

Poly((R)-3-hydroxybutyric acid)/Poly(ethylene glycol) 양친성 블록 공중합체를 이용한 약물전달체용 고분자 미셀

정관호 · 김영진[†]

충남대학교 고분자공학과

(2006년 7월 19일 접수, 2006년 9월 19일 채택)

Polymeric Micelle Using Poly((R)-3-hydroxybutyric acid)/ Poly(ethylene glycol) Amphiphilic Block Copolymer for Drug Delivery System

Kwan Ho Jeong and Young Jin Kim[†]

Department of Polymer Science and Engineering,
Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
(Received July 19, 2006; accepted September 19, 2006)

초록 : 양친성 블록공중합체는 생분해성 고분자인 poly((R)-3-hydroxybutyric acid), PHB와 친수성 고분자인 poly(ethylene glycol), PEG를 이용하여 제조되었다. 미셀물에 의해 생산된 분자량이 수십만인 PHB는 약물전달용 재료로 적합하지 않으므로 산 촉매 가수분해를 통해 분자량이 3000~30000을 가지도록 조절되었다. 공중합체를 수용액에 넣으면, 고분자들은 자기 조립에 의해 친수성인 PEG가 소수성인 PHB를 감싸는 형태의 고분자 미셀을 형성한다. 형성된 고분자 미셀은 생분해성과 생체적합성을 가지면서 생체 내에서 낮은 독성과 환자 친화적인 특성을 가지므로 약물 전달체로의 이용이 가능하다. 양친성 블록 공중합체는 PHB에 PEG를 도입한 것으로 에스테르교환 (transesterification) 반응을 통해 유도되었다. PEG는 친수성 블록의 형성과 반응성을 향상시키기 위해 말단의 작용기를 개질한 후 사용되었다. 양친성 블록 공중합체 형성에 대한 열적 특성과 화학적 구조 분석은 DSC, FTIR, ¹H-NMR을 사용하여 알아보았다. 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC)는 고분자 미셀이 형성되는 시점으로 형광 분광기를 사용하여 분석한 결과 5×10^{-5} g/L 부근에서 측정되었다. 수용액 상의 고분자 미셀은 냉동 건조 후, 분말 형태의 나노입자를 얻었다. 고분자 미셀의 크기는 dynamic light scattering으로 측정된 결과 약 130 nm 정도로 나타났다. 또한 atomic force microscopy 측정을 통해 크기가 약 130 nm 정도인 구형 입자를 확인하였다. 나노입자가 형성된 고분자 미셀은 소수성 약물을 담지하여 수동적 표적지향형 약물 전달용 수송체로 이용이 가능할 것이다.

Abstract : A biodegradable polymer poly((R)-3-hydroxybutyric acid) (PHB) was conjugated with a hydrophilic polymer poly(ethylene glycol) (PEG) by the transesterification reaction to form the amphiphilic block copolymer. PHB with low molecular weight (3000~30000) was appropriated for the drug delivery materials. High molecular weight PHB was hydrolyzed by an acid-catalyst to produce the low molecular weight one. Amphiphilic block copolymer was formed the self-assembled polymeric micelle system in the aqueous solution that the hydrophilic PEG was wrapped the hydrophobic PHB. Generally, polymeric micelle forms the small particle between 10~200 nm. These polymeric micelle systems have been widely used for the drug delivery systems because they were biodegradable, biocompatible, non-toxic and patient compliant. The hydroxyl group of PEG was substituted with carboxyl group which has the reactivity to the ester group of PHB. Amphiphilic block copolymer was conjugated between PHB, and modified PEG at 176 °C which was higher than the melting point of PHB. Transesterification reaction was verified with DSC, FTIR, ¹H-NMR. In the aqueous solution, critical micelle concentration(CMC) of the mPEG-co-PHB copolymer measured by the fluorescence scanning spectrometer was 5×10^{-5} g/L. The shape and size of the nanoparticle was taken by dynamic light scattering and atomic force microscopy. The size of the nanoparticle was about 130 nm and the shape was spherical. Our polymeric micelle system can be used as the passive targeting drug delivery system.

Keywords : PHB, PEG, transesterification, polymeric micelle, drug delivery system.

서 론

최근 약물 전달용 수송체는 생체 내 세망내피계의 회피를 유도하

면서 지능적이고 효율적으로 장기 순환이 가능하여야 한다.¹ 생분해성 고분자인 PHB는 의학, 생명공학, 일회용 포장재 등의 다양한 분야에 응용되고 있으며 PHB 단일 중합체,^{2,3} PHB 공중합체⁴⁻⁸ 및 유사체인 PHAs의⁹ 연구들이 활발히 이루어지고 있다. PHB는 다양

[†]To whom correspondence should be addressed. E-mail: kimyj@cnu.ac.kr

한 원핵세포와 진핵세포에서 세포 내 생리적 과정에 이용되면서 자연스럽게 탄소와 에너지 저장물질로 축적된다.⁷ 생체 내에서 PHB는 저분자나 단량체로 분해되어 생체적합성을 갖는 생체 구성 물질로 이용되며, 혈액의 혈장 속 또는 세포 교환막 사이의 채널을 이루는 물질이다.^{10,30} 미생물에 의해 생산된 PHB는 합성 고분자인 폴리프로필렌과 폴리에스테르의 물성의 중간 값을 가진다. 생체적합성, 생분해성, 낮은 독성 등의 장점을 갖는 반면, 결정성이 높아 잘 부스러지고, 열에 불안정하며, 물과 극성이 높은 용매에 잘 녹지 않는 단점을 가지고 있다.^{11,12} 미생물에 의해 생산된 PHB는 수십만의 고분자량을 가지는 물질로 형성되는데, PHB를 생체 내에서 보다 유용하게 이용하기 위해서는 수천~수만의 저분자량으로 조절할 필요가 있다. 저분자량의 PHB는 생체적합성, 생분해성, 비면역반응 그리고 비독성이 고분자량의 PHB보다 향상되기 때문에 생체 내의 사용이 보다 적합하다.^{2,4}

