

## PLGA 나노파티클로부터 수용성 블루 덱스트란의 서방성 방출

류상화 · 황성주 · 박정숙\*

충남대학교 약학대학

(2006년 3월 22일 접수 · 2006년 4월 10일 승인)

### Sustained Release of Water-Soluble Blue Dextran from PLGA Nanoparticles

Sang-Hwa Ryu, Sung-Joo Hwang and Jeong-Sook Park<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

(Received March 22, 2006 · Accepted April 10, 2006)

**ABSTRACT** – Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) nanoparticles were developed for sustained delivery of water-soluble macromolecules. PLGA nanoparticles were fabricated by spontaneous emulsification solvent diffusion method generating negatively charged particles and heterogeneous size distribution. As a model drug, blue dextran was encapsulated in PLGA nanoparticles. In addition, nanoparticles were also prepared with varying ratio of poloxamer 188 (P188) and poloxamer 407 (P407), and coating with poly(vinyl alcohol) (PVA). Then, the particle size, zeta potential and encapsulation efficiency of nanoparticles containing blue dextran were studied. In vitro release of blue dextran from nanoparticles was also investigated. The surface and morphology of nanoparticles were characterized by scanning electron microscopy (SEM). In case of nanoparticles prepared with PLGA, P407, and different organic solvents, particle size was in the range of 230~320 nm and zeta potentials of nanoparticles were negative. The SEM images showed that ethyl acetate is suitable for the formulation of PLGA nanoparticles with good appearance. Moreover, ethyl acetate showed higher encapsulation efficiency than other solvents. The addition of P188 to formulation did not affect the particle size of PLGA nanoparticles but altered the release patterns of blue dextran from nanoparticles. However, PVA, as a coating material, altered the particle size with increasing the PVA concentration. The nanoparticles were physically stable in the change of particle size during long-term storage. From the results, the PLGA nanoparticles prepared with various contents of poloxamers and PVA, could modulate the particles size of nanoparticles, in vitro release pattern, and encapsulation of water-soluble macromolecules.

**Key words** – PLGA nanoparticles, Drug release, Blue dextran, PVA, Poloxamer

지속성 방출 제제는 적용 후 즉시 소실되는 것을 회피하기 위해 고분자를 이용하여 방출을 제어함을 목적으로 한다. 특히 투여 용량이 매우 적은 약물이나 생리활성 물질의 경우 방출을 조절하여 투여횟수를 조절하고 적용부위에서의 머무름 시간을 늘리는 것이 중요하다. 제어방출 제제는 수용성 약물의 방출을 지연시키는 것이 일반적이며, 생체적합성 고분자를 이용하여 체내 적용 후 무해한 제제를 개발할 필요가 있다. 따라서 방출지속성 제제의 주요 성분으로 생분해성 고분자에 대한 관심이 점차 증가하고 있다.

생분해성 고분자를 이용한 나노파티클은 주사제 뿐만 아니라 경구 및 국소 투여제에 광범위하게 적용가능하며, 다른 화학 조성 및 물리적 성질을 가진 고분자를 첨가하여 약물의 방출을 조절할 수 있다.<sup>1)</sup> 이들은 생리활성 물질의 효

과를 증진시키고, 효소에 의한 분해를 감소시킬 뿐만 아니라 방출속도를 조절할 수 있다는 장점이 있다.<sup>2,4)</sup> 또한 나노파티클은 입자크기가 작기 때문에 생물학적인 장벽을 극복하여 봉입된 약물 분자의 수송을 향상시킬 수 있다.

이러한 수송체 제조에 가장 널리 사용되는 물질은 안전하고 생체에 적합한 것으로 알려진 poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)이다.<sup>5)</sup> 이 고분자는 체내에서 lactic acid와 glycolic acid로 분해되며 이들은 CO<sub>2</sub>로 배출되므로 인체에 전혀 무해하다.<sup>6,7)</sup> PLGA 폴리머 매트릭스로부터 다양한 약물의 제어 방출에 관한 많은 연구가 이루어졌다. 공중합체 조성 및 분자량, 미립구의 크기에 따라 조절이 가능하며 몇 주부터 몇 달까지 방출 기간을 다양하게 조절할 수 있다.

