超臨界流体を利用した微粒子製剤の調製

－高分子医薬の吸入剤化への応用－

Preparation of Powders with Supercritical Fluids

－ Application to Macromolecular Drugs for Inhalation Therapy －

岡本 浩一

Hirokazu Okamoto

Supercritical fluid is a useful medium to prepare dry tiny powders with advanced function. The powders prepared with supercritical fluid usually have a large surface area and a reduced crystallinity. This feature tends to increase the drug solubility, which is preferable especially to insoluble drugs for increasing their bioavailability. Supercritical fluid precipitation is also applicable to high molecular weight drugs. By selecting the running condition and/or additives, denaturation of proteins can be minimized. Sterilization of microorganisms and inactivation of viruses can be attained concomitantly with powder preparation in supercritical fluids.

Keywords : Inhalation, Protein, Gene, Dry powder, Drug delivery system

1. はじめに

医薬品微粒子は、錠剤などを調製するための中間製品であるばかりでなく、それ自体が最終製品としても用いられる。医薬品を微細化することにより、難水溶性薬物では製剤の表面積の増大により溶解速度が増加して吸収速度が改善される、直径3μm前後の微粒子製剤を吸入することで薬物を肺深部まで送達できる、直径200nm以下の微粒子を静脈内投与することで肝臓や脾臓といった細網内皮系への取り込みを回避できるなど、薬物に新たな機能を付加することが可能となる。

る。微粒子化の手法には、物理的破碎法、沈殿法、噴霧乾燥法など種々あるが、近年、超臨界流体技術を用いた製法が注目されつつある。現時点で、超臨界流体技術により調製された医薬品は市場には出ていないが、本稿の前半では、超臨界流体技術が医薬品の機能性微粒子化にどのように応用可能かを概観する。後半では、超臨界流体を用いた高分子医薬の微粒子製剤化について、最近の成果を紹介する。

2. 超臨界流体を利用した微粒子晶析法

超臨界流体を用いた微粒子調製法は、超臨界流体を薬物に対する良溶媒として用いる方法（RESS法、PGSS法）と、貧溶媒として用いる方法（GAS法、ASES法、SAS法、PCA法、SEDS法）に大別される¹⁾。それぞれの方法で用いられる晶析装置の模式図をFig. 1に示した。

超臨界流体が薬物の良溶媒である場合、高圧下で超臨界流体に溶解した薬物は、圧力を下げることによって非常に大きな過飽和状態になり、微粒子となって析出・回収される。この方法は、RESS (Rapid Expansion of Supercritical Solution) 法と呼ばれている。超臨界流体に対する医薬品の溶解度が低い場合には、溶解度改善のためにアルコールなどを少量添加するこ

2006年3月14日受付

名城大学薬学部製剤学研究室

(〒468-8503 名古屋市天白区八事山150) TEL 052-832-1781

Faculty of Pharmacy, Meijo University

(150 Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan)

< 著者紹介 >

1984年3月京都大学薬学部薬学科卒業。1989年3月同大学院薬学研究科博士課程修了、博士（薬学）。同年4月よりアップジョン ファーマシューティカルズリミテッド入社。筑波総合研究所製剤研究部で注射剤開発に従事。1998年4月より名城大学薬学部製剤学研究室助教。

専門：肺・鼻粘膜適用型微粒子製剤および経皮吸収型製剤の開発

Fig. 1 Schematic diagrams of the apparatus for preparation of powders with supercritical fluids
(A) RESS or PGSS, (B) GAS, (C) ASES, SAS or PCA, (D) SEDS and (E) SAA

とがある。RESS法に類似した方法で、液状薬物に二酸化炭素を溶解飽和させノズルから噴霧膨張させて微粒子化する方法があり、PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) 法と呼ばれる。固形薬物の場合も、熱に安定であれば、オートクレーブ内で加熱加圧融解後同様に処理できる。

一方、超臨界流体が薬物の貧溶媒である場合、薬物を良溶媒に溶解した溶液に、貧溶媒として超臨界あるいは亜臨界流体を加えて溶解度を低下させ、薬物を析出させることが可能となる。この方法はGAS (Gas Anti-Solvent) 法と呼ばれる。超臨界二酸化炭素を用いて水溶性たん白の微粒子を得た比較的初期の研究例では、dimethyl sulfoxide (DMSO) のように二酸化炭素と混合し、かつ、たん白溶解能の高い溶媒が多用された。