양친성 블록 공중합체는 친수성인 PEG와 소수성인 PHB를 결합하여 형성한다.⁴⁻⁸ 친수성 고분자로 사용되는 PEG는 생체 내에서 분자량 1000 g/mole 이상에서도 비독성, 비면역 반응을 나타내며, 쉽게 신장과 간을 통해 배출된다. 또한 PEG는 세포막과 상호작용을 하면서 단백질과 생리활성 물질들을 안정화시키고, 혈액 내에서 혈청의 생명주기를 증가시킨다.¹³ 공중합체에 사용된 PEG는 PHB의 결정성을 완화시키는 동시에 친수성 블록으로 수용액 상에서 고분자 미셀(micelle)을 형성한다.

양친성 블록 공중합체를 이용한 고분자 미셀은 소수성(난용성) 약물을 내부 중심 부분에 담지하여 서서히 방출시킬 수 있는 유용한 수송체이다. 소수성 블록과 친수성 블록이 결합된 양친성 블록 공중합체를 이용한 약물 전달용 수송체에 대한 연구는 polystyrene-co-poly(acrylic acid),¹⁴ polystyrene-co-poly(ethylene oxide),¹⁵ poly(aspartic acid)-co-poly(ethylene glycol),¹⁶ poly(ethylene oxide)-co-poly(propylene oxide)-co-poly(ethylene oxide)¹⁷ 등에서 다양하게 보고되고 있다. 고분자가 약물전달체로 사용되기 위한 최적의 조건은 생체적합성에 있다. PHB 공중합체를 이용한 약물전달용 수송체에 대한 연구는 Cheng과 Li 등에 의해 보고된 바 있다.^{18,19} 초분자 화학에서 미셀의 구조는 수용액의 임계 미셀 농도(critical micelle concentration, CMC) 이상에서 자기 조립에 의하여 구형의 미셀을 형성한다.²⁰ 고분자 미셀은 일반 계면활성제보다 안정하며, 일부 고분자 미셀은 10^{-6} M 보다 낮은 CMC 값을 갖는다. 고분자 미셀의 CMC는 열역학적 안정성에 기인하여 일반 계면활성제의 CMC보다 낮게 형성된다. 또한 고분자 미셀의 안정성은 영겨있는 소수성 사슬 부분에 대한 친수성 사슬 부분들의 입체 위치적 안정성에 기인한다.²¹ 고분자 미셀의 구조는 친수성 외곽이 소수성 중심을 보호하면서 구 또는 타원의 형태로 안정하게 형성한다.^{22,23} 고분자 미셀 수용액 속에서 소수성(난용성) 약물은 고분자 미셀 내부 중심 부분의 소수성 영역과 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)에 의해 약물이 봉입된 후 약물 전달체의 특성에 따라 방출된다.^{24,25} 수용액 상에서 약물이 봉입된 미셀은 중심부의 소수성 부분이 증가하면서 열역학적으로 더 안정화된 입자를 형성한다. 고분자 미셀의 외곽에 존재하는 친수성 고분자는 혈액과 접하는 부분으로 생체 내 혈액의 흐름 속에서 입체장애를 일으켜 고분자 미셀을 보호한다.^{26,27} 생체적합성을 갖는 고분자 미

셀은 생체 내 면역 체계에서 독소로 인식되지 않아 혈액의 흐름에 따라 장기 순환한다. 본 실험을 통해 형성된 고분자 미셀의 크기는 약 100 nm의 나노입자로 사구체에 의해 신장에서 배출이 되지 않을 정도로 충분히 큰 크기(>50 kDa, 미셀로 조립된 분자량)이고, 비장(지라) 등 세망내피세포들에서는 여과되어 통과할 수 있을 만큼의 작은 크기(<200 nm)이다.^{28,29} 또한, 비이온화된 상태의 친수성 고분자로 외곽이 보호된 고분자 미셀은 단핵 포식세포 체계(mononuclear phagocyte system : MPS)에 의해 제거되지 않으면서, EPR(enhanced permeation and retention) 효과를 통한 암 또는 염증이 있는 조직에서의 수동적인 약물 표적화를 유도할 수 있다.^{30,31} 본 연구에서 개발된 고분자 미셀은 수동적 약물 표적화와 생체 내 생분해 특성을 갖는 약물전달용 수송체로 활용될 수 있다.

실 험

시약 및 재료. 미생물에 의해 생산된 PHB(nature origin, M.W.=386,000), monomethoxy poly(ethylene glycol) (mPEG M.W.=5000), poly(ethylene glycol) (PEG M.W.=6000)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Tin(II)2-ethylhexanoate, 4-dimethylaminopyridine(DMAP), 1,3-dicyclohexylcarbodiimide(DCC), triethylamine(TEA)도 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Succinic anhydride는 Acros에서 구입하였다. 용매들은 1,4-dioxane(Merck), dimethyl ether(J. T. Baker), carbontetrachloride(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 용매는 calcium hydride(Acros)를 사용하여 무수화 상태로 정제하였다. pH 지시약은 methyl red(Sigma-Aldrich)를 사용하였다. Figure 1에서는 사용된 PHB, PEG, mPEG의 구조를 나타내었다.

산 촉매에 의한 가수분해 반응. 가수분해실험은 100 mL 플라스크에 0.5 g의 PHB를 3.0 N HCl 50 mL에 넣고, 104.5 °C (boiling point)에서 12시간 동안 연속적으로 교반한다. 가수분해된 저분자량의 PHB는 원심분리튜브에 넣고 증류수를 3회 교체하면서 5000 G에서 원심분리하였다. 원심분리한 후, 시료는 에탄올로 2회 세척한다. 얻어진 시료는 60 °C 진공 상태에서 24시간 건조한다. 건조된 시료는 GPC를 사용하여 분자량을 확인하였다.