방출 패턴을 보다 정밀하게 조절하기 위해 고분자 코팅을 하게 되는데, 대표적으로 폴리비닐알코올[poly(vinyl alcohol), PVA]을 사용한다. PVA는 수상에 비교적 균일하게 분산되고 재분산되기 쉽기 때문에 PLGA 나노파티클 제조시 유화제

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)821-5932, E-mail : eicosa@cnu.ac.kr

로 흔히 사용된다. 그러나 PVA의 양이 많아지면 나노파티클의 친수성이 증가하여 세포내 유입(uptake)이 감소하게 된다. 따라서, 나노파티클의 세포내 유입과 물리적 특성은 나노파티클 제조시 사용하는 PVA의 양을 변화시켜 조절가능하다.

기존의 나노파티클에 대한 연구가 저분자량의 약물에 주로 적용되었기 때문에, 새롭게 주목받고 있는 바이오 신약의 제제화에 적용하기 위해 본 연구에서는 거대분자의 모델 약물로 blue dextran을 사용하였다. PLGA를 사용하여 blue dextran을 함유하는 방출 지속성 나노파티클을 제조하고, 방출 패턴을 조절하기 위해 폴록사머의 조성비와 PVA의 사용량을 변화시켰다. 제조한 나노파티클의 입자 크기 및 물성을 평가하고 *in vitro* 방출 시험을 통해 수용성 거대 약물의 방출 지속성을 평가하였다.

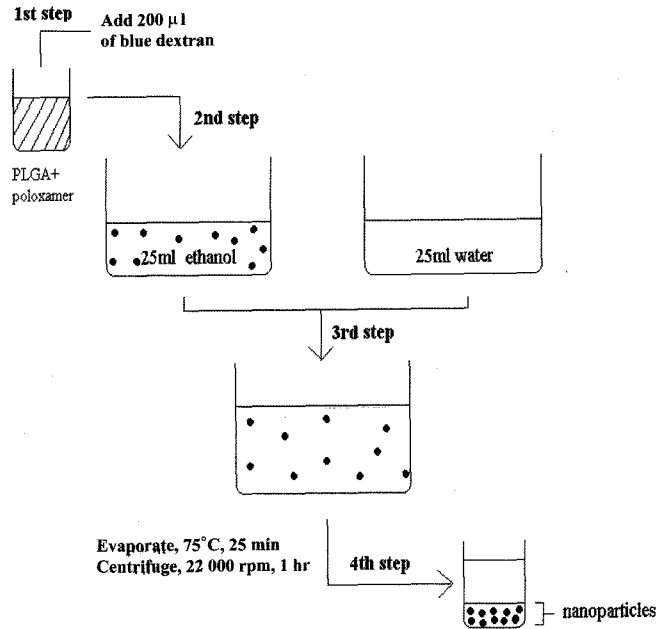
**실험 방법**

**시약 및 기기**

본 실험에 사용한 blue dextran(평균분자량 2,000,000)과 poly(vinyl alcohol) (PVA, 분자량 30,000~70,000)은 Sigma Chemical Co.(USA)의 제품을 구입하였다. Poly(lactide-co-glycolic acid) (PLGA, 50:50 Resomer RG 503, MW 40,000~75,000)는 Boehringer Ingelheim(Germany)의 제품을 사용하였으며, 폴록사머 188과 407은 BASF(Germany)의 제품을 구입하였다. 기타 용매와 시약은 시판 제품 중 시약급 이상을 사용하였다. 본 연구에는 evaporator (KU-LNW, Sunil Instrument Co., Ltd, Korea), ultra speed centrifuge (XL-80, Beckman Int., USA), freeze dryer (MD-FDU-540, Toyko Rikakikai Co. Ltd., Japan), UV spectrometer (UV-VIS mini-1240, Shimadzu, Japan), scanning electron microscopy (SEM, XL 30SFEQ, Philips, Netherlands) 등을 사용하였다.

