

고분자 조립체의 Encapsulation 안정성

Encapsulation Stability of the Polymeric Assembly

김기범 · 최후연 · 최은성 · 유자형 | Kibeom Kim · Huyeon Choi · Eunseong Choi · Ja-Hyoung Ryu

Department of Chemistry, Ulsan National Institute of Science and Technology,
50 UNIST-gil, Eonyang-eup, Ulsu-gun, Ulsan 44919, Korea
E-mail: jhryu@unist.ac.kr

1. 서론

고분자는 조성이나 형태를 달리하여 여러 가지 종류의 구조를 이룰 수 있기 때문에 코팅, 등 많은 분야에서 연구되어 왔고, 그 활용도가 높다. 그 중에서도, 서로 다른 타입의 단분자로 이루어진 블록공중합체는, 한 고분자에 여러 종류의 성질을 가지고 있으면서도 섞이지 않기 때문에, 유기용매나 수용액 안에서 상분리를 일으켜 용매에서 안정한 마이셀을 자기조립하여 형성할 수 있다. 고분자의 이러한 특성 때문에 바이오센서, 생체 진단, 생체공학 등 여러 분야에서 연구되고 있다. 특히, 수용액에서 소포를 스스로 이룰 수 있는 고분자는 코어에 물질을 담을 수 있어 전달체로 기능할 수 있기 때문에 특히, 약물 전달 시스템에서 약물 전달체의 많은 연구가 이뤄지고 있다. 생체 진단 침자나 약물 전달체로 쓰이기 위해서 체내에서 순환하는 동안 표적한 곳에 도달하기 전까지는 그 형태를 안정적으로 유지하는 것이 중요하다. 운반체가 불안정하여 운반되던 약이 방출이 되면 정상세포 또는 암세포 주변의 빈 운반체로 약물이 전달될 수 있기 때문이다.¹⁻² 그런데 고분자 마이셀의 경우, 물에서는 높은 안정성을 보이는 반면, α -globulin이나 β -globulin 등 체내 혈류에 흐르고 있는 단백질이나 혈액세포들과 충돌하거나, 생체 내 성분과 다양한 상호작용을 하기 때문에, 이러한 생리화학적 조건에서는 빠른 시간 안에 안정성을 잃고 약물을 방출하는 현상을 보인다.³⁻⁶ 이러한 고분자 마이셀이 체액의 영향에 관계없이 형태를 유지하고 약물을 잘 전달하기 위해서는 마이셀의 안정성을 강화할 방법이 필요하다. 본 고에서는 자기조립하여 마이셀을 이루는 고분자의 안정성을 강화시키는 방법에 대하여 소개하기로 한다.

Author



김기범

2011 삼육대학교 화학과 (학사)
2015 삼육대학교 융합과학과 (석사)
2015-현재 UNIST 화학과전공 (박사)



최은성

2015 UNIST 나노화학전공 (학사)
2015-현재 UNIST 화학과전공 (석박사 통합과정)



최후연

2015 UNIST 나노화학전공 (학사)
2015-현재 UNIST 화학과전공 (석박사 통합과정)



유자형

2000 연세대학교 화학과 (학사)
2002 연세대학교 화학과 (석사)
2006 연세대학교 화학과 (박사)
2006-2007 연세대학교 화학과 (Post-Doc.)
2007-2011 University of Massachusetts Amherst (Post-Doc.)
2011-2012 서울대학교 화학과 연구교수
2012-현재 UNIST 화학과 조교수

2. 본론

2.1 마이셀 안정성 실험

용매에 쉽게 녹지 않거나 독성이 심한 물질을 안전하고 쉽게 전달하기 위해 자기 조립된 고분자 전달물질들이 많이 사용되고 있다. 하지만 전달물질들이 목표에 도달할 때까지 안정하지 않다면 내가 원하는 물질을 효과적으로 전달할 수 없다. 따라서 고분자 자기조립에 의해 만들어진 전달물질들의 안정성 측정은 물질을 이용하기 전에 반드시 실행되어야 한다. 또한 안정성 실험으로 물질의 방출과 이동을 관찰할 수 있다.

