

항암 약물전달을 위한 Poly(ethylene glycol)/Poly(trimethylene carbonate) AB₂형 미토암 고분자의 합성 및 특성 분석

서진솔 · 정유정* · 이영주 · 김유경 · Tran Thi Ngoc Van · 이 립 · 이은지* · 강한창** · 허강무†
충남대학교 고분자공학과, *충남대학교 분석과학대학원, **카톨릭대학교 약학대학
(2015년 8월 5일 접수, 2015년 9월 5일 수정, 2015년 9월 9일 채택)

Synthesis and Characterization of Poly(ethylene glycol)/Poly(trimethylene carbonate) AB₂ Miktoarm Copolymers for Anticancer Drug Delivery

Jin Sol Seo, You Jeong Jeong*, Young Ju Lee, Yu Gyeong Kim, Tran Thi Ngoc Van, Li Li,
Eunji Lee*, Han Chang Kang**, and Kang Moo Huh†

Department of Polymer Science and Engineering, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
*Graduate School of Analytical Science and Technology, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
**Department of Pharmacy and Integrated Research Institute of Pharmaceutical Sciences,
The Catholic University of Korea, Gyeonggi-do 14662, Korea
(Received August 5, 2015; Revised September 5, 2015; Accepted September 9, 2015)

초록: 본 연구에서는 친수성 poly(ethylene glycol)(PEG)와 생분해성 poly(trimethylene carbonate)(PTMC)로 구성된 양친매성 생체인지질 모방 구조인 AB₂형 미토암 공중합체를 합성하여, 선형 PEG-PTMC 이중블록 공중합체와의 자기조립 및 약물전달체로서의 특성을 비교하였다. ¹H NMR, FTIR, GPC, DSC 분석 등을 통하여 화학적 조성과 구조를 확인하였고, 수용액 내에서 자기조립을 통해 약 40~70 nm의 구형 미셀 구조를 이루는 것을 확인하였다. 고체 분산법에 의한 난용성 항암제인 paclitaxel의 봉입 실험 결과, 고분자의 구조특성과 봉입조건에 따라 봉입효율과 봉입량이 크게 달라짐을 확인하였다. 특히 미토암 구조 고분자가 선형 이중블록 공중합체와 비교하여, 상대적으로 높은 약물 담지능과 재분산성을 보임으로써 약물전달체로서의 특성이 우수함을 확인하였다.

Abstract: In this study, a series of amphiphilic phospholipid structure-mimetic AB₂ miktoarm copolymers consisting of hydrophilic poly(ethylene glycol) (PEG) and biodegradable poly(trimethylene carbonate) (PTMC) were synthesized and compared with typical linear di-block copolymers in terms of self-assembling and drug carrier properties. All the synthesized polymers were characterized by ¹H NMR, FTIR, GPC and DLS measurements to confirm their chemical structures and found to self-assemble in aqueous media to form spherical micelle structures with about 40~70 nm in diameter. A poorly soluble drug, paclitaxel, as a model drug was loaded into polymer micelles by a solid dispersion method and the drug loading efficiency and content was significantly dependent on the loading conditions and the polymer structures. In particular, the miktoarm polymers demonstrated better drug-loading capacity and colloidal stability than the corresponding di-block copolymers, increasing their potential for drug delivery applications.

Keywords: miktoarm copolymer, poly(ethylene glycol), poly(trimethylene carbonate), polymeric micelle, drug delivery.

서 론

최근 고분자 합성기술의 비약적인 발전은 덴드리머(dendrimer), 고차가지구조 고분자(hyperbranched polymer), 스타 고분자(star polymer), 그래프트형 고분자(graft polymer),

폴리로텍산(polyrotaxane) 등과 같이 정교하고 복잡한 구조의 고분자를 더욱 쉽고 효율적으로 합성할 수 있게 되었다. 위에서 언급된 기하학적 구조를 가진 고분자들은 선형 고분자가 갖지 못하는 독특한 구조적, 기능적 특징에 기반하여 바이오메디컬 및 기타 여러 응용분야에서 많은 관심을 받고 있다. 최근 새로운 형태의 고분자로 분류되고 있는 미토암 고분자는 코어(core)로 부터 다양한 종류의 고분자 사슬이 성장되어 있는 모습을 하고 있는 스타 고분자의 일종이다.¹ 미토암 고분자는 최소한 두 가지 이상의 다른 고분자 구성체들이

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khuh@cnu.ac.kr
©2016 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

하나의 코어에 연결되어 있는 형태로, 벌크 또는 수용액 상에서 상분리(phase-separation)나 자기조립(self-assembly)과 같은 특징적 성질을 나타내며, 약물 나노전달체(drug nanocarrier), 진단 분석(diagnostic assays), 나노패턴(nanopatterns), 포토닉스(photonic) 분야에 잠재적 응용성을 갖는 새로운 형태의 나노구조체를 형성하는데 이용될 수 있다.¹²

양친매성 고분자가 수용액 상에서 자기조립에 의해 형성하는 자기조립체는 일반적으로 소수성 영역과 친수성 영역을 가지고 있는 나노미터 크기의 다양한 형태의 입자를 형성할 수 있으며, 난용성 약물의 가용화, 약물의 수동적 또는 능동적 표적화, 약물 방출 조절, 기타 생체반응형 약물전달 등의 다양한 장점으로 인해 약물전달체로서 많은 주목을 받아왔다.³⁻⁶ 특히, 양친매성 블록 공중합체에 의해 형성되는 고분자 미셀은 대표적인 나노 약물전달체형의 하나로 이용되고 있으며, 전달체로서의 안정성과 효율성이 향상된 다양한 조성의 고분자 블록들로 구성된 미셀이 개발되어 왔다.⁷⁻¹¹

하나의 친수성 고분자(A) 블록과 두 개의 소수성 고분자(B) 블록으로 구성된 양친매성 AB₂형 미토암 고분자는 자기조립 형성능이 뛰어난 생체인지질 모방 구조를 갖는다. 이러한 구조의 미토암 고분자는 선형 고분자와는 다른 자기조립 거동을 보임과 동시에 약물전달체로서의 특성이 우수한 자기조립 나노구조체를 형성하는데 유용한 것으로 보고되었다.¹²⁻¹⁴ 예를 들면, poly(ethylene glycol)(PEG)과 poly(L-lactide)(PLA)로 구성된 AB₂형 미토암 고분자는 상응하는 선형 고분자보다 우수한 베시클 구조 형성능을 가진다는 것이 보고되었다.¹² 한편, 본 연구그룹의 기존 연구에서는 PEG와 poly(ϵ -caprolactone)(PCL)로 구성된 양친매성 AB₂형 미토암 고분자는 블록 구조에 따라 구형에서 실린더형(cylindrical) 나노구조체를 형성할 수 있었으며, 실린더형 나노구조체는 구형의 전달체보다 우수한 약물담지능을 가지면서, 높은 세포 유입률을 보여주었다.¹⁵ 기존의 연구결과들이 보여주듯이, 미토암 고분자의 블록 구조 및 조성을 체계적으로 변환하는 연구를 통해 다양한 자기조립 형성 및 특성에 대한 제어가 가능할 수 있을 뿐더러, 이로부터 다양한 특성의 나노전달체를 구현할 수 있을 것으로 기대된다.

