*Journal of the Korean Chemical Society*
**2003**, *Vol. 47, No. 6*
Printed in the Republic of Korea

# Poly(DL-lactide-co-glycolide) 나노입자의 표면 수식

오유미 · 정택규 · 지상철† · 신병철*
한국화학연구원 화학소재부
†성균관대학교 약학대학
(2003. 7. 1 접수)

# Surface Mmodification of Poly(DL-lactide-*co*-glycolide) Nanoparticle

**Yu Mi Oh, Taek Kyu Jung, Sang Cheol Chi†, and Byung Cheol Shin***
*Advanced Materials Division, Korea Research Institute of Chemical Technology,*
*100 Jang Dong, Yusong, Daejon 305-343, Korea*
*†College of Pharmacy, SungKyunKwan University, 300 chunchun Dong, Jangan, Suwon, Kyonggi-Do 440-746, Korea*
(Received July 1, 2003)

**요 약.** 생분해성 고분자인 poly(DL-lactide-co-glycolide)(PLGA)를 자발적 유화용매 확산(spontaneous emulsification solvent diffusion, SESD)법을 이용하여 표면이 양이온으로 수식된 나노입자로 제조하고 그 특성을 조사하였다. 고분자 용액은 에탄올과 아세톤의 이종 혼합 용매를 사용하였고, 유화제는 양이온성 유화제인 cetyltrimethylammonium chloride(CTAC), tetradecyltrimethylammonium bromide(TTAB)와 비이온성 유화제인 polyethylene glycol-block-polypropylene glycol 공중합체(Lutrol F68)를 사용하였다. 제조한 입자에 결합한 백신은 인플루엔자($H_3N_2$, $H_1N_1$, B strain)이었고 입자에 대한 백신의 코팅 양은 NHS-fluorescein을 사용하여 확인하였다. 양이온성과 비이온성 유화제가 표면에 수식된 입자의 크기는 160-180 nm와 80-90 nm이었고 제타포텐셜은 50~60 mV, -10 mV이었다. 백신 코팅 후 입자의 크기는 양이온성이 380-400 nm, 비이온성은 별다른 크기 변화가 없었다. 양이온이 수식된 입자에 코팅된 백신의 양은 22.73 μg/mg이었다.

**주제어:** PLGA, 나노입자, 양이온성 유화제, 백신, 표면 수식

**ABSTRACT.** We studied on preparation of nanoparticles modified surface using biodegradable polymer, poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA). Two kinds of PLGA nanoparticles were prepared by a spontaneous emulsification solvent diffusion (SESD) method using cetyltrimethylammonium chloride (CTAC) and tetradecyltrimethylammonium bromide (TTAB) as a cationic surfactant and polyethylene glycol-block-polypropylene glycol copolymer (Lutrol F68) as a non-ionic surfactant. Model protein was coated on the surface of nanoparticles by the ionic complexation. The model protein was that influenza vaccine ($H_3N_2$, $H_1N_1$, B strain) labeled with NHS-fluorescein. The sizes of cationic nanoparticles were 140-160 nm and the surface charges were 50-60 mV. The sizes of nonionic nanoprticles were 80-90 nm and the surface charge was -10 mV. After coating vaccine on the surface of nanoparticles, the sizes of cationic nanoparticles were increased to 380-400 nm and the size of nonionic nanoparticles was not increased. The amount of coated vaccine on the cationic nanoparticles was 22.73 μg/mg.