**PLGA와 폴록사머를 사용한 나노파티클의 제조**

PLGA와 폴록사머(188 또는 407)의 중량비를 50:50으로 정하여 용매환산법으로 나노파티클을 제조하였다.<sup>8)</sup> PLGA 50 mg과 폴록사머 50 mg을 2 mL의 유기용매(acetone, methylene chloride 또는 ethyl acetate)에 녹인 후, blue dextran이 포함된 수용액(1 mg/ml) 200 µL를 가하여 1분간 진탕혼합하였다. 제조한 에멀전을 교반하면서 에탄올 25 mL에 붓고 고분자 나노파티클의 형태로 급속히 침전시킨 다음, 증류수 25 mL로 희석하여 10분간 교반하였다. 75°C 진공 하에서 유기용매를 증발시키고 농축하였다. 분석을 위해 나



**Figure 1**—Schematic procedure for preparation of PLGA nanoparticles.

노파티클을 22,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후, 동결 건조하였다. 동결건조 과정은 2단계로 이루어는데 첫 번째 단계로 -34°C에서, 48시간 동안 건조시킨 후, 두 번째 단계로 25°C까지 온도를 점차 상승시켜 건조하였다.<sup>9)</sup> 나노파티클의 제조과정은 Figure 1에 나타내었다.

**PVA가 코팅된 나노파티클의 제조**

나노파티클의 입자 크기 및 방출 특성에 미치는 PVA 코팅의 영향을 알아보기 위해, PLGA와 폴록사머로 나노파티클을 제조한 후, 증류수 대신 PVA 용액의 농도를 0, 0.5, 1, 2, 4%로 변화시켜 나노파티클에 가해 주었다. 10분간 방치 후, 동일한 방법으로 75°C, 진공 하에서 용매를 증발시켜 나노파티클을 회수하였다.

**Blue dextran의 봉입 효율 측정**

동결 건조한 나노파티클 5 mg에 증류수 1 mL과 클로로포름 1 mL을 가한 후 실온에서 1시간 동안 방치하였다. 용액을 15,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후, 상징액의 흡광도를 측정하여 blue dextran의 봉입 효율을 계산하였다.

**나노파티클의 입자 크기 및 제타 전위 측정**

나노파티클의 입자 크기 및 제타 전위는 광산란분광기(light scattering spectrophotometer, ELS-8000, Otsuka Electronics Co., Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정 전 시

료를 증류수에 균일하게 분산시켰으며, 3회 반복 측정 한 결과의 평균값을 계산하였다.

**주사전자현미경 (SEM)**

제조한 나노파티클의 입자 크기, 표면, 형상 등을 주사전자현미경을 이용하여 관찰하였다. 시료를 gold와 palladium으로 코팅한 후, 10 kV의 가속 전압 하에서 3,000~60,000배의 배율로 관찰하였다.

**PLGA 나노파티클로부터 blue dextran의 *in vitro* release**

제조한 나노파티클의 방출은 용출시험기(VK 7000, Vankel, NJ)를 이용하여 미국약전(USP 25판)의 패들법에 따라 측정하였다. 교반속도는 100 rpm이었고, 온도는 37 ± 0.1°C로 유지하였다. 각 시험은 pH 6.8의 인산 완충액 500 mL를 용출액으로 사용하였고, 제조한 시료를 dialysis tube에 넣어 용출액에 넣었다. 정해진 시간마다 검체를 1,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 그 상정액 2 mL을 취하였고, 동량의 새로운 인산 완충액을 넣어 용출 매질의 부피를 보충해 주었다. Blue dextran의 농도는 260 nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