Paclitaxel(PTX)은 폐암, 난소암, 유방암 등 다양한 종류의 암에 광범위하게 사용되고, 적은 양으로 높은 암 치료 효율을 나타내는 대표적인 항암제이다.¹⁶ 하지만, PTX는 물에 대한 용해도가 매우 낮은 난용성 약물로 경구 투여 시 생체이용률이 낮고, 심각한 부작용들이 보고되고 있어, 이를 극복하기 위해 리포솜(liposome), 마이크로스피어(microsphere), 나노입자(nanoparticle), 고분자 마이셀(polymer micelle) 등 다양한 제형들이 개발되고 있다.¹⁶⁻¹⁸

본 연구에서는 친수성 고분자 블록으로서 PEG와 소수성 고분자 블록으로서 poly(trimethylene carbonate)(PTMC)를 갖는 양친매성 AB₂형 미토암 고분자를 합성하고, 약물전달체

로의 특성을 평가하였다. PEG는 생체적합성이 우수한 친수성 고분자로 고분자 미셀 형성을 위한 블록 공중합체에 가장 널리 사용되는 고분자이다. PTMC는 생체적합성이 우수하고, 생체 내에서 효소와 가수분해에 의해 분해되는 생분해성 고분자이며, 유리전이온도가 낮아 다른 생분해성 고분자에 비해 뛰어난 유연성을 가지고 있어 생체재료로 널리 사용되고 있다.¹⁹⁻²⁵ 본 실험에서는 친수성 PEG 블록과 소수성 PTMC 블록으로 구성된 선형 이중블록 공중합체, 미토암 고분자, 및 이들로부터 제조된 자기조립 나노전달체의 물리화학적 특성을 분석하고, 난용성 약물인 PTX를 대상으로 다양한 조건하에서 약물 담지능, 입자 안정성, 약물방출 등 약물전달체로서의 기본 특성을 비교하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 연구에서는 거대개시제로서 수평균분자량이 2000 Da인 methoxy poly(ethylene glycol)(MPEG, Sigma-Aldrich, 미국)는 70 °C 진공 상태에서 12시간 건조한 후 사용하였다. Stannous octoate(Sn(Oct)₂, Sigma-Aldrich, 미국)는 톨루엔(Sigma-Aldrich, 미국)에 희석시켜 사용하였다. 트리에틸아민(TEA), 아세트니트릴, 다이메틸설폭사이드(DMSO), 다이클로로메탄(DCM), 클로로포름은 Sigma-Aldrich사(미국)에서 구입하였고, trimethylene carbonate(TMC), *p*-nitrophenyl chloroformate(pNC), 2-amino-1,3-propanediol(serinol)은 Tokyo Chemical Industry사(일본)에서 구입하였다. 다이에틸에테르와 메탄올은 (주)삼전화학(한국)에서 구입하였다. 실험에 사용한 물은 3차 증류수를 사용하였다.

MPEG-serinol Conjugate의 합성. AB₂형 미토암 고분자를 합성하기 위하여 MPEG의 말단에 두 개의 하이드록실기를 가지는 MPEG 유도체(MPEG-serinol conjugate)를 합성하였다. 먼저 둥근 플라스크에 MPEG 10 g을 아세트나이트릴 40 mL에 녹인 후, pNC 12.6 g을 넣어 충분히 교반하였다. 질소기체 하에서 TEA 4.36 mL를 한 방울씩 천천히 떨어뜨려 주고 상온에서 24시간 반응시켰다. 반응 시 HCl-TEA가 생성되면서 흰색의 침전물이 생성되고, 반응 후 침전물을 원심분리와 0.45 μ m syringe filter를 통해 제거한 후, 과량의 차가운 다이에틸에테르에 침전시켰다. 침전된 고분자를 감압 여과 후 상온의 진공오븐에서 건조하여 MPEG말단이 *p*-nitrophenyl ester로 치환된 생성물(MPEG-pNC)을 얻었다. 둥근 플라스크에 MPEG-pNC 9 g과 serinol 3.37 g을 DMSO 55 mL에 넣고 질소기체 하에서 36시간 상온에서 반응시켰다. 반응 후 증류수에서 하루 동안 투석(MWCO=1000 Da)을 통해 유기용매와 미반응된 serinol을 제거한 후, 동결건조를 통해서 파우더 형태의 생성물을 얻었다. 생성물을 DCM에 녹이고 차가운 다이에틸에테르에 침전시킨 후, 수거하여 진공오븐에 건조시킴으로써 파우더 형태의 MPEG-serinol

conjugate를 얻었다.

PEG-PTMC₂ 미토암 고분자의 합성. PEG-PTMC₂ 미토암 고분자는 MPEG-serinol conjugate를 거대개시제로 사용하여 TMC의 개환중합을 통하여 합성하였다. 둥근 플라스크에 MPEG-serinol conjugate와 TMC 단량체를 넣고 90 °C, 진공 하에서 2시간 동안 수분을 제거한 후, 반응물에 Sn(Oct)₂를 넣고 120 °C에서 12시간 동안 반응시킨다. 생성물을 클로로포름에 녹인 다음, 차가운 메탄올에 침전시켰다. 원심분리를 통해 침전물을 수거한 후, 진공건조를 통해 PEG-PTMC₂ 미토암 고분자를 얻었다. PEG-PTMC 이중블록 공중합체는 MPEG를 개시제로 사용하여 미토암 고분자의 경우와 같은 반응 조성으로 합성하였다.

PEG-PTMC₂ 미토암 고분자의 특성분석. 합성된 고분자의 화학적 조성은 ¹H NMR(JNM-AL400, Jeol Ltd, Akishima, 일본)을 이용하여 분석하였고, 용매는 deuterated chloroform (CDCl₃, Aldrich)을 사용하였다. 또한 합성 전과 후의 분자결합의 구조적인 변화를 살펴보기 위하여 FTIR(MAGNA 560 spectrometer, 미국)을 이용하여 분석하였다. KBr pellet을 만들어 시편을 제조하였으며, 500~4000 cm⁻¹ 범위에서 측정하였다. 고분자의 분자량 및 분자량 분포는 겔투과크로마토그래피(GPC, Agilent 1100 series, 미국)를 이용하여 분석하였다. 두 개의 컬럼(pLgel 5 μm MIXED-D & E columns), RI 탐지기, quaternary 펌프를 장착했으며, 이동상 용매인 테트라하이드로퓨란(THF, J.T Baker, 미국)을 1 mL/min의 유속으로 측정하였다. PEG를 기준 시료로 이용하였고 컬럼과 탐지기의 온도는 모두 40 °C를 유지하였다. 합성된 고분자의 열적 특성을 관찰하기 위하여 시차주사열량계(DSC 1, Mettler-Toledo, 미국)를 이용하여 2 °C/min의 승온 속도로 0~80 °C의 범위에서 용융온도를 관찰하였다.

