

조직 흡착 및 세포점착 방지의 양쪽특성을 갖는 Polylysine-PEG 공중합체 차단제

한동근[†] · Donald L. Elbert* · Jeffrey A. Hubbell* · 김종만 · 안광덕
한국과학기술연구원 생체재료연구센터, *ETH Zurich and Univ. of Zurich, Switzerland
(1998년 9월 7일 접수)

Polylysine-PEG Copolymer Barriers with Dual Character of both Adsorption to Tissue and Prevention of Cell Adhesion

Dong Keun Han[†], Donald L. Elbert*, Jeffrey A. Hubbell*, Jong Man Kim, and Kwang-Duk Ahn

Biomaterials Research Center, Korea Institute of Science and Technology,

P.O. Box 131, Cheongryang, Seoul 130-650, Korea

**Department of Materials and Institute for Biomedical Engineering,*

ETH Zurich and Univ. of Zurich, CH-8044 Zurich, Switzerland

[†]*e-mail : dkh@kist.re.kr*

(Received September 7, 1998)

요약: Biosurfactants와 같은 표면활성제로 사용할 수 있는 양쪽특성을 갖는 생체적합성 차단제를 제조하였다. 즉, 양이온성 polylysine (PL)과 비이온성 poly(ethylene glycol) (PEG)을 반응하여 블록 공중합체인 PL-*b*-PEG와 그라프트 공중합체인 poly-*L*-lysine (PLL)-*g*-PEG를 각각 합성하였다. 특히 PL-*b*-PEG 블록 공중합체는 활성화된 succinimidyl ester of carboxymethylated MPEG (SCM-MPEG)와 한쪽 아민기가 보호된 poly- ϵ -CBZ-lysine (PLZ)을 이용하여 새로운 방법으로 합성하였다. 양이온성 PL은 세포나 조직의 표면에 잘 흡착하고 반면에 비이온성 PEG는 오히려 그 표면과 반대방향으로 배열하여 세포나 조직의 점착을 방지할 수 있다. 반응 중간체와 공중합체의 화학적 구조는 ¹H NMR, 적정법 및 UV로 확인하였다. 자기회합하는 PLL-*g*-PEG 공중합체는 결합된 PEG의 비점착 특성과 사슬 유동성 때문에 섬유아세포 (HFFs) 및 적혈구 (RBCs)의 점착을 상당히 감소시켰으나 PL-*b*-PEG는 점착을 거의 막지 못하였다. 따라서 세포-조직의 상호작용을 방지하는데 있어서 블록 공중합체보다는 그라프트 공중합체가 더 바람직한 것으로 사료된다.

ABSTRACT: The biocompatible barriers with dual character for surface active agents like biosurfactants were made by reacting cationic polylysine (PL) with nonionic poly(ethylene glycol) (PEG) to give block and graft PL-PEG copolymers, PL-*b*-PEG and poly-*L*-lysine (PLL)-*g*-PEG. In particular, PL-*b*-PEG block copolymers were synthesized by a new method using an activated succinimidyl ester of carboxymethylated MPEG (SCM-MPEG) and a blocked poly- ϵ -CBZ-lysine (PLZ). One component, PL, adsorbs to a cell or a tissue surface, and the other, PEG, which has no strong interaction with the surface, dangles away from it, thus blocks the adhesion of the cells or tissues to the surface. The chemical structures of the intermediates and copolymers were confirmed by ¹H NMR, titration, and UV. The self-assembling PLL-*g*-PEG copolymers significantly reduced the adhesion of human foreskin fibroblasts (HFFs) and red blood cells (RBCs) due to the nonadhesive property and chain mobility of PEG attached, whereas PL-*b*-PEG did not. It, therefore, suggests that graft copolymers are more desirable than block ones in prevention of cell-tissue interactions.

Keywords: biosurfactants, biocompatible barriers, polylysine-PEG copolymers, cell-tissue interactions, prevention of adhesions.

서 론

인간의 질병을 일으키거나 치료하는데 있어서 세포나 조직의 접착이 중요한 역할을 하고 있다. 조직의 표면은 수많은 신호를 주고 받음으로써 상처치유 과정에 있어서 세포-조직간 상호작용을 증대한다. 이러한 조직 표면을 자기 회합하는 고분자 차단제로 막아 줌으로써 불필요한 세포간 상호작용을 막을 수 있다.¹