마이셀의 안정성은 Förster resonance energy transfer (FRET) 현상을 유도하여 측정할 수 있다. FRET은 에너지 주개(energy donor)와 에너지 받개(energy acceptor) 물질이 수십 나노미터 정도의 가까운 거리에 있을 때 에너지 주개로부터 에너지 받개로 에너지가 전이되는 현상을 뜻한다. FRET pair를 같은 자기조립된 나노고분자 물질에 내재시켰을 때, 마이셀이 안정하면 두 물질 간의 거리가 충분히 가깝게 유지되기 때문에 FRET 현상을 관찰할 수 있지만, 불안정한 상태에서 물질이 방출되면 거리가 멀어져 FRET 현상이 사라지게 된다. 이를 이용해 고분자 마이셀의 안정성을 측정할 수 있다. 에너지 주개(a)와 에너지 받개(b)의 흡수파장과 비교했을 때, (a)와 (b)를 담고 있는 마이셀(c)에 에너지 주개(a)의 흡수파장의 빛을 쬐어주면 에너지 주개가 아닌 에너지 받개(b)의 발광이 관찰되는 것으로 마이셀이 안정함을 확인할 수 있다(그림 1).⁷

이와는 다른 방법으로, FRET pair 중 한 쌍인 3,3'-diocadecyloxa carbocyanine perchlorate(DiO, donor)와 1,1'-diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl indocarbocyanine perchlorate(DiI, acceptor)를 각각 다른 나노젤에 내재시키면 서로 간의 거리가 멀어 FRET 현상이 일어나지 않는다. 그러나 나노젤이 불안정하여 DiO나 DiI가 용액으로 방출되면, 평형을 이루려고 하기 때문에 다른 나노젤 안의 DiO 또는 DiI와의 물질 교환이 일어난다. 그 때 DiO와 DiI가 동일한 나노젤 안에 담겨

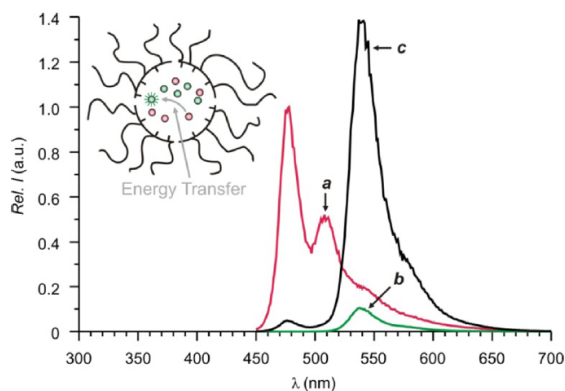


그림 1. FRET 현상에 의한 방출 그래프.⁷ Reproduced with permission of *J. Am. Chem. Soc.*, Copyright (2010) American Chemical Society.

분히 가까운 거리에 있게 되면 FRET 현상이 발생하여 DiO 방출 파장이 아닌 DiI의 방출 파장을 관찰할 수 있다. 그림 2b에서는 이를 이용하여 마이셀의 안정성을 실험하였는데, b에서 볼 수 있듯이 마이셀이 좀더 안정하게 약물을 담을 수 있도록 하기 위하여 단분자에 내재된 이황결합을 끊어 가교 반응이 일어나게 해 안정성이 더 강화된 나노젤을 설계하였다. 그림 2c에서는 여러 나노젤 중 6% 가교된 나노젤의 형광을 48시간동안 관찰한 결과, DiO와 DiI가 떨어져 있기 때문에 각자의 파장이 관찰된 처음과 달리, 시간이 지남에 따라 DiO의 파장 세기가 줄어들고 DiI의 파장 세기가 증가하는 것으로 나노젤의 안정성이 감소하는 것을 알 수 있었다.

2.2 고분자 마이셀의 합성

고분자 마이셀은 일반적으로 소수성 부분과 친수성 부분을 함께 가지고 있는 양친매성 고분자를 사용하여 만든다.⁹ 양친매성 고분자들은 수용액 상태에서 중심에는 소수성 핵을 가지고 표면에는 친수성 부분이 둘러싼 마이셀을 형성하게 된다(그림 3).

