

생체적합성과 생분해성을 갖는 Polypeptide copolymer의 합성과 물성에 관한 연구

(III) Polypeptide Hydrogels의 약물방출특성.

강인규, 권대룡, *성용길
경북대학교 고분자공학과 *동국대학교 화학과

Synthesis and physical Properties of Biocompatible and Biodegradable Polypeptide Copolymers.(III)
Drug Release Behaviours of Polypeptide Hydrogels.

Inn-Kyu Kang, Dae-Ryong Kwon, and *Young Kiel Sung
Dept. of Polym. Sci., Kyungpook Natl. Univ., *Dept. of Chemistry, Dongguk Univ.

1. 서론

생체의 구성 성분인 폴리펩티드는 오래전부터 의료용제 표로서 주목되어 왔다. 생체내에는 20여가지의 아미노산이 각각 단량체를 이루어 수많은 단백질을 형성하고 있다.

폴리펩티드의 축색에는 카르복시기, 아미노기 혹은 히드록시기 등의 극성기가 존재하는 경우도 있으며, 이 경우는 축색의 기능을 이용하여 각종 유기반응을 행할 수 있다. 많은 생의학 재료의 경우 생체내에서 분해성을 요구하게 되는데, 폴리펩티드는 생체내에서 효소에 의한 분해성이 관찰되고 있다. 또한 아미노산의 종류에 따라 친수성 혹은 소수성을 나타내기도 하며 주쇄가 아미드 결합으로 되어있어 강한 성질을 나타낸다. 따라서 유연성이 좋은 실리콘이나 폴리에테르 등과 블록공중합체로 하게 되면 기계적 성질이 향상될 뿐만아니라 중합체의 적시성도 조절될 수 있다. Poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG)를

polydimethylsiloxane(PDMS) 혹은 polyoxypropylene(POP)와 공중합하면 상분리 구조를 나타내며, 이것은 어느 조성에서 좋은 혈액적합성을 나타낸다. 이것은 흡착한 단백질이 conformation의 변화를 초래하지 않고, 그 때문에 혈소판의 점착량과 활성화가 적게 진행되기 때문이다. 또한 PBLG 축색에 fluoroalkyl 혹은 실리콘을 도입하면, 중합체막이 높은 소수성을 나타내게 되어 혈액적합성이 향상된다.

본 연구자들은 PBLG 축색에 유연성과 친수성을 갖고 있는 polyethylene glycol(PEG)을 도입하여 새로운 친수성계의 폴리펩티드를 합성하고 이들의 물성을 조사하였다. 합성된 폴리펩티드 hydrogel을 matrix로한 약물방출은 팽윤도에 따라 방출속도가 영향을 받는다. Hydrogels은 흔히 reserivior 및 diffusion-controlled delivery systems의 matrix 형태로서 사용되어 왔다. 방출속도는 polymer 조성에 의한 영향, hydrogel에서 물의 함량, 방출인자의 형태, crosslink density에 따라 조정된다. Water-swollen hydrogels matrix는 구조적인자로서

solute size, 팽윤도, 입자의크기, 혹은 가교구조에서 분자량의존성을 가진다. 일반적으로 controlled-release system은 swollen-controlled system, diffusion-controlled system, chemically-controlled system, solvent-controlled system, Release Induced by External Forces등으로 분류 된다. 가장 일반적인 mechanism이 diffusion에 의한 control system이라 할 수 있다. Hydrogels은 controlled release systems에서 중요한 역할을 한다.

본 연구에서는 비교적 hydrophobic한 PBLG와 hydrophilic한 PEG를 그라프트 및 가교 시킨 공중합체에 2-ethanolamine(EA)과 치환반응을 행하여 극히 친수성인 hydrogels matrix를 합성하였다. 약물로서는 항암제인 5-fluorouracil (5-FU)을 공중합체 matrix에 담지시켜 swelling-controlled systems에 대한 방출특성을 조사하였다.

