

입자 크기 측정을 통한 생분해성 나노입자의 시간에 따른 분산 안정성 평가

조국영[†] · 임진형 · 박정기* · 이기석**

공주대학교 신소재공학부, *KAIST 생명화학공학과, **공주대학교 기계자동차공학부
(2008년 1월 8일 접수, 2008년 3월 7일 채택)

Evaluation of the Stability of Biodegradable Nanoparticle with Time via Particle Size Measurement

Kuk Young Cho[†], Jin-Heong Yim, Jung-Ki Park*, and Ki Seok Lee**

Division of Advanced Materials Engineering, Kongju National University,
275, Budae-dong, Cheonan, Chungnam 303-717, Korea

*Department of Chemical & Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
373-1, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

**Department of Mechanical Engineering & Automotive Engineering,
Kongju National University, 275, Budae-dong, Cheonan, Chungnam 303-717, Korea
(Received January 8, 2008; Accepted March 7, 2008)

초록 : 본 연구에서는 분해성 고분자의 종류와 제조조건에 따른 나노입자의 분산 안정성을 평가하기 위하여 광산란 입도 분석기를 이용하여 입자 크기 변화를 조사하였다. 이를 위해 생분해성 고분자인 폴리(D,L-락타이드-co-글리콜라이드) 단독과 폴리(L-락타이드)와의 블렌드, 그리고 폴리(L-락타이드)-g-폴리(에틸렌 글리콜)과의 블렌드, 세 종류를 개선된 자발적 에멀션/용매 확산 방법을 이용하여 나노입자를 제조하였다. 제조조건에 영향을 파악하기 위하여서는 나노입자의 제조시에 대표적인 분산 안정제인 폴리(비닐 알코올) (PVA)의 사용 유무의 영향을 조사하였다. 시간이 진행함에 따라 분산 안정제가 적용되지 않은 경우에는 나노입자의 분해와 분해를 통해 붕괴된 입자의 응집에 의하여 입자의 크기가 bimodal 분포를 나타내었다. 나노입자가 분산된 수용액에 단백질 용액을 투입한 경우에는 분산 안정제인 PVA의 사용 유무에 의해 극명한 차이를 나타내었으며 PVA가 분산 안정성에 크게 기여함을 확인할 수 있었다. 또한 낮은 분자량의 폴리(에틸렌 글리콜)이 그래프트 고분자를 미량 블렌드함에 따라 입자의 단백질 흡착에 대한 분산 안정성은 침전이 일어나지 않고 1일 정도 분산 상태를 유지하는 것으로부터 일부 향상됨을 확인하였다.

Abstract : Colloidal stability of the biodegradable nanoparticle was characterized by measuring the variation of particle size with time using photon correlation spectroscopy. Three kinds of polymers, namely, poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), PLGA/poly(L-lactide) blends, and PLGA/poly(L-lactide)-g-poly(ethylene glycol) blends were used as matrix material for nanoparticle preparation. Nanoparticles were prepared with or without using poly(vinyl alcohol) (PVA) as suspension stabilizer to evaluate the condition of preparation. Nanoparticles from the blend of amphiphilic graft copolymer with short poly(ethylene glycol) chain and PLGA maintained suspension for 1 day when protein stock solution was introduced. This is somewhat improvement in colloidal stability against protein adsorption compared with that of nanoparticles without PEG moiety. Suspension stabilizer, PVA, had a significant effect on the colloidal stability against freezing and protein adsorption which led to coagulation of nanoparticles. It is important to consider effect of suspension stabilizer as well as materials used to prepare nanoparticle on the colloidal stability.

Keywords : nanoparticle, amphiphilic, biodegradable, colloidal stability, particle size.