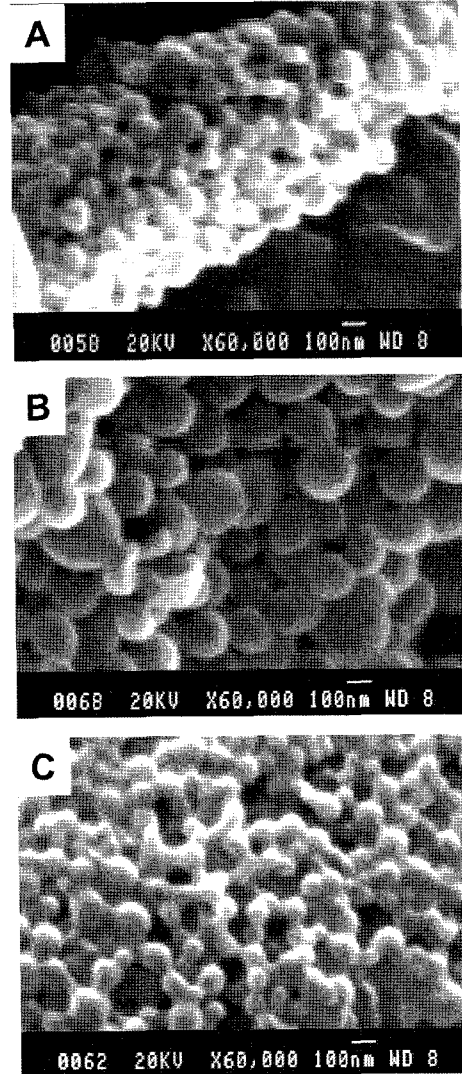
**결과 및 고찰**

**유기용매의 영향**

나노파티클의 물리화학적 특성에 미치는 유기용매의 영향을 Table I에 정리하였다. 각 용매로 제조한 나노파티클은 입자 크기가 균일하였으며, 분산성 또한 우수하였으나, 제조 과정에서 사용한 유기용매의 종류에 따라 서로 다른 크기를 나타내었다. 아세톤의 경우, 제조 직후에는 입자 크기가 매우 작았으나, 1주일 후 서로 응집되어 입자 크기가 증가하였다. 또한 주사전자현미경(SEM) 사진으로부터 아세톤으로 제조한 나노파티클은 입자 모양이 일정하지 않음을 알 수 있었다(Figure 2A). 일부 입자들은 나노파티클을 형성하였으나 일부는 응집되었다. 반면 메틸렌클로라이드를 사용한 경우, 나노파티클은 아세톤으로 제조한 경우보다 안정하였으며, 봉입효율은 약간 낮았으나 유의성 있는 차이는 나타나지 않

**Table I-Effect of Organic Solvent on Particle Size, Zeta Potential and Encapsulation Efficiency (n=3)**

Organic solvent	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation efficiency (%)
Acetone	316.0 ± 51.1	-31.8 ± 6.3	43.2 ± 8.9
Methylene chloride	320.2 ± 28.1	-31.5 ± 3.1	39.0 ± 4.5
Ethyl acetate	231.2 ± 39.3	-27.7 ± 1.0	59.4 ± 5.4



**Figure 2-SEM images of nanoparticles prepared using various organic solvent. (A) acetone, (B) methylene chloride, (C) ethyl acetate.**

았다(Table I). 에틸아세테이트를 유기 용매로 사용한 경우, 나머지 두 용매, 아세톤과 메틸렌클로라이드를 사용한 경우보다 안정한 나노파티클을 얻을 수 있었다. 메틸렌클로라이드를 사용하여 제조한 나노파티클 보다 입자 크기도 작았으며, SEM 사진에서 보여지는 바와 같이 입자는 균일함을 보였다(Figure 2C). 제조에 사용한 유기용매의 종류에 관계없이 모든 나노파티클은 음(-)의 표면 전하를 나타내었다. 사용한 유기용매의 유전상수 차에 따라 제조한 나노파티클의 물리화학적 특성에 차이가 나타나는 것으로 보고되었으나,<sup>10)</sup> 입자 크기에서 유의성 있는 차이는 나타나지 않았다.