일반적으로 biosurfactants와 같은 차단제는 2가지 특성을 같은 고분자구조로 되어 있다.^{2,3} 하나는 음이온 조직의 표면과 강하게 결합할 수 있는 양이온성 고분자 부분이고 다른 하나는 조직과 전혀 반응하지 않는 비이온성 고분자 부분이다. 양이온성 고분자로는 polylysine (PL), polyornithine, polyarginine, polyhistidine, polyamines, polysaccharides 등이 있으며 이것은 생체적합성이면서 조직과 이온결합을 잘 할 수 있어야 한다.^{4,5} 반면에 비이온성 고분자는 poly(ethylene glycol) (PEG), poly(vinyl alcohol), poly(*N*-vinylpyrrolidone), poly(2-ethyl-2-oxazoline) 등으로 수용성이면서 단백질, 혈소판 등의 혈액성분, 세포 및 조직과의 상호작용을 거의 하지 않는 생체적합성을 나타내야 한다.⁶⁻⁸

차단제 역할을 할 수 있는 양쪽 특성을 갖는 고분자구조는 공중합체 형태로 제조하여 사용할 수 있다. 공중합체는 기하학적으로 여러 가지의 구조가 가능하나 보통 그래프트 및 블록 공중합체가 입체적으로 안정하므로 그 기능을 잘 발휘하는 것으로 알려져 있다.⁹ 이러한 공중합체를 실제로 biosurfactants와 같은 의료용 표면활성제로 적용시 다음과 같은 용도로 이용할 수 있다.^{2,10} 즉, 1) 수술후 점착, 혈전형성 및 혈관성형술 (angioplasty) 후의 재협착 (restenosis) 등의 세포/조직의 점착방지, 2) 조직심장판막이나 인공혈관 등의 이식물의 코팅, 3) arginine-glycine-aspartic acid (RGD)와 같은 펩티드 리간드, tPA와 같은 용혈효소, 성장인자, 유전자, 의약 등의 생리활성물질의 생체로의 전달 등이 대표적인 예이다.

Hubbell 등은² poly-*L*-lysine (PLL)과 PEG를 이용하여 PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체를 합성하여 여러 가지 세포/조직과의 상호작용을 연구하였다. PLL-*g*-PEG는 섬유아세포 및 골반조직의 점착을 방지하고 혈관 모델성형술 후 혈전형성 방지 및 종양세포

포의 점착도 방지할 수 있다고 보고하였다. 또한 그들은 알지네이트-PLL microcapsules의 생체적합성을 향상시키기 위해서 PLL-*g*-PEG를 사용하였다.¹¹

본 연구에서는 가장 간단한 구조를 가지고 있는 PL-*b*-PEG 블록 공중합체 및 PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체를 합성한 다음 그 구조를 확인하고, 이 공중합체 차단제가 섬유아세포의 점착과 spreading 및 적혈구의 응집에 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

실 험

시약 및 재료. Monomethoxy poly(ethylene glycol) [MPEG, 분자량 : 2000 (2K) 및 5000 (5K), Aldrich]은 벤젠으로 공비중류한 다음 사용하였다. Polylysine (PL)은 poly-*L*-lysine[PLL, 분자량 : 21400 (21K)], poly- ϵ -CBZ-*L*-lysine[PLZ, 분자량 : 2900 (2.9K)] 및 poly- ϵ -CBZ-DL-lysine[PLZ, 분자량 : 8400 (8.4K)]으로 Sigma제품을 그대로 사용하였다. 1,1'-Carbonyldiimidazole (CDI), tosyl chloride, mesyl chloride, tresyl chloride, *N*-hydroxysuccinimide (NHS) 및 dicyclohexylcarbodiimide (DCC)는 Aldrich제품의 특급시약을 사용하였다. 적혈구 응집용 렉틴 (lectin)은 Sigma제품으로 *triticum vulgare*로부터 얻은 wheat germ agglutinin (WGA)을 사용하였다. 반응용매는 Aldrich제 무수 특급품, 그밖의 촉매 및 시약은 시판 특급 및 1급품을 그대로 사용하였다.

PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체의 합성. PLL-*g*-PEG는 Sawhney 등이¹¹ 보고한 방법에 의해서 합성하였다. 간단히 기술하면, 먼저 MPEG5K의 히드록시기들을 CDI로 활성화시킨 다음 PLL21K를 sodium borate 완충용액 (pH 9)에서 하루동안 상온에서 반응하여 PLL21K-*g*-PEG5K를 얻었다.

PL-*b*-PEG 블록 공중합체의 합성. Fig. 1은 새로운 방법으로 PL-*b*-PEG 블록 공중합체를 합성하는 반응모식도를 나타낸 것으로, 대표적인 합성예를 들면 다음과 같다.

