Polymer(Korea), Vol. 43, No. 4, pp. 491-495 (2019)
https://doi.org/10.7317/pk.2019.43.4.491

ISSN 0379-153X(Print)
ISSN 2234-8077(Online)

속보

β-Sheet 구조를 갖는 폴리아미노산 유도체의 자기조립 현상

박일우# · 정나슬# · 한사라 · 오승주 · 김희진 · 정재현†

숭실대학교 화학공학과

(2019년 3월 31일 접수, 2019년 4월 15일 수정, 2019년 4월 16일 채택)

β-Sheet Mediated Self-assembly of Poly(aspartamide) Grafted Oligo(*L*-valine)

IL-Woo Park#, Naseul Jung#, Sa Ra Han, Seung Joo Oh, Hee-Jin Kim, and Jae Hyun Jeong†

Department of Chemical Engineering, Soongsil University, 369 Sangdo-ro, Dangjak-gu, Seoul 06978, Korea

(Received March 31, 2019; Revised April 15, 2019; Accepted April 16, 2019)

초록: 양친매성 공중합체로 형성된 자기조립 나노입자는 치료 효능을 최대화하기 위한 효과적인 약물전달체로 활발하게 연구되고 있다. 본 연구에서는 베타 시트 구조의 패킹 정도를 제어하여 다양한 형태의 생체모방 자기조립체를 제조하였다. 친수성 폴리아미노산 유도체에 베타 시트 구조를 형성할 수 있는 발린 분자를 접목하여 그래프트 공중합체, PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)를 합성하였다. 이렇게 합성한 그래프트 폴리아미노산 공중합체는 수용액상에서 나노미터 크기를 갖는 안정한 자기조립체를 형성하였다. 자기조립체의 베타 시트 함량은 발린 분자의 접목도(DS)에 주도적으로, 자기조립체의 형태는 중합도(DP)에 주도적으로 영향을 받는 것이 확인되었다.

Abstract: Nano-sized self-assemblies formed with amphiphilic block and graft copolymers have been extensively studied for drug delivery. This study reports a novel strategy to prepare biomimetic self-assemblies with unique morphology by varying the packing of beta sheets. Specifically, the amphiphilic graft copolymers, PHEA-*g*-oligo(*L*-valine) composed of poly(amino acid)s derivative as the hydrophilic backbone and oligo(*L*-valine) as the grafted hydrophobic chain were successfully synthesized. Then, the effect of degree of substitution (DS) and polymerization (DP) on self-assemblies of PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)s were investigated in an aqueous solution. This study discovered that the β-sheets of polymers are formed favorably by increasing of DS, while the structural transition of self-assemblies is influenced dominantly by DP.

Keywords: self-assembly, β-sheet, oligo(*L*-valine), degree of substitution, poly(amino acid)s.

#These authors equally contributed to this work.
†To whom correspondence should be addressed.
nfejjh@ssu.ac.kr, ORCID 0000-003-4263-408X
©2019 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

서 론

수용액상에서 다양한 형태를 갖는 자기조립 나노입자는 그 형태적 특이성으로 말미암아 표적지향 약물전달을 포함한 다양한 응용분야에서 활발하게 연구되고 있다.[1-3] 특히, 친수성 백본에 소수성 분자(grafts)를 접목한 양친성 그래프트 공중합체를 사용하여, 소수성 분자단의 접목도를 변화시켜 다양한 형태의 자기조립체를 제조하는 연구가 진행 중이다.[4,5] 최근에는 자기조립체의 형태가 구형보다는 일정 종횡비(aspect ratio) 이상의 타원형 또는 막대 모양일 때, 입자의 표적지향 및 부착 능력이 향상된다는 연구결과도 보고되었다.[6] 원하는 크기 및 형태를 갖는 자기조립 나노입자를 효과적으로 제조하기 위해, 분자설계 단계부터 분자의 친수성비, 접목도 및 중합도 등의 통합적 제어 기술이 요구되고 있다.[7]