**Keywords:** PLGA, Nanoparticle, Vaccine, Cationic Surfactant, Surface Modification

## 서 론

최근에 생물공학의 발전에 힘입어서 효소, 백신, 펩타이드 등의 단백질 약물이 의약학적으로 관심의 대상이 되고 있다. 이러한 단백질류 약물들은 적은 양으로도 큰 약리효과를 기대할 수 있는 장점을 가지고 있다. 하지만 생체 내에서의 짧은 반감기와 불안정성 때문에 약물의 적절한 혈중농도의 유지를 위해서는 자주 투약해야 하는 단점을 가지고 있다. 이러한 단점을 극복하여 1회 투여로도 적절히 약물농도를 유지시켜 약물의 부작용을 감소시키고 효과적인 치료효과를 얻을 수 있는 지속성 제어 방출을 위한 제형이 그 관심 대상 중의 하나이다. 이러한 지속성 제어 방출을 위한 기구의 하나로 나노입자를 이용한 약물전달 방식이 많이 응용되어 지고 있다.[1-2] 나노입자는 Speiser의 그룹에서 연구가 시작되었으며,[3] 이들은 주로 emulsion polymerization 법으로 항암제를 함유한 polyalkylcyanoacrylate 나노입자를 제조하여 주사제로서의 가능성을 검토하였다.[4-6] 최근에 나노입자는 경구 약물 전달의 전달체로도 연구가 진행되고 있다. 나노입자는 제조방법에 따라 10-1000 nm의 다양한 크기를 제조할 수 있어[7-8] 주사제를 통한 긴 순환계 및 항암제의 표적화, 생체이용률이 낮은 약물들의 흡수 개선, 백신 전달, 유전자 전달 등의 다양한 목적의 약물송달 시스템으로 널리 사용되고 있다.[9-11] 이러한 나노입자는 다양한 고분자를 이용하여 제조되고 있으며 입자의 화학적 또는 물리적 표면 수식을 통하여 다양한 특성을 가지는 입자를 제조할 수 있는 것으로 알려져 있다.[12-13] 특히 이러한 고분자 중에서도 생체 내에서 분해 되는 생분해성 고분자들을 이용한 많은 연구가 진행되어 오고 있다. 고분자 소재 중의 하나인 poly (lactide-*co*-glycolide)(PLGA)는 우수한 생체적합성과 생분해성으로 인하여 마이크로 입자 또는 나노입자의 형태로서 약물전달이나 백신 전달체로서 활용가능성이 큰 것으로 알려져 있다.[14-16] 자발적 유화용매 확산(spontaneous emulsification solvent diffusion, SESD)법은 PLGA 입자를 제조하는 대표적인 방법 중의 하나로, 유화-확산 과정을 통하여 PLGA 입자 표면에 유화제를 코팅함으로써 안정적인 입자를 형성시키는 방법으로 보고되어 있다.

본 연구에서는 자발적 유화용매 확산법을 이용하여 표면이 유화제로 수식된 PLGA 입자를 제조하는데 있어서의 고분자와 유화제 농도 변화에 따른 입자 형성 과정의 영향을 조사하였다. 또한, PLGA 입자는 양이온성 유화제와 비이온성 유화제를 사용하여 입자 표면이 수식되도록 제조하고 이에 대한 표면분석은 ATR-IR과 ESCA로 확인하였다. 모델 단백질로서 인플루엔자 백신을 사용하였고, 표면이 수식된 나노입자와 백신의 결합 반응성은 입자분석기와 형광광도계를 사용하여 비교하였다. 이상과 같이 비이온 또는 양이온으로 표면이 수식된 PLGA 입자는 백신과 같은 단백질 전달체로서의 가능성을 알아보고자 하였다.

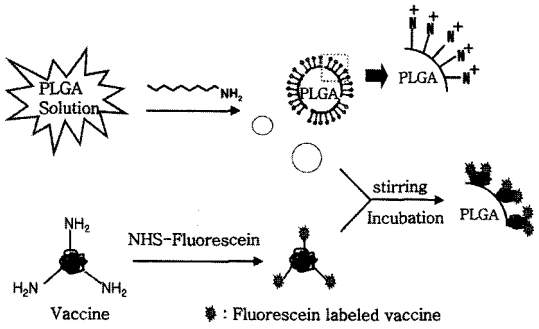
## 실 험

### 시약 및 재료

고분자는 분자량이 50,000-75,000이고 공동 단량체의 비율이 85:15인 PLGA를 Aldrich Co.(WI, USA)에서 구입하여 그대로 사용하였다. 유화제로 사용된 cetyltrimethylammonium chloride(CTAC), tetradecyltrimethylammonium bromide(TTAB), 5(&6)-Carboxyfluorescein, N-succinimydyl Ester(NHS-fluorescein), Dimethyl Sulfoxide (DMSO)와 phosphate-buffered saline(PBS)는 Sigma Chemical Co.(MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. polyethylene glycol-block-polypropylene glycol 공중합체(Lutrol F68)는 BASF(Ludwigshafen, Germany)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액 sodium bicarbonate (SBC)는 동양화학에서 구입하여 사용하였다. 백신은 인플루엔자($H_3N_2$, $H_1N_1$, B strain)를 동신제약에서 공급받았다. 에탄올과 아세톤은 일급 또는 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