GAS法では薬物溶液中に二酸化炭素を導入するが、超臨界二酸化炭素中に薬物溶液を噴霧する方法が

ASES (Aerosol Solvent Extraction System) 法、SAS (Supercritical Fluid Antisolvent) 法、PCA (Precipitation with Compressed Antisolvents) 法である。超臨界二酸化炭素を充填したタンク内に、数十 μm のノズル孔を通じて薬物溶液をスプレーして微粒子化する。SEDS (Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids) 法も同じ原理に基づくが、超臨界流体を充填したタンク内に、二流体ノズルの中心から超臨界流体を、外側から薬物溶液を流して、ノズル先端で二酸化炭素と薬物溶液が効率よく混合して微粒子を作る。

超臨界流体の膨張力を薬物溶液の微細化に用いるのがSAA (Supercritical CO_2 -assisted Aerosolization) 法である。T字管の中の微小空間で薬物水溶液と超臨界二酸化炭素を混合し、圧力弁から乾燥槽内に噴霧すると、圧力の低下により混合液中の二酸化炭素が爆発的に膨張し、細かな水滴が生じる。微細液滴を

高温の窒素流などで乾燥して微粒子を得る。

3. 結晶形および溶解速度の制御

コンビナトリアルスクリーニングで得られる活性物質の40%以上は難水溶性であり、低吸収率、吸収率個体差、食事による吸収率の変動、作用発現の遅延などの問題が伴う²⁾。難水溶性薬物の溶解速度は、粒子径や結晶形の制御で改善可能である。carbamazepineには四つの多形と2水和物が知られ、Ⅲ型(β型)が安定形でUSPに記載されている。RESS法により粒子径0.5~2.5μmの結晶を調製できるが、その結晶形は温度に依存し、低温ではⅢ型、高温ではⅡ型が多くなる。また、高压では結晶化度は低下する³⁾。抗マラリア薬 artemisinin は難溶性であるが、RESS法による微細化で溶出速度が2倍になる⁴⁾。カルシウム拮抗薬 nifedipine (融点171~175℃)をPGSS法で微粒子化することでも溶解度が改善する⁵⁾。気管支拡張薬 salbutamol sulfate のDMSO溶液を用いてASES法で微粒子化する場合、薬物濃度増加で粒子径は減少している⁶⁾。

当研究室で、親油性薬物であるフルオレセイン、および、親水性薬物であるフルオレセインナトリウムを超臨界二酸化炭素晶析法により微粒子化したところ、微細な非晶質体が得られた。ラット肺内に投与した後の血漿中薬物濃度を測定したところ、いずれの薬物でも未処理原末および噴霧乾燥製剤に比べて吸収性の向上が認められている。

4. 微粒子カプセル化

マイクロスフェアは、薬物を高分子などからなるマトリックス中に分散させた微粒子である。生分解性のpoly(L-lactic acid)(L-PLA)を塩化メチレンに溶解し、ASES法やSEDS法で微粒子化できる。塩基性薬物であるgentamycinは、塩化メチレンに溶けにくい、陰イオン性界面活性剤AOT(sodium bis-2-ethylhexyl sulfosuccinate)と塩を作って塩化メチレンに溶解する。この溶液を用い、PCA法で調製したgentamycinのL-PLAマイクロスフェアからは、7週にわたり持続的に薬物が放出される⁷⁾。ペプチド性医薬品であるinsulinも塩化メチレンに溶けないが、塩化メチレンとDMSOの混合溶媒にはL-PLAとinsulinが同時に溶け、マイクロスフェアが調製できる⁸⁾。

薬物微粒子を他の素材でコーティングする場合、一般にはコーティング剤を有機溶媒に溶かしたり高温で

の処理が必要となるが、超臨界流体を用いることにより、有害な有機溶媒を用いずマイルドな条件でのコーティングが可能となる。ポリエチレングリコール6000はエタノールにはほとんど溶けないが、エタノールと超臨界二酸化炭素の混合流体には溶解する。この混合流体にリゾチームのようなたん白を懸濁し、RESS法によりコーティングできる⁹⁾。ウシ血漿アルブミンの結晶とコーティング剤を35~45℃、200barのオートクレーブ内で超臨界二酸化炭素に溶かし、徐々に冷却・抜圧することでアルブミンが分解することなくコーティングできる。コーティング剤にGelucire 50-02を用いることで効果的に溶出が抑制されている¹⁰⁾。