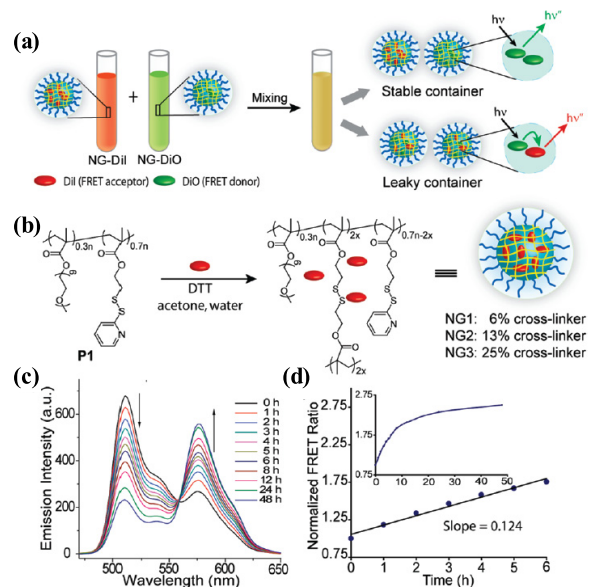


그림 2. (a) DiI/DiO를 내재한 혼합된 나노젤, (b) 자기조립된 고분자 마이셀을 가교시켜 나노젤을 합성할 수 있음, (c) DiI/DiO를 내재한 혼합된 나노젤의 형광스펙트럼, (d) 시간에 따른 FRET 그래프.⁸ Reproduced with permission of *J. Am. Chem. Soc.*, Copyright (2010) American Chemical Society.

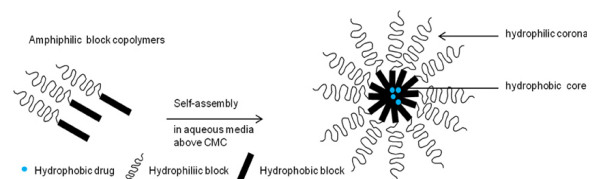


그림 3. 양쪽성 고분자를 사용하여 마이셀을 만드는 모식도.⁹ Reproduced with permission of *Front. Pharmacol.*, Copyright (2014) Frontiers.

고분자 마이셀을 만들기 위해서는 diblock(친수성-소수성)이나 triblock(친수성-소수성-친수성) 고분자가 사용된다. 또한 물과 닿는 표면을 구성하는 친수성 고분자로는 보통 poly(ethylene glycol), poly(ethylenimine), poly(aspartic acid)가 사용된다.

또한 고분자 마이셀을 만들기 위해서는 양친매성 고분자의 농도가 critical micelle concentration(CMC: 양쪽성 폴리머가 마이셀을 형성할 수 있는 최소농도) 이상이 되어야 한다. 만약 고분자의 농도가 CMC농도보다 낮을 경우, 고분자는 마이셀을 형성하는 대신 계면 활성제로써 활동하게 된다. CMC는 양친매성 고분자의 소수성 부분의 길이와 직접적으로 연관이 있으며 소수성 부분의 길이가 길어질수록 CMC의 농도는 낮아지게 된다. 고분자 마이셀은, 일반 계면 활성제가 이루는 마이셀에 비해 CMC가 훨씬 낮아 마이셀을 비교적 안정적으로 형성한다. 하지만 마이셀을 유지하는 비공유결합은, 충분히 강하지 않아 가역반응으로 마이셀이 분해될 수도 있다. 또한, 체내에 존재하는 세포막이나 단백질 등의 물질과 상호작용하기 때문에, 약물을 목표 지점까지 전

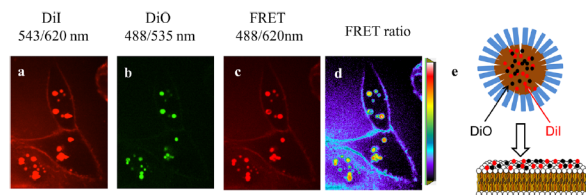


그림 4. 소수성 형광물질을 실은 고분자 마이셀이 세포 안이 아닌 세포막에서 물질교환을 하는 사진.¹⁰ Reproduced with permission of *Mol. Pharmaceutics*, Copyright (2013) American Chemical Society.

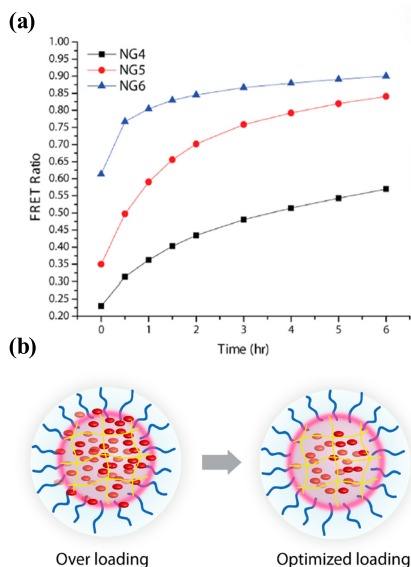


그림 5. (a) DiI/DiO를 담은 나노젤의 시간에 따른 FRET 비율, (b) 손님분자의 양과 고분자 나노젤의 encapsulation 안정성의 모식도.¹¹ Reproduced with permission of *Mol. Pharmaceutics*, Copyright (2012) American Chemical Society.