### PLGA 나노입자의 제조

PLGA 나노입자는 자발적 유화용매 확산법에 의하여 다음과 같은 과정을 통하여 제조되었다. 우선, PLGA 50 mg을 아세톤과 에탄올이 6:4의 비율로 혼합된 용매 5 ml에 용해시켜 1% w/v의 PLGA 용액을 제조하였다. 유화제는 양이온성 유화제로써 CTAC, TTAB를 사용하였으며 비이온성 유화제로써 Lutrol F68을 사용하였고, 유화제의 농도는 각각 1, 2, 4, 8% w/v로 제조하였다. 제조한 PLGA 용액은 유화제 수용액 20 ml에 서서히 첨가시키면서 Ultrasonicator(Model500, Fisher scientific, USA)를 사용하여 분산 및 교반시켰다. 이 때, 초음파의 진동수는 20 kHz였고 진동강도는 12 watts였다. 정제 과정은 아세톤과 에탄올을 제거하기 위한 방법으로 제조한 유화용액에 증류수를 첨가하여 희석한 후 한외여과 장치를 사용하여 실시하였고 이 과정은 3회 반복하였다.




*Scheme* 1. Schematic illustration for preperation of PLGA nanoparticles with cationic surfactant and labeled vaccine (HA).

### PLGA 입자에 백신 코팅

백신은 50 mM SBC 완충용액에 1 mg/ml의 농도로 용해시킨 후, 그 용액에 NHS-fluorescein(0.1 mg/ml DMSO)을 50 μl 가한 다음 2시간 동안 4 ℃ 이하에서 교반하였다. 반응이 종료된 후, 백신과 결합하지 않은 NHS-fluorescein을 제거하기 위해 막투석(MWCO 3500)을 4 ℃에서 48시간 이상 실시하였다. 백신이 표면에 코팅된 PLGA 나노입자를 얻기 위해 각각의 유화제(CTAC, TTAB와 Lutrol F68)로 만들어진 PLGA 입자 수용액(pH7)은 NHS-fluorescein이 결합된 백신을 서서히 첨가하면서 4 ℃에서 3시간 동안 교반하였다. *Scheme* 1은 제조한 양이온성 PLGA 입자에 백신이 코팅되는 과정을 나타낸 것이다. PLGA 입자와 백신의 결합반응 과정에서 입자에 코팅되지 않은 잔류 백신의 제거는 원심분리기(Centrifuge 5415D, Eppendorf, Germany)를 사용하였다. 원심분리 방법은 15000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 분리된 용액의 상등액을 버리고 PBS로 세척하였으며 이 과정을 3회 반복하였다.

### PLGA 입자의 분석

입자의 크기와 분산도는 PLGA와 각각의 유화제를 사용하여 제조한 입자 용액에 증류수를 5배 희석하여 측정하였다. 입자 크기의 측정은 90°의 산란각과 25 ℃의 온도에서 실시하였다. 제타포텐셜과 이동도는 PLGA 입자 용액에 증류수를 10배 희석하여 측정하였다. 제타포텐셜 측정은 25 ℃의 온도에서 일정한 pH 조건하에서 실행하였다. 제조한 PLGA 입자의 크기, 분산도, 제타포텐셜과 이동도는 전기영동광산란측정기(Electrophoretic light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otsuka Electronics, Japan)를 사용하여 측정하였다.

### PLGA 입자의 표면 분석

PLGA 입자 표면에 양이온의 코팅 여부는 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, Unitied Kingdom)를 이용하여 확인하였다. 제조한 PLGA 입자는 수용액 상태이므로 물을 제거하기 위해 동결건조를 실시하였다. -20 ℃ 이하의 냉동실에서 동결시킨 후 동결건조기(FD5505S, Ilshin Lab. Korea)에서 3일 동안 건조하였다. 대조시료로 비이온성 유화제인 Lutrol F68을 사용하여 제조한 PLGA 입자와 비교하여 분석하였다.