본 연구에서는 친수성 폴리아미노산 유도체에 베타 시트(β-sheet) 구조를 형성할 수 있는 발린 분자를 접목하여(Figure 1(a)), 수용액상에서 생체모방 자기조립 현상을 분석하였다. Figure 1(b)에서 보는 것처럼, 발린 분자가 접목된 양친성 그래프트 폴리아미노산 분자의 접목도(DS: degree of substitution)와 중합도(DP: degree of polymerization)를 각각 제어하여, 수용액상에서 분자의 2차 구조(secondary structure) 형성 정도와 자기조립 현상과의 연관성을 확인하였다. 그 결과 자기조립체의 베타 시트 함량은 발린 분자의 접목도에 따라, 구조 변이는 중합도에 주도적으로 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제조한 발린 분자가 접목된 그래프트 폴리아미노산 분자 및 단백질 구조를 모사한 생체모방분자 설계 기술은 표적지향 약물전달을 포함하여 다양한 응용분야에서 효과적으로 활용되리라 기대된다.

실 험

본 연구에서 전구체로 사용한 poly(succinimide)(PSI, Mw: 27000 g/mol)는 아스파르트산(*L*-aspartic acid, Sigma)을 산 촉매(phosphoric acid, Sigma) 하에서 180 °C로 중합하여 얻었다(Figure 1(a-1)).[8] 이렇게 합성한 PSI를 DMF(*N*′,*N*′-dimethylformamide, Sigma)에 녹여 적정량(designated)의 에탄올아민(ethanolamine, Sigma)을 첨가하고 6시간 반응 후, 에틸렌디아민(ethylenediamine, Sigma)을 과량으로 첨가하여 연속적으로(sequentially) 반응시키는 과정을 통해, 아민기가 도입된 poly(2-hydroxyehtyl aspartamide)(PHEA-NH_2)를 합성하였다

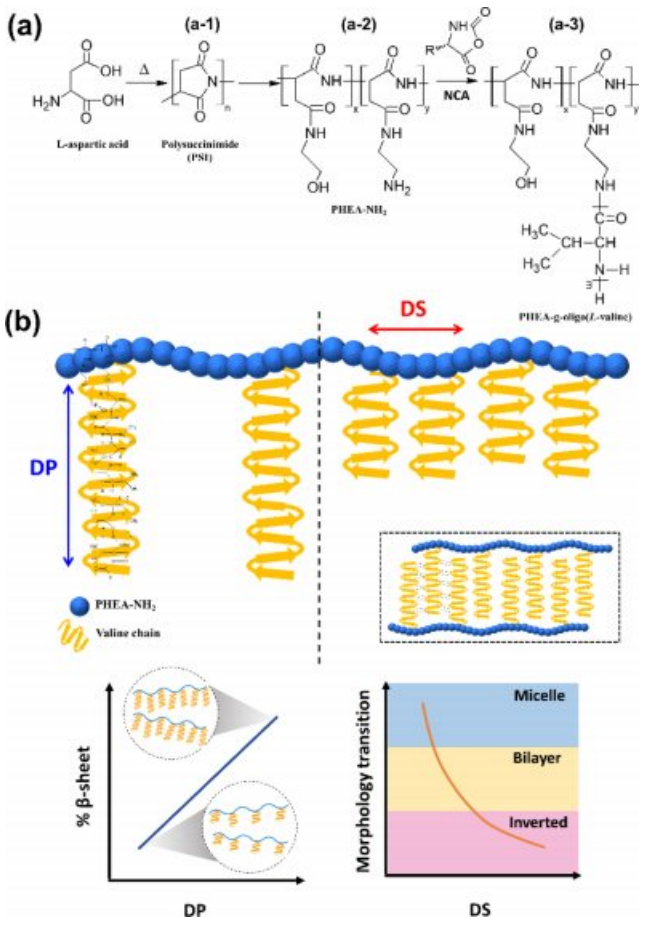

Figure 1. (a) Overall synthetic scheme of valine-conjugated PHEA *via* NCA polymerization; (b) the effects of DS and DP on self-assemblies of PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)s in an aqueous solution.