前項で述べたフルオレセインナトリウムに、粘膜附着ポリマーであるHPC-Mを5倍量添加して、超臨界二酸化炭素晶析法によりマトリックス微粒子を調製できる。本微粒子を、ラット肺内投与したところ、フルオレセインのみの製剤に比べて血漿中薬物濃度のピークが低く抑えられ、かつ持続することが認められている。

5. 超臨界流体中でのたん白質の安定性

たん白質を微粒子化する場合、その立体構造および生物活性が保持されるかどうかが重要なポイントとなる。DMSOのような有機溶媒を良溶媒として用いると、その中でたん白質の立体構造が変化する¹¹⁾。また、水溶液を用いた場合でも、超臨界二酸化炭素を作用させると、圧力とともに変性が進行する^{12, 13)}。加圧のみによるたん白変性は、100から300MPaという高压でないと起こらないことが報告されており¹²⁾、数10MPaの超臨界二酸化炭素中での変性には、高压以外の因子が働いていると考えられる。70~200atm、25~70℃の条件下で超臨界二酸化炭素と接触させた水のpHは2.80~2.95にまで低下する¹⁴⁾。したがって、低pHで変性しやすいたん白質や遺伝子は、水溶液を用いた超臨界流体晶析法で変性する危険性がある。リン酸塩や酢酸ナトリウムなどを添加することにより、超臨界二酸化炭素と接触した水のpH低下を防止できる。この手法により、たん白質や遺伝子の超臨界二酸化炭素晶析過程での分解を抑制できる^{15, 16)}。

一方、超臨界流体晶析法で得られたたん白微粒子の活性が低下しないという報告も多い。谷口らは、超臨界二酸化炭素(35℃、200atm)中で1時間、9種の酵素を処理して、活性がほとんど低下しなかったと報告している¹⁷⁾。また、変性が可逆的であり、生物活性

に影響しない場合も多い。Wintersらは、インスリン、リゾチーム、トリプシンをDMSOに溶解後、超臨界二酸化炭素を用いてSAS法で1~5 μm の微粒子を得た。微粒子化後は α ヘリックスが減って β シートが増えたが、水溶液にすると未処理のたん白質と同じ構造になった¹⁸⁾。

水溶液に超臨界二酸化炭素を作用させるとたん白質が変性するという性質は、製剤の滅菌に応用可能である。S. aureus, L. innocua, S. salford, P. vulgaris, L. dunnifii, P. aeruginosa, E. coliに超臨界二酸化炭素を作用させると、短時間で滅菌可能である¹⁹⁾。菌が乾燥している場合には滅菌効果が無く、少量の水を添加すると滅菌効果が増大することから、細胞内に侵入した二酸化炭素により細胞内pHが低下して滅菌効果を示すものと考えられる。骨組織を250bar, 50 $^{\circ}\text{C}$ の超臨界二酸化炭素で処理することで、HIV-1, Sindbis virus, polio Sabin type I virus, pseudorabies virusといったウイルスを不活性化できる²⁰⁾。これらの知見は、超臨界二酸化炭素を利用することにより、たん白微粒子製剤の調製と滅菌が同時に行える可能性を示唆する。

6. 超臨界流体を利用したたん白質微粒子製剤

超臨界流体を利用したたん白質の微粒子化は、1993年にYeoらによってはじめて報告された。Yeoらは、DMSOなどにインスリンを溶解し、GAS法により超臨界二酸化炭素中で微粒子化した。得られた粒子の90%以上が4 μm 以下であった。溶解後ラット皮下注射時の血糖値低下はnativeインスリンと同程度であった²¹⁾。その後前述したWintersらの研究をはじめ、種々のたん白質の微粒子製剤が調製されている。しかし、得られた微粒子製剤の吸入剤としての有用性を、in vitroとin vivoの両面から検討した研究はほとんどない。

吸入剤の有効性は、吸入器からヒトが吸入した際に製剤が肺深部に到達する割合と、薬物が肺局所で吸収される割合で決まる。当研究室では、インスリンをモデル薬物に選び、超臨界二酸化炭素晶析法により微粒子製剤を調製している (Fig. 2)²²⁾。