**Blue dextran의 봉입 효율**

감압 하에서 동결건조한 나노파티클의 무게를 달아 클로

로포름에 용해시켰다. 용액을 membrane filter(pore diameter, 0.22 μm)에 통과시키고 260 nm에서 흡광도를 측정하였다. 나노파티클 중의 blue dextran의 봉입 효율은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Encapsulation efficiency(\%)} = \frac{\text{Amount of blue dextran within nanoparticles}}{\text{Theoretical amount of blue dextran loaded}} \times 100$$

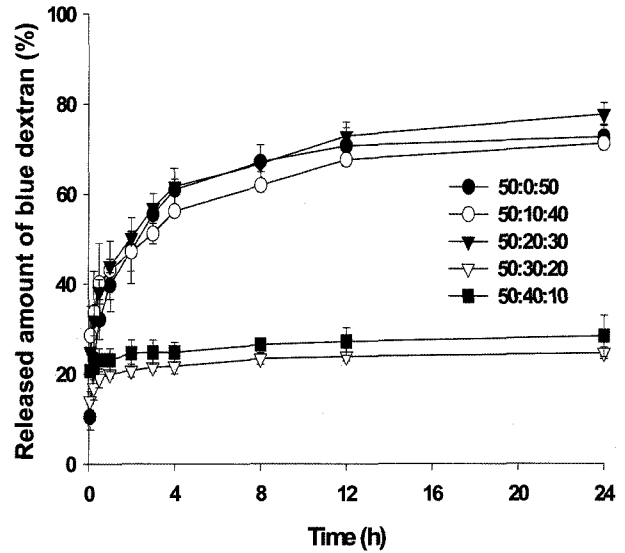
에틸아세테이트, 아세톤, 메틸렌클로라이드로 제조한 나노파티클의 blue dextran 봉입효율은 각각 59%, 43%, 39%였다(Table I). 친수성 약물에 대한 봉입효율을 고려하여 에틸아세테이트를 나노파티클 제조에 적합한 유기용매로 결정하였으며, 이는 용해도 변수 값이 작아 수용성 약물의 누출을 막아준 것으로 사료된다.

**PLGA 나노파티클에 미치는 폴록사머 조성비의 영향**

폴록사머의 영향을 알아보기 위해, 폴록사머 188과 407의 비율을 변화시켜 나노파티클을 제조하였다. PLGA의 양은 50 mg으로 고정하였고, 폴록사머 188과 407의 비율은 5가지 (PLGA:P188:P407=50:40:10, 50:30:20, 50:20:30, 50:10:40, 50:0:50)로 변화시켰다. 50:50:0의 조성비로 제조하였을 경우, 친수성인 폴록사머 188이 첫 번째 단계에서 물에 녹기 때문에 나노파티클이 형성되지 않았다. 폴록사머 188이 blue dextran 수용액에 용해되어, 물과 에틸 아세테이트의 두 층으로 분리되었다. 나머지 조성의 경우 PLGA, blue dextran과 균일하게 혼합되었다. 형성된 나노파티클의 입자 크기와 제타전위를 측정하고 방출시험을 하였다. 나노파티클의 입자 크기는 Table II에 나타내었다. 폴록사머 188의 비율을 증가시키에 따라, 나노파티클의 입자 크기는 감소하였다. 이는 폴록사머 407과 188에 존재하는 PEO 유도체의 양이 서로 다르기 때문인 것으로 생각된다.<sup>11)</sup> 이러한 특이적인 성질은 PEO 유도체와 blue dextran 사이에 서로 다른 상호작용을 유도할 수 있다.