서 론

생분해성 나노입자는 용도에 따른 표적지향성을 부여할 수 있는 특성과 생분해 특성을 이용한 제어 방출 제형에의 응용과 같은 장점으로 인해 이에 대한 연구들이 집중되고 있다.^{1,2} 고분자를 이용하여 제조한

10–100 nm의 크기에 해당하는 입자를 고분자 나노입자(polymeric nanoparticle)라 하며 천연고분자나 합성고분자 중 미생물 또는 가수분해를 통해 생분해 성질을 갖는 고분자를 사용함으로써 생분해성 나노입자를 제조할 수 있다. 일반적으로 생분해성 합성고분자로서는 생체 적합성이 우수한 polylactide (PLA), poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA), poly(ϵ -caprolactone) (PCL)과 같은 지방족 폴리에스테르계가 많이 사용되고 있다.³ 일반적으로 나노입자를 제조하

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

기 위하여서는 고분자를 분산하는 방법과 단량체에서부터 합성을 통하여 제조하는 방법이 널리 이용된다. 특히, 지방족 폴리에스테르계 생분해성 고분자는 전자의 방법을 사용하여 제조되어지게 된다.

나노입자의 제조에 있어서 가장 중요한 요구조건 중에 하나는 분산 안정성(colloidal stability)이다. 이는 제조 직후의 안정적인 분산상의 확보뿐만 아니라 시간에 따라서도 안정성을 유지하여야 하는 것을 의미하며 더 나아가 인체의 혈관 등에 투여하였을 때 혈액 내 단백질에 대하여서도 응집이 없이 그 크기를 유지하며 고유의 기능을 수행할 수 있음을 의미한다.^{4,5}

제조 시에 나노입자의 안정성을 높이기 위하여서는 분산매질 내에 poly(vinyl alcohol) (PVA)나 PEG와 PPG의 블록공중합체(상품명: pluronic)와 같은 분산 안정제(suspension stabilizer)를 사용한 연구결과들이 많이 보고되고 있다.^{6,7} 이러한 분산 안정제는 종류나 사용 농도에 따라 입자의 크기와 분포에도 영향을 주는 것으로 잘 알려져 있다. 그러나 나노입자가 정맥주사를 통하여 인체에 투여할 때는 분해되지 않는 PVA와 같은 분산안정제는 문제가 될 수 있기 때문에 이를 대체하기 위한 생분해성 분산 안정제의 연구가 필요하다.⁸ 혈액 내에서 나노입자의 분산 안정성은 PEG와 지방족 폴리에스테르를 공중합한 재료를 사용함으로써 분산 시에 PEG 사슬이 표면 쪽에 위치하여 단백질 흡착 등에 기인하는 응집을 억제하는 기능을 갖는 스텔스 나노입자에 대한 연구 결과가 보고되고 있다.^{4,5} 일반적으로 이러한 목적으로는 PEG의 분자량이 2~5 kDa이 연구되었다.⁹ 그러나 나노입자의 시간에 따른 수용액내에서 분산 안정성에 대해서는 많이 연구되어지지 않은 상황이다.

최근들어 Jérôme 등은 PCL(A)과 PEG(B)를 이용하여 AB형 블록공중합체, PEG의 그래프트 밀도를 제어한 그래프트 공중합체(A-g-B)를 제조하고 나노입자의 제조시에 스텔스 특성에 대한 연구결과를 보고하였다.¹⁰ 이 논문에서 고분자내에 PEG의 함량을 증가할수록 분산안정성이 향상됨을 나타내었다. 또한, 본 연구진에서 개발한 PLLA-g-PEG를¹¹ PLGA와 블렌드하여 제조한 단백질 약물 방출용 미립구(microparticle) 제형에서도 그래프트 양친성 공중합체의 도입을 통해 높은 약물담지 특성과 100%에 가까운 단백질 약물 방출 특성을 나타냄을 보였다.¹² 이는 양친성 그래프트 공중합체로 인해 단백질에 대한 안정성을 나타내는 것이며 나노입자의 적용에서도 우수한 특성을 기대할 수 있다.