インスリン微粒子製剤は、超臨界二酸化炭素を貧溶媒として用い、DMSO試料溶液からMI SCF製剤 (マンニトール/インスリン質量比: 20/1) を、水溶液からMIC SCF製剤 (マンニトール/インスリン/クエン酸質量比: 20/1/0.8) を調製した。クエン酸は、インスリンの経肺吸収を促進することから²³⁾、吸収促進

Fig. 2 Supercritical carbon dioxide apparatus for powder preparation

剤として添加した。水溶液を用いる場合は、二酸化炭素と水の混合を助ける補助溶媒として、少量のエタノールをあらかじめ二酸化炭素に添加した。また、同組成の製剤を噴霧乾燥法でも調製した (MI SDおよびMIC SD)。

超臨界二酸化炭素晶析法での回収率 (>80%) は、噴霧乾燥法 (~50%) と比較して高かった。Fig. 3は、調製した製剤のSEM写真を示している。SCF製剤は長方形の形状を示しており、SD製剤は丸みを帯びた製剤が回収された。SCF製剤のうちSCF MIC製剤は、SCF MI製剤と比較して短辺、長辺共に短い製剤が回収された。製剤の粒子径をTable 1にそれぞれ示した。

インスリン微粒子製剤中の理論的インスリン力価は、MI製剤で、1.33unit/mg、MIC製剤で1.28unit/mgとなる。MI SCF製剤、MIC SD製剤及びMIC SCF製剤は製剤中インスリン力価がほぼ理論値

Fig. 3 Scanning electron micrographs of insulin dry powders
(a) MI SCF, (b) MIC SCF, (c) MI SD and (d) MIC SD

Table 1 Physical characteristics of insulin powders^a

Formulation Code	LMS-30 ^b (μm)	MMAD ^c (μm)	OE ^d	RF ^e
MI SCF	21.8 $\pm$ 0.6	6.4 $\pm$ 0.10	0.718 $\pm$ 0.014	0.266 $\pm$ 0.007
MIC SCF	11.9 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.10	0.778 $\pm$ 0.006	0.476 $\pm$ 0.021
MI (susp.) SD	5.71 $\pm$ 0.10	4.7 $\pm$ 0.1	0.874 $\pm$ 0.006	0.306 $\pm$ 0.040
MIC SD	7.24 $\pm$ 0.15	4.4 $\pm$ 0.1	0.822 $\pm$ 0.005	0.300 $\pm$ 0.008

^a Data are represented as Mean $\pm$ S.E for 3 successive measurements^b Laser micron sizer (LMS-30)^c Mass median aerodynamic diameter^d Out put efficacy (ratio of total powder mass exiting from capsule and device)^e Respirable fraction (ratio of the drug mass on the respirable fraction (under 7.0 μm) of the impactor divided by emitted dose)**Table 2** AUC for intratracheal administration of dry insulin powder in rats

Formulation code	AUC ₀₋₃₆₀ $\times 10^{-3}$ (% / unit $\times$ min) ^{ab}	Insulin potency ^c (unit / mg)	Insulin dose ^a (unit / rat)	n
MI SCF	4.5 $\pm$ 0.2	1.3	1.70 $\pm$ 0.09	4
MIC SCF	6.6 $\pm$ 0.4	1.3	1.63 $\pm$ 0.14	5
MI (susp.) SD	2.9 $\pm$ 0.7	0.82	1.24 $\pm$ 0.09	3
MIC SD	6.0 $\pm$ 0.5	1.3	1.54 $\pm$ 0.15	3

^a Mean $\pm$ S.E.^b Significant difference ($p < 0.05$) was observed for (MI (susp.) SD vs MI SCF) and (MI SCF vs MIC SD)Significant difference ($p < 0.01$) was observed for (MI (susp.) SD vs MIC SD), (MI (susp.) SD vs MIC SCF) and (MI SCF vs MIC SCF)^c The amount of insulin (unit) in one mg of the powder

を示した (Table 2)。しかしながら、MI SD 製剤は理論値より低い値を示した。

超臨界二酸化炭素晶析法及び噴霧乾燥法により調製した製剤中インスリン凝集物の生成の有無を、SDS-PAGE 法で確認した (Fig. 4)。インスリン原末のインスリンバンドは、3kDaに見られ、これはインスリン A鎖及びB鎖のバンドと一致した。一方、60℃/Dry 条件下で10日間保存した製剤のSDS-PAGE 結果は、インスリン凝集物のバンドが見られた。インスリン原末と同様に、調製された製剤はインスリン凝集物が見られなかった。