2. 실험

공중합체의 합성

Poly(γ -benzyl L-glutamate)(PBLG)의 합성은 이전 보고한 방법에 따라 행했다. Polyethylene glycol(PEG)-crosslinked PBLG(PEG-c-PBLG) 및 PEG-grafted PBLG의 합성에 대해서는 이미 보고했다. PBLG와 2-ethanolamine(EA)과의 치환반응은 폴리펩티드의 친수성을 높이기 위한 수단으로 자주 이용되고 있다.

PEG-g-PBLG-EA 및 PEG-c-PBLG-EA의 합성

PEG-g-PBLG, PEG-c-PBLG 각각 2g을 정량한 후 dioxane(DOX), chloroform(CHCl₃) 혼합용매 60/60ml 혹은 40/40ml에 균일상으로 녹인 후 EA 12g(0.196 mol) 및 10g(0.326 mol)을 넣고 60°C에서 환류반응을 행하였다. 각각 12시간 반응후 생성물을 농축시킨다음 아세톤에 침전시켜 미반응의 EA를 제거했다. 1차반응 시킨 각 생성물을 EA와

다시 2차반응을 행한후 각각 1.86g, 1.84g의 고체당어리를 얻었다.

측정기기

적외선흡수 스펙트럼: 반응의 확인은 Jasco IR 0080

분광광도계를 사용하여 film법으로 측정하였다.

UV 흡수스펙트럼: Beckman Du 64 spectrophotometer를 이용하여 나오는 약물의 양을 결정하였다.

전자현미경관찰: 전자현미경은 Scanning Electron Microscope를 사용하였으며, 방출된 표면을 먼저 gold coating한 후, 표면 morphology의 변화를 관찰하였다.

약물방출을 위한 Matrix의 제조방법

PBLG, PEG-g-PBLG, PEG-c-PBLG 시료제조: 각각 30mg을 DMF 1ml에 녹인 3wt%의 각종 Polymer 용액에 약물분 5-FU, 250 μ g(0.86wt%)를 교반용 메프론 sheet에 용액을 casting법으로 두께 350 μ m, 단면적 3.5cm²를 가진 film상의 matrix를 제조하였다. PEG-g-PBLG-EA, PEG-c-PBLG-EA 시료제조과정: 각각 30mg을 DMF/H₂O 혼합용매 10/1(V/V)의 비로서 녹인후 약물 250 μ g(0.86wt%)과 교반시켰다. 약물이 matrix 표면에서만 방출되는 것을 막기위해 앞서 제조된 각 film의 표면을 메탄올/phosphate buffer solution(PBS) 1:9 혼합용매에서 rinsing을 행한 후 메탄올/PEG용액과의 검정곡선으로 matrix에 담지된 전체 약물의 양을 결정하였다.

약물방출 장치

약물방출을 위한 장치는 Fig.1에서와 같이 시료를 테프론 sheet로 일정규격의 구멍이 뚫린 sample holder 속에 넣고 pH 7.4 PBS에 37°C incubation속에서 magnetic stirrer를 사용하여 150rpm 속도로 stirring시켰다. 방출되어 나오는 약물을 상부에 있는 silicon 튜브를 통하여 0.45 μ m의 pore size를 가지는 green filter모 여과하였다. 주사기로 매 일정 용액을 취하여 UV 분광기로서 5-FU의 matrix는 최대파장 266.6nm에서 O.D변화에 따른 흡광도를 구한 다음 검정곡선을 이용하여 방출되어 나오는 약물의 양을 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

공중합체의 확인

PEG-c-PBLG와 PEG-g-PBLG-EA의 확인은 적외선분광기를 이용하여 행하였다. PEG가 도입됨에 따라 3100cm⁻¹ 부근에서 PBLG homopolymer에 의한 aromatic CH의 소멸과, 2940cm⁻¹ 부근에서 aliphatic CH의 증가로 반응이 진행되었음을 확인하였다. 친수성인 EA와의 반응성 정도는 1740 cm⁻¹에서 에스테르기에 있는 carbonyl기가 EA에 의해 amide