나노입자는 일반적으로 낮은 농도로 분산이 되어 있고 수분산상과 건조상의 차이로 인해 특성화가 용이하지 않는 특성이 있으며 특히, 시간에 따른 입자의 크기측정을 통한 분해 거동이나 분산 안정성은 최근에서야 일부 보고되고 있는 실정이다.^{13,14} 이에 본 연구에서는 수분산 상태에서의 시간에 따른 입자 크기를 측정함으로써 짧은 사슬 길이의 PEG가 그래프트된 경우에 분산안정성에 대한 영향, PVA 분산 안정제의 영향, 시간에 따른 분해거동에 따른 분산 안정성을 정리하였다.

실 험

시약 및 재료. Lactide와 glycolide 조성비가 50 : 50인 PLGA 공중합체는 Sigma사에서 PLA는 미국의 Polyscience사에서 구입하여 사용하였다. 사용되어진 PLGA와 PLA의 분자량은 각각 8.6

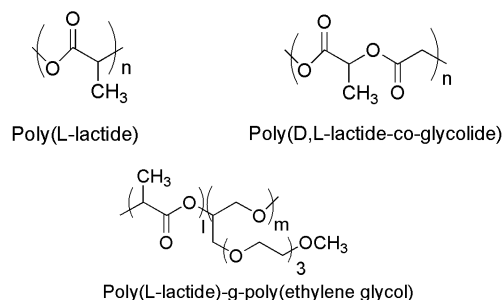


Figure 1. Chemical structure of the biodegradable polymer for the nanoparticle preparation.

Table 1. Polymer Composition of the Nanoparticle

Notation	PVA ^a	PLGA (wt%)	PLA (wt%)	PLLA-g-PEG (wt%)
NP-1	X	100	—	—
NP-2	X	90	10	—
NP-3	X	90	—	10
NP-4	O	100	—	—
NP-5	O	90	10	—
NP-6	O	90	—	10

^aO or X indicates whether PVA is used as suspension stabilizer or not.

과 2 kD이었다. 양친성 생분해성 그래프트 형태의 고분자인 PLLA-g-PEG는 기존에 보고된 방식으로¹¹ PEG가 23% 그래프트율을 갖는 고분자를 합성하여 사용하였다. 요약하면, 그래프트 고분자는 L-lactide와 한 쪽 말단이 에폭시기로 개질된 MPEG를 이용하여 개환중합을 통하여 중합되었다. 그래프트에 사용된 MPEG의 분자량은 120이고 사용된 PLLA-g-PEG의 분자량은 10 kD($M_w/M_n = 1.88$)이었다. 모델 단백질로는 Sigma사의 난백 lysozyme(hen egg white)를 사용하였다. Phosphate 완충 용액(PBS, 33 mM, pH 7.4) 50 mL에 1 g의 lysozyme을 용해시켰다. PVA (87~89% hydrolyzed, $M_w = 13-23$ kD)는 Aldrich사의 제품을 사용하였다. Figure 1에서는 나노입자를 제조하는데 사용한 고분자의 화학적 구조를 나타내었다.

나노입자의 제조. 나노입자는 자발적 에멀전/용매 확산 방법(spontaneous emulsification solvent diffusion technique)을 사용하여 제조하였다.¹⁵ 간략하게 200 mg의 고분자를 10 mL의 아세톤에 용해를 시킨다. 그 후 이 용액을 150 mL의 PBS 용액에 적하하였으며 상온에서 3시간 동안 교반하면서 아세톤을 제거함으로써 나노입자를 얻었다. 나노입자가 분산된 PBS는 주사기를 통해 0.45 μ m의 필터를 통과시켰다. 나노입자는 분산 안정제인 PVA가 0.4% 용해된 PBS 용액과 PVA가 도입되지 않은 PBS 용액에서 각각 제조하였다. 나노입자가 분산된 액은 증류수를 첨가하여 희석하였고 최종 농도가 0.6 mg/mL가 되도록 하였다. 나노입자 제조를 위한 자세한 조성은 Table 1에 나타내었다.