物理混合して調製した製剤と比較して、SCF 製剤及びSD 製剤は結晶性が低下した (Fig. 5)。また、噴霧乾燥法により調製したMIC 製剤及び超臨界二酸化炭素晶析法により調製したMI SCF、MIC SCF 製剤ではマンニトールが結晶転移 (β 型)を示し、噴霧乾燥法により調製したMI SD 製剤では α 型を示した。また、MI 製剤およびMIC 製剤共にSD 製剤、SCF 製剤の結晶性は同程度であった。

Fig. 4 SDS-PAGE

(a) molecular weight marker, (b) insulin standard, (c) insulin stored at 60℃/dry for 10days, (d) MI (susp.) SD, (e) MI SCF, (f) MIC SD, (g) MIC SCF

デバイスとしてジェットヘラー (日立ユニシアオートモティブ, 厚木) を用い、調製した製剤の in vitro 吸入特性をカスケードインパクターにより検討した (Fig. 6)。In vitro 吸入特性 (製剤放出率 (OE

Fig. 5 Powder X-ray diffraction patterns
(a) mannitol (α form),
(b) mannitol (β form),
(c) MI SD physical mixture,
(d) MIC SD physical mixture,
(e) MI (susp.) SD, (f) MI SCF,
(g) MIC SD and (h) MIC SCF

値), 肺深部到達率 (RF 値), 空気力学的粒子径) を Table 1 に示した。空気力学的粒子径は, 超臨界二酸化炭素晶析法および噴霧乾燥法により調製した製剤とも, 肺適用製剤として有用な $7\mu\text{m}$ 以下となった (Table 1)。また, MIC SCF 製剤においては, 他の製剤と比較して Stage2 以降への到達率が増大し, 空気力学的粒子径は $3.2\mu\text{m}$ となった。しかしながら, MI SCF 製剤は, 空気力学的粒子径は $7\mu\text{m}$ 以下となったものの, 他の SD 製剤及び MIC SCF 製剤と比較して Stage 0, 1 への到達量が多くなった。

インスリン微粒子製剤の有効性を, 製剤ラット肺内投与後の血糖値低下作用を調べることで評価した (Fig. 7)。MI SD 製剤を肺内投与した際の血糖値低下作用には30分の time lag が見られ, ゆっくりとした血糖値低下作用が見られた。MI SD 製剤とは異なり, MI SCF 製剤では肺内投与後速やかな血糖値低下作用が見られ, MI SCF 製剤肺内投与後の血糖値低下作用

Fig. 6 In vitro inhalation properties of dry insulin powders evaluated with cascade impactor

Fig. 7 Profiles of plasma glucose levels following intratracheal administration of dry insulin powder in rat lung. $\circ$; MI (susp.) SD, $\triangle$; MI SCF, ∇ ; MIC SD and $\square$; MIC SCF. Insulin doses are shown in Table 2. Each point represents the mean $\pm$ S.E. ($n = 3 \sim 5$). Significant difference ($p < 0.05$) was observed for (#) MI (susp.) SD vs MI SCF, (+) MI (susp.) SD vs MIC SD, (\$) MI (susp.) SD vs MIC SCF, and (®) MI SCF vs MIC SCF.

は, MI SD 製剤と比較して製剤投与 30, 60, 90, 120 分後で有意に高い値を示した。また, 製剤肺内投与 360 分までの AUC は, MI SCF 製剤は MI SD 製剤と比較して 1.5 倍高くなった。MIC SCF 製剤及び MIC SD 製剤は, 製剤中に含有されるクエン酸の効果により MI SD 製剤よりも速やかな血糖値低下作用が見られた。MIC SCF 製剤と MIC SD 製剤の経肺投与後の ΔGlc -時間曲線はほぼ一致し, AUC 値もほぼ同様な値を示した。

MI SD 製剤はインスリン懸濁液から調製され, MI SCF 製剤はインスリン溶液から調製した。そこで, 微粒子製剤調製時の試料溶液中インスリン状態が吸収性に及ぼす影響について検討するため, インスリン溶液から噴霧乾燥法により MI SD 製剤を調製し (マンニトール: インスリン質量比 95:5), ラット肺内投与後の血糖値低下作用について検討した。しかし, MI SCF 製剤は MI SD 製剤より高い吸収性を示したことから, SCF 製剤が高い吸収性を示した原因についてさらに検討する必要がある。