1) **CM-MPEG 합성.** MPEG5K (28 g, 5.6 mM)를 50 °C에서 4시간동안 *t*-부탄올 150 mL에 녹인 다음 potassium *t*-butoxide (3.14 g, 28 mM)를 넣고 같은 온도에서 8시간동안 반응시킨 후 ethyl

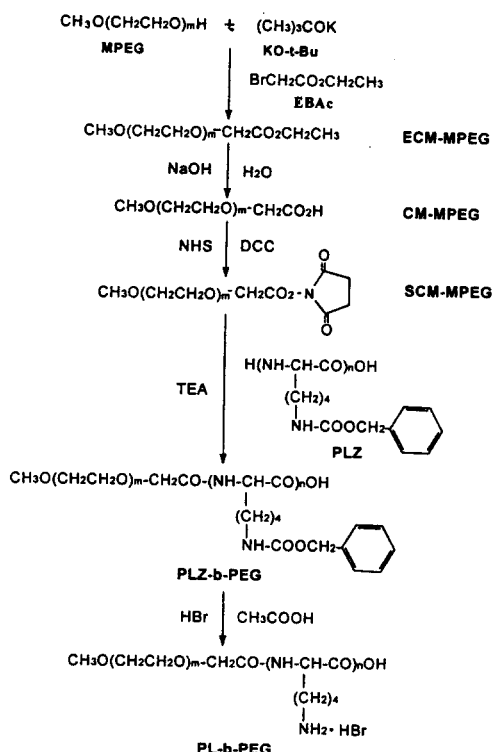


Figure 1. Reaction scheme for synthesis of PL-*b*-PEG block copolymers.

bromoacetate (6.4 mL, 56 mM)를 넣고 같은 온도에서 하루동안 반응시켰다. 반응물을 여과하고 용매를 증발시켜서 ethoxycarbonylmethyl MPEG (ECM-MPEG5K)를 얻었다. 계속해서 여기에 1N 수산화나트륨 100 mL을 가한 후 상온에서 4시간동안 가수분해시킨 다음 2N 염산으로 pH 2-3으로 맞추고 디클로로메탄 200 mL로 3번 추출하였다. 이렇게 추출된 유기층을 모아서 물로 수세하고 황산나트륨으로 탈수한 다음 건조하고 에테르에 재침전한 후 건조하여 carboxymethyl MPEG (CM-MPEG5K)를 합성하였다. 수율 : 98% ; ¹H NMR (CDCl₃) : δ 3.34 (s, 3H, CH₃O), δ 3.64 (m, 4H, CH₂CH₂O), δ 4.16 (s, 2H, CH₂-COOH), δ 6.42 (s, 1H, CH₂-COOH).

2) SCM-MPEG 합성. CM-MPEG5K (5 g, 1 mM)를 0 °C에서 무수 디클로로메탄 30 mL에 녹인 다음 NHS (237 mg, 2 mM)를 넣고 이어서 DCC

(417 mg, 2 mM)를 첨가한 후 상온에서 4시간동안 반응하였다. 반응액을 여과하고 유기층을 증발시킨 다음 에테르에 재침전한 후 에틸 아세테이트로 재결정하여 succinimidyl ester of carboxymethylated MPEG (SCM-MPEG5K)를 합성하였다. 수율 : 95% ; ¹H NMR (CDCl₃) : δ 2.86 (s, 4H, COCH₂CH₂CO), δ 3.38 (s, 3H, CH₃O), δ 3.64 (m, 4H, CH₂CH₂O), δ 4.53 (s, 2H, CH₂-COO).

3) PL-*b*-PEG 합성. SCM-MPEG5K (750 mg, 0.15 mM), PLZ8.4K (500 mg, 0.06 mM) 및 트리에틸아민 (33.5 μL, 0.24 mM)을 무수 디메틸포름아미드 (DMF) 50 mL에 녹인 후 상온에서 하루동안 반응시켰다. 반응액을 에테르에 침전하고 여과한 다음 물에 용해해서 투석 (dialysis)한 후 냉동건조하거나 염석 (salting out)하여 PL의 아민기가 보호된 PLZ8.4K-*b*-PEG를 합성하였다. 수율 : 50% ; ¹H NMR (CF₃COOD) : δ 1.3-1.6 (m, 6H, CH-(CH₂)₃-CH₂), δ 3.10 (s, 2H, CH₂-CH₂-NH), δ 3.38 (s, 3H, CH₃O), δ 3.64 (m, 4H, CH₂CH₂O), δ 4.27 (d, 3H, CH₂O-CH₂-NH 및 NH-CH-CO), δ 5.07 (s, 2H, COO-CH₂), δ 7.28 (m, 5H, phenyl). 계속해서 얻어진 PLZ8.4K-*b*-PEG (300 mg)에 30% HBr/초산 용액 5 mL을 첨가하여 CBZ기를 탈보호하면 침전이 되는데 약 20분 후 에테르를 가하여 30분 더 반응시킨 다음 여러번 에테르로 수세하고 건조하여 최종적으로 PL4.7K-*b*-PEG5K를 합성하였다. 이와 같은 방법으로 분자량이 서로 다른 3가지의 PL1.2K-*b*-PEG5K, PL4.7K-*b*-PEG2K 및 PL1.2K-*b*-PEG2K 블록 공중합체도 합성하였다. 수율 : 100% ; ¹H NMR (D₂O) : δ 1.4-1.7 (m, 6H, CH-(CH₂)₃-CH₂), δ 2.95 (s, 2H, CH₂-CH₂-NH), δ 3.38 (s, 3H, CH₃O), δ 3.64 (m, 4H, CH₂CH₂O), δ 4.27 (d, 3H, CH₂O-CH₂-NH 및 NH-CH-CO).