입자 크기의 측정. 나노입자의 평균 크기는 BI-9000AT digital auto-correlator (Brookhaven Instruments)가 부착된 BI-90 Plus 입자 크기 분석기를 이용해 동적 광산란법(dynamic light scattering)으로 측정하였다. 측정조건은 20 $^{\circ}$ C에서 입사빔에 대해 fixed scattering angle 90 $^{\circ}$ 에서 duplicate로 제조된 샘플을 측정하였다.

결과 및 토론

나노입자의 제조. 나노입자는 입자 크기를 작게 제어할 수 있는 자발적 에멀션/용매 확산 방법을 사용하여 제조하였다. 이전의 연구보고와 같이 분산 안정제를 사용하지 않고 나노입자를 제조하였을 때와¹⁶ PVA를 분산 안정제로 도입한 경우, 양친성 그래프트 고분자 또는 소수성 고분자를 PLGA에 일부 도입하였을 경우의 안정성 평가를 위하여 Table 1에 나타난 바와 같이 나노입자를 제조하였다. 분산매에서의 PVA 농도가 1% 이상에서는 PVA의 함량이 제조되어지는 나노입자의 크기에 영향을 미치게 되며 농도가 2.5% 이상부터 PVA 자체가 응집체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 이에 본 연구에서는 PVA 농도를 매우 낮게(0.4 wt%) 유지하여 PVA의 입자크기에 대한 영향변수를 최소화하고자 하였다.¹⁷ Figure 2에서는 PVA가 분산 안정제로 도입되었을 경우와 도입되지 않았을 경우의 나노입자 제조 직후의 크기를 나타내고 있다. PVA의 사용 유무와 관계없이 모든 입자들은 그 크기의 분포가 매우 좁았음을 확인하였고 분산 안정제 없이도 나노입자가 잘 제조됨을 알 수 있다.¹⁶ PVA를 분산 안정제를 사용한 경우는 사용하지 않은 경우보다 입자의 크기가 약간 증가함을 알 수 있다. 일반적으로 PVA의 농도에 따라 입자 크기가 변경될 때는 농도가 증가할수록 입자 크기가 줄어들게 되나¹⁸ 본 연구에서는 매우 낮은 농도의 PVA가 적용되어 사용된 PVA의 농도가 입자 크기에는 영향을 미치지 않고 분산 안정화에만 작용하고 입자 크기의 증가는 나노입자 표면에 PVA가 흡착되어 표면층을 형성하기 때문이다.^{17,19}

분해시간에 따른 분산 안정성의 평가. Figure 3에서는 37 °C에서 항온 배양에 따른 나노입자의 크기 변화를 나타내고 있다. 분산 안정제가 없이 제조된 경우에는 항온 배양 시간에 따라 지속적으로 입자의 크기가 줄어들었으며 7일째에는 bimodal distribution 형태의 입도 분포를 나타내었다. PLLA-*g*-PEG를 첨가한 경우(NP-3) 외에 PLGA단독(NP-1)의 경우나 PLLA를 PLGA와 블렌드하여 제조된 나노입자(NP-2)는 초기의 입자 크기보다 큰 입자 크기가 관찰되었다. 지방족 폴리에스테르의 분해특성은 벌크 분해 메커니즘을 따르며 입자내로의 물분자의 확산, 분자량의 감소, 입자의 질량 감소의 순으로 분해가 진행되는 것으로 잘 알려져 있다. 또한 laser light

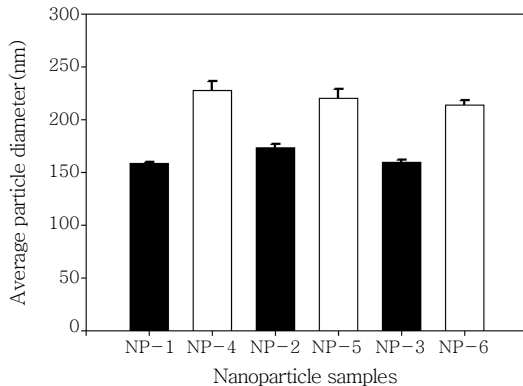


Figure 2. Initial average diameter of nanoparticle prepared with (NP-4, 5, 6) and without (NP-1, 2, 3) PVA as a suspension stabilizer.

