

## 모델 microspheres의 합성 및 bovine serum albumine의 흡착 연구

### (I) Synthesis of model microspheres and adsorption study of bovine serum albumine.

김종현, 김우식

연세대학교 화학공학과

#### 〈요약〉

표면에 여러 가지 기능성기를 가지는 microspheres는 immunoassay, drug delivery system, cell separation등 의 공학분야에 응용이 기대되고 있다. 이들 분야의 응용을 위하여 유화제를 사용하지 않으면서, 기존의 회분식, 반회분식, seed 중합법등의 문제점을 극복한 two stage shot growth technique을 개발하여 여러 가지 기능성기가 표면에 도입된 microspheres를 제조하였으며, 응용의 전단계로서 이들 microspheres에 대한 모델 단백질(BSA)의 흡착실험을 pH, 기능성기의 종류와 양, BSA농도를 변수로 행하여 최대 흡착량을 보이는 조건을 결정하였다.

#### 1. 서론

오늘날 고분자 공학의 발전과 함께 생물 공학의 기술 또한 빠른 진전을 보이고 있으며, 고분자 공학과 생물 공학의 접합 연구가 관심의 대상이 되고, 이들 연구 결과를 이용한 biomedical 분야에서의 기능성 microspheres의 응용이 큰 주목을 받기 시작했다. 과거 Biomedical 분야에서 microspheres의 응용은 blood flow나 perfusion rates 측정등에 한정되었지만, 최근에는 생명을 위협하거나 심각한 질환을 일으키는 많은 병들에 대한 진단과 치료등을 포함하는 것으로 그 응용범위가 넓어질 전망이다[1,2]. 특히 이 분야의 발전에는 biotechnology의 발전을 이용한 세포융합기술로 동물이나, 생물 반응기에서 균일한 항체 분자를 생산할 수 있게 된 것이 큰 계기가 되었으며, 이 기술은 앞으로 척추 동물의 면역 방어의 작용제인 항체

가 병이나, 특별한 세포의 진단과 약물운반 그리고 생분리 등에서 유용한 상품이 될 것을 예고하고 있다. 다양한 응용들 중에 어떤 것들은 빠른 진전을 보이는 것도 있고, 또 어떤 것들은 초기 개발 단계에 있는 바, biomedical 분야에서의 microspheres의 주요 응용으로는 다음을 들 수 있다.

#### (a) Solid phase immunoassays

- 항체로 코팅된 microspheres에 항원이 포함된 sample이 혼합되면 표면의 항체와 항원-항체 반응을 통해 라텍스가 응집하여 큰 덩어리를 형성하며, 이를 검출하여 정량화한다.

#### (b) Drug delivery system

- 약물로 코팅된 microspheres는 magnetic등의 성질을 이용하여 특정 병소부위를 선택적으로 표적화하여 극부적으로 약의 농도를 집중시켜 치료 효과를 높일 수 있다.

#### (c) Cell separation

- 한번의 조작으로 기존의 방법들보다 많은 양의 sample을 처리할 수 있고, 효과 또한 높기 때문에 유용하게 사용될 전망이다.

단백질 흡착 실험을 위한 기능성기를 기능성 공단량체를 공중합 함으로써 입자 표면위의 기능성기의 종류 및 그 농도를 조절하려는 연구가 진행되었다[3,4,5,6]. 또한 유화 공중합 방법을 이용하여 입자에 기능성 단량체를 결합시키려는 시도가 있었다[7]. 그러나 초기 중합 성분에 투여한 기능성 단량체의 양은 최종 중합체에서의 양보다 언제나 작다는 것이 밝혀졌다 [8].

따라서 기존의 중합 방법으로는 기능성 단량체를 주단량체 대비 1 wt % 이상으로하여 무유화제 공중합할 경우, 입자의 크기가 균일하지 않게되고, 많은 양의 수용성 고분자가 형성되어 생물공학에 응용시 많은 문제점이 있게 되어 two stage shot growth technique 이 개발되었다[9].