구조 분석. PL-PEG의 반응 중간체와 공중합체의 화학적 구조 및 치환도는 ¹H NMR (GE Gemini 300 MHz)로 분석하였으며 용매는 PLZ-*b*-PEG의 경우 CF₃COOD, PL-*b*-PEG의 경우 D₂O를 사용한 것을 제외하고는 CDCl₃를 사용하였다. CM-MPEG의 카복실기는 0.156 M 수산화나트륨으로 적정하여 치환도 (DS, %)를 구했으며, SCM-MPEG의 에스테르화 (치환도)는 수산화나트륨으로 가수분해한

후 생긴 hydroxysuccinimide를 260 nm에서의 UV 흡수도로부터 계산하였다.

섬유아세포 정착 및 Spreading 실험.¹⁰ 합성된 공중합체를 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) 용액에 녹여 0.2%로 만든 다음 세포배양용 24 well dish에 넣고 20분동안 흡착시킨 후 과량의 PBS용액으로 수세하였다. 10% serum을 함유한 DMEM 배양액에 neonatal foreskin으로부터 분리한 섬유아세포 (human foreskin fibroblasts, HFFs)를 2000 및 40000 cell/cm²로 파종하여 공중합체가 흡착된 24 well dish에 넣고 37 °C에서 3시간동안 배양한 다음 10% 포름알데히드로 하루동안 고정화시켰다. 섬유아세포는 phase contrast 현미경 (Nikon, 200배)으로 관찰하여 정착 및 spreading된 수를 직접 센 다음 계산하였다. 공중합체를 흡착시키지 않고 PBS 용액으로만 흡착한 것을 실험 control로 사용하였다.

적혈구 응집 (Agglutination) 실험. PBS용액을 사용하여 공중합체 및 적혈구를 각각 1% 용액으로 만든 다음 50 μ L의 공중합체 용액을 0.5 mL Eppendorf관에 넣고 100 μ L의 적혈구 용액을 첨가한 후 5분동안 incubation하였다. 여기에 0.05%부터 일련의 농도로 WGA 50 μ L를 첨가한 다음 3분 후 원심분리 (200 g, 1분)하였다. 원심분리 후 피펫으로 일정량을 채취하여 유리판에 적하한 다음 적혈구끼리의 응집여부를 100배의 현미경으로 관찰하였다. 공중합체를 사용하지 않고 PBS용액만을 처리한 것을 실험 control로 하였다.

결과 및 고찰

PL-PEG 공중합체의 합성. 생체적합성이 우수한 PEG를 의료용 고분자재료로 사용하기 위해서 많은 합성 및 개질 방법이 보고되고 있다.^{12,13} 본 연구에서는 PEG를 이용하여 그라프트 및 블록 공중합체를 합성하기 위해서 먼저 PEG를 여러 가지 방법으로 활성화시킨 다음 polylysine을 결합시켰으며 그 구조는 ¹H NMR, 적정법 및 UV로 확인하였다.

PLL-*g*-PEG 그라프트 공중합체는 Sawhney 등이¹¹ 합성한 방법을 이용해서 제조하였다. PLL-*g*-PEG의 ¹H NMR분석 결과 lysine기의 5.7%가 1,1'-carbonyldiimidazole에 의해 활성화된 PEG (CDI-

MPEG)와 반응하였다. 이것은 PLL (분자량 : 21400) 하나당 MPEG (분자량 : 5000)가 9.5개정도 결합되었음을 의미하며 따라서 PLL-*g*-PEG의 전체 평균분자량은 69000이 된다.

PL-*b*-PEG 블록 공중합체는 새로운 방법에 의해서 합성하였다. 일반적으로 아민기와 공유결합을 유도하기 위해서 PEG의 히드록시는 1,1'-carbonyldiimidazole, tosyl chloride, mesyl chloride 및 tresyl chloride 등으로 활성화시키고 있다.^{11,14,15} 본 연구에서도 MPEG을 위의 화합물들로 활성화시킨 다음 poly- ϵ -CBZ-lysine (PLZ)의 아민기와 반응시켰으나 치환도는 5-15%밖에 되지 않았다. 일반적인 polylysine반응과는 달리 poly- ϵ -CBZ-lysine반응에 있어서 이렇게 낮은 치환도를 보인 이유는 결사슬 아민기에 CBZ (carbobenzyoxy ; benzyloxycarbonyl ; Z)기가 결합되어 있어서 자체의 소수성, 저용해성, 입체장애 및 DMF용매에서의 강인한 막대구조의 α -helix 폴리펩티드 구조때문으로 생각된다. 따라서 PLZ의 독특한 특성때문에 이것과 반응하기 위해서는 MPEG가 더 강한 친전자성 화합물에 의해서 활성화되어야 한다. 본 연구에서는 친전자성이 아주 강한 SCM-MPEG를 합성하여 PL-*b*-PEG 블록 공중합체를 합성하는데 사용하였다.