고분자 미셀의 제조. 고분자 미셀은 고체 분산체 방법으로 제조하였다. 일정량의 고분자를 둥근 플라스크에 넣고 THF에 녹인 고분자용액을 회전증발기를 사용하여 용매를 증발시켜 젤과 같은 형태의 고분자 필름으로 만든 후, 증류수를 넣고 미셀이 고르게 분산되도록 30분 동안 교반하였다. 남은 유기용매를 제거하기 위해 투석막(MWCO=2000 Da)을 이용하여 증류수로 1일간 투석한다. 분산 및 투석에 사용한 증류수는 온도에 따른 미셀 형성 거동의 차이를 비교하기 위해 차가운(약 4 °C 이하) 또는 뜨거운(약 40 °C 이상) 증류수를 각각 사용하였다. 투석 후 얻은 용액은 동결건조하여 분말상 미셀 입자를 얻었다.

임계 미셀 농도(Critical Micelle Concentration, CMC) 측정. 합성된 고분자가 수용액상에서 자기조립하여 미셀을 형성하는 농도인 CMC를 측정하고자 형광분석기(Cary Eclipse, Varian, 미국)를 이용하여 분석하였다. 형광물질로 pyrene (Sigma-Aldrich, 미국)을 사용하였고, 소량의 THF에 녹인 pyrene 용액을 3차 증류수에 희석하고, 잔류 THF를 제거하

기 위해 65 °C에서 3시간 동안 교반해 주었다. 이 pyrene 용액을 농도가 각각 1×10⁻⁵~0.2 mg/mL인 고분자 용액에 1:1(v/v)로 혼합하여 pyrene 용액의 최종 농도가 6.0×10⁻⁷M이 되도록 하였다. pyrene의 안정화를 위하여 상온에서 12시간 이상 유지한 후, pyrene의 방출 파장 373 nm에서 특이적 형광 흡수 스펙트럼들을 측정하였다. 흡수파장은 300~350 nm 범위에서 측정하였다.

자기조립 나노구조체 특성평가. 각각의 고분자의 수용액상에서 형성된 자기조립 나노구조체의 크기와 형태를 관찰하기 위해 고분자 농도를 1 mg/mL로 하여 측정하였다. 입자의 크기 및 분포는 동적광산란기(ELS-Z, Photal, 일본)를 통하여 측정하였다. 또한 입자의 형태를 관찰하기 위해 투과전자현미경(JEM-2100F, JEOL, 일본)을 통하여 알아보았다. 고분자 수용액을 탄소 코팅된 구리 그리드 위에 적하하여 건조시킨 후 가속전압 300 kV에서 측정하였다.

약물봉입(Drug Loading). 소수성 약물인 PTX를 고체 분산체 방법으로 봉입하였다. 약물과 고분자를 둥근 플라스크에 넣고 1 mL의 THF에 녹인다. 녹은 고분자 용액을 회전증발기를 사용하여 용매를 증발시켜 젤과 같은 형태의 고분자 필름으로 만든 후, 증류수를 넣고 미셀이 고르게 분산되도록 30분 동안 교반하였다. 남은 유기용매를 제거하기 위해 투석막(MWCO=2000 Da)을 이용하여 증류수로 하루 동안 투석한다. 투석 후 봉입되지 않은 약물은 0.45 μm syringe filter를 이용해 제거하고 동결 건조하여 약물이 함유된 분말상의 입자를 얻었다. 약물봉입 함량(drug loading content, DLC)과 약물봉입 효율(drug loading efficiency, DLE)은 약물이 봉입된 동결건조 샘플을 THF에 녹인 후 UV-Vis spectrometer(SINCO, Korea)를 통해서 흡광도를 측정하고, 미리 측정한 표준곡선에 대입하여 봉입된 PTX의 양을 측정하였다. PTX 농도 변화에 의한 표준곡선은 다양한 농도의 PTX를 THF에 녹여서 기준용액을 준비하고 237 nm 파장에서의 PTX의 흡광도를 측정한 후, 그 흡광도 값을 이용하여 PTX 농도 변화에 의한 표준 곡선을 그렸다. DLC와 DLE는 아래의 식을 이용하여 계산하였다.²⁰

$$\text{약물봉입함량(\%)} = \frac{\text{봉입된 약물의 양}}{\text{약물이 봉입된 나노입자의 양}} \times 100$$

$$\text{약물봉입효율(\%)} = \frac{\text{봉입된 약물의 양}}{\text{초기 사용된 약물의 양}} \times 100$$

약물함유 고분자 미셀의 재분산성 및 안정성 분석. 약물이 봉입된 나노입자의 재분산성을 평가하기 위해 약물을 함유한 나노입자를 동결 건조한 후, 건조한 샘플을 처음과 같이 인산완충용액(Dulbecco's phosphate buffered saline, 0.1 M, pH=7.4)상에서 동일한 농도(1 mg/mL)로 만든 후, 동적광산란기(DLS)를 통하여 시간에 따른 입자크기의 변화를 관찰하였다.

생체 외 약물 방출 거동. 약물이 함유된 나노입자로부터의 약물 방출 거동을 알아보기 위하여 pH 7.4인 인산완충용액에 약물 함유 나노입자를 넣은 후 시간에 따른 PTX의 방출량을 UV-Vis spectrophotometer를 통하여 측정하였다. PTX이 봉입된 나노입자를 인산완충용액에 녹인 후 투석막(MWCO=10000)에 넣고 인산완충용액에서 정해진 시간마다 샘플을 취하여 방출된 약물의 양을 분석하였다.