一方, MIC SCF 製剤は, MIC SD 製剤と比較して血糖値の変化及び AUC に差が見られなかった。吸収促進剤としてクエン酸を含有した製剤は, 投与後血糖値を速やかに下げるため, SCF 製剤と SD 製剤で差が見られなくなったと考えられる。しかし, SCF 製剤と SD 製剤の AUC (Table 2) を 2 元配置分散分析

法にて検定した結果、有意な差が見られたことから ($p < 0.05$), 超臨界二酸化炭素晶析法は吸入用微粒子製剤の調製方法として有用であることが示唆された。

吸収実験に用いたラット肺内に微粒子製剤を直接投与する方法は、実際に製剤を吸入する場合と異なり、カプセル、デバイス及び咽頭に付着する製剤さえも吸収部位である肺深部に投与できるため、比較的粒子径の影響を受けにくい。したがって、微粒子製剤の *in vitro* の吸入特性の指標である OE 値 (デバイスから放出される製剤の割合) 及び RF 値 (放出された製剤のうち肺深部に到達されるといわれる空気粒子径 $7\mu\text{m}$ 以下の粒子の割合) (Table 1) と, *in vivo* の吸収性の指標である AUC 値 (Table 2) の積 ($\text{OE} \times \text{RF} \times \text{AUC}$) は、インスリン製剤の治療効果を示すパラメータとして有用であると考えられる。MI SCF 製剤, MIC SCF 製剤, MI SD 製剤, MIC SD 製剤はそれぞれ 0.86, 2.5, 0.77 及び $1.5 (\times 10^3 \text{ \% / unit} \times \text{min})$ を示し、同じ処方の製剤では SCF 製剤が SD 製

剤と比較して有効であることが示された。また、MI SCF 製剤は吸入特性 (OE 値, RF 値) が SD 製剤と比較して劣っていたため、MI SCF 製剤の吸入特性を改善する必要がある、吸入特性を改善することによりさらにインスリン吸収性を改善することが出来る可能性が示唆された。

7. ま と め

2006 年 1 月に欧州と米国で相次いで糖尿病治療薬インスリンの吸入剤が製造承認され、高分子医薬の吸入用微粒子製剤化に対する期待が高まっている。超臨界流体による高分子薬物の微粒子化の歴史はまだ浅いが、ワンステップで高機能な微粒子が調製可能であり、また、スケールアップによる品質の変動が少ないと考えられている²⁴⁾。さらに、装置を工夫することで製剤の滅菌も調製と同時に可能であり、新規高分子吸入剤の開発に、超臨界晶析法は有望であると考えられる。