PEG, mPEG의 개질. 개질 실험은 PEG 말단에 존재하는 수산기

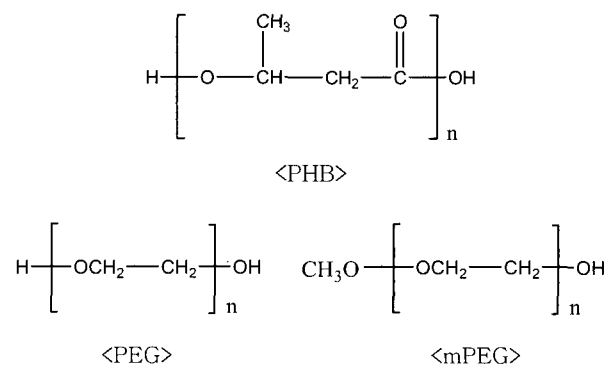
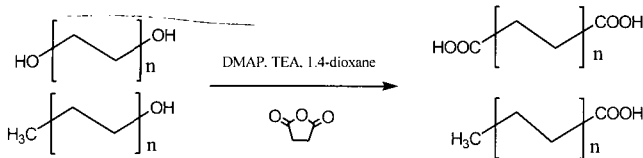


Figure 1. Structure of PHB, PEG, and mPEG.

Table 1. Reaction Condition of the PEG Modification

Reagent	mPEG		PEG	
	Weight	Mole	Weight	Mole
PEG	10 g	0.002 mol	10 g	0.0017 mol
Succinic anhydride	0.20 g	0.002 mol	0.34 g	0.0034 mol
1,4-Dioxane	300 mL	0.002 mol	300 mL	0.0017 mol
TEA	0.20 g	0.002 mol	0.17 g	0.0017 mol
DMAP	0.34 g	0.002 mol	0.21 g	0.0017 mol

**Figure 2.** Modification scheme of PEG and mPEG.

를 카복실기로 치환하는 것이다. 시험과정은 500 mL 삼구 둥근 플라스크에 용매인 1,4-dioxane에 PEG를 넣고 DCC, DMAP, TEA를 첨가한 후 질소 분위기 상태에서 24시간 동안 상온에서 반응시켰다. Table 1에서는 반응에 사용한 시료의 양을 표시하고, Figure 2는 개략적인 반응도를 나타내었다. 반응 종료 후 용매는 회전 증발기를 사용하여 상온 진공 상태에서 제거하였다. 미반응물은 사염화탄소(CCl₄)를 사용하여 용해시킨 후 여과지로 걸러 미반응 물을 제거하였다. 개질된 시료는 차가운 에테르에서 재침전하여 얻었다. 침전물은 에테르를 제거하기 위해 상온의 진공 상태에서 24시간 동안 에테르를 완전히 제거하였다.

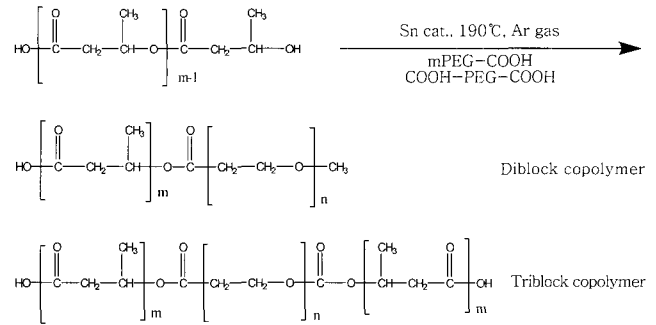
양친성 블록 공중합체 합성. 합성은 50 mL 플라스크에 1 : 1 비율의 PHB와 PEG를 넣은 후 180 °C 진공하에서 시행하였다. 두 물질은 일정한 용융상태가 되도록 진공상태로 10~15분 유지하였다. 용융된 시료가 들어있는 플라스크 내부의 진공을 제거하고 촉매 (Tin(II)₂-ethylhexanoate)를 넣으면서 동시에 아르곤 가스를 흘려준다. 촉매의 양은 전체 중량의 5 wt%를 넣었고, 반응을 30분 동안 유지하였다. Figure 3은 양친성 블록 공중합체를 형성하는 개략적인 반응도이다. 공중합 반응에서 부산물인 물은 고온에서 증발되어 아르곤과 같이 배출된다. 양친성 블록 공중합체는 액체 질소 안에서 급속히 냉각한 후, 촉매 제거를 위해 플라스크 안에 에테르를 넣고 3시간 동안 교반하였다. 촉매가 제거한 양친성 블록 공중합체는 진공 상태에서 24시간 동안 건조하였다.

수용액 상 고분자 미셀 제조 및 CMC 측정. 고분자 미셀 제조는 증류수와 시료를 유리병에 넣고 15분 정도 bath type의 초음파 분쇄기를 사용하여 균일하게 분산시켰다.

CMC 측정은 다양한 농도의 고분자 미셀 수용액을 만든 후, 형광 물질(pyrene)을 넣어 fluorescence scanning spectrometer를 이용하여 각각의 농도에서의 형광 세기를 측정하였다.

기기 분석. 열적 성질은 DSC(TA Instruments 2010 DSC)를 이용하였다. 질소 분위기에서 PHB, 공중합체와 PEG를 10 °C/min로 승온하면서 측정하였다.

GPC 분석은 Shodex GPC KD-804 컬럼을 사용한 Agilent

**Figure 3.** Reaction scheme of PHB-co-PEG.

1100 series를 사용하였다. 이동상은 DMF를 사용하였고, 20~30 μL(5mg/mL)의 시료를 1.0 mL/min로 흘려주었다.