결과 및 토론

MPEG-serinol Conjugate의 합성 및 특성 분석. AB₂형 미토암 고분자를 합성하기 위하여 MPEG의 말단을 pNC로 활성화시킨 MPEG-pNC를 얻은 후, serinol과의 컨쥬게이션을 통해 두 개의 하이드록실기 말단을 가진 MPEG-serinol conjugate를 합성하였다. Figure 1(a)는 ¹H NMR을 통한 분석 결과로, 첫 번째로 pNC로 치환된 MPEG-pNC에서 MPEG부분의 피크는 δ=3.4 ppm, 3.65 ppm에서, pNC부분의 피크는

δ=7.4ppm, 8.26 ppm에서 확인하였다. MPEG-serinol conjugate에서 serinol 부분의 피크는 δ=5.76 ppm에서 확인하였고, 또한 pNC의 벤젠 특성 피크가 없어진 것을 통하여 컨쥬게이션을 확인하였다. Figure 1(b)는 FTIR 분석스펙트럼을 나타낸 것으로, MPEG-pNC는 카보닐 그룹에 해당하는 특성피크가 1760 cm⁻¹에서 나타난 것으로 보아 MPEG의 말단이 성공적으로 pNC로 활성화되었음을 확인할 수 있었고, MPEG-serinol conjugate에서는 카보닐 그룹 피크가 사라지는 대신 1720 cm⁻¹에서 아마이드 결합에 대한 특성피크를 확인함으로써 serinol과의 컨쥬게이션 반응이 성공적으로 일어났음을 알 수 있었다.

미토암 고분자의 합성 및 특성 분석. 미토암 고분자는 거대 개시제로 MPEG-serinol conjugate를 이용하여 TMC를 개환중합하여 합성하였다. 미토암 고분자에 상응하는 분자량의 이중블록 공중합체는 MPEG를 개시제로 하여 같은 조건 하에서 합성하였다. 합성한 고분자의 화학적 조성은 ¹H NMR과 FTIR을 이용하여 분석하였다. Figure 2(a)는 ¹H NMR을

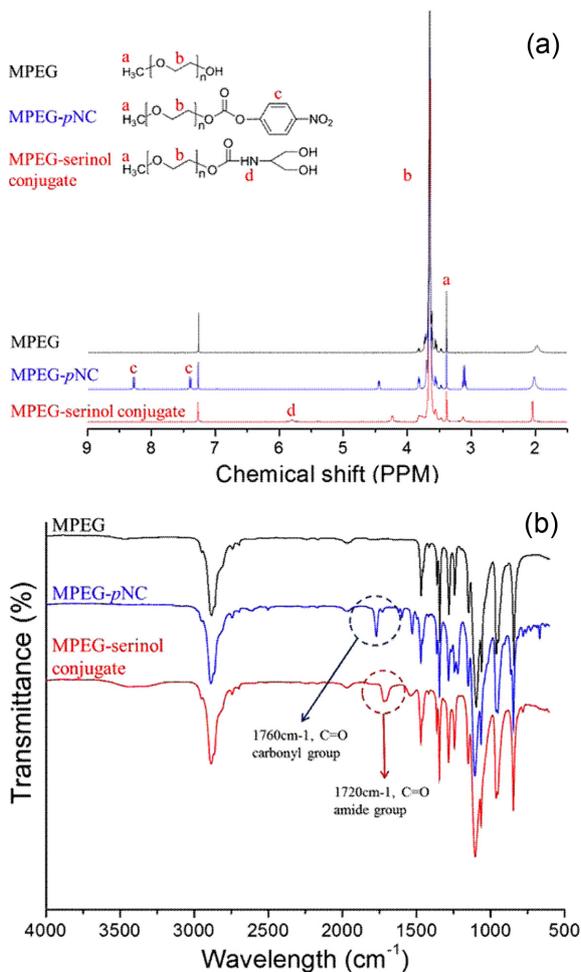


Figure 1. ¹H NMR (a) and FTIR (b) spectra of MPEG, MPEG-pNC, and MPEG-serinol conjugate.

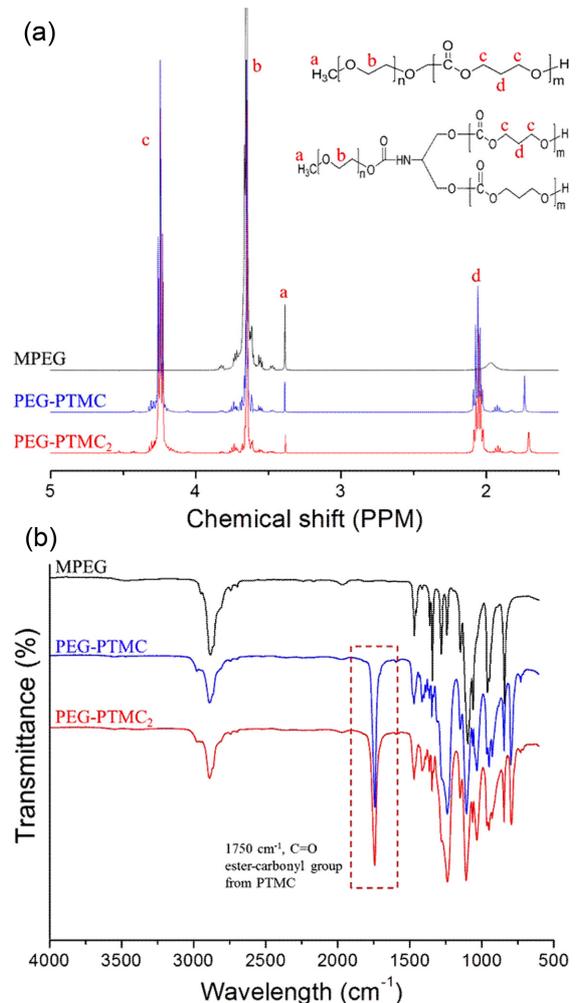


Figure 2. ¹H NMR (a) and FTIR (b) spectra of MPEG, PEG-PTMC diblock copolymer, and PEG-PTMC₂ miktoarm copolymer.

Table 1. Characterization of PEG-PTMC Di-block and Miktoarm Copolymers

No.	Feed molar ratio PEG:TMC	M_n^a (PEG-PTMC)	M_n^b	M_w/M_n^b	Yield (%)	CMC (mg/L)	Size (nm)
D1	1:20	2000-2060	4140	1.20	69.7	7.19	43.1
D2	1:40	2000-3690	4980	1.20	67.6	3.96	39.3
M	1:40	2000-(1940) ₂	4790	1.23	70.2	3.84	69.1

^aCalculated from the peak integration of ¹H NMR spectra. ^bDetermined by GPC measurements. ^cCritical micelle concentration determined by fluorescence measurements.

통한 분석 결과로, 이중블록 공중합체와 미토암 고분자의 MPEG부분의 특성 피크는 $\delta=3.4$ ppm, 3.65 ppm에서 확인하였고, PTMC부분의 특성 피크는 $\delta=2.06$ ppm, 4.24 ppm에서 확인하였다. ¹H NMR 분석결과로부터 MPEG의 에틸렌 그룹의 피크($\delta=3.65$ ppm) 면적과 PTMC의 메틸렌 부분의 피크($\delta=2.06$ ppm) 면적 비를 비교하여 합성한 고분자의 분자량을 계산하였다. Figure 2(b)는 FTIR 분석스펙트럼을 나타낸 것으로, MPEG의 알코올 그룹의 파장을 1106 cm^{-1} 에서 확인하였고, MPEG에서는 볼 수 없었던 PTMC부분의 카르보닐 그룹의 파장을 1750 cm^{-1} 에서 확인하였다.