(Figure 1(a-2)). PHEA-NH_2을 개시제(macroinitiator)로 하여, 발린 NCA(valine *N*-carboxyanhydride)를 원하는 중합도에 맞게 적정량 첨가한 후 질소 환경에서 40 °C로 15시간 동안 중합시켜, PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)(PHEA-*g*-OVal)을 합성하였다(Figure 1(a-3)). 이때, 발린 NCA는 발린 분자(*L*-valine, Sigma)에 트리포스겐(triphosgene, Sigma)을 첨가하여 Fuchs-Farthing 합성법으로[9] 얻었다. 합성한 valine-NCA와 PHEA-NH_2는 DMSO-d_6, PHEA-*g*-OVal는 TFA-*d*를 용매로 400 MHz에서 ^{1}H NMR(Avance II, Bruker Biospin)로 구조를 분석하여, 최종 고분자의 DS와 DP를 결정하였다(Table 1). 합성한 PHEA-*g*-OVal은 친수성 PHEA 백본과 소수성 발린이 모두 녹는 co-solvent(TFA)에 녹인 후, 증류수에 도입하여 자기조립을 유도하였다. 이후, 투석(dialysis, MWCO; 3500 g/mol)하여 잔존 용매를 제거하고 동결건조하여 최종적으로 발린 분자가 접목된 양친성 고분자를 파우더 형태로 얻었다. 이렇게 준비된 고분자는 수용액에 녹인 후 750 W로 초음파 처리(tip type sonication, VCX-750, Sonics, USA)를 10분간 진행하여 자기조립체를 형성시킨 후, 이후에 있는 자기조립체 분석에 사용하였다. 자기조립체의 크기분포도는 90°의 산란각에서 He-Ne laser를 방출하는 DLS(dynamic light scattering, Nano S90, Malvern Inc., England)로 측정하였다. 임계자기조립농도, CAC(critical aggregation concentration)는 pyrene probe를 사용하여 330 nm에서 여기하고 방출되는 스펙트럼을 photo luminescence(with bandwidth; 2.0 nm, QM40, PTI, USA)로 측정하여 확인하였다. 자기조립체에 형성된 2차 구조, β-sheet 구조는 CD(circular dichroism, J-815, JASCO)로 180-250 nm에서 분석하였다. 마지막으로 80 kV에서 투과전자현미경(TEM-2010, JEOL Ltd., Japan)을 이용하여 수용액에서 형성된 PHEA-*g*-OVal 자기조립체의 형태를 관찰하였다.

결과 및 토론

베타 시트 구조를 형성할 수 있는 발린 분자를 접목하여 그래프트 공중합체, PHEA-*g*-OVal를 합성하였다. 발린 분자의 접목도(DS)는 PHEA 분자에 도입된 아민기 접목도로 제어할 수 있었다. 여기서 접목도란 친수성 PHEA 백본의 반복단위마다 접목된 아민기의 mol%를 의미하며, ^{1}H NMR 분석 결과를 활용하여 식 (1)과 같이 계산할 수 있었다.

$$DS = \frac{\text{The integral of the peak in 2.8~2.9 ppm}/2}{\text{The integral of the peak in 4.3~4.7 ppm}} \times 100(\%) \quad (1)$$

Table 1. Molecular Characterization of Valine-Conjugated PHEAs

Sample	DS[a]	DP[b]	Number[c]	Diameter[d]	CAC[e]	$f_{(w)}$[f]
PHEA	-	-	-	Highly soluble	-	100
PHEA-*g*-OVal1	4.5	6	54	53	2.5×10^{-1}	80
PHEA-*g*-OVal2	6.2	10	120	60	1.5×10^{-1}	64
PHEA-*g*-OVal3	10.9	6	126	89	1.0×10^{-1}	62

[a]Degree of substitution (succinimide units/amine groups, mol%) determined based on ^{1}H NMR. [b]Degree of polymerization (number of valine units) determined based on ^{1}H NMR of graft copolymers. [c]Number of valine molecules per a polymer chain. [d]Effective diameter (nm) obtained by DLS. [e]Critical aggregation concentration(mg/mL) determined by pyrene assay. [f]Hydrophilic mass ratio to total mass, $f_{(w)} = \frac{a_w}{a_w + b_w} \times 100$, where a_w is the mass of hydrophilic part, and b_w is the mass of hydrophobic part.