### PLGA 입자에 코팅된 백신의 양 측정

코팅된 백신의 양을 측정하기에 앞서 제조한 양이온성 입자와 백신간의 결합 생성 여부는 광밀도를 측정하여 확인하였다. 광밀도는 제조한 양이온성과 비이온성 입자에 각각 백신을 첨가한 후, UV spectrometer(UV MINI 1240, Shimadzu scientific, Japan)를 이용하여 450 nm의 파장에서 시간에 따라 측정하였다. 한편, PLGA 입자에 결합된 백신의 양은 백신 말단기에 도입한 fluorescein의 형광강도를 측정하여 정량하였다.[17] 형광강도는 NHS-fluorescein을 백신의 말단기에 도입한 후, 백신을 PLGA 입자에 코팅하고 fluorescence spectrophotometer (FM109530-33, Barnstead Co. USA)를 이용하여 방출파장 518 nm, 흡수파장 491 nm에서 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### PLGA 나노입자

*Fig.* 1은 PLGA의 농도를 변화시켜 나노입자를 제조했을 때 입자 크기의 변화를 나타낸 것이다. 제조한 입자의 크기는 PLGA의 농도가 1, 2, 4% w/v로 높아질수록 증가하였다. 유화-확산법에서 PLGA의 농도 조건은 입자크기에 영향을 주는 중요한 인자중의 하나로 알려져 있다.[18,19] PLGA의 농도가 증가할수록 입자의 크기가 뚜렷하게 증가하는 것은 유화제가 함유된 수용액 속에서 PLGA 용액이 분산될 때 PLGA의 농도 증가에 따라 형성된 에멀젼 방울들의 밀도가 높아져서 입자간의 뭉침 현상이 일어나는 것으로 생각되어 진다. 이러한 결과는 입자 크기와 수율을 PLGA의 농도에 의하여 조절될 수 있으며, 100 nm 정도의 입자를 얻을 수 있는 최적의 조건은 1% PLGA와 2% 유화제의 농도 조

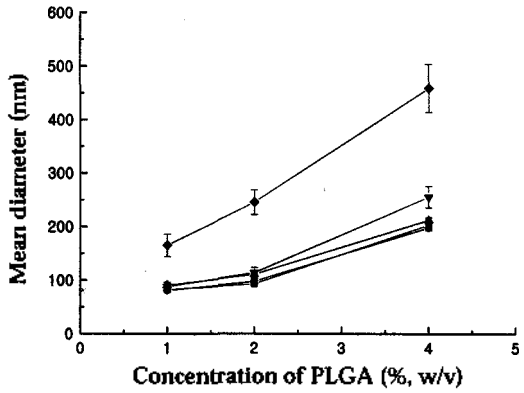



*Fig.* 1. Mean diameter of PLGA nanoparticles with a variation of concentration of PLGA. (surfactant concentration (% w/v) : -■- 1, -●- 2, -▲- 4, -▼- 8, -◆- 16).

건이었다.

*Table* 1은 고분자 용액의 농도를 1% w/v로 고정시키고 양이온성 유화제인 CTAC, TTAB와 비이온성 유화제인 Lutrol F68의 농도를 1, 2, 4, 8% w/v로 각각 변화시키면서 PLGA 입자를 제조하여 입자의 크기와 분포도를 비교한 결과이다. CTAC와 TTAB로 만들어진 입자의 크기는 140-160 nm 이었고, Lutrol F68로 만들어진 입자의 크기는 80-90 nm 이었다. 이 입자들은 모두 1-2 사이의 안정된 분포도를 보였다. 보고 된 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.[20] 이 결과는 1~8% w/v 사이의 유화제 농도 범위에서 유화제 농도 변화에 따른 입자 크기에 대한 영향이 가장 적은 것으로 나타났다. 즉, 사용된 유화제들이 1~8% w/v 농도 범위에서 에멀젼 방울의 효과적인 분산과 안정성이 확보되었기 때문인 것으로 사료된다.

*Table* 2는 각각의 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 제타포텐셜과 이동도를 비교한 결과이다. 입자의 제타포텐셜은 양이온성 입자들이 50-70 mV의 범위를, 비이온성 입자가 -10 mV 내외의 범위를 보였다. 양이온성 유화제로 제조한 입자의 표면은 양전하로 하전되고, 비이온성 유화제로 제조한 입자는 약한 음전하로 하전 되어 있음을 알 수 있었다. 비이온성 유화제가 도입되어 약한 음전하를 띠는 PLGA 입자에 비해, 양이온성 유화제가 도입되어 암모늄기를 포함하는 PLGA 입자는 백신과 같은 단백질에 포함된 카르복실기와 이온 결합에 의한 반응성이 증가할 수 있을 것으로 예측된다. 실험을 통하여 얻은 여러 가지 조건 중에서 입자의 크기, 제타포텐셜과 안정성을 고려해 볼 때 1% w/v PLGA 용액과 2% w/v 유화제의 농도가 가장 적절한 것으로 관찰되었고, 이것으로 비이온 또는 양이온이 입자 표면에 수식된 PLGA 입자가 제조되었음을 추측할 수 있었다.