로 진행됨에 따라서 에스테르기에 의한 흡수띠가 대폭 감소함에 따라 측쇄에 hydroxyl group이 도입되었음을 확인하였다. 각종의 hydrogels의 팽윤도 및 접촉각의 변화를 Table.1에

나타내고 있다. PEG의 도입율이 증가함에 따라 팽윤도는 PBLG < PEG-g-PBLG < PEG-c-PBLG 순으로 증가하였다. 친수성을 증가시킨 목적으로 EA를 도입한 PEG-c-PBLG-EA의 팽윤도는 71.3%, PEG-g-PBLG-EA는 170.5%로 증가하여, 고도의 hydrogel copolymers임을 확인 하였다. 또한 water contact angles의 변화에서는 PEG의 함량에 따라 PBLG homopolymer에 비해, 그라프트 및 가교 copoly-peptides는 68°에서 45°로 감소하였으며 친수성인 hydroxyl기가 측쇄에 도입됨에 따라 접촉각은 12°-20°로 극히 친수성인 hydrogels임을 확인하였다.

37°C PBS 완충용액(pH7.4)에 공중합체 film (1.5x1.1cm²)을 침지시킨 후, 시간에 따른 팽윤정도를 조사하였다. 가교 copolypeptides에는 물체가 쉽게 침투할 수 없었으며, 반면에 그라프트 copolypeptides는 EA와 치환반응이 일어남에 따라 친수성이 증가하여 3시간 후에는 거의 170%의 팽윤도를 나타냈다. PBLG와 PEG-c-PBLG를 EA와 반응시킨 copolypeptides 막이 팽윤도에 따른 5-FU의 방출 관계를 Fig.2에 나타냈다. PEG-g-PBLG-EA의 경우 초기에 급격히 방출을 지속하다가 약 170%에 도달되었을때 약물의 80% 이상이 방출되었으며, PEG-c-PBLG-EA는 시간이 지남에 따라 약 70% 팽윤도가 유지되었다. 그결과 5-FU의 방출이 68%정도를 나타냈다.

5-FU의 방출특성

PBLG와 PEG를 그라프트 및 가교시킨 copolypeptide를 matrix로 사용하여 행한 실험결과를 Fig.3에 나타냈다. PBLG에 비해 친수성인 PEG의 함량이 증가함에 따라 20시간 후, PEG-g-PBLG는 25%, PEG-c-PBLG는 35%의 약물방출을 나타냈다. PEG-g-PBLG, PEG-c-PBLG에 hydroxyl group을 도입한 copolymer를 matrix로 사용하여 약물방출을 측정할 결과, 팽윤도가 증가된 grafted copolymer의 경우 초기 10시간 전에 급격한 방출을 하다가 그후 시간이 지남에 따라 증가속도는 완만하게 지속되었고, 가교 copolypeptide 경우 초기 20시간까지는 급격한 방출을 하다가 80시간 이후에는 90%이상 방출하였음을 알 수 있었다.