scattering을 이용한 나노입자의 밀도 측정을 통해 나노입자는 벌크 상태에 비해 많은 물분자를 포함하며 느슨하게 고분자 사슬이 응집된 형태를 이루고 있음이 보고되었다.²⁰ 분산상에는 나노입자 외에 입자의 크기를 증가시킬 인자가 없으며 이에 분해시간에 따른 입자 크기가 증가한 것은 bulk erosion에 의해 붕괴된 일부 입자가 붕괴되지 않은 입자와 응집(aggregation)하는 것으로 예측된다. PVA를 분산 안정제를 사용한 경우에는 7일째에서 현격한 크기 변화를 나타내었다. 특히하게도 PLLA-*g*-PEG가 도입되고 PVA를 분산 안정제로 사용한 경우에는 unimodal한 분포를 나타내었고 입자 크기의 변화가 거의 없어 분해가 진행됨에도 7일까지 그 형태를 잘 유지하고 있는 것으로 나타났다. 블렌드 형태로 도입된 PLLA-*g*-PEG는 PLGA와 상용성을 나타내며 입자 내부와 표면에 위치한다.¹² 또한 PVA는 나노입자 표면에 위치하게 되고 그 농도에 따라 표면에 위치하는 PVA 함량이 증가하는 것은 잘 알려져 있는 사실이다. NP-6의 경우에는 PVA와 PLLA-*g*-PEG가 공통으로 나노입자 표면에서 입자의 붕괴를 억제하고 있어 7일간의 배양에도 입자 크기를 유지하는 것으로 예측된다.

나노입자가 분산된 매질에서 분해반응이 일어나는지를 확인하기 위하여 분산매질의 pH를 측정하였다. 모든 분산매질이 7일의 항온 배양 후에 초기의 7.4에서 7.1로 산도가 약간 증가하였음을 확인하였고 이를 통하여 모든 경우 7일간의 배양에도 분해가 일어나고 있

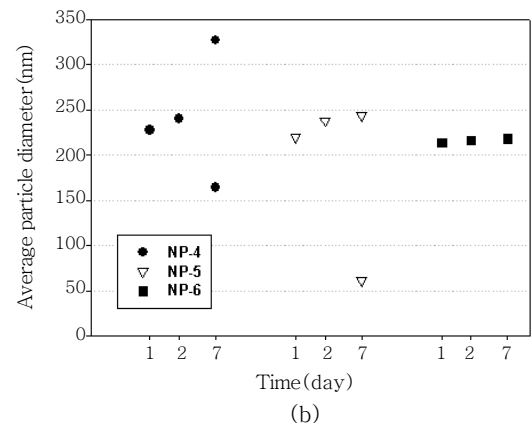
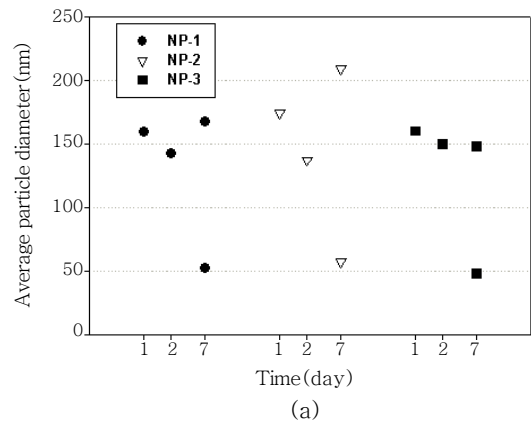


Figure 3. Nanoparticle size variation with incubation time at 37 °C. (a) No suspension stabilizer and (b) PVA as suspension stabilizer.