### PLGA 입자의 표면 분석

*Fig.* 2는 양이온성 유화제와 비이온성 유화제를 각각 사용하여 PLGA 입자를 제조한 후, 생성된 입자의 표

*Table* 1. Mean diameter and polydispersity of PLGA nanoparticles with various surfactants

| Concentration of Surfactant (% w/v)[a] | Mean Diameter (nm) | | | Polydispersity Index | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CTAC | TTAB | Lutrol F68 | CTAC | TTAB | Lutrol F68 |
| 1 | 158.7 | 154.9 | 82.3 | 1.1 | 2.0 | 1.4 |
| 2 | 146.2 | 142.9 | 80.7 | 1.4 | 1.1 | 1.7 |
| 4 | 161.9 | 159.8 | 90.3 | 1.8 | 2.0 | 1.8 |
| 8 | 168.4 | 165.3 | 88.4 | 1.8 | 2.0 | 1.1 |

[a]Concentration of PLGA: 1% w/v

*Table* 2. Zeta potential and mobility of PLGA nanoparticles with various surfactants

| Concentration of Surfactant (% w/v) | Zeta Potential (mV) | | | Mobility ($cm^2/Vs$, $10^{-4}$) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CTAC | TTAB | Lutrol F68 | CTAC | TTAB | Lutrol F68 |
| 1 | 54.5 | 65.0 | −8.1 | 4.2 | 4.9 | −1.0 |
| 2 | 49.3 | 45.6 | −13.1 | 3.8 | 3.5 | −1.7 |
| 4 | 56.5 | 51.9 | −14.3 | 4.4 | 4.0 | −0.8 |
| 8 | 71.3 | 53.0 | −14.5 | 5.6 | 4.1 | −0.7 |

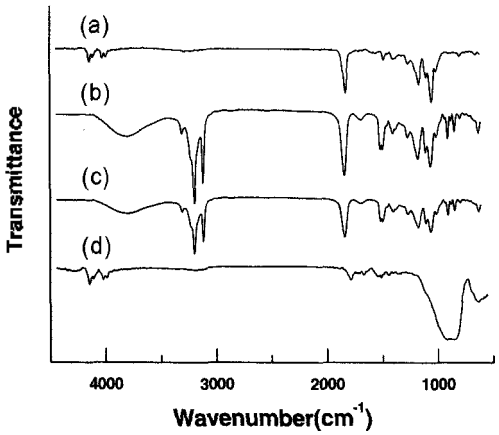



*Fig.* 2. ATR-IR spectrum of PLGA nanoparticles prepared with various surfactant by the SESD method. (a) PLGA (b) CTAC coated PLGA nanoparticles, (c) TTAB coated PLGA nanoparticles, (d) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

면에 유화제가 코팅되어 있는지를 확인하기 위하여 ATR-IR spectroscopy를 이용하여 비교 분석한 결과이다. *Fig.* 2의 (a)는 유화제를 사용하지 않은 PLGA 자체의 스펙트럼으로써, 1800 $cm^{-1}$ 부근에서 카르보닐 그룹의 특성 피크를 보여주고 있다. (b)는 양이온성 유화제, CTAC를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 스펙트럼으로써 1800 $cm^{-1}$ 부근에서 PLGA의 카르보닐 그룹의 피크, 1500-1600 $cm^{-1}$ 부근에서 N-H 피크와 3000 $cm^{-1}$ 부근에서 C-H 특성 피크를 모두 보여주고 있다. (c)는 양이온성 유화제, TTAB를 사용한 경우로서 CTAC의 결과와 동일한 결과를 나타내고 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 F68에서 나타나는 C-O 단일결합에 의한 피크가 강하게 나타나 있다. 양이온성 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 ATR-IR 표면 분석 결과는 CTAC와 TTAB의 특성 피크인 N-H가 나타남으로써 입자 표면에 CTAC와 TTAB가 코팅되어 있음을 보여주었다. 또한, 비이온성 유화제를 사용하여 제조한 PLGA 입자의 ATR-IR 표면 분석 결과도 Lutrol F68의 특성 피크인 C-O피크가 나타남으로서 입자 표면에 Lutrol F68이 코팅되어 있음을 보여주었다. 이와 같은 결과로 제조한 입자의 표면이 유화제로 수식되어 있음을 확인하였다.