Fig. 2는 CM-MPEG와 SCM-MPEG의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. MPEG는 3.64 ppm에서 전형적인 특성피크 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$)가 나타났으며, 4.16 ppm에서의 CH_2COOH 피크, 2.86 ppm에서의 $\text{COCH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ 피크의 존재로부터 각각 CM-MPEG 및 SCM-MPEG가 잘 합성되었음을 확인할 수 있었다. Fig. 3은 PLZ-PEG와 PL-PEG의 ¹H NMR 스펙트럼을 나타낸 것이다. 아민기를 보호하는 CBZ기에 의해서 기인하는 5.07 ppm에서의 COO-CH_2 및 7.28 ppm에서의 phenyl기로부터 MPEG에 PLZ가 잘 결합되었음을 확인하였으며 이중 phenyl기를 치환도를 계산하는데 사용하였다. PL-PEG의 경우 HBr/초산 용액으로 처리하면 phenyl기가 완전히 사라지는 것으로 보아 CBZ기가 100% 떨어져 나감을 알 수 있었다.

Table 1은 활성화된 MPEG의 치환도를 나타낸 것으로 ¹H NMR, 적정법 및 UV에 의해서 각각 분석하였다. 분석방법에 따른 치환도의 차이는 그리 크

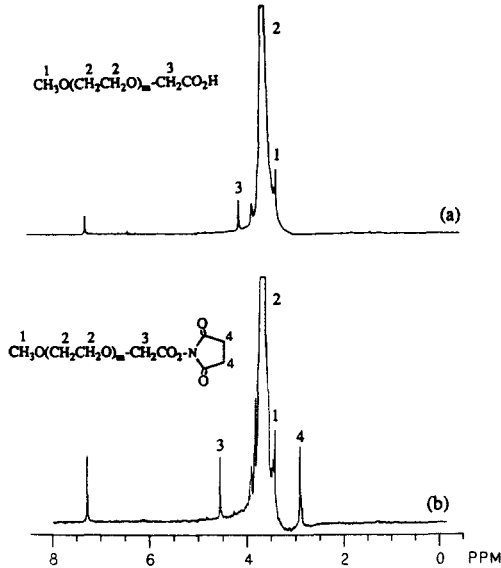


Figure 2. ¹H NMR spectra of (a) CM-MPEG and (b) SCM-MPEG.

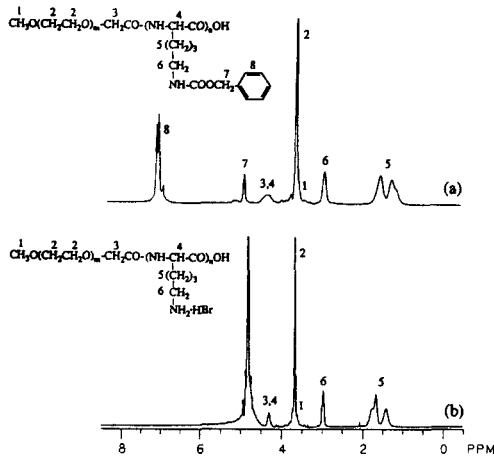


Figure 3. ¹H NMR spectra of (a) PLZ-*b*-PEG and (b) PL-*b*-PEG.

지 않지만 MPEG의 분자량이 낮은 경우보다는 큰 경우가 상대적으로 치환도가 높고 더욱이 분자량이 5000인 CM-MPEG의 경우 분석방법에 관계없이 높은 치환도(DS : 115-117%)를 보였다. Veronese 등도¹⁶ CM-MPEG (분자량 : 5000)를 유사한 방법으로 합성한 후 카르복실기를 적정법으로 측정된 결

Table 1. Degree of Substitution (DS, %) of Activated MPEGs

MPEG MW	CM-MPEG		SCM-MPEG	
	¹ H NMR	titration	¹ H NMR	UV
5000	117	115	90	93
2000	103	100	85	90

Table 2. Graft Yield of PL-*b*-PEG Block Copolymers

sample ^a	SCM-MPEG	PLZ	Graft yield ^b (%)
	MW	MW	
PL4.7K- <i>b</i> -PEG5K	5K	8.4K	70
PL1.2K- <i>b</i> -PEG5K	5K	2.0K	98
PL4.7K- <i>b</i> -PEG2K	2K	8.4K	75
PL1.2K- <i>b</i> -PEG2K	2K	2.0K	55

^a After deprotection with HBr/acetic acid.