**Table II-Particle Size of PLGA Nanoparticles Including Blue Dextran Prepared with Varying Ratio of Poloxamer (n=3)**

PLGA:P188:P407	Particle size (nm)
50:40:10	226.7 ± 34.0
50:30:20	230.9 ± 34.0
50:20:30	243.7 ± 30.3
50:10:40	221.5 ± 41.0
50:0:50	231.0 ± 39.3



**Figure 3-Release profiles of blue dextran from PLGA nanoparticles prepared with varying ratio of poloxamers (n=3).**

**나노파티클로부터 blue dextran의 방출**

친수성 폴록사머 188, 407과 PLGA로 제조한 나노파티클에서 blue dextran의 방출은 Figure 3과 같다. 모든 나노파티클의 혼합 조성으로부터 blue dextran 분자가 지속적으로 방출되었다. 두 개의 조성비 50:30:20과 50:40:10의 경우, Figure 3에 나타난 바와 같이 다른 조성비로 제조한 나노파티클보다 방출이 느리게 일어났다. 방출이 빠르게 나타나는 조성의 나노파티클로부터 방출을 조절하기 위해 이후 실험에서는 50:0:50의 조성을 선정하였다. *In vitro* 방출 실험 결과는 입자의 폴록사머 조성의 blue dextran의 방출을 변경하는 데 중요하다는 것을 보여 준다. 이는 폴록사머를 첨가함으로써 서로 다른 매트릭스의 수화과정에 의해 방출이 향상된 다른 연구 결과와도 일치한다. 기본적으로 폴록사머는 HLB 값에 의존하여 입자 매트릭스의 세공을 채워 봉입된 blue dextran의 방출 속도를 조절할 수 있다. 또한, 나노구조 내에 봉입된 PEO 유도체의 양이 blue dextran의 방출 속도에 영향을 주는 것으로 생각할 수 있다. 특이적으로 방출속도는 PEO 유도체의 HLB 값에 의존하는 것으로 나타났다.<sup>11)</sup>

**Table III-Particle Size of PLGA Nanoparticles Including Blue Dextran Coated with Varying Amount of PVA (n=3)**

PVA content (%)	Particle size (nm)
0	231.0 ± 39.3
0.5	517.0 ± 54.4
1	667.1 ± 56.8
2	941.3 ± 63.6

매트릭스에서 이러한 조성 변화는 봉입된 blue dextran의 안정성을 유지하고 방출을 조절하는 측면에서 매우 성공적인 것으로 나타났다.

일반적으로 거대분자는 고분자 분해, 매트릭스 부식(erosion) 과정 동안 형성된 수성 경로를 통한 확산 기전에 의해 생분해성 매트릭스로부터 방출된다. 일반적으로, PLGA 나노파티클로부터 봉입되었던 거대분자의 방출은 다음의 2 phase 방출 양상을 따른다. 초기 phase에서는 표면에 국소적으로 존재하는 blue dextran 분자가 탈착되기 시작하고, 2번째 phase에서는 PLGA가 현저히 분해되고 매트릭스 부식이 일어날 때까지 방출이 일어나지 않거나 매우 제한적으로 방출된다. 일단 이 시점에 도달하게 되면, 봉입된 blue dextran은 갑자기 방출되어 맥동성(pulsatile) 방출 양상을 나타내기도 한다. 이러한 방출 패턴은 큰 단백질 분자나 플라스미드 DNA의 방출에서 관찰되었으며, 이는 단백질과 고분자 분해 물과의 바람직하지 않는 상호작용 및 고분자 분해 과정에서 생성되는 산성 미세환경에 의한 것으로 생각된다.