달하는데 어려움이 있다. 그림 4를 보면, DiO와 DiI를 동시에 실은 고분자 마이셀이 세포 안으로 침투하지 못하고 세포막과 물질교환을 하여 DiO와 DiI가 표면에 존재함을 알 수 있다.

2.3 자기조립 고분자의 성질

2.3.1 고분자 조립체의 소수성, 손님분자의 양, Encapsulation 안정성의 관계

물질을 특정 자극에 반응시켜 효과적으로 전달하려면 고분자 조립체는 자극을 받기 전까지 안정한 상태를 유지하여야 한다. 고분자 조립체의 encapsulation 안정성에 영향을 줄 수 있는 요소들 중 하나가 고분자의 소수성 비율이다. 그림 5에서는 마이셀을 구성하는 소수성의 decyl methacrylate의 비율을 조절하여 각각 30%, 40%, 50%의 소수성 핵을 가진 고분자 조립체(NG4, NG5, NG6)를 만들어 안정성을 실험하였다. 고분자 조립체의 소수성이 증가할수록 encapsulation 안정성은 낮아지는 것이 관찰되었다(그림 5a). 고분자 조립체의 소수성 비율이 증가하게 되면 고분자 조립체의 핵의 소수성이 소수성의 손님분자와 강하게 상호작용할 수 있기 때문에 더 많은 손님분자를 담을 수 있게 된다. 하지만 고분자 조립체가 encapsulation할 수 있는 양보다 더 많은 양의 손님분자를 가지게 되면 손님분자는 고분자 조립체 표면과 가까워져 용액으로 전달되기 쉬워지기 때문에 고분자 조립체의 encapsulation 안정성은 떨어지게 된다(그림 5).

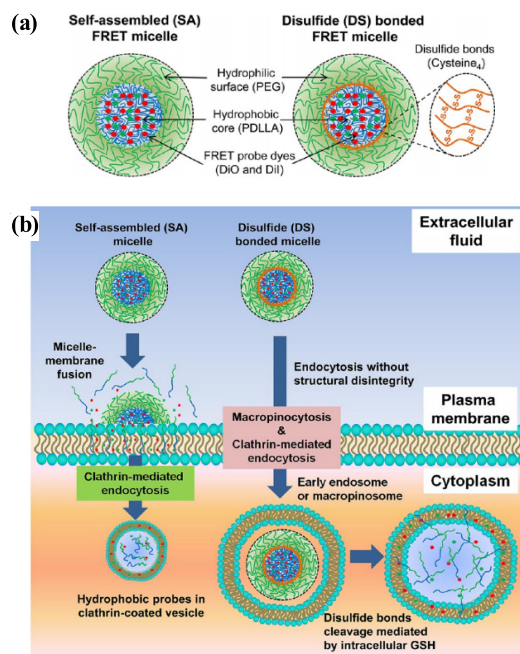


그림 6. (a) 자기조립한 고분자의 마이셀 (PEG-PDLLA)과 이황결합을 이용한 마이셀 (PEG-Cys-PDLLA)이 DiI/DiO를 포함한 그림. (b) 세포외액에서 자기조립한 고분자의 마이셀보다 안정한 이황결합으로 이루어진 고분자 마이셀의 전체적인엔토시토시스의 그림.¹⁴ Reproduced with permission of *Mol. Pharmaceutics*, Copyright (2013) American Chemical Society.