음을 확인하였다. 실제로 나노입자를 적용하는 경우에는 나노입자의 소멸 반감기가 수 시간으로 보고되고 있어²¹ 투여 후 7일까지 인체 내에 존재하는 경우가 흔치 않으며 혈액 내에서 나노입자의 낮은 농도로 인해 분해가 진행된 작은 입자간의 응집에 따른 초기 대비 입자의 크기가 증가하는 경우는 발생하지 않을 것으로 판단되나 시간에 따라 나노입자가 분해됨에 따라 분산 안정성의 변화가 발생할 수 있으며 투여 이전의 분산상의 보관에 따른 입도의 크기가 증가할 수 있음을 알 수 있다.

나노입자는 일반적으로 낮은 농도로 수상에 분산되어 있기 때문에 이의 회수를 위해서는 고속의 원심분리를 사용하거나 동결건조를 하였을 경우 극미량의 나노입자를 얻게 된다. 사용을 위해서는 재분산의 과정을 거쳐야 하는 번거로움이 있다. 이에 본 연구진은 나노입자가 분산된 상태로 매질을 동결하여 보관 가능 여부를 파악하기 위하여 NP-1과 NP-4를 선택하여 나노입자가 분산된 PBS 자체를 2일간 동결상태로 유지한 후 상온으로 해동하였고 이때 나노입자의 크기를 측정하였다. 결과로 NP-1은 평균 입경 832 nm, NP-4는 232 nm 값을 얻었고 표면에 분포한 PVA가 동결시에도 분산 안정성을 유지시키는데 영향을 준다는 사실을 확인하였다. 기존에 PVA나 PEG-PPG를 분산 안정제로 사용한 경우에서도 이와 동일한 특성이 보고되었다.^{7,22} 이것은 분산매의 동결시에 나노입자의 표면에 위치한 PVA가 입자간의 장벽으로 작용하여 응집을 억제하였기 때문이다.

단백질 용액 투입에 따른 분산 안정성 평가. 난백단백질은 미립자 형태의 단백질 약물 방출연구나 단백질 안정성 연구에 많이 적용되고 있는 모델 단백질이다.^{23,24} 이에 본 연구에서도 난백단백질이 나노입자에 도입되었을 때 분산 안정성을 평가하기 위하여 Table 1의 조성으로 제조된 나노입자가 분산된 10 mL에 1 mL의 난백단백질이 용해된 PBS(protein stock solution)를 주입하였다. 이 때 분산 안정제인 PVA를 매질에 분산하여 제조한 경우와 그렇지 않은 경우에는 큰 차이가 발생함을 확인할 수 있었다. 우선 PVA를 분산안정제로 사용하지 않은 NP-1과 NP-2는 난백단백질이 도입되는 즉시 나노입자간의 응집에 의한 침전물이 발생하였다. PLLA-*g*-PEG가 도입된 경우에는 나노입자의 크기가 160 nm에서 2440 nm로 증가하였으나 분산형태를 유지하였다. 그러나 약 1일 이후에는 NP-1이나 NP-2와 같이 응집에 의한 침전물이 생성되었다. 이를 통해 양친성 그래프트 고분자가 PLGA와 블렌드되었을 때 단백질에 분산안정성을 나타냄을 확인할 수 있었으나 그 효과가 크지 않았다. 이러한 원인은 여러 가지로 예측해 볼 수 있는데 우선 그래프트에 사용된 MPEG의 분자량이 매우 작아서 단백질에 대한 안정성을 유지하기 불충분하였고 분자량 120인 MPEG가 그래프트된 경우는 rigid한 구조를 통해 측사슬의 움직임이 제약되었을 가능성이 있다.^{25,26} Figure 4에서는 PLGA로만 제조된 NP-1과 NP-4에 난백단백질 PBS 용액을 주입한 직후에 모습을 나타내고 있다.