이 방법은 1단계로 기능성 단량체의 양을 1wt% 이하로하여 입자의 크기를 조절할뿐만 아니라 입자의 안정성을 향상시키며, 2단계로 주단량체와 기능성 단량체의 혼합물을 투입하여 표면 전하 밀도를 결정한다. 이 공정의 장점은 기능성 단량체를 고 농도로 공중합시키면서도 입자의 크기를 균일하게할 수 있고 입자의 크기 및 표면전하밀도를 독립적으로 조절이 가능한 것 등이다.

본 연구에서는 two stage shot growth technique에 의해 여러가지 기능성기가 표면에 도입된 microspheres를 제조하고, 의용공학적인 응용을 위하여 ion exchange방법과 serum replacement를 이용하여 세척한 후, 모델 단백질 BSA 흡착실험을 행하여 흡착의 최적 조건을 결정하였다.

## 2. 실험 및 결과

### 2.1 Two stage shot growth technique 에 의한 기능성 microspheres 의 제조

주단량체로 styren(St) 음이온성 기능성 단량체로 sodium styrene sulfonate(NaSS), 2-hydroxyethyl acrylate(HEA), methacrylic acid(MA), 양이온성 기능성 단량체로 dimethyl sulfate quaternary of dimethylaminoethyl methacrylate(DSDM)를 사용하였으며, 그 장치를 Fig.1 에 나타내었다.

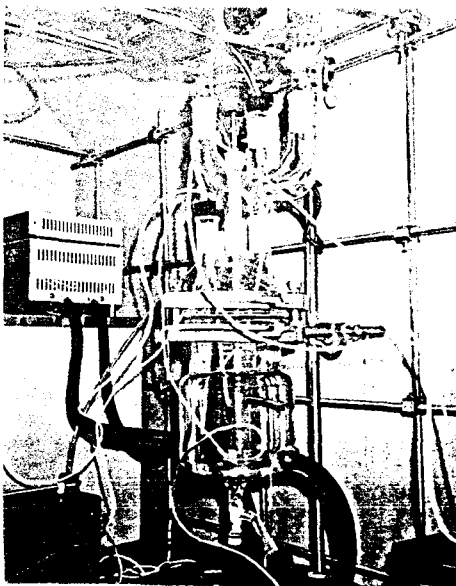


Fig.1 : Photograph of experimental apparatus

1단계로 반응기에 알맞은 양의 단량체와 탈이온 증류수를 채우고, 반응 온도에 도달하면 개시제와 기능성 단량체를 투입하여 반응을 진행시키고 2단계로 알맞은 전하율에 이르면 주 단량체와 기능성 단량체의 혼합물을 개시제와 같이 투입한다. 이때 반응물은 질소기류하에서 교반된다. 이와 같이하여 기능성 단량체의 공중합비율이 1wt% 이상 되게하여 입자의 표면이 양전하 및 음전하로 하전된 기능성 microspheres를 제조하였고 또한 여러 가지 기능성기를 가진 기능성 microspheres 중의 일부를 Fig.2 에 나타내었다.