Table 1에서 나타난 바와 같이 개시제와 TMC의 반응 몰비 1:20와 1:40으로부터 각각 평균분자량 2060과 3690 Da의 PTMC블록을 가진 이중블록 공중합체(D1, D2)를 합성할 수 있었고, 미토암 고분자(M)의 경우 1:40의 반응 몰비로부터 평균분자량 1940 Da인 두 개의 PTMC 블록을 구성할 수 있었다. 따라서, 미토암 고분자의 두 개의 PTMC 블록에 해당하는 평균분자량은 3880 Da으로 계산된다. 결과적으로 합성된 모든 고분자는 같은 분자량의 친수성 PEG 블록($M_n=2000$ Da)을 갖고 있으며, D1은 미토암 고분자와 같은 분자량의 하나의 PTMC 블록을 갖고 있고, D2의 경우는 미토암 고분자에 존재하는 두 개의 PTMC 블록들의 분자량 합과 유사한 길이의 PTMC 블록을 갖고 있다. Figure 3은 GPC를 통

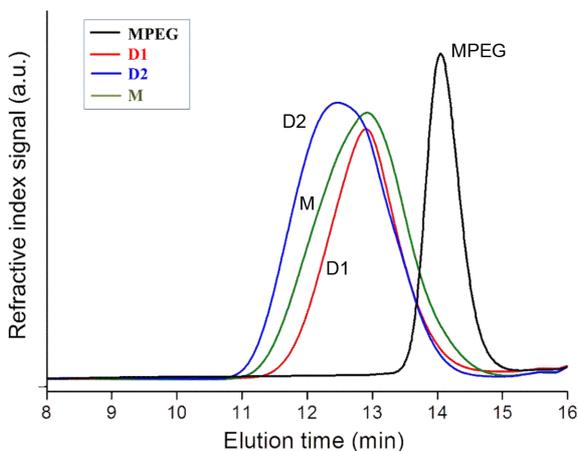


Figure 3. GPC traces of MPEG, PEG-PTMC diblock copolymers, and PEG-PTMC₂ miktoarm copolymer.

하여 고분자의 상대평균 분자량과 분자량 분포(M_w/M_n)를 측정된 결과를 나타낸다. 합성한 고분자의 상대평균 분자량은 D1, D2, M의 경우 각각 4140, 4980, 4790 Da으로 측정되었다. 미토암 고분자는 같은 분자량의 PTMC 블록 하나를 갖고 있는 D1에 비해 높은 분자량을 보인다. 하지만, 유사한 수 평균 분자량을 갖는 D2와 비교할 때는 다소 작은 분자량이 측정되었다. 이는 미토암 고분자가 선형 구조의 이중블록 공중합체와 구별되는 특유의 밀도 높은 기하학적 구조를 갖고 있어 유체반경이 같은 분자량의 선형 고분자에 비해 상대적으로 작은 것에 기인된 것으로 사료된다. 측정된 분자량 분포는 D1, D2, M이 각각 1.2, 1.2, 1.23으로 모두 유사한 정도의 단분산성을 갖는 것을 확인하였다.

고분자의 열적 특성평가. Figure 4는 MPEG와 합성한 고분자의 열적 특성을 알아보기 위해 DSC를 통하여 분석한 결과이다. MPEG는 $53.2\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 T_m 에 해당하는 뚜렷한 단일 피크를 확인할 수 있었던 반면, D1, D2, M 고분자는 $34\sim 52\text{ }^\circ\text{C}$ 에 걸쳐 다중 피크 형태의 T_m 이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. $44\sim 52\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 관찰되는 피크는 결정성 MPEG 블록의 T_m 에 해당하는 것으로 MPEG 블록에 PTMC 블록과 결합되

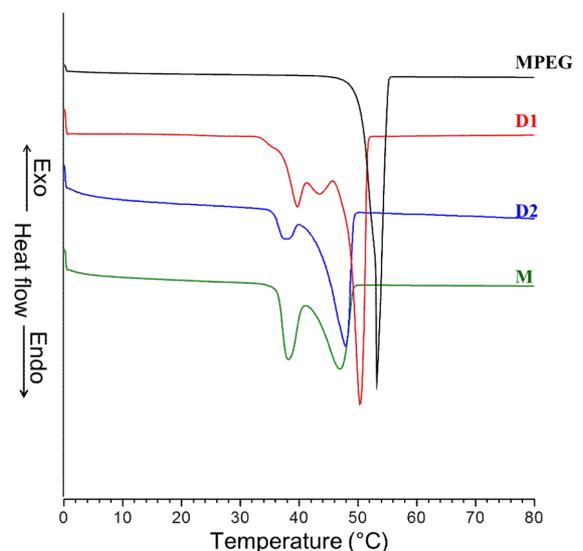


Figure 4. DSC thermograms of MPEG, PEG-PTMC diblock copolymers, and PEG-PTMC₂ miktoarm copolymer.

면서 MPEG의 결정성이 다소 감소되면서 T_m 이 낮게 관찰되었다. 이는 기존의 저분자량 MPEG 기반의 블록 공중합체에서도 관찰되었다.²⁶ 한편, 더 낮은 온도 영역에서 관찰되는 용융 피크는 PTMC에 기반한 것으로, 일반적으로 PTMC는 무정형 고분자로 알려져 있으나, 분자량 10000 Da 이하의 저분자량 PTMC에서는 결정화가 일어나 34~34 °C 부근에서 T_m 이 관찰되는 것으로 보고되었다.²⁷

입계 미셀 농도(CMC) 측정. 양친매성인 블록 공중합체는 수용액 상에서 소수성 상호작용에 의해 자가조립 나노입자를 형성한다. 본 실험에서는 형광물질인 pyrene을 이용하여 형광분석법을 통하여 CMC를 측정하였다. 합성한 양친매성 고분자 D1, D2, M을 각각 농도별로 형광물질인 pyrene을 처리한 후, pyrene의 흡수파장을 얻었다. Figure 5에서와 같이 고분자의 농도에 따른 형광분석을 통해 얻어진 pyrene의 흡수파장의 첫 번째와 세 번째 형광 강도 값인 I_{338} 과 I_{333} 의 비(I_{338}/I_{333})를 측정하여 급격히 변화하는 구간에서의 변곡점을 CMC로 결정하였다(Table 1). 측정된 CMC 값의 범위는 일반적인 PEG 기반의 블록 공중합체로 구성된 고분자 미셀이 보이는 CMC 범위와 비슷하였고, 소수성 블록인 PTMC의 분자량의 크기가 증가하면서 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 고분자 구조 내 소수성의 증가로 수용액 내 소수성 상호작용의 향상으로 자가조립 거동이 더 낮은 농도에서도 이루어질 수 있다는 것을 의미하며 일반적으로 범용의 고분자 미셀에서도 관찰되는 특징이며, 생체 내 희석 환경하에서 약물전달체로서의 미셀의 안정성과도 관련할 수 있다.^{28,29}