PHB, 개질된 PEG 그리고 공중합체는 ¹H-NMR을 사용하여 분자 구조 규명 및 물질 조성을 분석하였다. 분석 용매는 CDCl₃ (spectra δ=7.3 ppm, 1 wt% TMS)을 사용하였고, ¹H-NMR (JEOL Ltd., JNM-AL400, 400 MHz, FT-NMR spectrometer, Akishima, Japan)기기를 통해 분석하였다.

¹H-NMR과 더불어 화학적 구조를 알아보기 위해 FTIR(NICO-LET, MAGNA-IR 560 spectrometer)을 이용하였다.

고분자 미셀의 모양은 AFM을 사용하여 측정되었다. 시료의 전 처리는 1 cm² 유리판 위에 시료를 얹었다. AFM(NanoscopeIIIa, Digital Instruments, USA)은 일정한 높이에서 측정하는 tapping mode를 사용하였다.

수용액 상에서 고분자 미셀의 나노입자들의 크기를 알아보기 위해 1 mg/mL의 시료를 DLS(Photal Otsuka Electronics, ELS-6000, Japan)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 토론

PHB의 가수분해. PHB는 미생물의 다양한 대사경로를 거쳐 생산된 폴리에스테르로 생분해성과 생체적합성을 갖는 생분해성 고분자이다. 생산된 PHB는 보통 100~500 kda의 분자량을 갖는다. PHB가 생체 내에서 생분해성과 생체적합성을 지니면서 약물을 효율적으로 전달하려면 고분자량의 PHB를 저분자량 상태로 만들어야 한다. 올리고머나 저분자량의 PHB는 생체 내에서 고분자량 PHB보다 더 우수한 생체적합성, 생분해성, 비면역반응 그리고 비독성을 나타낸다.²⁴ 생분해성 고분자인 PHB는 여러 경로를 통해 분해되는데, 본 연구에서는 고온의 산(3 N HCl) 촉매를 이용하여 가수분해를 통해 짧은 시간 내에 저분자량의 PHB를 얻었다. 고분자량의 PHB 결정성 입자들은 매우 안정한 상태를 유지하고 있기 때문에 PHB 사슬을 강제로 끊기 위해서는 고온, 고농도의 강산 촉매 가수분해 조건이 요구되었다. 산 촉매를 이용한 가수분해 과정은 에스테르 사슬들의 결합이 무질서하게 분해되고 재결합하는 곳에서 분자량 감소를 보인다. 분해 과정은 우선 저분자량 PHB 사슬들로 전체 고분자량 PHB 사슬들이 끊어지는 제 1과정과 끊어진 사슬들에서 복분해가 일어나는 제 2과정으로 나눌 수 있으며, 두 과정은 동시에 일어난다. 가수분해 과정에서 분자량의 감소는 결정화

Table 2. Molecular Weight and Melting Temperature Change after the Hydrolysis of PHB

Time (hr)	PHB			
	M_n	M_w	M_w/M_n	T_m (°C)
0	386000	644620	1.67	176
2	31000	52700	1.70	172
4	17800	23140	1.30	169
6	11200	13888	1.24	168
8	5424	6942	1.28	166
10	3813	4829	1.27	161
12	2978	4028	1.25	156

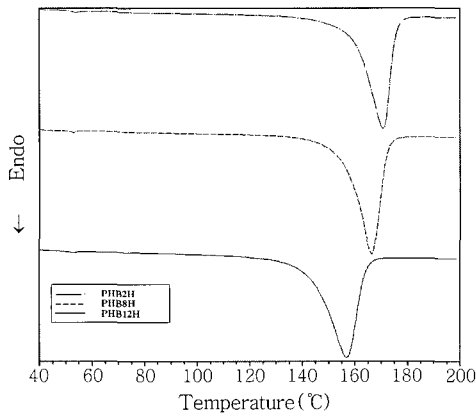


Figure 4. DSC thermogram of PHB after the hydrolysis.

된 PHB 사슬 외곽과 중심부 사이의 미세 공간에서 이완과 수축을 반복하는 사슬 사이에 양자화된 물 분자들이 급격하게 침투하여 일어나는 열역학적 현상이다. 이 때 고온 강산은 물 분자들이 더욱 밀집된 사슬 사이에 더욱 강하게 침투하여 가수분해를 촉진한다. 분해율은 계속된 분해과정에서 증가와 감소 시점이 나타나는데, 저분자량 PHB에서는 사슬의 분포와 길이가 줄어들어 가수분해하는 미세 공간이 축소되기 때문이다. 고온의 염산 촉매를 이용한 조건에서 고분자량 PHB는 6시간 전후로 최대 분해율을 나타내며, 이 후 분해율이 급속히 줄어든다. 보통 수용액 속에서 PHB의 가수분해는 52주 이상에서도 1% 미만의 분해를 나타내지만, 생체촉매(효소), 산, 염기, 미생물 등 촉매의 역할을 수행하는 물질이 있으면 분해가 급속도로 촉진된다.^{32,33} Table 2와 Figure 4에서는 PHB를 가수분해하여 2시간 간격의 시료를 GPC로 측정하였고, DSC 분석을 통한 T_m 의 변화를 알아보았다. Figure 4에서 나타난 것처럼 물성의 변화, 분자량의 변화에 따라 결정화 정도가 미미하게 변화하였기 때문에 큰 영향을 끼치지 않았다. 하지만 사슬의 길이와 분자량 변화 정도에 따라서 T_m 의 변화가 나타났다. 생체촉매인 효소나 미생물에 의한 가수분해 거동은 강산과 온도에 의한 가수분해 실험을 통해 이해할 수 있다.