*Table* 3은 ESCA를 측정하여 각각의 입자 표면에 존재하는 원소의 비율을 나타낸 결과이다. (a)는 PLGA, (b)는 CTAC로 제조한 양이온성 PLGA 입자, (c)는 TTAB로 제조한 양이온성 PLGA 입자이고 (d)는 Lutrol F68로 제조한 비이온성 PLGA 입자의 표면 원소를 비교한 것이다. PLGA를 측정한 (a)는 C가 41.6%, O가 58.4%를 보여 주고 있으나, CTAC로 제조한 양이온성 입자를 측정한 (b)는 C의 비율이 86.8%로 커지고 O가 8.1%로 줄어들고 이외에도 N과 Cl이 3.4%, 2.6%를 각각 나타냈다. (c)는 TTAB로 제조한 양이온성 입자 표면의 원소비율로 (c)에서 C의 비율이 87.8%, O가 7.2%, N이 2.9%, Br이 2.0%로 나타났고, (d)의 Lutrol F68로 제조한 비이온성 입자의 비율은 O가 30.0%, C가 70.0%로 나타났다. CTAC와 TTAB로 제조한 입자의 표면에는 PLGA에 없던 N이 생성되고 C의 비율이 증가하였다. 입자의 표면에 양이온성 유화제를 주로 구성하고 있는 알킬 그룹의 C, 암모늄그룹에서 기인한 N의 원소들, 말단기에 존재하는 Cl과 Br이 나타난 것으로 보아 PLGA 입자의 표면에 CTAC와 TTAB가 코팅되어 있다고 사료된다. Lutrol F68도 알킬그룹에서 기인한 C의 증가로

*Table* 3. Surface analysis of PLGA and PLGA nanoparticles by ESCA. (a) PLGA, (b) CTAC coated PLGA nanoparticles (c) TTAB coated PLGA nanoparticles (d) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles

| (a) PLGA | |
|---|---|
| Peak | [AT]% |
| O 1s | 41.639 |
| C 1s | 58.361 |
| **(b) PLGA-CTAC** | |
| Peak | [AT]% |
| O 1s | 8.171 |
| N 1s | 3.376 |
| C 1s | 86.846 |
| Cl 2p | 2.607 |
| **(c) PLGA-TTAB** | |
| Peak | [AT]% |
| O 1s | 7.183 |
| N 1s | 2.975 |
| C 1s | 87.834 |
| Br 2p | 2.008 |
| **(d) PLGA-Lutrol F68** | |
| Peak | [AT]% |
| O 1s | 29.960 |
| C 1s | 70.040 |

*Table* 4. 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) | |
|---|---|---|---|---|
| | CTAC | Lutrol F68 | CTAC | Lutrol F68 |
| 1 | 387.4(141.7)[b] | 93.2(82.3) | −4.2(54.5) | −18.5(-18.5) |
| 2 | 394.3(159.7) | 88.5(80.7) | −4.2(49.3) | −23.3(-23.3) |
| 4 | 402.2(161.9) | 95.1(90.3) | −6.3(56.5) | −24.3(-24.3) |
| 8 | 425.5(168.4) | 89.8(88.4) | −6.9(71.3) | −25.4(-14.5) |

[b]Data of PLGA naanoparticles before vaccine coating.

보아 입자 표면에 코팅되어 있다고 사료된다. 본 결과로부터 양이온성 유화제로 수식된 입자의 표면에 양이온들이 코팅되어 있음이 확인되었다.