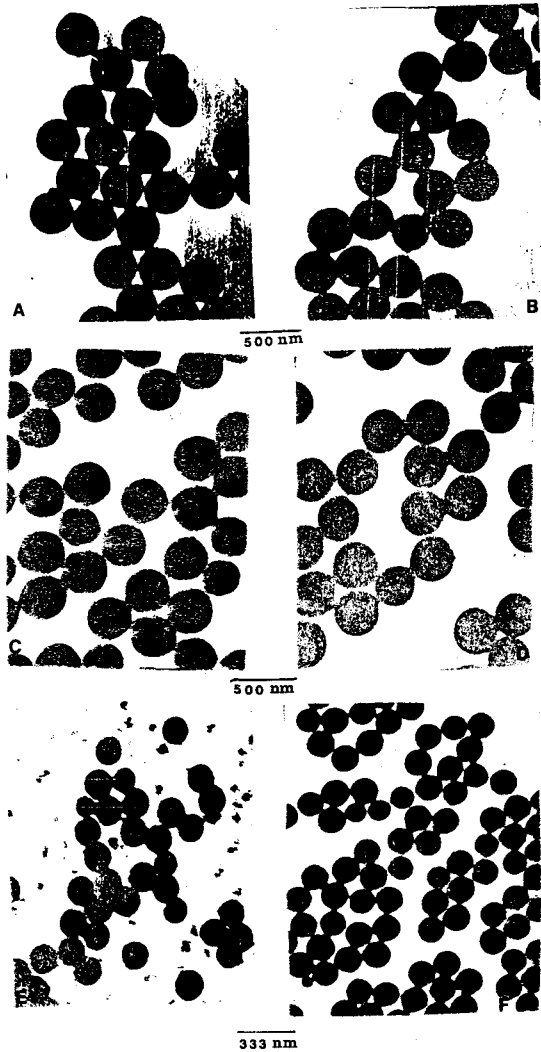


Fig.2 : TEM micrographs of St-NaSS copolymers, St-HEA copolymers and St-DSDM copolymers:  
 (A) 4.76 wt% NaSS (B) 6.25 wt% NaSS (Surface functional group :  $-SO_3^-$ )  
 (C) 3.64 wt% HEA (D) 7.27 wt% HEA (Surface functional group :  $-OH^-$ )  
 (E) 5.56 wt% DSDM (F) 8.73 wt% DSDM (Surface functional group :  $-NH_4^+$ )

또한 제조된 microspheres 를 IR 분석하여 기능성기의 도입을 확인하였고, 원소분석의 결과로부터 공중합함량을 구하였다. 이상의 결과에서 알 수 있듯이 주단량체대비 1wt% 이상의 기능성 단량체를 사용하여 공중합하였음에도 기존의 방법을 사용한 경우와는 다르게 모두 입자의 크기가 균일한 반면 기존의 방법보다 약 5-13배 가량 많은 기능성 단량체를 포함한 모델 microspheres 를 합성하였다.

2.2 기능성 microspheres 의 분석 및 세척

중량법으로 반응물의 전화율을 결정하였고, 입자의 크기 및 분포는 투과전자현미경(TEM), 기능성 단량체의 도입은 자외선 분광기(IR spectroscopy), 공중합 비율은 원소 분석을 하여 구하였다.

제조된 기능성 microspheres는 ion-exchange resin으로 표면 및 액상에 존재하는 미반응 monomer, initiator, 각종 electrolyte 및 기타 불순물들을 제거한다. 이를 다시 serum replacement cell에 넣어 세척한다. 세척정도는 배출되는 serum의 conductivity를 측정하여 결정하였다. Fig. 3 에 serum replacement cell을 이용한 세척장치를 나타내었다.

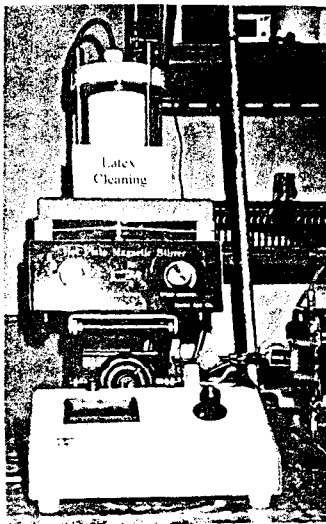


Fig. 3 : Photograph of purification apparatus

2.3 기능성 microspheres 의 흡착 응용

모든 microspheres의 응용분야는 antigen 또는 antibody등 단백질과의 결합을 기본단계로 한다. 때문에 여러 단백질 중 모델 단백질로서 BSA(Bovine Serum Albumin)를 선정하여 실험하였다.