2.4 안정성을 강화하기 위한 방법

2.4.1 Shell-Core-Crosslinking

고분자 마이셀의 안정성을 강화하기 위하여 마이셀의 shell에 교차결합이 가능한 이황 결합(disulfide bond) 같은 작용기를 적용한다. Paclitaxel(PTX)을 운반하기 위한 운반체로 가역적인 이황 교차 결합된 마이셀을 사용하여 혈류의 순환에서 약이 미리 방출되는 것을 최소화하고 안전하게 암세포 내에서만 약물이 방출되게 하는 연구가 진행되었다.¹² 이 연구는 PEG^{5k}-Cys₄-L8-CA₈를 사용하여 마이셀을 만들고 Cys의 싸이올기가 산소에 의해 이황 결합이 형성되어 대조군인 PEG^{5k}-CA₈에 비해 혈청 단백질 용액 내에서 구조가 안정되고 포함된 약물(PTX)이 방출되지 않는 결과로 안정함을 증명하였다. 이러한 이황 결합은 암세포 내에 특히 많이 발현하는 glutathione(GSH)에 의해 암세포 내에서 구조가 깨지며 효과적인 약물 방출이 이루어진다. 양친매성 고분자 mPEG-(Cys)₄-PDLLA를 이용하여 소수성 부분인 PDLLA에 소수성 FRET probes로 DiO와 DiI 혹은 항암약물로서 doxorubicin를 encapsulation한 마이셀을 만들었다.

교차결합으로 인한 안정성을 보여주기 위하여 대조군으로 mPEG-PDLLA 자기조립 마이셀을 사용하였고 교차결합이 가능한 작용기 cysteine을 이용하여 고분자 mPEG-(Cys)₄-PDLLA

마이셀을 만들었다(그림 6a).¹³⁻¹⁴ 이황 결합이 없이 자기조립 마이셀은 소수성인 부분과 세포막의 융합으로 인하여 마이셀의 구조가 깨지게 되며 약물이 세포 외 액에서 방출이 가능하다. 하지만 이황결합으로 만들어진 마이셀은 혈액 내에서 안정하며 구조의 붕괴없이 엔도시토시스를 통해 세포 내에 들어와 GSH에 의해 약물을 방출시킬 수 있다(그림 6b).

2.4.2 나노젤

나노젤은 물리적으로나 화학적인 교차결합으로 이루어진 고분자 네트워크로 만들어진 나노크기의 입자이다. 마이크로 이멀전, 반대로의 마이크로이멀전 혹은 자기조립된 고분자의 뭉침 등으로 인해 만들어지는 나노 운반체는 화학적인 교차결합이 분자내의 혹은 분자끼리의 공유결합을 형성하여 더욱 안정된 유기 나노 입자를 만든다. 나노젤은 센싱, 진단학, 바이오공학 등 많은 분야에 응용되고 있지만, 가장 연구가 많이 진행되는 분야는 약물 전달이라 할 수 있다. Oligoethyleneglycol (OEG)와 pyridyldisulfide(PDS)을 포함하는 랜덤 공중합체는 안정하게 약을 운반하는 고분자 운반체로, PDS는 수용액 상에서 양친매성을 가지게 하는데 중요한 역할을 하며 소수성의 분자를 내부에 격리시키며 싸이올기에 매우 반응성이 좋아 이 나노젤을 형성하게 하는 이황결합이 가능하게 한다

