

PEGA/BMA 공중합체의 코팅을 통해 CD34 단일클론항체가 고정화된 폴리우레탄 표면

정윤기 · 황인규 · 박기동[†]

아주대학교 분자과학기술학과

(2009년 7월 28일 접수, 2009년 8월 26일 수정, 2009년 8월 31일 채택)

CD34 Monoclonal Antibody-Immobilization on Polyurethane Surface by Poly(PEGA-co-BMA) Coating

Yoon Ki Jung, In Kyu Hwang, and Ki Dong Park[†]

Department of Molecular Science and Technology, Ajou University,
5 Wonchon, Yeongtong, Suwon 443-749, Korea

(Received July 28, 2009; Revised August 26, 2009; Accepted August 31, 2009)

초록: 심혈관용 소재로서 혈관내피전구세포의 포획을 통해 *in vivo* 내피세포화가 가능한 표면을 가진 폴리우레탄 표면을 개발하였다. 혈관내피전구세포의 접착을 유도하는 CD34 단일클론항체(monoclonal antibody, mAb)를 표면에 도입하기 위해, poly (poly (ethylene glycol) acrylate-co-butyl methacrylate), poly (PEGA-co-BMA) 공중합체가 합성되었고, 이를 폴리우레탄 표면에 코팅하여 CD34 단일클론항체를 화학적으로 고정화하였다. 중합된 공중합체의 ¹H-NMR 분석은 원하는 조성을 가진 poly (PEGA-co-BMA)의 합성이 가능함을 확인해 주었다. 이전 연구에서 개발된 PEG가 그래프트된 폴리우레탄과의 비교를 통해, 본 연구에서 제조된 poly (PEGA-co-BMA)가 코팅된 폴리우레탄 표면이 CD34 mAb의 고정화에 더 효과적인 것으로 나타났으며, 이는 CD34 mAb의 표면밀도와 활성도가 32배 이상 증가된 결과를 통해 증명되었다. 개질된 폴리우레탄 표면의 물리화학적 특성은 XPS와 물 접촉각, AFM에 의해 분석되었으며, 각각의 개질된 표면에 따른 표면의 특이적 성질을 잘 보여주었다. 본 연구에서 얻어진 결과들은 poly (PEGA-co-BMA)의 코팅을 통해 제조된 표면이 CD34 mAb의 고정화에 효과적임을 설명하였으며, 실제로 심혈관용 소재의 개발에 적용 가능성이 크다는 것을 증명해 주었다.

Abstract: A polyurethane (PU) surface enabling *in vivo* endothelialization via endothelial progenitor cell (EPC) capture was prepared for cardiovascular applications. To introduce CD34 monoclonal antibody (mAb) inducing EPC adhesion onto a surface, poly (poly (ethylene glycol) acrylate-co-butyl methacrylate) and poly (PEGA-co-BMA) were synthesized and then coated on a surface of PU, followed by immobilizing CD34 mAb. ¹H-NMR analysis demonstrated that poly (PEGA-co-BMA) copolymers with a desired composition were synthesized. Poly (PEGA-co-BMA)-coated PU was much more effective for the immobilization of CD34 mAb, comparing with PEG-grafted PU prepared in our previous study, as demonstrated by that surface density and activity of CD34 mAb increased over 32 times. Physico-chemical properties of modified PU surfaces were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), water contact angle, and atomic force microscopy (AFM). The results demonstrated that the poly (PEGA-co-BMA) coating was effective for CD34 mAb immobilization and feasible for applying to cardiovascular biomaterials.

Keywords: surface immobilization, CD34 monoclonal antibody, polyurethane, endothelial progenitor cell, endothelialization.

서 론

심혈관 질환(cardiovascular disease, CVD)은 전세계적으로 최다의 장애 및 사망을 유발하는 주요 원인이다.¹ 심혈관 질환들의 대부분은 심장과 혈관의 장애가 원인이며, 허혈성 심장질환(ischemic heart disease)과 관상동맥 질환(coronary artery disease)같은 심혈관

질환들은 동맥경화증(atherosclerosis)이 주요 발병요인이다.² 동맥경화증의 치료법은 관상동맥 우회 시술법과 스텐트 삽입술이 있으나, 장기 개통성(long-term patency)과 재협착(restenosis) 발생률에 여전히 한계가 있다. 특히, 소구경 혈관(직경 5 mm 이하)의 경우는 자가 혈관을 이용한 우회 시술법이 수행되는데, 이 또한 자가 혈관의 가용성에 한계가 있으며, 사용 가능하더라도 높은 시술 비용과 제한적인 장기 개통성 때문에 여전히 문제가 되고 있다.³⁻⁵ 따라서, 소구경 혈관을 위한 인공 혈관 그래프트 개발의 필요성이 지속적으로 대두

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: kdp@ajou.ac.kr

되고 있는 상황이다.