^b Grafting of SCM-MPEG to PLZ.

과 치환도가 110-115%임을 보고하였다. 이와 같이 MPEG의 분자량이 상대적으로 큰 경우 100%이상의 치환도를 나타내는데 이는 고분자량일수록 분자량이 일정하지 않고 또한 다분산성도 크기 때문으로 사료된다.

Table 2는 PL-*b*-PEG 블록 공중합체의 그래프트율을 나타낸 것으로 전술한 ¹H NMR의 결과로부터 각각 산출하였다. 시료에 표기한 PL의 숫자는 CBZ기가 완전히 탈보호된 후의 분자량을 나타내고 있다. 사용한 PL과 PEG의 분자량에 관계없이 그래프트율은 55-98%로 큰 차이를 보였다. 이렇게 그래프트율이 전반적으로 차이가 있고 낮은 것은 SCM-MPEG의 높은 반응성에도 불구하고 사용한 SCM-MPEG의 치환도가 약 90%이고 또한 CBZ기로 보호된 PLZ의 반응성이 낮기 때문으로 생각된다.

섬유아세포 점착 및 Spreading. Fig. 4는 PBS control 및 PLL-*g*-PEG 공중합체 표면에 점착되고 spreading된 섬유아세포의 사진을 나타낸 것이다. PLL-*g*-PEG를 처리하지 않은 control은 섬유아세포의 점착 및 spreading이 많이 된 반면에 공중합체를 처리한 것은 점착은 약간 되었지만 섬유아세포가 거의 spreading되지 않고 원래 모양을 그대로 유지하였다. 이러한 섬유아세포의 spreading된 수를 각각 현미경으로 세어서 통계처리한 것이 Table 3이다. 먼저 PEG의 경우 초기 세포배양용 dish에 PEG가

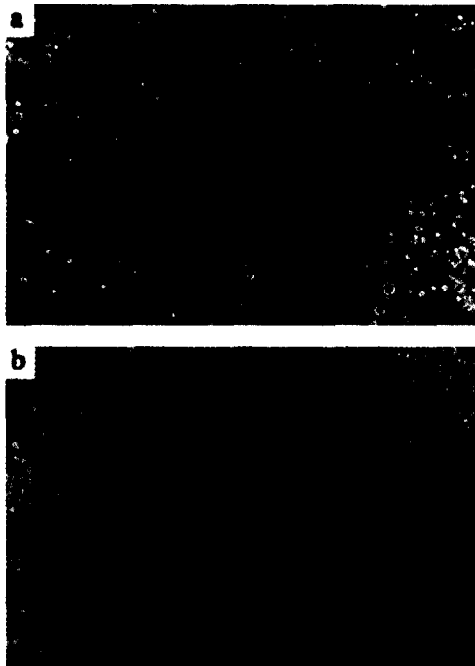


Figure 4. Photographs of adhesion and spreading of HFFs onto surfaces: (a) PBS control and (b) PLL-*g*-PEG treatment.

흡착이 잘 안되어서 상대적으로 섬유아세포의 spreading이 많이 되는 결과를 나타내었다. 또한 PLL은 세포접착은 어느정도 되었으나 spreading은 파종한 세포수에 따라 차이를 보였다. 즉, 초기 파종된 세포수가 2000일 때는 spreading이 비교적 적었으나 40000일 때는 spreading이 control과 비슷하게 많이 되는 것으로 보아 세포배양용 dish에 흡착된 PLL의 농도와 orientation이 섬유아세포의 spreading에 크게 관여하는 것으로 생각된다.¹⁰ 한편 사용한 세포의 초기 파종수와 관계없이 몇가지 control를 포함해서 4가지의 PL-*b*-PEG 블록 공중합체도 섬유아세포의 spreading을 방지하지는 못하였으나 PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체는 결합된 PEG의 비점착 특성 및 유동성에 의해서 섬유아세포의 spreading을 거의 완전히 막아주었다. 이러한 결과로부터 그래프트 공중합체가 블록 공중합체보다 더 세포나 조직의 점착을 막아줄 수 있을 것으로 예측된다.