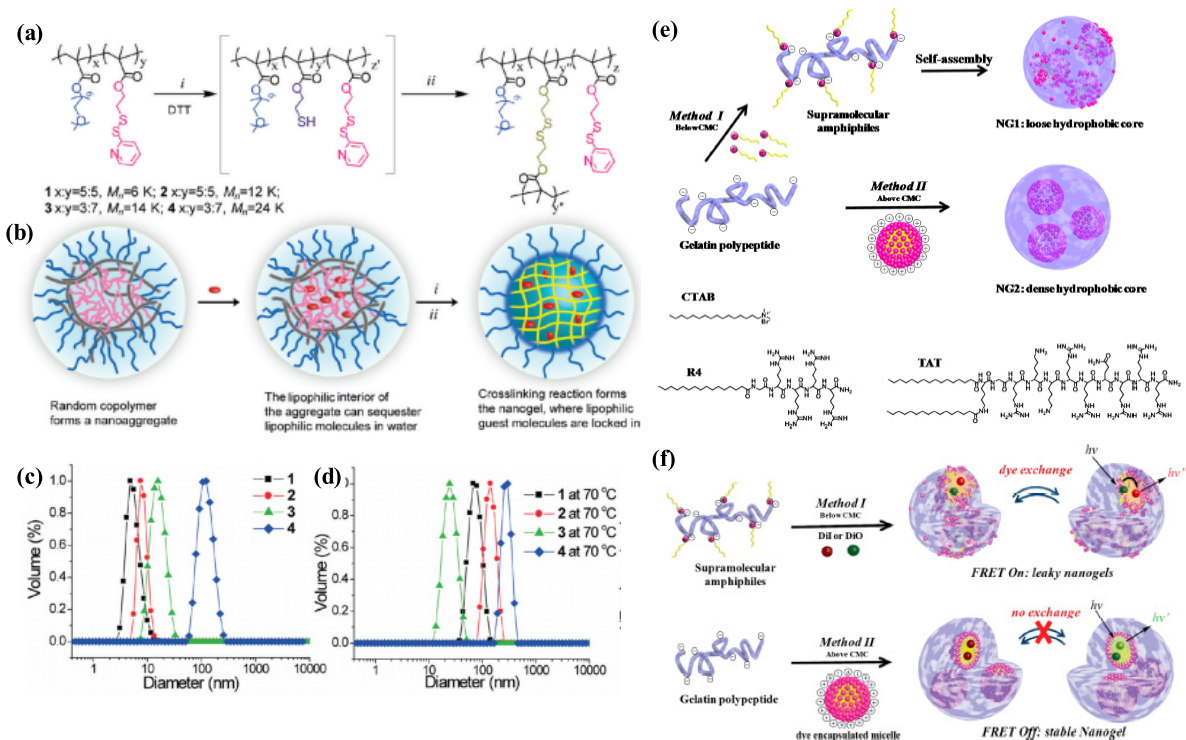


그림 7. (a-d) PEG-PDS의 고분자로 이루어진 마이셀에 가교제 DTT를 처리해 약물 혹은 FRET probes를 실은 나노젤의 합성 그림.¹⁵ (c-d) 온도에 따라서 달라지는 PEG-PDS의 나노젤의 크기: (c) 25°C에서 관찰한 나노젤의 크기, (d) 75°C에서 관찰한 나노젤의 크기, Reproduced with permission of J. Am. Chem. Soc. Copyright (2010) American Chemical Society. (e-f) 음전하를 띠는 젤라틴 폴리펩타이드와 CMC 이하 혹은 이상의 농도에서 양전하를 가지는 계면활성제로 이루어진 나노젤의 형성¹⁷: (f). CMC 이상에서 형성된 나노젤은 안정성을 FRET off 현상으로 보여주며 CMC 이하의 농도에서 형성된 나노젤은 FRET on으로 불안정한. Reproduced with permission of Biomacromolecules, (2013) Copyright American Chemical Society.

(그림 7a,b).¹⁵ 또한, OEG는 LCST 성질을 가지게 하여 온도가 높아질수록 OEG의 수화의 정도가 낮아지며 고분자가 더 소수성의 성질을 가지게 된다. 따라서, 그림 7c,d 에서 보면, 온도가 높아짐에 따라 소수성의 성질이 강해져 고분자의 크기가 커지게 된다. PDS와 DTT의 반응으로 만들어진 이황결합은 나노젤을 안정하게 하여 소수성의 형광물질 또는 약물을 안전하게 전달할 수 있는 운반체가 될 수 있다. 이 고분자에 양전하를 띄는 리간드인 CRRR(Cys-Arg-Arg-Arg) 펩타이드 또는 Cys - Folic acid 등 싸이올기를 포함한 양전하를 가지거나 암세포를 특정 표적화할 수 있는 리간드를 PDS에 도입하여 효과적으로 표적화할 수 있는 나노젤을 연구하였다.¹⁶

게다가, 화학적인 교차결합이 아닌 물리적인 교차결합으로 만들어진 나노젤은 이온결합, 소수성결합, 여러 개의 정전기력 인력 등의 2차 결합으로 인한 자기조립이 유기 나노 입자를 만들기 때문에 초분자 나노젤이라 불리운다. 한 예시로, 화학적인 가교제 없이 소수성의 분자에 대해 높은 encapsulation 안정성을 가지게 하는 나노젤이 연구되었다(그림 7e). 이 연구는 양전하를 가지는 계면활성제인 CTAB과 양전하를 가지는 펩타이드 R4와 TAT의 CMC를 이용해 CMC보다 낮은 농도에서는 자기조립이 없는 형태로 음전하를 가지는 젤라틴과 이온결합에 의해 만들어진 나노젤과 CMC 보다 높은 농도에서 양전하를 띄는 마이셀과 젤라틴의 이온결합으로 만들어진 나노젤의 안정성을 비교하였다. CMC보다 높은 농도의 마이셀이 젤라틴과 이온결합하여 만든 나노젤이 FRET