또한 중합도(DP)는 친수성 PHEA에 접목된 각 아민기로부터 valine-NCA가 중합된 발린 분자의 개수를 의미하며, 식 (2)를 통해 산출할 수 있었다.

$$DP = \frac{\text{The integral of the peak in 0.55~0.59 ppm}/3}{\text{The integral of the peak in 3.32~3.37 ppm}}/DS \quad (2)$$

그 결과 본 연구에서는 Table 1에 정리한 것과 같이, 접목도가 4.5, 6.2, 10.9 mol%, 중합도 6, 10, 6개를 갖는 양친성 폴리아미노산을 제조하였고 각각을 PHEA-*g*-OVal1, PHEA-*g*-OVal2, PHEA-*g*-OVal3으로 명명하였다. 여기서 주목할 것은 PHEA-*g*-OVal2와 PHEA-*g*-OVal3은 접목도와 중합도는 다르지만 분자 한 개당 도입된 전체 발린 분자 개수는 비슷한 수준인 것을 확인할 수 있다.

이렇게 합성한 양친성 폴리아미노산 공중합체는 수용액 상에서 안정한 자기조립체를 형성하였다. 각 분자의 임계자기조립농도(CAC)를 측정하여(Figure 2(a)), CAC 이상에서 자기조립체가 형성됨을 확인하였고 그 값은 Table 1에 나타내었다. 발린 분자의 접목도가 증가함에 따라 CAC는 감소하는 경향을 보여주는데, 이는 접목도가 증가할수록 자기조립체를 쉽게 형성할 수 있고 더욱 안정한 자기조립체를 형성할 수 있음을 나타낸다. PHEA-*g*-OVal의 자기조립체 형태는 수용액상에서 발린 분자의 2차 구조 형성 및 결합 정도에 기인한다. 때문에 자기조립체 내에 도입된 2차 구조를 원형편광이색성(CD, circular dichroism) 분광기를 사용하여 확인하는 실험을 진행하였다(Figure 2(b)). 특히, 식 (3)과 같이, 분자당 편광 타원율(mean residual ellipticity, $[\theta]_{MRW}$)로 정규화(normalized)하여 2차 구조 형성 정도를 확인하였다.[10]

$$[\theta]_{\mathrm{MRW}} = \frac{[\theta]_{\lambda} \times M_{\mathrm{MRW}}}{10 \times c \times l} \quad (3)$$

여기서, $[\theta]_{\lambda}$는 측정된 파장에 따른 ellipticity 값, M_{MRW}는 폴리아미노산 분자의 반복 단위의 평균 분자량, c는 측정 시료의 농도, l은 측정 cuvette의 길이를 의미한다.

Figure 2(b) 결과에서 볼 수 있는 것처럼, 합성한 양친성 폴리아미노산으로 제조한 자기조립체는 모두 안정적인 β-sheet 구조를 갖는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 도입된 발린 분자의 수가 많을수록 분자 내의 β-sheet 형성비(% of β-sheet)가 증가하는 것을 알 수 있다. 그런데 Figure 2(b-2)의 결과와 같이, 전체 도입된 발린 분자 개수가 비슷한 PHEA-*g*-OVal2와 PHEA-*g*-OVal3을 비교해 보면, PHEA-*g*-OVal2가 β-sheet 형성이 더 잘 되었음을 확인할 수 있다. 이는 양친성 그래프트 폴리아미노산 분자의 β-sheet 형성이 도입된 발린 분자 수가