**PLGA 나노파티클에 미치는 PVA 농도의 영향**

PVA의 영향을 조사하기 위해, 수상 대신 여러 농도의 PVA 용액을 나노파티클 제조에 사용하였다. 나노파티클의 조성은 PLGA:P188:P407=50:0:50으로 선정하였고, 0.5, 1, 2, 4%의 PVA 용액을 3번째 과정에서 증류수 대신 가하였다. 용액에 0.5, 1, 2% PVA 용액을 가하였을 때, 용액의 성상은 PVA를 넣지 않는 용액과 유사하였다. 그러나 4% PVA 용액을 가하였을 때, PVA 용액은 분산되지 않고 서로 달라붙어서 나노파티클을 형성하지 않았다. 형성된 나노파티클의 입자 크기는 PVA를 넣지 않은 나노파티클보다 증가하였다. 나노파티클의 물리적 안정성을 평가하기 위해 12주 동안 입자 크기의 변화를 측정된 결과, 입자 크기의 변화는 매우 적었으며, 제조한 나노파티클은 비교적 안정한 것으로 생각되었다(Figure 4). 계면활성제로서 PVA는 소수성 PLGA 고분자와 친수성 blue dextran의 배합성을 향상시킬 수 있었다. 이러한 영향은 보다 소수성으로 만들 수 있는 blue dextran과의 상호작용으로 이해될 수 있으며, 이는 또한 입자 매트릭스 내로 blue dextran의 봉입을 촉진할 수 있다.<sup>9,12)</sup>

**PVA 나노파티클로부터 blue dextran의 방출**

PVA를 코팅한 PLGA 나노파티클의 입자크기는 PVA 농도에 따라 큰 차이를 나타내었으나, 방출은 지속적으로 나타난 반면 농도에 따른 차이는 없었다(Figure 5). 친수성 PVA가 소수성 PLGA 나노파티클과 상호작용하기 때문에 PVA 나노파티클로부터 blue dextran의 방출은 PLGA 나노파티클

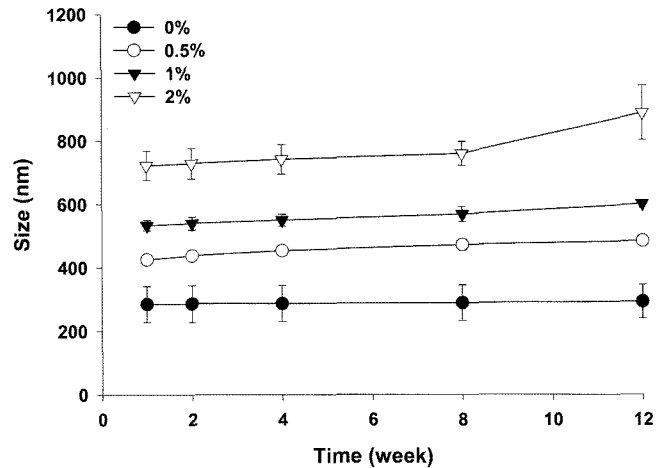


Figure 4—Long-term stability of PVA-coated PLGA nanoparticles during the storage (n=3).

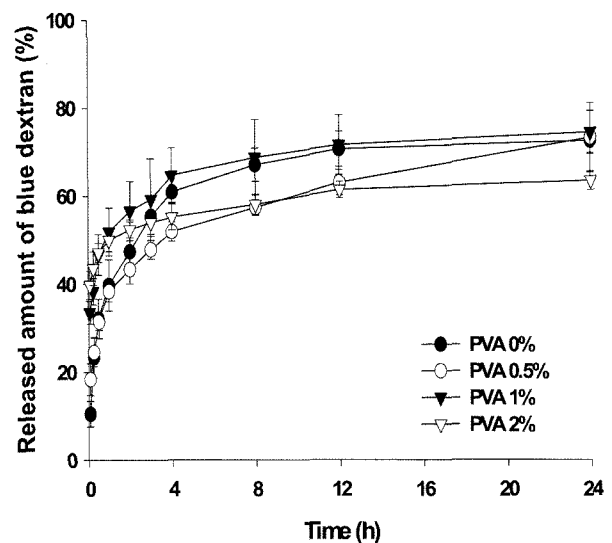


Figure 5—Release profiles of blue dextran from PLGA nanoparticles coated with varying amount of PVA (n=3).