현상으로 관찰한 결과 물과 10% FBS 용액 상에서 뛰어난 안정성을 보였다(그림 7f).¹⁷

2.4.3 고분자의 교차결합을 이용한 실리카 기반의 안정성

고분자 자체의 마이셀이 가지는 안정성뿐만 아니라 실리카 나노 입자에 고분자를 도입하여 고분자의 교차결합을 이용한 약물의 안정적인 전달이 가능하게 된다. 그림 8에서는 메조포러스 실리카 나노 입자(MSN)에 소수성의 약물을 넣어 교차결합이 가능한 고분자로 표면을 감싸 높은 소수성 약물의 운반과 향상된 입자(PMSN)의 안정성을 연구하였다.¹⁸⁻¹⁹ PEG-PDS의 고분자를 소수성 약물이 들어진 MSN을 감싸고 DTT로 교차결합을 시키면 안정화된 PMSN을 약물의 전달체로 사용한다. 이에 반해, 고분자 PEG-*b*-PLA에 약물을 넣은 마이셀은 안정하지 않으며 높은 약물을 가질수록 안정된 마이셀이 형성되지 않고 고분자 뭉침의 결과로 그림 8c,d 와 같이 침전이 관찰되었다. 이에 반해, 실리카에 약물을 실은 PMSN은 높은 농도의 약물에도 침전이 생기지 않고 투명한 용액의 상태를 보아 안정한 나노 입자로서 고효율의 약물 전달체로 사용될 수 있다.