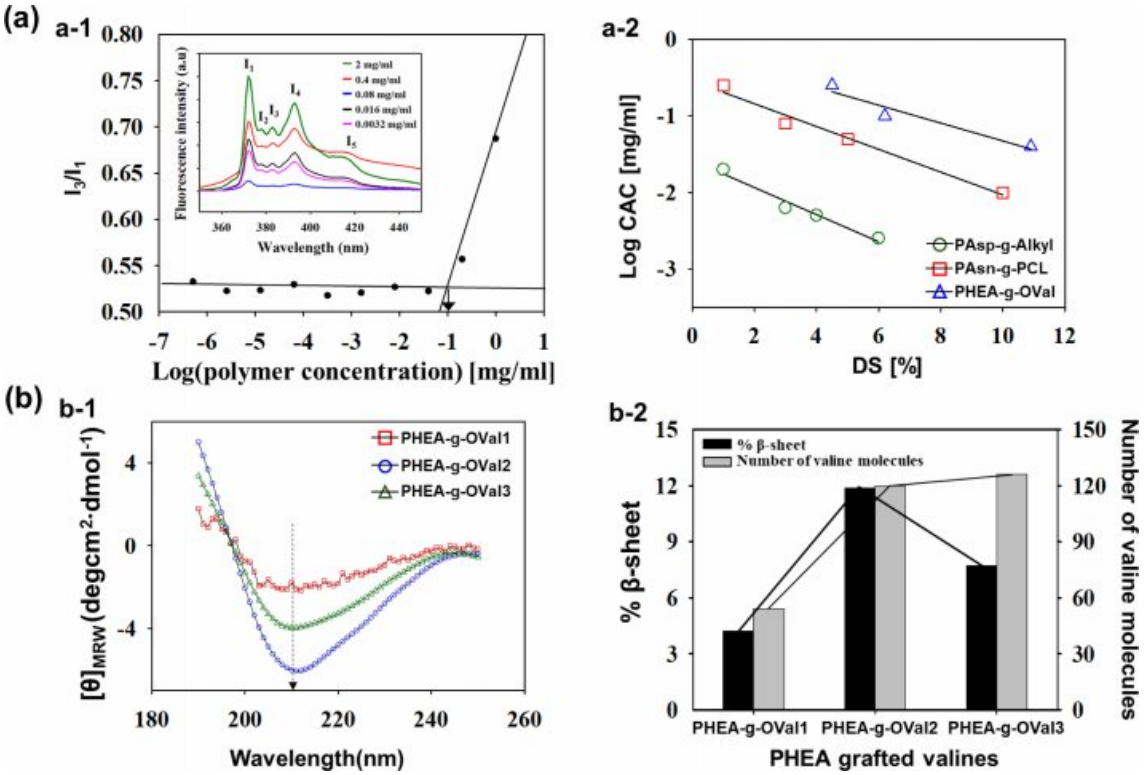

Figure 2. (a-1) Fluorescence emission spectra and I_3/I_1 ratio of pyrene loaded in the PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)s solution; (a-2) critical aggregation concentration (CAC) determined by emission fluorescence spectra of pyrene; (b-1) circular dichroism spectra of PHEA-*g*-oligo(*L*-valine)s solution; (b-2) the percent of β-sheet and number of valine molecules on self-assemblies in an aqueous solution.