로부터의 방출보다 지속적이다. 이러한 화합물의 친화성은 수소 결합 및 다른 약한 결합에 근거를 두고 있으며, 그 결과 blue dextran은 PLGA 나노파티클로부터 지속적으로 방출되었다. 또한 본 실험에서 24시간 동안 수행한 방출 실험 결과만으로 방출 지속성을 확인할 수는 없었으나, 단백질이나 펩타이드 약물 봉입시 나타나는 초기방출을 지연시킬 수 있음을 확인하였다. 그러나 폴록사머가 함유된 제제에서 PVA는 안정화제로서의 역할을 충분히 발휘하지 못하는 것으로 알려져 있어,<sup>13)</sup> PVA 농도 변화만으로는 방출을 효과적으로 조절할 수 없으며 새로운 코팅제를 사용하여 방출을 조절할 필요가 있다.

## 결 론

본 실험의 결과는 PLGA 나노파티클 제조시 사용되는 유기 용매와 폴록사머 혼합물의 조성을 변화시켜 blue dextran을 효율적으로 봉입할 수 있음을 보여주었다. 또한, PVA를 첨가함으로써 나노파티클의 방출 특성을 조절할 수 있었다. 따라서 폴록사머와 PVA를 나노파티클 조성에 첨가함으로써 거대분자 약물의 수송에 새로운 가능성을 제시하였다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년도 충남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## 참고문헌

- 1) S.S. Feng, Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy, *Expert Rev. Med. Devices*, **1**, 115-125 (2004).
- 2) J. Panyam and V. Labhasetwar, Sustained cytoplasmic delivery of drugs with intracellular receptors using biodegradable nanoparticles, *Mol. Pharmaceut.*, **1**, 77-84 (2004).
- 3) A. Rosler, G.W.M. Vandermeulen and H.A. Klok, Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**, 95-108 (2001).
- 4) R.A. Jain, The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices, *Biomaterials*, **21**, 2475-2490 (2000).
- 5) J.M. Anderson and M.S. Shive, Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **28**, 5-24 (1997).
- 6) E.J. Frazza and E.E. Schmitt, A new absorbable suture, *J. Biomed. Mater. Res.*, **5**, 43-58 (1971).
- 7) J.M. Brady, D.E. Cutright, R.A. Miller and G.C. Battestone, Resorption rate, route of elimination and ultra structure of the implant site of polylactic acid in abdominal wall of the rat, *J. Biomed. Mater. Res.*, **7**, 155-173 (1973).
- 8) C.X. Song, V. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W.R. Humphrey, R.J. Shebuski and R.J. Levy, Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery, *J. Control. Release*, **43**, 197-212 (1997).
- 9) N. Csaba, P. Caamano, A. Sanchez, F. Dominguez and M.J. Alonso. PLGA:poloxamer and PLGA:poloxamine blend nanoparticles: new carriers for gene delivery, *Biomacromolecules*, **6**, 271-278 (2005).
- 10) U. Bilati, E. Allémann and E. Doelker, Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **24**, 67-75 (2005).
- 11) P. Alexandridis and T.A. Hatton, Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling, *Colloid. Surf. A-Physicochem. Eng. Asp.*, **96**, 1-46 (1995).
- 12) T.G. Park, S. Cohen and R. Langer. Controlled protein release from polyethyleneimine-coated poly(L-lactic acid)/pluronic blend matrices, *Pharm. Res.*, **9**, 37-39 (1992).
- 13) J. Vandervoort and A. Ludwig, Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study, *Int. J. Pharm.*, **238**, 77-92 (2002).