaccine, FluMist[™], administered in addition to parenteral trivalent inactivated influenza vaccine to seniors with chronic medical conditions, *Vaccine*, **17**, 1905-1909 (1999).
- 6) W.E.P. Beyer, A.M. Palache, J.C. de Jong and A.D.M.E. Osterhaus, Cold-adapted live influenza vaccine Vs inactivated vaccine: systemic vaccine reaction, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy A meta-analysis, *Vaccine*, **20**, 1340-1353 (2002).
- 7) R.B. Belshe, W.C. Gruber, P.M. Mendelman, I. Cho, K. Reisinger, S.L. Block, J. Wittes, D. Iacuzio, P. Piedra, J. Treanor, J. King, K. Kotloff, D.I. Bernstein, F.G. Hayden, K. Zangwill, L. Yan and M. Wolff, Efficacy of vaccination with live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine against a variant (A/Sydney) not contained in the vaccine, *J. Pediatr*, **136**, 168-175 (2000).
- 8) B. Morein and K.L. Bengtsson, Immunomodulation by iscoms, immune stimulating complexes, *Methods*, **19**, 94-102 (1999).
- 9) L. Illum, I.J. Gill, M. Hinchcliffe M, A.N. Fisher and S.S. Davis, Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccine, *Advanced Drug Del. Rev.*, **51**, 81-96 (2001).
- 10) K. Hashigucci, H. Ogawa, T. Ishidate, R. Yamashita, H. Kamiya, K. Watanabe and N. Hattori, Antibody responses in volunteers induced by nasal influenza vaccine combined with Escherichia coli heat-labile enterotoxin B subunit containing a trace amount of the holotoxin, *Vaccine*, **14**, 113-119 (1996).
- 11) U.-R. Gluck and J.O. Gebbers, Phase 1 evaluation of intranasal virosomal influenza vaccine with and without Escherichia coli heat-labile toxin in adult volunteers, *Virology*, **73**, 7780-7786 (1999).
- 12) R. Gluck, R. Mischler, P. Durrer, E. Furer, A.B. Lang, C. Herzog and S.J. Cryz, Safety and immunogenicity of intranasally administered inactivated trivalent virosome-formulated influenza vaccine containing Escherichia coli heat-labile toxin as a mucosal adjuvant in young adult and elderly subjects, *J. Infectious Dia.*, **181**, 1129-1132 (2000).
- 13) T. Riley, S. Stolnik, C.R. Heald, C.D. Xiong, M.C. Garnett, L. Illum and S.S. Davis, Physicochemical evaluation of nanoparticles assembled from poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) (PLA-PEG) block copolymers as drug delivery vehicles, *Langmuir : The ACS J. Surfaces and Colloids*, **17**, 3168-3174 (2001).
- 14) D.T. O'Hagan, Microparticles and polymers for the mucosal delivery of vaccines, *Advanced Drug Del. Rev.*, **34**, 305-320 (1998).
- 15) V. Michael and D.T. O'Hagan, Microparticles for intranasal immunization, *Advanced Drug Del. Rev.*, **51**, 127-141 (2001).
- 16) A. Vila, A. Sanchez, M. Tobio, C. Evora, I. Soriano, O. McCallion and M.J. Alonso, PLA-PEG nano and microparticles as carriers for nasal vaccine delivery, *Pharm. Res.*, **15**, 270-275 (1998).
- 17) H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi and Y. Kawashima, Preparation of poly(DL-Lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spotaneous emulsification solvent diffusion method, *Int. J. Pharm.*, **187**, 143-152 (1999).
- 18) O. Hiraku and M. Yoshiharu, Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice, *Biomaterials*, **20**, 175-182 (1999).
- 19) S.J. Park, S.H. Kim, I.R. Lee, H.B. Lee and S.K. Hong, Preparation and characterization of biodegradable poly(ϵ -caprolactone) microcapsules containing erythromycin by emulsion solvent evaporation technique *Polymer(Korea)*, **26**(3), 326 (2002).
- 20) H. Murakami, Y. Kawashima, T. Niwa, T. Hino, H. Takeuchi and M. Kobayashi, Influence of the degrees of hydrolyzation and polymerization of poly(vinylalcohol) on the preparation and properties of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, **149**, 43-49 (1997).