카복실기로 치환된 PEG, mPEG의 개질. 개질 실험은 PHB의 말단과 PEG 또는 mPEG의 말단 사이의 에스테르교환 반응이 쉽게 일어나도록 유도하기 위해 수행되었다. PEG와 mPEG 말단 개질은 말단에 존재하는 수산기를 반응성이 좋은 카복실기로 치환하였다. 말단기의 치환 여부를 확인하기 위해서 FTIR로 분석하였다. PEG

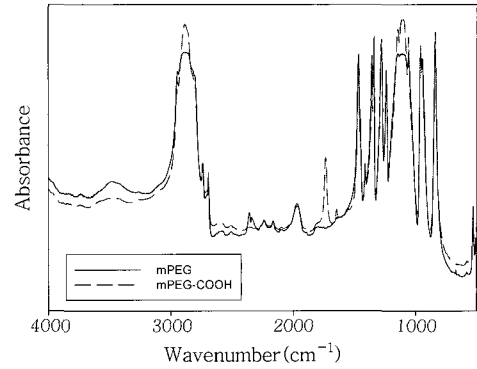


Figure 5. FTIR absorption spectra compared mPEG with mPEG-COOH (M.W.=5000).

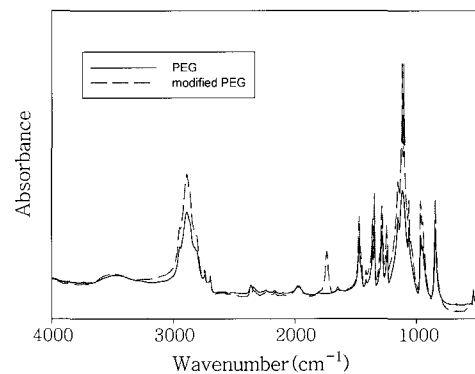


Figure 6. FTIR absorption spectra compared PEG with PEG-COOH (M.W.=6000).

의 반복 단위인 $-OCH_2CH_2-$ 에서 C-O-C(신축 진동)의 특징은 1110 cm^{-1} 에서 관찰되었으며, PEG의 결정상 특징은 963 과 843 cm^{-1} 에서 나타났다. 카복실기($-COOH$)는 Figures 5와 6에서 나타난 것과 같이 1560 cm^{-1} 에서 COO^- 와 1735 cm^{-1} 에서의 C=O(에스테르) 특징 피크가 나타났다. 카복실기로 치환된 PEG 말단은 분석을 통해 성공적으로 시료가 개질되었음을 확인하였다.⁸

양친성 블록 공중합체의 합성. 양친성 블록 공중합체(mPEG-co-PHB)는 개질된 PEG의 카복실기와 PHB의 말단 부분과의 에스테르교환 반응을 통해 합성하였다. PHB, PEG, 양친성 블록 공중합체의 분자 구조와 화학적 성분은 1H -NMR과 FTIR 분석을 통해 알아보았다. FTIR에서 PHB 피크는 1735 cm^{-1} (에스테르)에서 나타났고, 카보닐기 성분의 피크는 $1000\sim 1450\text{ cm}^{-1}$ 사이(메틸기와 메틸렌기의 변형과 C-O결합의 신축 진동)에서 나타났다.³⁴ Figure 7에서는 PHB와 PEG의 양친성 블록 공중합체의 전형적인 피크를 나타내었다. 양친성 블록 공중합체의 피크는 2869 cm^{-1} 에서 나타나는 PEG 블록과 에스테르교환 반응으로 형성된 에스테르 1735 cm^{-1} 피크로 알 수 있었다.

Figure 8은 양친성 블록 공중합체(mPEG-co-PHB)의 1H -NMR 분석을 통해 얻은 그래프로 시료의 화학적 성분을 알 수 있었다. A 부분의 3.64 ppm 피크는 PEG의 메틸렌기에 의해 나타난 표시이다. 다른 중요 피크로는 C 부분의 2.42 ppm 피크, D 부분의

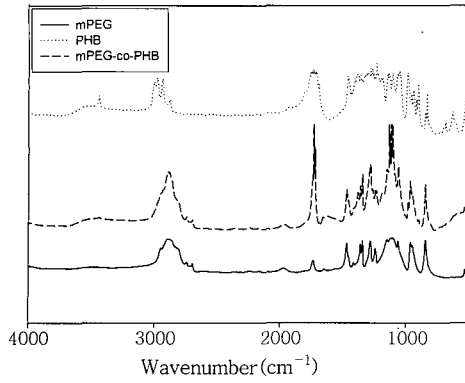


Figure 7. FTIR spectra of PHB(···), mPEG(—) and amphiphilic block copolymer mPEG-co-PHB(---).

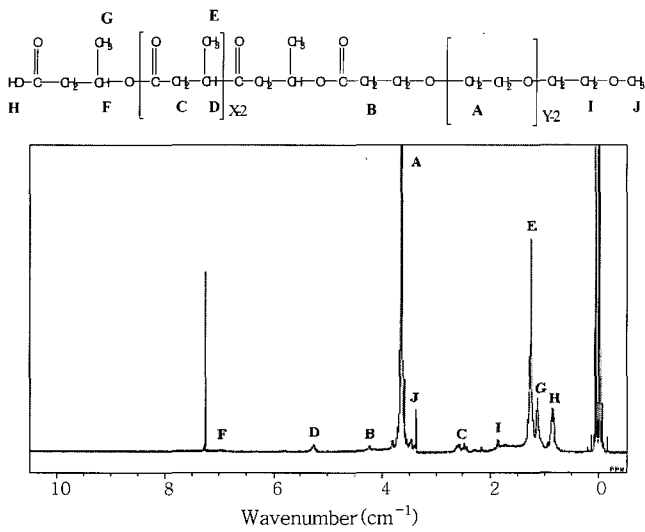


Figure 8. ¹H-NMR spectra of amphiphilic block copolymer mPEG-co-PHB in CDCl₃ (1% TMS contain).