### PLGA 입자와 백신 결합의 특성

*Table* 4는 제조한 양이온성, 비이온성 입자와 NHS-fluorescein과 결합된 백신을 반응시킨 후 입자의 크기와 제타포텐셜을 측정하여 나타내고 있다. 백신이 코팅된 양이온성 입자의 크기는 380-400 nm이고 제타포텐셜은 -5 mV의 범위에서 측정되었다. 반면에, 비이온성 입자의 크기는 90 nm이고 제타포텐셜이 -23 mV 범위로 나타났다. 비이온성 입자는 백신과 반응하기 전과 후의 입자 크기나 제타포텐셜이 유사한 반면, 양이온성 입자의 크기는 크게 증가하였고 제타포텐셜도 크게 감소하였다. 이러한 결과는 양이온성 유화제가 수식되어 있는 경우 음전하를 띠고 있는 백신이 양전하를 띠고 있는 입자 표면에 결합되면서 입자의 크기가 증가된 것이다. 이 결과는 PLGA 입자와 백신의 결합 반응에 의하여 표면 전하에도 영향을 준 것으로 판단되며, 백신과의 반응이 용이하게 진행되었음을 보여주는 결과이다. 반면에, 비이온성 유화제가 코팅되어 있는 경우는 입자의 크기 및 표면 전하의 변화가 거의 없는 것으로 보아 백신과의 반응이 진행되지 않은 것으로 생각된다.

*Fig.* 3은 양이온으로 수식된 입자와 백신의 결합 반응성을 나타내고 있다. 양이온성 CTAC로 수식된 PLGA 입자와 백신을 반응시킨 용액은 30분 이내에 광밀도가 급격하게 증가하였지만 비이온성 Lutrol F68로 수식된 PLGA 입자와 반응시킨 백신 용액은 시간이 지남에 따라 광밀도에 별다른 차이가 없었다. 이것은 비이온성 입자의 결합성과 비교할 때, 입자의 표면에 수식된 양이온성 암모늄기들이 백신의 카르복실기와 결합하여 광밀도를 증가시킨 것이라 생각된다. TTAB로 제조한 PLGA 입자는 백신을 반응시키면 반응초기부터 뭉침 현상이 심하여 결과에서 배제하였다.

*Fig.* 4는 양이온으로 수식된 입자와 비이온으로 수식

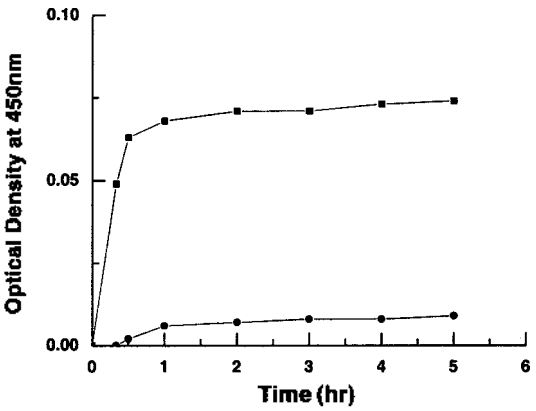



*Fig.* 3. Adsorption profile of vaccine on PLGA nanoparticles coated by various surfactants. (-■- CTAC coated PLGA nanoparticles, -●- Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles).

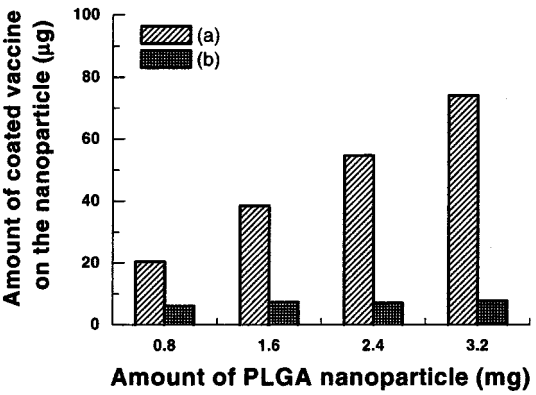



*Fig.* 4. Amount of coated vaccine on the nanoparticles. (a) CTAC coated PLGA nanoparticles, (b) Lutrol F68 coated PLGA nanoparticles.

된 입자를 NHS-fluorescein이 결합된 백신과 complex 시킨 후 입자에 코팅된 백신의 양을 측정한 결과이다. 이때, 백신의 양은 형광분광광도계를 이용하여 측정하였다. 양이온성 입자와 비이온성 입자에 각각 약 22.73 μg /mg, 9.47 μg/mg의 백신이 코팅되어 있는 것을 확인하였다. 비이온성 입자에 비하여 양이온성 입자는 입자의

양을 증가시키면 코팅되는 백신의 양도 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 양이온성 유화제가 코팅되어 있는 입자가 비이온성 유화제가 코팅되어 있는 입자보다 코팅된 백신의 양이 증가하는 원인은 음전하를 갖는 카르복실기를 포함하고 있는 백신이 전하를 띠지 않는 비이온성 입자와 물리적 결합만을 통하여 코팅되는 반면에 양전하를 띠는 암모늄기가 포함되어 있는 양이온성 입자의 경우, 백신과 이온결합을 하기 때문인 것으로 사료된다.