Coating effect

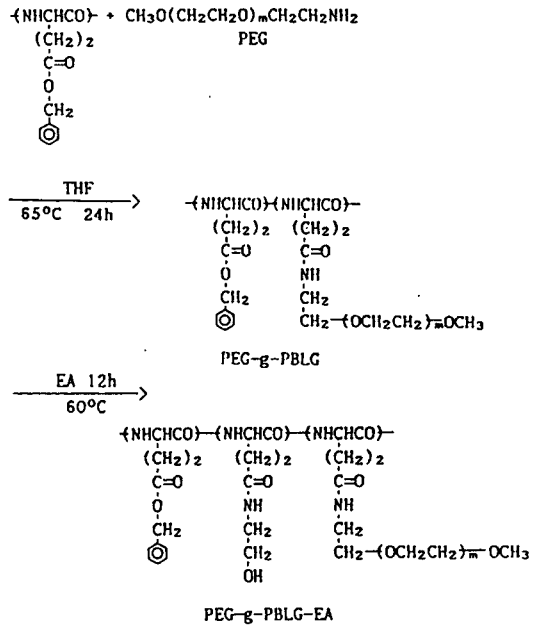
Controlled release system에서는 방출되는 약물의 농도를 일정하게 유지하는 것이 중요하다. polypeptide hydrogels을 이용한 약물방출에서 약물이 초기에 급격히 방출됨으로, 약물을 control 하기 위한 방법으로 matrix표면에 polymer coating을 행하였다. 글로트포름 용매에 녹인 PBLG(1wt%) 용액에, 5-FU를 함유한 film상의 matrix를

일정시간 침적시켰다. 이것을 꺼내어 수시간 자연건조한후, 적외선 램프하에서 용매를 휘발시킨 후 진공건조 시켰다. 이와 같은 조작을 반복시행 하므로서 코팅두께를 변화시킬 수 있었다. coating 두께에 따른 PEG-g-PBLG의 5-FU 방출 특성을 조사해본 결과, uncoated sheet의 경우 초기에 급격한 방출을 보인 반면, coating의 두께에 50 μ m에서 100 μ m로 증가함에 따라 5-FU 방출이 65%에서 39%로 control 되는 것을 확인하였다. 또한 PEG-c-PBLG-EA의 coating 두께에 따른 방출 결과에서는 두께변화에 따라 Drug의 방출이 control되어 50 μ m로 coating을 했을때 20시간 전후 급격히 방출을 하였고, 100 μ m 경우에는 40시간 전후에서 방출이 증가하다가 그후 완만히 지속되는 control 효과를 관찰 할 수 있었다.

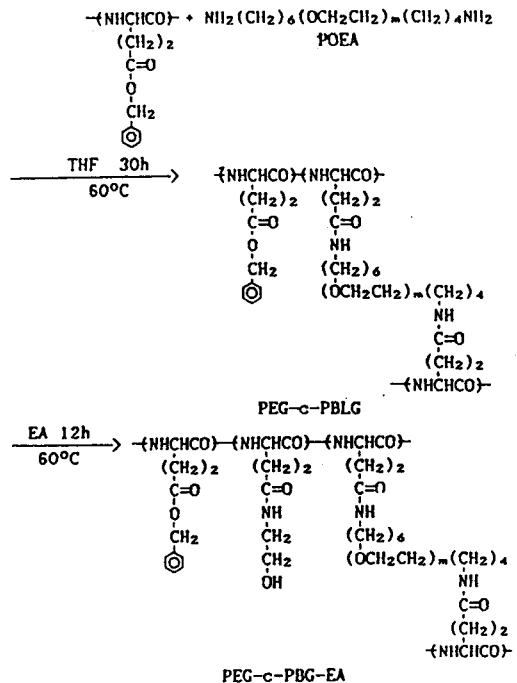
4. 결 론

Poly(γ -benzyl L-glutamate)에 폴리에틸렌글리콜을 그라프트 또는 가교시켜 얻은 중합체의 물성은 PEG의 도입이 증가함에 따라 탄성율은 다소 감소하나 신도는 대폭 증가하였다.