분산 안정제인 PVA를 분산매에 용해시켜 제작한 나노입자의 경우에는 난백단백질 PBS 용액을 주입하였어도 응집에 의한 침전은 발견되지 않았다. Figure 5에서는 분산 안정제를 사용한 경우 시간에 따른 나노입자의 크기변화를 나타내었다. 그림에서 나타난 바와 같이 나노입자의 크기는 초기 대비 거의 일정(약 10 nm 정도 커짐)하게 유지하였으며 이는 단백질 존재하에서 나노입자가 안정되게 분산되어 있음을 의미한다. 이는 PVA가 나노입자의 제조시에 영향을 미칠뿐

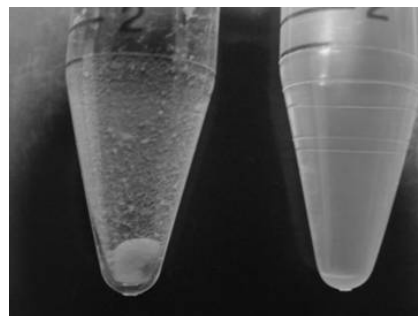


Figure 4. Snap shot of the buffer solution containing nano-particles (NP-1 (left), NP-4 (right)) when the lysozyme stock solution was added.

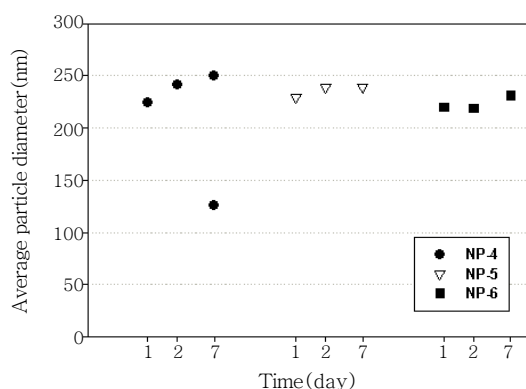


Figure 5. Nanoparticle size variation with incubation time at 37 °C when lysozyme stock solution was introduced after the nanoparticle preparation.

만 아니라 단백질 흡착을 억제하는 능력이 있음을 나타낸다. 이러한 특징은 기존의 보고 결과에서와 같이 단백질을 미립자에 담지화하는 과정에서도 PVA가 단백질의 안정성과 응집을 억제하는 사실과 동일한 결과이다.²⁴

결론

본 연구에서는 PLGA, PLGA(9)/PLLA(1), 그리고 PLGA(9)/PLLA-*g*-PEG(1) 고분자를 기반으로 하여 나노입자를 제조하고 이의 분산 안정성을 나노입자의 크기를 측정함으로써 평가하였다. 시간에 따른 광산란법을 이용한 크기 측정은 나노입자가 분산된 상태에서 변화를 관찰하기에 용이할 뿐만 아니라 분산 안정성을 평가하는 기법으로 제시될 수 있음을 확인하였다. 짧은 길이의 PEG가 그래프트된 고분자를 적용한 경우에도 PVA를 분산 안정제로 사용하지 않은 경우 단백질 흡착에 대하여 분산 안정성을 어느 정도 나타냄을 확인할 수 있었다. 나노입자의 분산 안정성에 미치는 양친성 고분자의 구조에 대한 영향은 양친성 고분자의 함량, 사용하는 PEG의 분자량의 변화를 통해 더욱 자세히 확인될 수 있을 것으로 판단되어 이에 따른 표면전하의 변화에 대한 추가적인 연구가 계획 중이다.

PVA가 나노입자의 분산 안정성에 상당한 영향을 미치는 결과를 통해 스탬프 형태의 나노입자 제조를 위해 도입되는 PEG를 함유하는

양친성 고분자의 영향 분석을 위해서는 분산 안정제가 미치는 영향을 동시에 고려해야 한다. 최근 지방족 폴리에스테르와 PEG를 기반으로 한 수용성 계면안정제의 도입과 같은 시도가 나노입자의 제조를 위한 재료로도 동시에 고려되어야 한다.