적혈구 응집. Table 4는 각각의 시료에 대한 적혈구의 혈액응집 결과를 나타낸 것이다. 이것은 어떤

Table 3. Fibroblast Spreading (% , mean ± S.D.)

sample	conc. of cells seeded (cells/cm ²)	
	2000	40000
PBS	50.5 ± 18.4	59.0 ± 5.66
MPEG5K	33.8 ± 26.9	62.5 ± 0.71
PLL21K	5.75 ± 7.22	41.0 ± 1.41
PL1.2K- <i>b</i> -PEG5K	10.6 ± 8.83	36.7 ± 2.12
PLL21K- <i>g</i> -PEG5K	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.71

Table 4. Hemagglutination of RBC by Wheat Germ Agglutinin (WGA)

sample	minimum conc. of WGA for hemagglutination (μg/mL)
PBS	12.5
MPEG5K	<2.5
PLL21K	<2.5
MPEG5K+PLL21K	<2.5
PL1.2K- <i>b</i> -PEG5K	12.5
PL4.7K- <i>b</i> -PEG5K	12.5
PLL21K- <i>g</i> -PEG5K	>125

시료의 점착특성을 알아보기 위한 실험으로, 먼저 적혈구에 시료 및 control을 흡착시킨 다음 응집소인 WGA 렉틴에 의해서 적혈구가 어느정도 서로 점착되는지를 비교함으로써 평가할 수 있다. 일반적으로 Sigma에서 보고한 결과에 의하면 2% 적혈구를 응집시키는데 필요한 최소한의 WGA 농도는 20 μL이하로 되어 있다.¹⁷ 본 연구에서는 PLL-*g*-PEG를 제외한 모든 시료에서 WGA의 농도가 12.5 μL이하에서도 적혈구의 응집이 관찰되었다. 그러나 PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체는 그 농도가 약 6배인 125 μL이상을 사용해도 적혈구의 응집이 일어나지 않음을 확인할 수 있었다. 이러한 현상은 전술한 섬유아세포의 점착거동과 잘 일치하는 것으로 그래프트 공중합체가 세포나 조직의 점착을 방지함을 알 수 있다.

PL-PEG 공중합체의 점착거동. Fig. 5와 같이 biosurfactants와 같은 블록 공중합체가 음이온성 조직에 접촉하면 공중합체의 양이온성 부분은 이온결합에 의해 조직에 잘 붙어있는 반면에 비이온성 부분은 수용성이어서 조직과 반대방향으로 배열할 수 있다. 이렇게 처리된 표면에 세포나 조직이 접근하면 Fig. 5에서와 같이 비이온성의 반발작용에 의해서 점착을 방지할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 PLL-*g*-

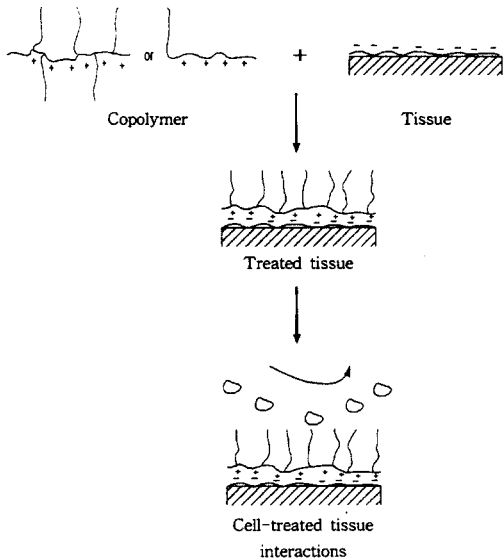


Figure 5. Highly non-adhesive barrier formed by treating copolymer with dual character onto biological substrates.

PEG 그래프트 공중합체는 생체적용 시 충분히 세포나 조직의 점착을 막아주는 차단제 역할을 할 수 있을 것으로 기대된다. 그러나 PL-*b*-PEG 블록 공중합체의 경우 세포의 점착을 차단할 수 없었는데 그 이유는 PEG의 역할보다는 양이온성 PL의 영향이 더 크게 작용한 것으로 보인다. 즉, 블록 공중합체는 그래프트 공중합체에 비해서 상대적으로 PL의 분자량 (1.2K 및 4.7K)이 작기 때문에 세포 및 생체조직의 특성인 그 표면이 너무 불균일하고 또한 음이온성 자리가 불규칙적으로 넓게 퍼져 있어서 이온결합을 잘 할 수 없었기 때문으로 여겨진다.

최근 Elbert는¹⁰ 이러한 PL-*b*-PEG 블록 공중합체의 효율성을 높이기 위해서 PEG-(lysine dendron)이란 덴드리머를 펩티드 합성기로 만들어 PLL-*g*-PEG와 그 특성을 비교하였다. 덴드리머는 PEG (분자량: 5K, 20K, 100K) 하나의 말단에 lysine을 최고 5단계까지 결합시켜서 말단 아민기가 32개가 되게 하였다. 이 덴드리머는 세포배양용 petri dish에 코팅한 결과 섬유아세포의 spreading을 방지했지만 단백질 표면에 코팅한 경우는 섬유아세포의 spreading을 전혀 막을 수가 없었다. 이 PEG-PL

덴드리머도 또한 PL-*b*-PEG 블록 공중합체와 마찬가지로 PL의 분자량이 작기 때문에 제거능을 다하지 못한 것으로 사료된다. 실제로 Elbert 등은¹⁸ 아민기가 약 100개인 PLL-*g*-PEG의 경우 단백질 흡착표면에서 섬유아세포의 spreading을 30% 정도만 막았으며 아민기가 약 1800개인 경우 완전히 spreading을 방지했다고 보고하고 있다.