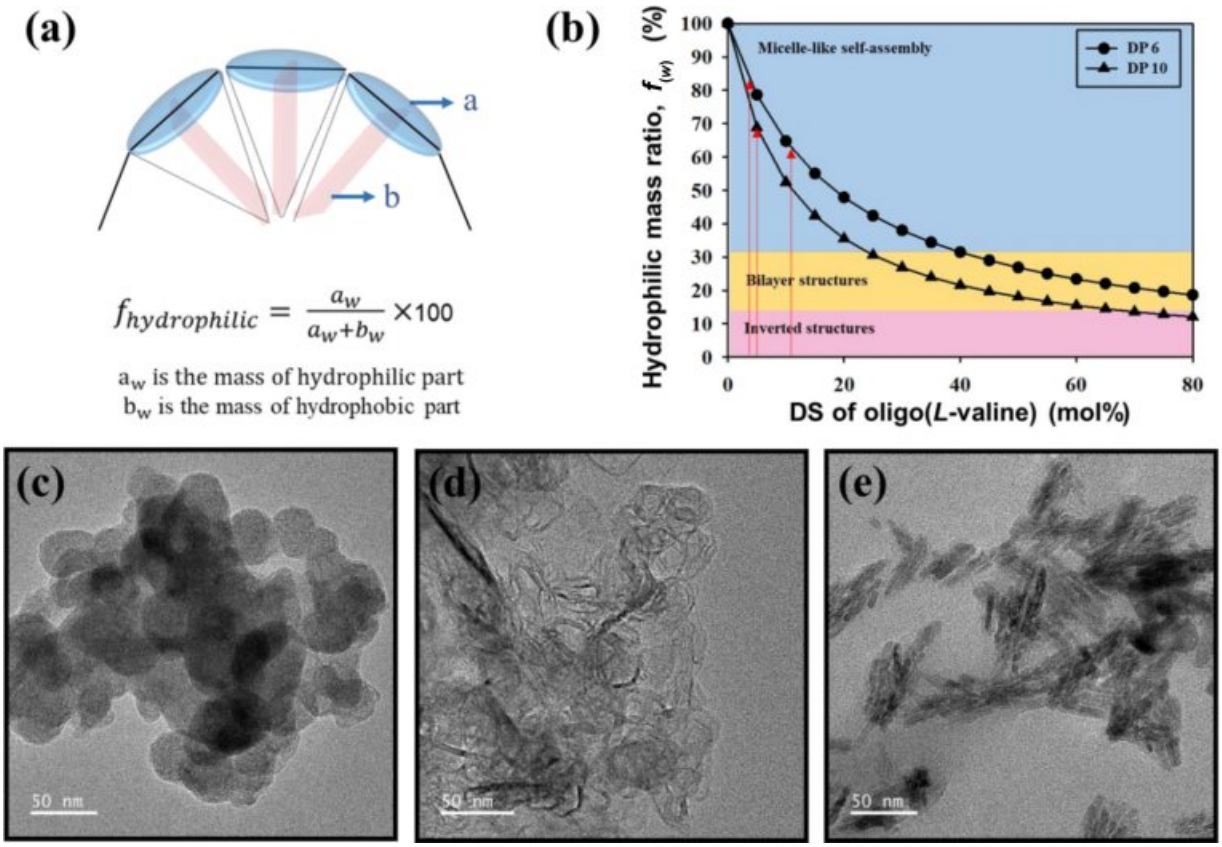

Figure 3. (a) Scheme for estimating the $f_{(w)}$ of valine-conjugated graft polymer system; (b) estimation of the $f_{(w)}$ of valine-conjugated PHEA with varying of DS and DP. TEM images of self-assemblies of (c) PHEA-*g*-OVal1; (d) PHEA-*g*-OVal2; (e) PHEA-*g*-OVal3.

동일한 경우, DS보다는 DP에 더 영향을 받기 때문으로 판단된다. 실제로 β-sheet는 친수성 백본에 접목된 발린 분자가 이웃한 그래프트의 분자와 수소결합(inter hydrogen bonding)에 의해 형성되기 때문이다.