## 결 론

본 실험은 자발적 유화용매 확산법에 의해 유화제를 사용하여 표면이 수식된 PLGA 입자를 제조하는 것이다. PLGA 입자의 표면 수식은 음전하를 갖는 백신의 결합을 유도하기 위해 양이온성 유화제를 코팅함으로써 양이온을 입자 표면에 도입할 수 있었다. 또한, 입자 표면에 양이온 수식 효과는 대조시료로서 비이온성 유화제가 수식된 입자와 비교하여 관찰하였다. 표면 수식에 대한 확인은 ESCA와 ATR-IR의 측정을 통하여 양이온이 PLGA 입자의 표면에 코팅되어 있음을 알 수 있었다. 양이온으로 코팅된 PLGA 입자의 크기는 140-160 nm 이었고 입자의 크기는 PLGA와 유화제의 농도, PLGA와 유화제의 비율 등의 조건에 따라 조절됨을 알 수 있었다. 입자의 크기와 제타포텐셜의 변화, 형광분광광도계 측정을 통해 PLGA 입자에 백신이 코팅되어 있는지 여부를 확인하였다. PLGA 입자 표면에 코팅된 백신의 양은 비이온성 유화제가 도입된 PLGA 입자의 경우에 비하여 양이온성 유화제가 도입된 PLGA 입자의 경우, 2배 이상 증가하였다. 본 실험의 결과로 양이온이 수식된 PLGA 입자는 백신의 결합성을 향상 시킬 수 있었고, 이 입자는 백신 전달체로의 활용 가능성을 보여주었다.

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

## 인 용 문 헌

1. Brannon-Peppas, L. *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1.
2. Labhasetwar, V.; Song, C.; Levy, R. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, *24*, 63.
3. Kreuter, J.; Speiser, P. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 1624.
4. Couvreur, P.; Kante, B.; Roland, M.; Speiser P. *J. Pharm. Sci.* **1979**, *68*, 1521.
5. Couvreur, P.; Kante, B.; Lenaerts, V.; Scailteur V.; Roland, M.; Speiser P. *J. Pharm. Sci.* **1980**, *69*, 199.
6. Couvreur, P.; Kante, B.; Grislain, L.; Roland, M.; Speiser P. *J. Pharm. Sci.* **1982**, *71*, 790.
7. Allemann, E.; Gurny, R.; Doelker, E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1993**, *39*, 173.
8. Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessi, H.; Doelker, E. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1998**, *24*, 1113.
9. Zimmer, A.; Kreuter, J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1995**, *16*, 61.
10. Peppas L. B. *Int. J. Pharm.* **1995**, *116*, 1.
11. Leroux, J.-C.; Allemann, E.; De Jaeghere, F.; Doelker, E.; Gurny, R. *J. Controlled Release* **1996**, *39*, 339.
12. Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Kulkarni, A. R.; Rudzinski, W. E. *J. Controlled Release* **2001**, *70*, 1.
13. Govender, T.; Stolnik, S.; Garnett, M. C.; Illum, L.; Davis, S. S. *J. Controlled Release* **1999**, *57*, 171.
14. O'Hagan, D. T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 305.
15. Michael, V.; O'Hagan, D. T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *51*, 127.
16. Vila, A.; Sanchez, A.; Tobio, M.; Evora, C.; Soriano, I.; McCallion, O.; Alonso, M. *J. Pharm. Res.* **1998**, *15*, 270.
17. Murakami, H.; Kobayashi, M.; Takeuchi, H.; Kawashima, Y. *Int. J. Pharm.* **1999**, *187*, 143.
18. Hiraku, O.; Yoshiharu, M. *Biomaterials* **1999**, *20*, 175.
19. Park, S. J.; Kim, S. H.; Lee, I. R.; Lee, H. B.; Hong, S. K. *Polymer (Korea)* **2002**, *26*(3), 326.
20. Murakami, H.; Kawashima, Y.; Niwa, T.; Hino, T.; Takeuchi, H.; Kobayashi, H. *Int. J. Pharm.* **1997**, *149*, 43.