따라서 공중합체가 차단제로 작용하기 위해서는 어느 정도의 고분자량의 PL과 같은 양이온성 부분이 필요하며 PL-*b*-PEG 블록 공중합체도 PL 및 PEG의 분자량과 그 비율에 따라 그 기능이 크게 달라질 수 있음을 시사하고 있다. 이를 증명하기 위해서 분자량이 더 큰 PL을 사용하여 AB형태의 PL-*b*-PEG 블록 공중합체를 합성하거나 ABA형태의 PEG-*b*-PL-*b*-PEG 트리블록 공중합체를 합성하여 실험할 예정이다.

결론

Biosurfactants와 같은 표면활성제로 사용하기 위해서 PLL-*g*-PEG 그래프트 공중합체와 PL-*b*-PEG 블록 공중합체의 양쪽특성을 갖는 생체적합성 차단제를 각각 합성하였다. PLL-*g*-PEG 공중합체는 섬유아세포 및 적혈구의 점착을 상당히 방지했으나 PL-*b*-PEG 공중합체는 거의 점착을 막아주지 못했다. 이러한 공중합체의 점착방지 효과는 결합된 PEG의 비점착 특성과 사슬 유동성에 기인하며 특히 PL-*b*-PEG 공중합체의 경우 사용한 PL의 분자량이 너무 작아서 점착방지 역할을 못한 것으로 생각된다.

따라서 공중합체가 차단제로 작용하기 위해서는 음이온 세포나 조직과 이온결합할 수 있는 어느정도 고분자량의 양이온성 부분이 필요하며 더불어 PEG의 분자량과 lysine/PEG 비율도 중요한 인자가 될 수 있다. 생체조직과 이온결합을 형성하는데 있어서 공중합체의 기하학적 구조로 보면 세포-조직의 상호작용을 방지하는데 있어서 블록 공중합체보다는 그래프트 공중합체가 더 바람직할 것으로 사료된다.

이상의 결과로부터 PL-PEG 공중합체와 같은 이상적인 구조의 양이온성-비이온성 공중합체를 제조하면 생체적합성 biosurfactants 뿐만 아니라 외과 및 조직공학용 비점착 차단제로 이용이 가능할 것으

로 기대된다.

참 고 문 헌

1. M. J. Slepian and J. A. Hubbell, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **24**, 11 (1997).
2. J. A. Hubbell, D. L. Elbert, J. L. Hill-West, P. D. Drumheller, S. M. Chowdhury, and A. S. Sawhney, U. S. Patent 5,462,990 (1995).
3. D. H. Napper, "Polymeric Stabilization of Colloidal Dispersions", Academic Press, London, 1983.
4. A. K. Singh, B. S. Kasinath, and E. J. Lewis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1120**, 337 (1992).
5. H. Moroson and M. Rotman, "Polyelectrolytes and Their Applications", eds. by A. Rembaum and E. Selegny, p. 187, Reidel, Dordrecht, Holland, 1975.
6. J. M. Harris, "Poly(ethylene glycol) Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications", Plenum, New York, 1992.
7. D. K. Han, S. Y. Jeong, Y. H. Kim, B. G. Min, and H. I. Cho, *J. Biomed. Mater. Res.*, **25**, 561 (1991).
8. D. K. Han, K. D. Park, J. A. Hubbell, and Y. H. Kim, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn*, **9**, 667 (1998).
9. H. L. Jakubauskas, *J. Coatings Tech.*, **58**, 71 (1986).
10. D. L. Elbert, Ph.D. Dissertation, Univ. of Texas, Austin, 1997.
11. A. S. Sawhney and J. A. Hubbell, *Biomaterials*, **13**, 863 (1992).
12. S. Zalipsky, *Bioconjugate Chem.*, **6**, 150 (1995).
13. J. M. Harris, *JMS-Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C25**, 325 (1984).
14. C. H. Beauchamp, S. L. Gonias, D. P. Menapace, and S. V. Pizzo, *Anal. Biochem.*, **131**, 25 (1983).
15. K. Nilsson and K. Mosbach, "Methods in Enzymology", ed. by W. B. Jakoby, vol. 104, p. 56, Academic Press, Orlando, 1984.
16. F. M. Veronese, P. Caliceti, A. Pastorino, O. Schiavon, L. Sartore, L. Banci, and L. M. Sclaro, *J. Contr. Rel.*, **10**, 145 (1989).
17. Sigma Catalogue, p. 1968 (1997).
18. D. L. Elbert and J. A. Hubbell, *Chem. & Biol.*, **5**, 177 (1998).