5.25 ppm, E 부분의 1.25 ppm로 PHB 사슬의 메틸기(-CH₃), 메틸렌기(=CH₂), 메틴기(=CH-)임을 알 수 있다. F, G 부분의 피크는 3-HB의 이량체 때문에 나타난 것으로 말단 HB 단위의 메틸기와 메틴기를 나타낸 것이다. B 부분의 2.59 ppm에서 나타난 PEG의 피크는 양친성 블록 공중합체의 HB 단위에 연결된 PEG의 메틸렌기이다. H, J 피크는 양친성 블록 공중합체의 양말단의 수산기(-OH)와 메톡시기(-OCH₃)를 나타내는 것이다. PEG 부분에서 반복적으로 나타나는 메틸렌기는 3.64 ppm에서 나타나고, PHB 부분의 반복된 메틸기는 5.25 ppm에서 나타났다. 양친성 블록 공중합체의 EG 단위와 HB 단위의 위치에 대한 결정은 A 부분(3.64 ppm, EG의 메틸렌기)과 D 부분(5.25 ppm, HB의 메틸기)을 통해 알 수 있었다.

양친성 블록 공중합체(mPEG-co-PHB)의 열적 특성은 DSC를 사용하여 알아보았다. DSC로 측정된 mPEG의 T_m은 64.22 °C (ΔH_f=174 J/g)에서 나타났으며, 저분자량의 PHB의 T_m은 160.90 °C (ΔH_f=81.00 J/g)에서 나타났다. mPEG-co-PHB의 양친성 블록 공중합체의 T_m을 45.96 °C (ΔH_f=29.17 J/g)와 148.69°C (ΔH_f=

32.45 J/g) 나타냈다. 공중합체로 결합된 시료는 상이한 물리적 특성을 갖기 때문에 PEG, PHB의 T_m 보다 상대적으로 낮게 나타났다. 상이한 특성을 갖는 두 물질의 결합에서 PEG는 PHB의 강하고 깨지기 쉬운 특성을 방해하여 보다 부드럽게 이완시킨다. 또한, PEG는 PHB의 높은 결정성으로 유연성과 유동성을 제한받는다. 양친성 블록 공중합체의 T_m 감소는 mPEG와 PHB의 상대적 결정성 차이 때문에 나타나는 현상으로 두 물질은 상호 영향을 끼쳐 각각의 T_m보다 낮게 존재한다.

수용액 속 고분자 미셀 형성 및 임계 미셀 농도의 결정. 양친성 블록 공중합체는 수용액 상에서 초음파 분쇄기를 사용하여 고분자 미셀을 분산시켰다. 고분자 미셀이 형성되는 시점은 CMC 이상이며, 고분자 미셀 수용액 상에서는 양친성 블록 공중합된 사슬들은 자기 조립과 회합을 통해 고분자 미셀을 형성한다. 고분자 미셀의 소수성 부분은 내부 중심 부분으로 모이고, 수용성과 만나는 친수성 부분은 외곽을 형성한다. 자기 조립에 의해 형성된 고분자 미셀은 구형의 실타래와 같이 얽힌 모양으로 구성되며, 내부에는 미세 공간이 존재한다. CMC 측정은 pyrene(형광물질)을 고분자 미셀의 내부의 소수성 부분과 소수성 상호작용시켜 봉입시킨 후 형광 정도를 측정한다.

Figure 9은 미셀 내부에 pyrene을 봉입한, 열은 농도에서 진한 농도로의 들뜬 스펙트럼을 나타낸 것이다. Pyrene의 특징은 일정한 여기 파장(338~340 nm)과 발산 파장(393 nm)을 나타낸다. 또한 고분자 미셀의 중심부와 상호작용하여 내부 미세 공간에 봉입

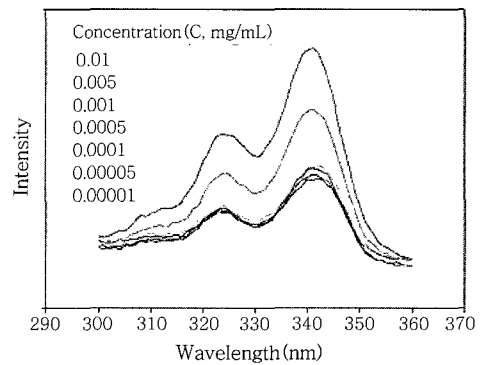


Figure 9. Excitation spectra of pyrene as mPEG-co-PHB concentration in water.

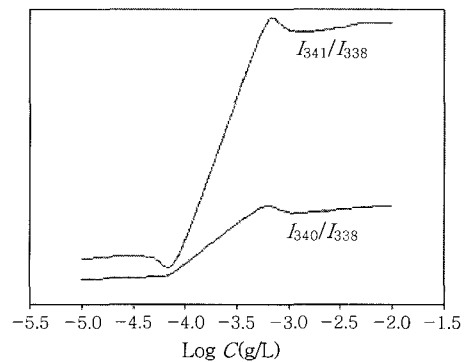


Figure 10. Plots of I₃₄₀/I₃₃₈ and I₃₄₁/I₃₃₈ vs log C of mPEG-co-PHB respectively (pyrene excitation spectra).