3. 결론

지난 10여 년간, 고분자 마이셀의 안정성에 대한 연구가 진행되어 왔다. 양친매성의 고분자는 마이셀을 형성할 수 있

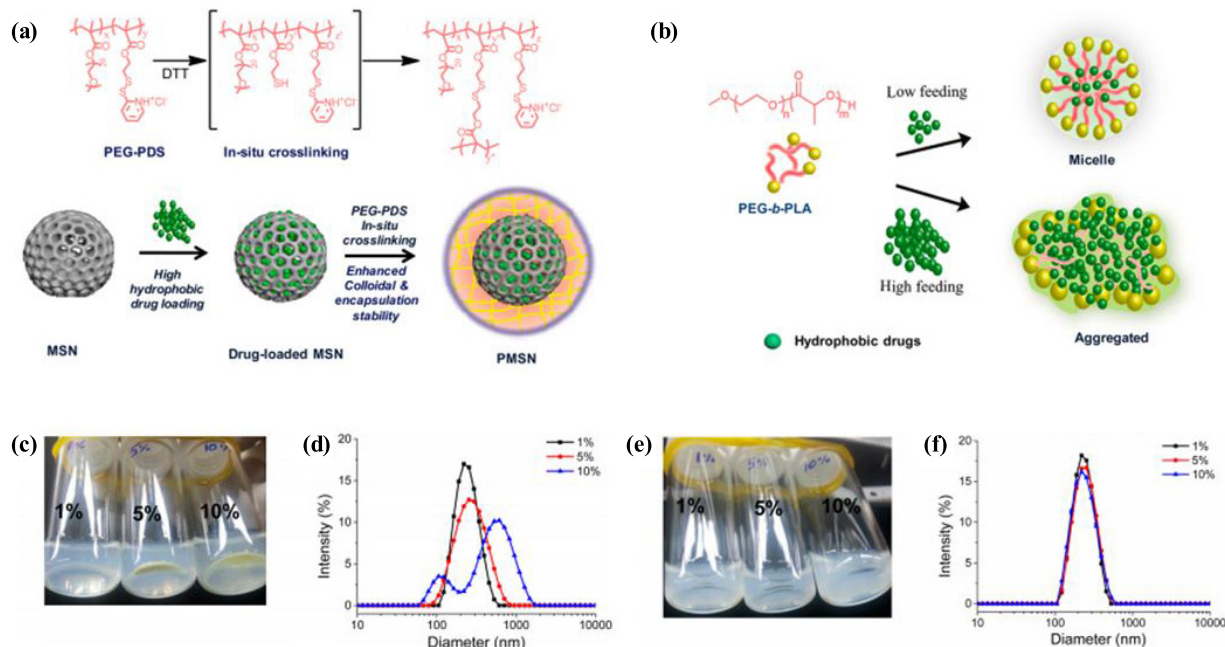


그림 8. (a) PEG-PDS의 이황 교차결합을 이용한 고분자를 약물을 실은 메조포러스 실리카 나노입자 (MSN)에 감싸 PMSN을 합성하는 그림. (b) PEG-*b*-PLA에 높은 약물 혹은 낮은 약물을 실을 때 관찰 가능한 나노입자의 구조. (c) PEG-*b*-PLA의 고분자 마이셀에 1%, 5%, 10%의 약물을 실을 때의 입자의 크기로 관찰한 안정성. (d) PMSN에 1%, 5%, 10%의 약물을 실을때의 크기로 관찰한 안정성. Reproduced with permission of *Biomacromolecules*. Copyright (2015) American Chemical Society.

으며, 고분자 내의 중심에 소수성의 약물 혹은 FRET probe를 실어 FRET 현상을 관찰하거나 약물의 방출로 마이셀의 안정성을 확인할 수 있다. 또한, 마이셀의 크기를 DLS로 측정하여 안정성을 확인할 수 있다. 마이셀의 안정성을 향상시키기 위한 방법으로 교차결합을 이용하여 내부의 약물 또는 형광물질의 누출을 막을 수 있으며 나노젤의 형성 또한 안정성을 향상시킬 수 있다. 외부 혹은 내부의 특정한 자극에만 안정성이 무너지는 자극에 민감한 고분자를 만들어 효과적으로 적용가능한 고분자 마이셀이 많은 분야에 응용 가능할 것이다.

참고문헌

1. R. T. Chacko, J. Ventura, J. Zhuang, and S. Thayumanavan, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **64**, 836 (2012).
2. Y. Bae and K. Kataoka, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **61**, 768 (2009).
3. H. Chen, S. Kim, W. He, Haifeng Wang, Philip S. Low, Kinam Park, and Ji-Xin Cheng, *Langmuir*, **24**, 5213 (2008).
4. H. Chen, S. Kim, L. Li, S. Wang, K. Park, and J.-X. Cheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6596 (2008).
5. Y. H. Bae and H. Yin, *J. Control. Release*, **131**, 2 (2008).
6. L. Li, K. Raghupathi, C. Song, P. Prasad, and S. Thayumanavan, *Chem. Commun.*, **50**, 13417 (2014).
7. S. Swaminathan, C. Fowley, B. McCaughan, J. Cusido, J. F. Callan, and F. M. Raymo, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 7907 (2014).
8. S. Jiwanich, J.-H. Ryu, S. Bickerton, and S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 10683 (2010).
9. A. M. Jhaveri and V. P. Torchilin, *Front. Pharmacol.*, **5**, 1 (2014).
10. P. Zou, H. Chen, H. J. Paholak, and D. Sun, *Mol. Pharmaceutics*, **10**, 4185 (2013).
11. S. Bickerton, S. Jiwanich, and S. Thayumanavan, *Mol. Pharmaceutics*, **9**, 3569 (2012).
12. Y. Li, K. Xiao, J. Luo, W. Xiao, J. S. Lee, A. M. Gonik, J. Kato, T. A. Dong, and K. S. Lam, *Biomaterials*, **32**, 6633 (2011).
13. S.-Y. Lee, S. Kim, J. Y. Tyler, K. Park, and J.-X. Cheng, *Biomaterials*, **24**, 552 (2013).
14. S.-Y. Lee, J. Y. Tyler, S. Kim, K. Park, and J.-X. Cheng, *Mol. Pharmaceutics*, **10**, 3493 (2013).
15. J.-H. Ryu, R. T. Chacko, S. Jiwanich, S. Bickerton, R. P. Babu, and S. Thayumanavan, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 17227 (2010).
16. J.-H. Ryu, S. Bickerton, J. Zhuang, and S. Thayumanavan, *Biomacromolecules*, **13**, 1515 (2012).
17. K. Kim, B. Bae, Y. J. Kang, J.-M. Nam, S. Kang, and J.-H. Ryu, *Biomacromolecules*, **14**, 3515 (2013).
18. L. Palanikumar, H. Y. Kim, J. Y. Oh, A. P. Thomas, E. S. Choi, M. T. Jeena, S. H. Joo, and J.-H. Ryu, *Biomacromolecules*, **16**, 2701 (2015).
19. L. Palanikumar, E. S. Choi, J. Y. Cheon, S. H. Joo, and J.-H. Ryu, *Adv. Funct. Mater.*, **25**, 957 (2015).