참 고 문 헌

1. K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, *J. Control. Release*, **70**, 1 (2001).
2. R. Gref, A. Domb, P. Quellec, T. Blunk, R. H. Müller, J. M. Verbavatz, and R. Langer, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **16**, 215 (1995).
3. K. E. Uhrich, S. M. Cannizarro, R. S. Langer, and K. M. Shakesheff, *Chem. Rev.*, **99**, 3181 (1999).
4. R. Gref, Y. Minamitake, M. T. Peracchia, V. Trubetskoy, V. Torchilin, and R. Langer, *Science*, **263**, 1600 (1994).
5. M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, E. Dellacherie, and C. Vigneron, *J. Biomed. Mater. Res.*, **44**, 109 (1999).
6. B. S. Kim, Y. Zeroual, and K. M. Lee, *Polymer(Korea)*, **31**, 20 (2007).
7. T. K. Jung, Y. M. Oh, and B. C. Shin, *Polymer(Korea)*, **27**, 370 (2003).
8. T. Verrecchia, G. Spenlehauer, D. V. Bazile, A. Murry-Brelie, Y. Archimbaud, and M. Veillard, *J. Control. Release*, **36**, 49 (1995).
9. S. M. Moghimi, A. C. Hunter, and J. C. Murray, *Pharmacol. Rev.*, **53**, 283 (2001).
10. J. Rieger, C. Passirani, J. P. Benoit, K. van Butsele, R. Jérôme, and C. Jérôme, *Adv. Funct. Mater.*, **16**, 1506 (2006).
11. K. Y. Cho, C. H. Kim, J. W. Lee, and J. K. Park, *Macromol. Rapid Commun.*, **20**, 598 (1999).
12. K. Y. Cho, S. H. Choi, C. H. Kim, Y. S. Nam, T. G. Park, and J. K. Park, *J. Control. Release*, **76**, 275 (2001).
13. C. Wu, J. Fu, and Y. Zhao, *Macromolecules*, **33**, 9040 (2000).
14. M. J. Santander-Ortega, N. Csaba, M. J. Alonso, J. L. Ortega-Vinuesa, and D. Bastos-González, *Colloid Surface A*, **296**, 132 (2007).
15. H. Murakami, M. Kobayashi, H. Takeuchi, and Y. Kawashima, *Powder Technol.*, **107**, 137 (2000).
16. J. K. Kweon, Y. I. Jeong, M. K. Jang, C. H. Lee, and J. W. Nah, *Polymer(Korea)*, **26**, 535 (2002).
17. M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M. J. Alonso, P. Labrude, and C. Vigneron, *J. Control. Release*, **50**, 31 (1998).
18. S. K. Sahoo, J. Panyam, S. Prabha, and V. Labhasetwar, *J. Control. Release*, **82**, 105 (2002).
19. K. M. Shakesheff, C. Evora, I. Soriano, and R. Langer, *J. Colloid Interface Sci.*, **185**, 538 (1997).
20. J. Fu and C. Wu, *J. Polym. Sci.; Part B: Polym. Phys.*, **39**, 703 (2001).
21. K. Avgoustakis, A. Beletsi, Z. Panagi, P. Klepetsanis, E. Livaniou, G. Evangelatos, and D. S. Ithakissios, *Int. J. Pharm.*, **259**, 115 (2003).
22. H. Murakami, Y. Kawashima, T. Niwa, T. Hino, H. Takeuchi, and M. Kobayashi, *Int. J. Pharm.*, **149**, 43 (1997).
23. G. Jian, B. H. Woo, F. Kang, J. Singh, and P. P. DeLuca, *J. Control. Release*, **79**, 137 (2002).
24. M. van de Weert, J. Hoechstetter, W. E. Hennink, and D. J. A. Crommelin, *J. Control. Release*, **68**, 351 (2000).
25. K. Y. Cho, K. H. Lee, and J. K. Park, *Polym. J.*, **32**, 537 (2000).
26. A. Vonarbourg, C. Passirani, P. Saulnier, and J. P. Benoit, *Biomaterials*, **27**, 4356 (2006).