되고, 형광 스펙트럼을 나타낸다. Figure 10은 양친성 블록 공중합체(mPEG-co-PHB의 I_{340}/I_{338} , I_{341}/I_{338})를 이용하여 각각의 과장 값을 조사한 후 일정한 비율의 농도(Log C)와 비교하여 서로 다르게 교차하는 지점에서 CMC를 나타내었다. 고분자 미셀의 CMC는 일반 계면활성제 SDS(sodium dodecyl sulfate)가 2.3 g/L인

데 반해 5×10^{-5} g/L 이하로 매우 작게 나타난다. 본 실험에서 고분자 미셀의 CMC는 5×10^{-5} g/L 부근에서 낮게 측정되었다. 고분자 미셀의 CMC의 측정에서 사용된 pyrene의 양은 무시할 정도로 미미하지만 특정 농도 이상이 되면 소수성 물질의 농도도 고려해야 한다. 따라서 소수성 상호작용으로 내부 약물이 봉입된 고분자 미셀은 새로운 CMC 값을 갖으며 고분자 미셀의 농도와 약물의 농도를 같이 고려해야 한다. 고분자 미셀의 크기는 수용액 상에서 DLS를 사용하여 측정되었다. 1 mg/mL 이하의 수용액에서 DLS를 측정한 결과 크기 분포는 Figure 11과 같이 약 135 nm 전후에서 나타났다. 고분자 미셀의 크기와 모양은 고분자 미셀 수용액을 냉동 건조하여 분말로 만든 후 AFM을 알아보았다. Figure 12는 나노입자로 이루어진 고분자 미셀로서 AFM을 이용하여 얻은 그림이다. 본 실험을 통해 고분자 미셀의 형태는 구형 또는 타원형임을 알 수 있었고, 고분자 미셀의 크기는 AFM과 DLS를 통해 약 135 nm 정도로 측정되었다.

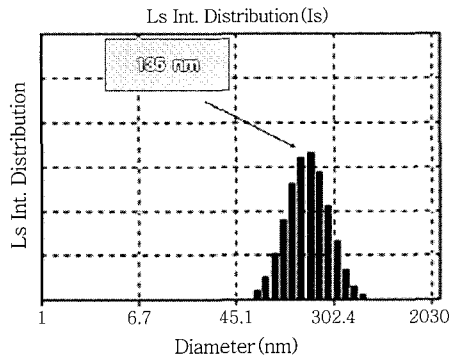


Figure 11. Micelle size in water suspension solution over CMC as DLS(135 nm).

결론

생분해성 고분자인 저분자량의 PHB는 친수성 고분자인 PEG와

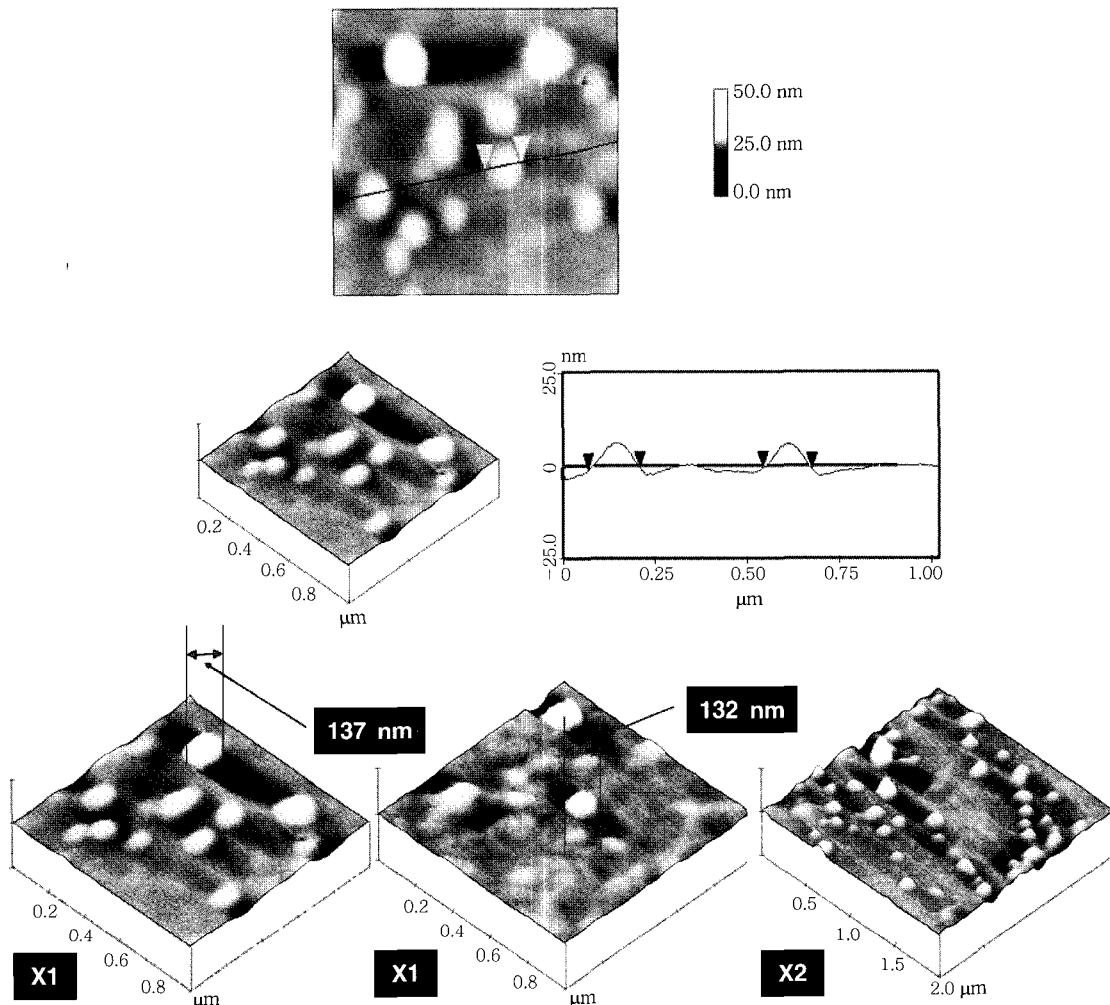


Figure 12. AFM image of micelle using amphiphilic block copolymer mPEG-co-PHB.