세척된 라텍스는 20%로 농축하며, 정해진 pH의 buffer에 원하는 농도의 BSA를 용해시킨 다음, 이 용액과 20% 라텍스의 부피비를 4:1로 섞는다. 3시간 동안 항온조에서 반응시킨 후 (25°C), cellulose nitrate membrane으로 액상만을 여과해낸다. 얻은 액체상은 280nm에서 UV로 BSA의 농도를 구하였다. 흡착된 BSA의 양은 단백질에 대한 물질수지로부터 구할 수 있다.

Poly(St/HEA) 및 poly(St/MA) 샘플들에 대해 BSA의 농도는 고정시키고 pH를 변화시키면서 실험하였으며, 그 결과를 Fig. 4, 5 에 나타내었다.

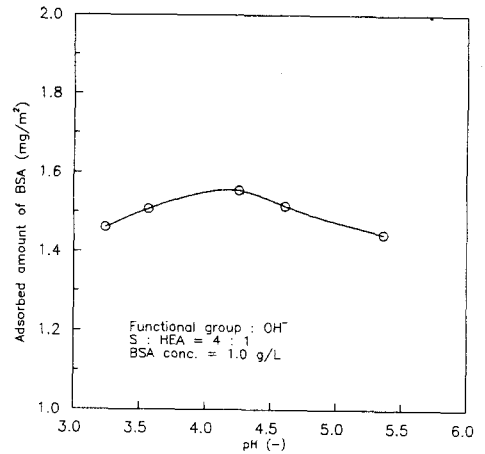


Fig. 4 Adsorption amount of BSA as a function of pH

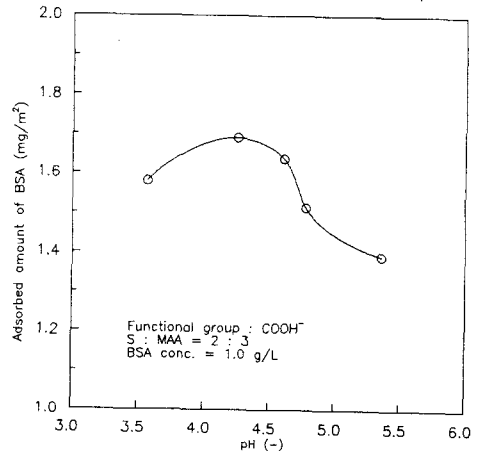


Fig. 5 Adsorption amount of BSA as a function of pH

그림에서 볼 수 있듯이, pH=4.5부근에서 최대 흡착을 나타내었으며, 이 점을 isoelectric point로 볼 수 있었다.

Poly(St/HEA) 샘플에 대하여 공중합비에 따른 흡착량의 변화를 Fig. 6 에 보였다.

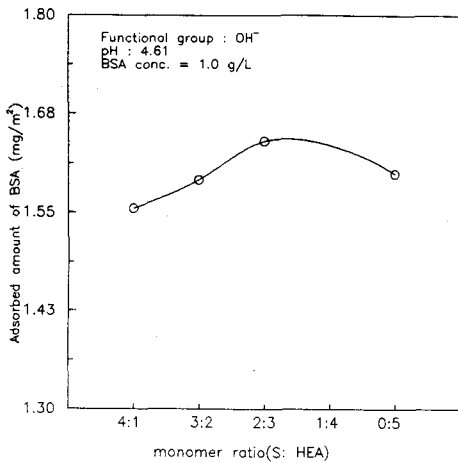


Fig. 6 Adsorption amount of BSA as a function of S:HEA ratio

전반적으로 poly(St/MA)쪽이 더 많은 흡착량을 보이며, 카르복시 그룹의 단백질과의 상호작용력이 히드록시 그룹의 그것보다 더 클을 보여준다.

단량체 HEA의 분율이 늘어날수록 흡착량이 늘어나는 것은 -OH 그룹의 BSA와의 상호작용력이 커서 그 그룹의 숫자가 늘어날수록 흡착량이 늘어나는 것으로 생각할 수 있다. 그러나 무한히 늘어나는 것은 아니고 HEA의 분율이 어느 이상으로 늘어나면 오히려 흡착량이 감소함을 보인다. 이는 HEA에 비해 St가 더 소수성인 때문이다. BSA는 소수성 표면에 더 많이 흡착되는 것으로 보고되어 있다[10].