나노입자의 크기 및 형태 분석. 합성한 고분자가 자가 조립하여 형성된 나노입자의 크기와 형태를 DLS와 TEM을 이용하여 확인하였다. 모든 샘플은 고체 분산체 방법으로 수용액 상태에서 1 mg/mL의 농도로 준비하였다. Figure 6은 DLS로 측정된 나노입자의 크기 및 분포와 TEM으로 측정된 입

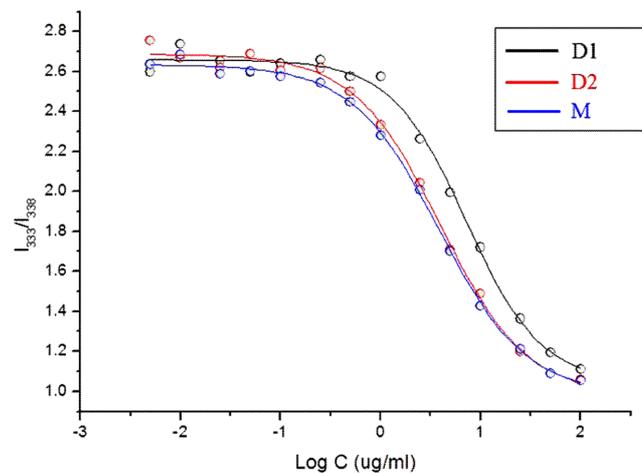


Figure 5. Change in the intensity ratio(I_{338}/I_{333}) of pyrene emission spectra by fluorescence measurements.

자의 형태를 보여준다. 측정된 입자의 평균 크기는 40~70 nm 정도의 범위이며, 미토암 구조의 고분자가 선형 고분자에 비해 다소 큰 나노입자를 형성함을 하였고, 모두 구형의 미셀 입자 형태를 띠는 것을 확인할 수 있었다.

약물 봉입 특성 평가. 난용성 약물인 PTX를 고체 분산체 방법을 통하여 고분자 미셀에 봉입하였다. 일반적으로 고체 분산체 법의 마지막 분산 단계에서 미셀 구조 형성을 위해 사용하는 분산매인 물의 온도는 30~60 °C의 따뜻한 상태의 온수를 사용하는 것이 일반적이다. 하지만, 본 연구에서 사용되는 PTMC의 경우 일반적으로 소수성 블록으로 사용되는 고분자들에 비해 매우 낮은 온도 범위의 T_m 과 유연한 골격구조를 갖고 있어, 효율적인 약물 봉입을 위한 최적화 조건을 찾기 위해 미셀 형성 온도 및 봉입 온도가 중요한 실험인자로 고려되었다. 따라서 PTMC의 T_m 보다 낮은 온도(4 °C)와

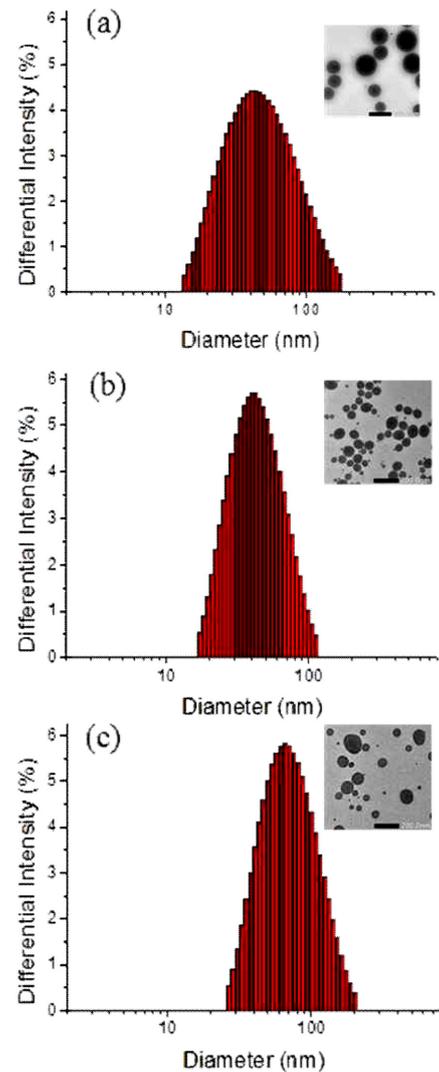


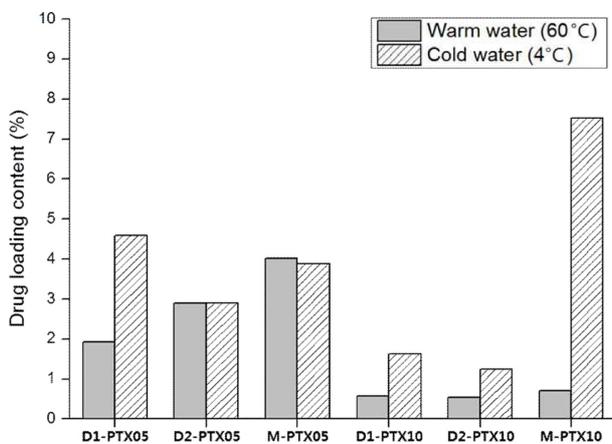
Figure 6. DLS size distribution results and TEM images of D1 (a); D2 (b); M (c).

Table 2. Characterization of Drug-loaded Polymeric Micelles

No.	Feed ratio Polymer:Drug (w:w)	Drug loading content (%)	Drug load- ing efficiency (%)	Particle size (nm)
D1-PTX05	19:1	4.58	84.9	47.6
D1-PTX10	9:1	1.63	13.3	34.0
D2-PTX05	19:1	2.90	50.8	50.1
D2-PTX10	9:1	1.24	10.2	40.5
M-PTX05	19:1	3.88	69.5	75.6
M-PTX10	9:1	7.53	62.1	72.0