공중합하여 양친성 블록 공중합체를 형성하였다. 고분자량의 PHB는 저분자량의 PHB로 가수분해시켰고, PEG는 친수성 블록을 형성하고 반응성을 향상시키기 위하여 PEG의 말단 부분을 개질하여 사용하였다. 수용액 속 고분자 미셀의 CMC는 형광 분석을 통하여 5×10^{-5} g/L에서 측정되었다. 고분자 미셀 내부의 소수성 약물의 봉입 가능성은 소수성을 지닌 pyrene의 형광분석을 통해 확인할 수 있었다. 고분자 미셀의 크기와 모양은 DLS와 AFM으로 측정하여 약 135 nm의 정도의 구형의 나노입자임을 확인하였다. 본 연구에서 개발된 고분자 미셀은 생분해성과 생체적합성을 갖는 재료로 수동적 표적지향형 약물전달용 수송체로의 응용 가능성을 알 수 있었다.

감사의 글 : 본 논문은 한국과학재단(과제번호 : R11-1997-044-06013-0)의 연구비 지원과 2004년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- G. S. Kwon and K. Kataokab, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **16**, 295 (1995).
- G. Yu and R. H. Marchessault, *Polymer*, **41**, 1087 (2000).
- S. Akita, Y. Einaga, Y. Miyaki, and H. Fujita, *Macromolecules*, **9**, 774 (1976).
- C. Lauzier, J. F. Revol, E. M. Debzi, and R. H. Marchessault, *Polymer*, **35**, 4156 (1994).
- F. Ravenelle and H. R. Marchessault, *Biomacromolecules*, **3**, 1057 (2002).
- J. Li, X. Li, X. Ni, and K. W. Leong, *Macromolecules*, **36**, 2661 (2003).
- Y. Kumagai and Y. Doi, *J. Environ. Polym. Degr.*, **1**, 81 (1993).
- Q. Zhao, G. Cheng, H. Li, X. Ma, and L. Zhang, *Polymer*, **46**, 10561 (2005).
- D. Seebach and M. G. Fritz, *Int. J. Biol. Macromol.*, **25**, 217 (1999).
- C. Kunzea, H. E. Berndt, R. Androsch, C. Nischana, T. Freiera, S. Kramera, B. Krampb, and K. Schmitza, *Biomaterials*, **27**, 192 (2006).
- B. Nebe, C. Forster, H. Pommerenke, G. Fulda, D. Behrend, U. Bernewski, K. Schmitz, and J. Rychly, *Biomaterials*, **22**, 2425 (2001).
- G. B. Yim, *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **3**, 371 (1992).
- Y. Kodera, A. Matsushima, M. Hiroto, H. Nishimura, A. Ishii, T. Ueno, and Y. Inada, *Prog. Polym. Sci.*, **23**, 1233 (1998).
- K. Yu and A. Eisenberg, *Science*, **272**, 1777 (1996).
- Y. Wang, C. M. Kausch, M. Chun, R. P. Quirk, and W. L. Mattice, *Macromolecules*, **28**, 904 (1995).
- K. Kataoka, G. S. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano, and Y. Sakurai, *J. Control. Release*, **24**, 119 (1993).
- Q. Wang, L. Li, and S. Jiang, *Langmuir*, **21**, 9068 (2005).
- Q. Zhao and G. Cheng, *J. Mater. Sci.*, **39**, 3829 (2004).
- X. J. Loh, K. K. Tan, X. Li, and J. Li, *Biomaterials*, **27**, 1841 (2006).
- G. Gente, A. Iovino, and C. L. Mesa, *J. Colloid Interf. Sci.*, **274**, 458 (2004).
- A. N. Lukyanov and V. P. Torchilin, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **56**, 1273 (2004).
- G. S. Kwon and T. Okanob, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **21**, 107 (1996).
- H. M. Burt, X. Zhang, P. Toleikis, L. Embree, and W. L. Hunter, *Colloid Surface B*, **16**, 161 (1999).
- A. Moschetta, E. R. M. Eckhardt, M. B. M. D. Smet, W. Renooij, G. P. V. Berge-Henegouwen, and K. J. V. Erpecum, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1532**, 15 (2001).
- M. Rueping, A. Dietrich, V. Buschmann, M. G. Fritz, M. Sauer, and D. Seebach, *Macromolecules*, **34**, 7042 (2001).
- S. C. Lee, Y. K. Chang, J. S. Yoon, C. H. Kim, I. C. Kwon, Y. H. Kim, and S. Y. Jeong, *Macromolecules*, **32**, 1847 (1999).
- J. H. Ahn, B. H. Sohn, S. T. Noh, and W. C. Zin, *Macromolecules*, **34**, 4459 (2001).
- V. M. Cupere, J. F. Gohy, R. Jérôme, and P. G. Rouxhet, *J. Colloid Interf. Sci.*, **271**, 60 (2004).
- G. Gaucher, M. Dufresne, V. P. Sant, N. Kang, D. Maysinger, and J. C. Leroux, *J. Control. Release*, **109**, 169 (2005).
- G. Kwon, M. Naito, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, and K. Kataoka, *J. Control. Release*, **48**, 195 (1997).
- H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, *J. Control. Release*, **65**, 271 (2000).
- X. J. Loh, K. K. Tan, X. Li, and J. Li, *Biomaterials*, **27**, 1841 (2006).
- H. S. Yoo and T. G. Park, *J. Control. Release*, **100**, 247 (2004).
- G. Jarute, A. Kainz, G. Schroll, J. R. Baena, and B. Lendl, *Anal. Chem.*, **21**, 6353 (2004).