Poly(St/HEA)와 poly(St/MA) 샘플에 대한 흡착등온선을 Fig. 7에 보였다.

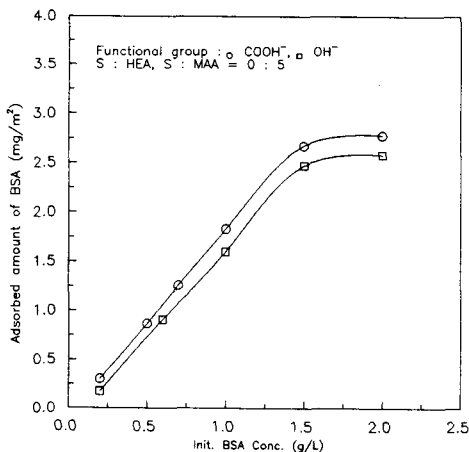


Fig. 7 Adsorption amount of BSA as a function of BSA init. conc.

### 3. 토의

유화제를 사용하지 않는 two stage shot growth technique에 의해 입자의 표면에 여러 가지 기능성기를 가질뿐만 아니라 음이온 및 양이온 전하를 가지는 기능성 microspheres를 제조하였고, 이는 기존의 방법에 비하여 많은 기능성 단량체를 포함하였음에도 입자의 크기는 모두 균일하여 의용공학적 응용에 더욱 유용하게 사용될수 있으며, 응용의 전단계로서 세척 및 모델 단백질 BSA의 흡착 실험을 행하였는 바, pH 4.5부근에서 최고 흡착량을 나타내었으며, 이를 준 이온강도에서의 등전점으로 볼 수 있었다. 흡착 등온선은 1.5 g/L까지 선형적 증가를 보이다가 이후 완만한 증가를 보였다. 이는 폴리머 흡착의 경우와 매우 유사하며, 단분자층 흡착의 경우가 아님을 알 수 있었다. 표면 기능성 기의 종류에 따른 영향은 히드록시 기보다 카르복시 기에 더 많은 단백질이 흡착되었다. St/HEA의 공중합비에 따른 실험결과, HEA의 양이 늘어날 수록 흡착량이 증가하다가 감소하는 경향을 보였다. 이는 HEA가 St에 비해 덜 소수성이기 때문으로 생각된다.

### 4. 참고 문헌

1. B.I. Hoffbrand & R.P. Forsyth : *Cardiovascular Research*, 3, 426(1969).
2. R.H. Phibbs et al : *Nature*, 216, 1339(1967).
3. M.S.Juang and I.M. Krieger, *J. Poly. Sci. Polym. Chem. Ed.*, 14,2089 (1976).
4. B.N.Greene, D.P. Sheetz, and T.D.Fisher, *J. Colloid Interface Sci.*, 32,97 (1970).
5. R.L. Schild, M.S. El-Aasser, G.W. Phehlien and J.W. Vanderhoff, " *Emulsion, Latices, and Dispersion*", P. Becher, Ed., Dekker, New York, 99 (1978).
6. D.F. Witmann, M.S. Research Report, Lehigh Univ., Bethlehem, PA (1978).
7. Liu, L. J. and Krieger, I.M., *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 19, 3013 (1981).
8. Turner, R.S, Weiss, R.A. and Robert, D.L., *J. Polym. Sci., Polym. Chem.*, 23, 535 (1983).
9. J.H. Kim, M. Chainey, M.S. El-Aasser and J.W. Vanderhoff, *J. Polym. Sci. Polym. Chem.*, 27, 3187 (1989).
10. T. Suzawa & T. Murakami, *J. Colloid and Interface Sci.*, 78: 266 (1980).