References

- 1) Okamoto, H.: "Design of particles with supercritical fluids", *Powder Sci. Technol.*, **35**, No. 11, 45-52 (2003)
- 2) Merisko-Liversidge, E., G. G. Liversidge and E. R. Cooper: "Nanosizing: A formulation approach for poorly-water-soluble compounds", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **18**, 113-120 (2003)
- 3) Gosselin, P. M., R. Thibert, M. Preda and J. N. McMullen: "Polymorphic properties of micronized carbamazepine produced by RESS", *Int. J. Pharm.*, **252**, 225-233 (2003)
- 4) Van Nijlen, T., K. Brennan, G. Van den Mooter, N. Blaton, R. Kinget and P. Augustijns: "Improvement of the dissolution rate of artemisinin by means of supercritical fluid technology and solid dispersions", *Int. J. Pharm.*, **254**, 173-181 (2003)
- 5) Kerc, J., S. Srcic, Z. Knez and P. Sencar-Bozic: "Micro-nization of drugs using supercritical carbon dioxide", *Int. J. Pharm.*, **182**, 33-39 (1999)
- 6) Reverchon, E., G. Della Porta and P. Pallado: "Supercritical antisolvent precipitation of salbutamol micro-particles", *Powder Technol.*, **114**, 17-22 (2001)
- 7) Falk, R., T. W. Randolph, J. D. Meyer, R. M. Kelly and M. C. Manning: "Controlled release of ionic compounds from poly (L-lactide) microspheres produced by precipitation with a compressed antisolvent", *J. Controlled Release*, **44**, 77-85 (1997)
- 8) Elvassore, N., A. Bertucco and P. Caliceti: "Production of Protein-Loaded Polymeric Microcapsules by Compressed CO_2 in a Mixed Solvent", *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**, 795-800 (2001)
- 9) Mishima, K., K. Matsuyama, D. Tanabe, S. Yamauchi, T. J. Young and K. P. Johnston: "Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent", *AIChE J.*, **46**, 857-865 (2000)
- 10) Ribeiro Dos Santos, I., J. Richard, B. Pech, C. Thies and J. P. Benoit: "Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process", *Int. J. Pharm.*, **242**, 69-78 (2002)
- 11) Huang, P., A. Dong and W. S. Caughey: "Effects of dimethyl sulfoxide, glycerol, and ethylene glycol on secondary structures of cytochrome c and lysozyme as observed by infrared spectroscopy", *J. Pharm. Sci.*, **84**, 387-391 (1995)
- 12) Ishikawa, H., M. Shimoda, A. Yonekura, K. Mishima, K. Matsumoto and Y. Osajima: "Irreversible unfolding of myoglobin in an aqueous solution by supercritical carbon dioxide", *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 4535-4539 (2000)
- 13) Zagrobelny, J. A. and F. V. Bright: "In situ studies of protein conformation in supercritical fluids: trypsin in carbon dioxide", *Biotechnol. Prog.*, **8**, 421-423 (1992)
- 14) Toews, K. L., R. M. Shroll, C. M. Wai and N. G. Smart: "pH-Defining Equilibrium between Water and Supercritical CO_2 . Influence on SFE of Organics and Metal Chelates", *Anal. Chem.*, **67**, 4040-4043 (1995)
- 15) Sellers, S. P., G. S. Clark, R. E. Sievers and J. F. Carpenter: "Dry powders of stable protein formulations from aqueous solutions prepared using supercritical CO_2 -assisted aerosolization", *J. Pharm. Sci.*, **90**, 785-797 (2001)
- 16) Tservistas, M., M. S. Levy, M. Y. Lo-Yim, R. D. O'Kennedy, P. York, G. O. Humphrey and M. Hoare:

- "The formation of plasmid DNA loaded pharmaceutical powders using supercritical fluid technology", *Biotechnol. Bioeng.*, **72**, 12-18 (2001)
- 17) Taniguchi, M., M. Kamihira and T. Kobayashi: "Effect of treatment with supercritical carbon dioxide on enzymatic activity", *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 593-594 (1987)
 - 18) Winters, M. A., B. L. Knutson, P. G. Debenedetti, H. G. Sparks, T. M. Przybycien, C. L. Stevenson and S. J. Prestrelski: "Precipitation of proteins in supercritical carbon dioxide", *J. Pharm. Sci.*, **85**, 586-594 (1996)
 - 19) Dillow, A. K., F. Dehghani, J. S. Hrkach, N. R. Foster and R. Langer: "Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide", *Proc. Nat. l Acad. Sci. USA*, **96**, pp. 10344-10348 (1999)
 - 20) Fages, J., B. Poirier, Y. Barbier, P. Frayssinet, M. L. Joffret, W. Majewski, G. Bonel and D. Larzul: "Viral inactivation of human bone tissue using supercritical fluid extraction", *ASAIO J.*, **44**, 189-193 (1998)
 - 21) Yeo, S. -D., G. -B. Lim, P. G. Debenedetti and H. Bernstein: "Formation of microparticulate protein powders using a supercritical fluid antisolvent", *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 341-346 (1993)
 - 22) Todo, H., H. Okamoto, K. Iida and K. Danjo: "Improvement of insulin absorption from intratracheally administrated dry powder prepared by supercritical carbon dioxide process", *J. Pharm. Sci.*, **92**, 2475-2486 (2003)
 - 23) Todo, H., H. Okamoto, K. Iida and K. Danjo: "Effect of additives on insulin absorption from intratracheally administered dry powders in rats", *Int. J. Pharm.*, **220**, 101-110 (2001)
 - 24) Shariati, A. and C. J. Peters: "Recent developments in particle design using supercritical fluids", *Cur. Opinion Solid State Mater. Sci.*, **7**, 371-383 (2003)