일반적으로 자기조립체의 형태는 양친성 분자의 구조에 따라 예측이 가능하다. 양친성 그래프트 공중합체의 경우, Figure 3(a)와 같이 친수성 헤드 그룹을 소수성 분자단이 차지하는 정도에 따라 상응하여 나타내고 또한 이를 친수성 정도($f_{hydrophilic}$)를 계산하여 예측하고 있다.[7] 예측 모델에 의하면 (Figure 3(b)) 본 연구에서 적용한 접목도 범위에서는 모두 미셀 형태의 구형의 자기조립체를 기대할 수 있다. 그러나 Figure 3의 TEM 결과에서 볼 수 있는 것처럼, 접목도가 증가함에 따라 자기조립체의 형태가 구형의 입자(spherical structure, Figure 3(c))에서 층상 구조(lamellar-like structure, Figure 3(d))로 나아가 막대 형태(rod-like structure, Figure 3(e))로 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 일반적인 소수성-소수성 결합에 의해 형성되는 자기조립체와 비교할 때, β-sheet mediated self-assembly 경우, 접목도에 따라 그래프트 분자 내 이웃한 분자(inter interaction)와의 결합이 증가하여, 층상 구조를 갖는 형태의 자기조립체가 형성됨을 알 수 있다. 결론적으로 자기조립체의 베타 시트 함량은 발린 분자의 접목도에 따라, 구조 변이는 중합도에 주도적으로 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 제조한 발린 분자가 접목된 그래프트 폴리아미노산 분자 및 이를 활용한 생체모방분자 설계 기술은 표적지향 약물전달을 포함하여 다양한 응용분야에서 효과적으로 활용되리라 기대된다.[11-13]

결 론

베타 시트 구조의 패킹 정도를 제어하여 다양한 형태의 자기조립 나노입자를 제조하였다. 친수성 폴리아미노산 유도체에 베타 시트 구조를 형성할 수 있는 발린 분자를 접목하여 수용액상에서 자기조립 나노입자를 형성할 수 있는 그래프트 폴리아미노산 공중합체를 성공적으로 합성하였다.

이러한 자기조립체는 발린 분자의 접목도에 따라 베타 시트의 함량에 영향을 주며, 중합도에 따라 구조 변화에 영향을 주는 것을 확인하였다. 이를 통해 접목도와 중합도를 조절하여 자기조립체 나노입자의 크기, 형태 및 구조적 특이성을 제어할 수 있었다. 본 연구에서 제조한 발린 분자가 접목된 그래프트 폴리아미노산 분자 및 이를 활용한 생체모방분

자 설계 기술은 표적지향 약물전달을 포함하여 다양한 응용 분야에서 효과적으로 활용되리라 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 한국연구재단의 우주기술개발사업 (NFR-2016M1A3A3A02018239) 및 기후변화대응기술개발사업(2017M1A2A2086515)의 지원을 받아 수행된 연구입니다.

참 고 문 헌

1. J. D. Jang, C. Do, J. Bang, Y. S. Han, and T. H. Kim, *Polymers*, **11**, 63 (2019).
2. F. Sua, P. Yun, C. Li, R. Li, L. Xi, Y. Wang, Y. Chen, and S. Li, *Colloids Surf., A*, **566**, 120 (2019).
3. J. Y. Lee and K. H. Lee, *Polym. Sci. Technol.*, **23**, 282 (2012).
4. K. S. Jang, H. J. Lee, H. M. Yang, E. J. An, T. H. Kim, S. M. Choi, and J. D. Kim, *Soft Matter*, **4**, 349 (2008).
5. J. H. Jeong, C. Y. Cha, A. Kacamarowski, J. Haan, S. N. Oh, and H. J. Kong, *Soft Matter*, **8**, 2237 (2012).
6. R. Toy, E. Hayden, C. Shoup, H. Baskaran, and E. Karathanasis, *Nanotechnology*, **22**, 115101 (2011).
7. D. E. Discher and A. Eisenberg, *Science*, **297**, 967 (2002).
8. M. Tomida, T. Nakato, S. Matsunami, and T. Kakuchi, *Polymer*, **38**, 4733 (1997).
9. W. H. Daly and D. Poche, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5859 (1988).
10. A. J Miles and B. A. Wallace, *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 39 (2006).
11. J. Huh and W. H. Jo, *Polym. Korea*, **30**, 453 (2006).
12. S. W. Cho, H. J. Kim, Y. N. Cho. J. H. Jeong, and H. J. Kong, *Mater. Lett.*, **168**, 184 (2016)
13. N. E. Clay, J. Leong, J. Chen, I. Choi, E. Liamas, J. H. Jeong, D. H. Kim, Z. Zhang, I. W. Kim, and H. J. Kong, *Nanoscale*, **9**, 5194 (2017).