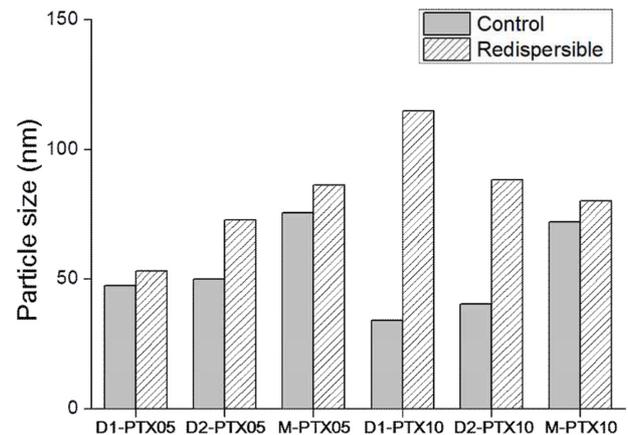
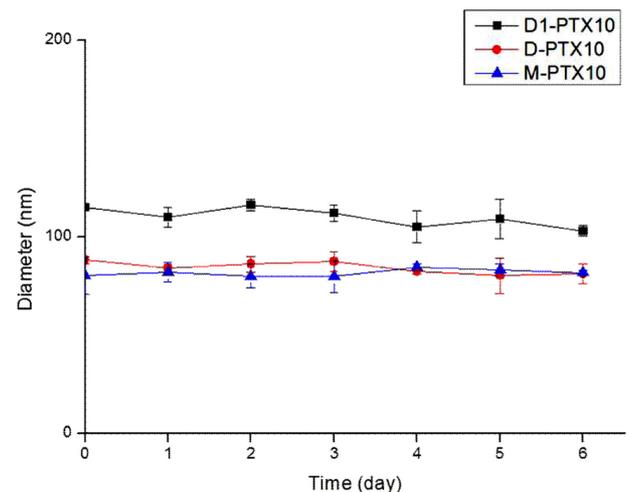
높은 온도(60°C)에서 각각 약물 봉입능을 평가하였다. 고분자와 약물의 무게비를 19:1과 9:1로 하여 서로 다른 온도에서 이중블록 공중합체와 미토암 고분자의 약물 봉입능을 비교하였다. Table 2는 4°C에서 약물봉입이 이루어진 고분자 미셀의 제조 결과를 보여준다. D1 고분자 미셀은 고분자와 약물의 무게비가 19:1일 때, 봉입 함량이 4.58%, 봉입 효율이 84.9%로 가장 높게 나타났으나, 약물의 혼합비가 증가된 9:1의 경우에는 봉입 함량이 1.63%, 봉입 효율이 13%로 크게 떨어졌다. 높은 약물 혼합비에서 봉입 효율이 크게 떨어지는 경향은 D2 미셀에서도 관찰되었다. 미토암 고분자의 경우, 혼합비에 상관없이 모두 높은 봉입 함량과 봉입 효율을 보이고 있고, 특히 9:1에서 가장 높은 7.53%의 봉입 함량을 갖는 것을 확인하였다. 이는 동일한 약물에 대해 같은 화학적 조성을 갖는 블록 공중합체라도 구조적 특징에 기인하여 약물 봉입능이 크게 달라질 수 있음을 의미한다. 한편, Table 2에 나타내었듯이 약물 봉입 후 미셀의 크기는 봉입 전과 비교하여 다소 증가하는 것을 알 수 있었다.

Figure 7은 고분자 미셀에 약물을 봉입할 때 사용하는 물의 온도 차이에 따른 약물 봉입능을 비교한 결과이다. 약물

**Figure 7.** Temperature effects on the drug loading contents of polymeric micelles.

봉입 및 미셀 형성을 위한 온도가 60°C일 때보다 4°C일 때, 사용된 모든 고분자가 혼합비와 상관없이 더 높은 약물 봉입능을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 특히 미토암 고분자의 경우 9:1의 혼합비에서의 봉입 함량은 매우 큰 차이를 보인다. 온수를 사용할 때는 다른 고분자와 마찬가지로 약물 봉입이 거의 이루어 지지 않지만, 냉수를 사용하면 약물 봉입이 효과적으로 이루어 진다는 것을 알 수 있었다. 결과적으로 PEG-PTMC 미토암 고분자는 일반적인 이중블록 구조의 고분자에 비해 약물 봉입능이 우수하고, 특히 저온에서 봉입될 때 높은 봉입 함량과 효율을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

약물 봉입 미셀 입자의 재분산성 및 안정성. PTX가 봉입된 고분자 미셀의 재분산성을 평가하기 위해 동결 건조한 약물 봉입 미셀을 다시 물에 분산시킨 후 입자의 크기를 비교하였다. Figure 8의 결과를 보면 동결건조 후, 19:1의 혼합비에서는 대부분의 약물 봉입 미셀의 크기가 동결건조 전과 비

**Figure 8.** Redispersibility tests of PTX-loaded micelles (1 mg/mL) in DPBS.**Figure 9.** Colloidal stabilities of drug-loaded micelles in DPBS (1 mg/mL, 37°C).

교하여 크게 차이가 나지 않았다. 하지만, 9:1의 경우 D1과 D2는 재분산시 형성되는 미셀의 크기가 크게 증가된 것으로 보아, 약물 봉입 미셀의 재분산성이 크게 떨어진 반면, 미토암 고분자 미셀의 경우 거의 크기의 차이 없이 재분산이 용이함을 알 수 있었다. Figure 9는 약물 봉입 미셀을 완충용액 상에서 37 °C 온도 조건하에서 시간에 따른 입자 크기의 변화를 DLS로 측정된 결과이다. 모든 약물 봉입 미셀은 6일 이상 초기 입자 크기와 비교하였을 때 큰 변화가 없이 안정하게 유지되는 것을 확인하였다. PTX 가용화 및 전달에 주로 사용되는 PEG-PLA 미셀이 약물 봉입 후 수용액 상에서 수 시간에서 수일 이내에 침전을 보이는 것을 고려할 때 본 미셀 입자의 수용액 내 안정성은 우수한 것으로 사료된다.³⁰

약물 방출 특성 평가. PTX가 봉입된 미셀의 약물 방출 특성 평가를 약물 기준 300 µg으로 인산완충용액상에서 항온수조(80 rpm, 37 °C)에서 방출 실험을 진행하였다. Figure 10의 결과를 보면 모든 고분자 미셀이 초기 4시간 동안의 빠른 방

출 거동을 보이고, 이후 100시간에 걸쳐 나머지 약물을 서서히 지속적으로 방출하는 것을 확인하였다.

결론

본 연구에서는 생체 적합성 고분자인 PEG와 생분해성 고분자인 PTMC를 사용하여 양친매성 AB₂형 미토암 고분자를 합성하고, 자기조립 특성과 약물전달체로서의 기본 특성을 일반적인 선형 이중블록 공중합체와 비교하였다. 난용성 약물인 paclitaxel을 대상으로 서로 다른 고분자 블록구조, 약물 봉입 온도, 고분자-약물 혼합비 등을 적용하여 고분자 미셀의 특성 및 약물 담지능을 평가하였다. 미토암 고분자는 생체인 지질 모방 특이적 기하학적 구조와 양친매성을 기반으로 수용액 내에서 자기조립을 통해 나노 크기의 구형의 미셀을 형성할 수 있었으며, 일반적인 선형의 이중블록 공중합체보다 높은 약물 담지능, 재분산성을 가지는 것을 확인하였다. 미토암 구조의 블록 공중합체의 설계는 나노입자의 형태 및 크기, 약물 봉입 및 방출, 안정성 등 약물전달체 특성에 다양한 특성 변화를 줄 수 있는 유용한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2013년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2013R1A2A2A04015914).