PEG를 함유한 copolypeptides는 PBLG 동종중합체 보다 높은 팽윤도를 보였으며, 특히 측쇄에 hydroxyl기가 도입된 공중합체막은 대단히 높은 팽윤도를 나타내었다. 약물로서 사용된 5-FU을 각 중합체에 담지시켜 방출 실험을 행한 결과, PBLG<PEG-g-PBLG<PEG-c-PBLG < PEG-c-PBLG-EA < PEG-g-PBLG-EA 순으로 방출속도가 증가하였다. 즉 측쇄에 친수성의 PEG를 많이 함유하고 있는 PEG-c-PBLG가 높은 방출 속도를 나타냈다. hydroxylalkylamine을 각 중합체에 치환 반응시킨 PEG-g-PBLG-EA, PEG-PBLG-EA를 matrix로한 5-FU의 방출은 단시간에 대부분 약물이 물계로 빠져나왔다. 이것은 hydrogel 표면에 물이 쉽게 접근해 내부까지의 침투가 용이하여 약물의 확산이 증가되었기 때문인 것으로 생각된다. 약물방출이 초기에 대부분 일어나는 경우, matrix 표면을 소수성인 PBLG homopolymer용액으로 coating 하므로서 방출속도를 조절 할 수 있었다.



Scheme 1



Scheme 2

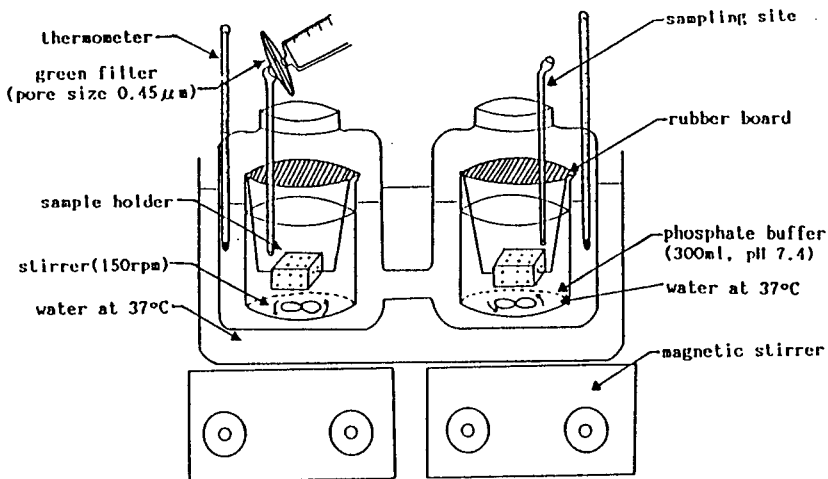


Fig.1 Apparatus for drug release experiments.

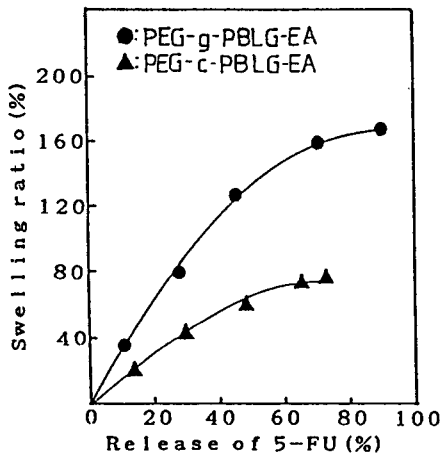


Fig.2 Relation between release of 5-fluorouracil and swelling ratio of modified polypeptides in buffer solution at 37°C .

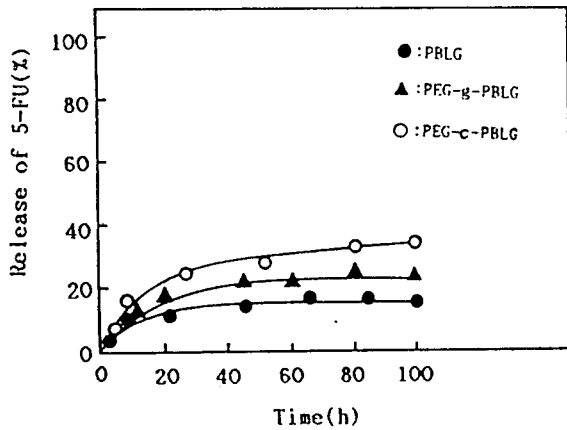


Fig.3 Release of 5-fluorouracil from composite sheet made of polypeptides and drug in 300ml buffer solution at 37°C .