참고 문헌

1. K. Khanna, S. Varshney, and A. Kakkar, *Polym. Chem.*, **1**, 1171 (2010).
2. J. Rao, Y. Zhang, J. Zhang, and S. Liu, *Biomacromolecules*, **9**, 2586 (2008).
3. J. Ding, C. He, C. Xiao, J. Chen, X. Zhuang, and X. Chen, *Macromol. Res.*, **20**, 292 (2012).
4. J. Cao, M. Naeem, J.-K. Noh, E. H. Lee, and J.-W. Yoo, *Macromol. Res.*, **23**, 485 (2015).
5. A. Nahain, J. A. Nam, H. Mok, Y.-k. Lee, and S. Y. Park, *Macromol. Res.*, **21**, 92 (2013).
6. S. Schuller-Ravoo, J. Feijen, and D. W. Grijpma, *Macromol. Biosci.*, **11**, 1662 (2011).
7. M. S. Kim, H. Hyun, B. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Curr. Appl. Phys.*, **8**, 646 (2008).
8. D. E. Discher and F. Ahmed, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **8**, 323 (2006).
9. G.-Y. Liu, C.-J. Chen, and J. Ji, *Soft Matter*, **8**, 8811 (2012).
10. T. Thambi, V. G. Deepagan, H. Ko, D. S. Lee, and J. H. Park, *J. Mater. Chem.*, **22**, 22028 (2012).
11. J. P. Jain and N. Kumar, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **40**, 456 (2010).
12. H. Yin, S.-W. Kang, and Y.H. Bae, *Macromolecules*, **42**, 7456 (2009).

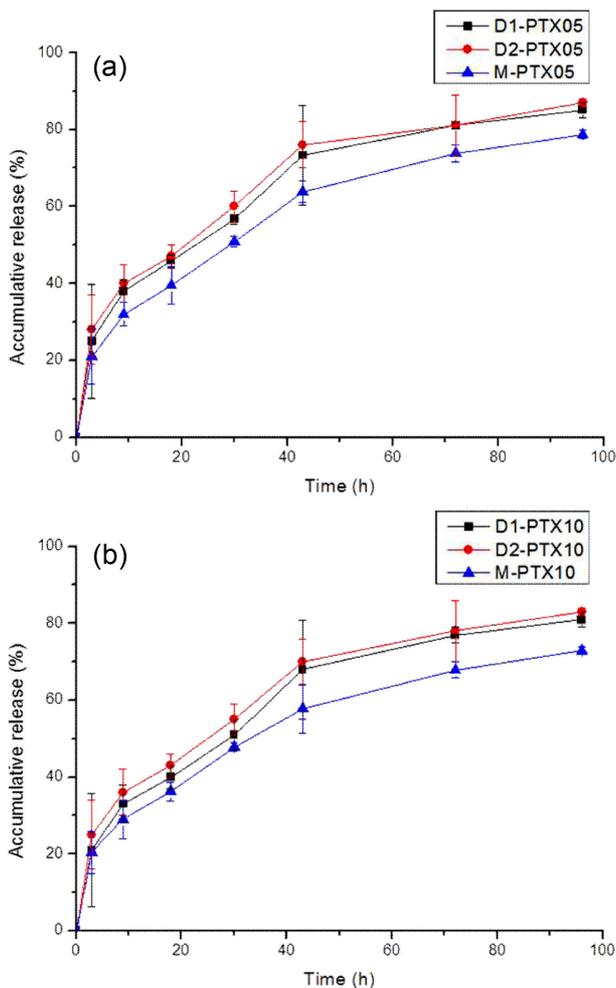


Figure 10. Drug release profiles from polymer micelles in DPBS at 37 °C.

13. H. Yin, H. C. Kang, K. M. Huh, and Y. H. Bae, *Colloid Surface B*, **116**, 128 (2014).
14. H. Yin, H. C. Kang, K. M. Huh, and Y. H. Bae, *J. Mater. Chem.*, **22**, 19168 (2012).
15. K. Yoon, H. C. Kang, L. Li, H. Cho, M.-K. Park, E. Lee, Y. H. Bae, and K. M. Huh, *Polym. Chem.*, **6**, 531 (2015).
16. P. B. Schiff, J. Fant, and S. B. Horwitz, *Nature*, **277**, 665 (1979).
17. F. Danhier, N. Lecouturier, B. Vroman, C. Jérôme, J. Marchand-Brynaert, O. Feron, and V. Préat, *J. Controlled Release*, **133**, 11 (2009).
18. P. Ma and R. J. Mumper, *J. Nanomed. Nanotechnol.*, **4**, 164 (2013).
19. K. H. Jeong and Y. J. Kim, *Polym. Korea*, **30**, 512 (2006).
20. X. Jiang, H. Xin, X. Sha, J. Gu, Y. Jiang, K. Law, Y. Chen, L. Chen, X. Wang, and X. Fang, *Int. J. Pharm.*, **420**, 385 (2011).
21. Z. Zhang, D. W. Grijpma, and J. Feijen, *J. Control. Release*, **111**, 263 (2006).
22. M. S. Kim, H. Hyun, B. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Curr. Appl. Phys.*, **8**, 646 (2008).
23. H. Hyun, J. W. Lee, J. S. Cho, Y. H. Kim, C. R. Lee, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *Colloid Surface A*, **313**, 131 (2008).
24. H. Wang, J. H. Dong, and K. Y. Qiu, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **36**, 695 (1998).
25. Y. Zhang and R.-X. Zhuo, *Biomaterials*, **26**, 2089 (2005).
26. Y.-H. Kim, J. H. Im, H. S. Min, J. Kim, Y.-K. Lee, G. E. Park, K. J. Cho, and K. M. Huh, *Polym. Korea*, **34**, 274 (2010).
27. C. Sanson, J.-F. Le Meins, C. Schatz, A. Soum, and S. Lecommandoux, *Soft Matter*, **6**, 1722 (2010).
28. H. Wang, J. H. Dong, and K. Y. Qiu, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **36**, 695 (1998).
29. H. Hyun, M. S. Kim, G. Khang, and H. B. Lee, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **44**, 4235 (2006).
30. K. M. Huh, S. C. Lee, Y. W. Cho, J. Lee, J. H. Jeong, and K. Park, *J. Control. Release*, **101**, 59 (2005).