현재 사용되고 있는 혈관 그래프트 재료로는 polyurethane (PU) 와 expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE), polyethylene terephthalate (PET, Dacron) 등이 주로 사용되는데, 이들이 소구경 혈관에 적용되었을 때 주로 초기 패색, 혈전 형성 및 내막 이상증식 등이 발생하게 된다.^{6,7} 이와 같은 문제를 해결하기 위한 근본적인 접근 방법은 재료의 내부 표면에 내피세포(endothelial cell)의 단일층 형성을 유도하여 혈관내피화된 혈관 그래프트를 제조하는 것이다. 이를 위해 혈관 그래프트를 환자에게 이식하기 전에 자가 내피세포를 이용하여 혈관내피화를 유도하는 조직공학 기법이 수년간 집중적으로 연구되었다.⁸⁻¹⁰ 그러나, 이 과정은 매우 집중적인 시간과 노력, 비용을 필요로 하므로 아직까지는 거의 임상에 적용되지 못하는 한계를 가지고 있다. 혈관 그래프트의 내피세포화를 위한 또 다른 방법으로, 환자에 이식한 후에 *in vivo* 환경에서 내피세포화를 유도하는 것이다. 혈관 이식물의 표면에 내피세포의 부착을 촉진하는 RGD나 YIGSR 같은 특정 펩타이드 등을 표면에 고정화하는 연구들이 수행되고 있으나 여전히 희망적인 결과를 도출하지 못하고 있다.¹¹⁻¹⁶ 그러나, 1997년에 혈관을 순환하는 혈관내피전구세포(endothelial progenitor cell, EPC)의 발견은 새로운 전기를 마련해 주었다.¹⁷

혈관내피전구세포는 성숙한 내피세포로 분화, 증식할 수 있는 능력을 가지는 성체줄기세포의 한 종류이다.¹⁸ 내피세포와 달리 이 세포들은 새로운 혈관을 형성하거나 손상된 혈관을 재건할 수 있는 잠재력을 가진 것으로 보고되고 있다. 이 세포들은 골수나 혈액 내에 존재하므로 실제로 *in vivo* 내피세포화에 이용이 가능하며, 최근에 관련 연구들이 발표되고 있다.^{19,20} 그 연구들은 대부분 혈액 내에서 순환하는 혈관내피전구세포를 낚아 채어 부착을 유도할 수 있는 표면의 설계와 개발과 그에 따른 내피세포화 정도를 측정하는 것이다. 혈관내피전구세포에 과다 발현되어 있는 수용체인 CD34는 표면에 이 세포의 부착을 유도할 수 있는 목표 수단이 될 수 있으며, 이것은 CD34 단일클론항체(monoclonal antibody, mAb)의 개발과 표면 도입에 의한 의학적 활용 연구를 촉발시켰다.²¹⁻²³

본 연구에서는 혈액접착용 소재로 폭넓게 사용되는 폴리우레탄의 표면에 CD34 mAb를 효과적으로 도입하여 인공혈관 그래프트 뿐만 아니라 심혈관 질환을 위한 다양한 소재에 활용하기 위한 표면 개질 방법을 개발하는 것에 목표를 두었다. 이를 위해 CD34 mAb를 표면에 다량으로 도입할 수 있는 코팅 물질의 개발에 집중하였다. 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)는 높은 유연성을 가진 생체적합성이 우수한 친수성 고분자이며, 약물 수송체 입자의 표면이나 약물 결합체, 약물의 고정화를 위한 스페이서(spacer)로 주로 사용된다.²⁴⁻²⁶ 폴리부틸메타크릴레이트(polybutylmethacrylate)는 소수성의 부틸기로 인해 소수성 표면에 부착성을 주기 위한 코팅재료로 사용된다. 그래서, 본 연구에서는 CD34 mAb의 부착 효율을 높이고, 폴리우레탄에 코팅하기 위한 고분자 재료로, PEG 이크릴레이트와 부틸메타크릴레이트의 라디칼 중합을 통해 새로운 공중합체를 합성하였다. 이렇게 합성된 공중합체를 PEG 말단을 활성화하여 Figure 1과 같이 폴리우레탄의 표면에 코팅하면, CD34 mAb를 표면에 다량으로 도입할 수 있게 된다. 제조된 항체가 결합된 폴리우레탄의 표면은 다양한 방법에 의해 그 특성이 분석되었고, 도입된 CD34 mAb의 도입량과 활성 또한 측정되었다. 본 연구에서 제조된 이들 표면은 혈

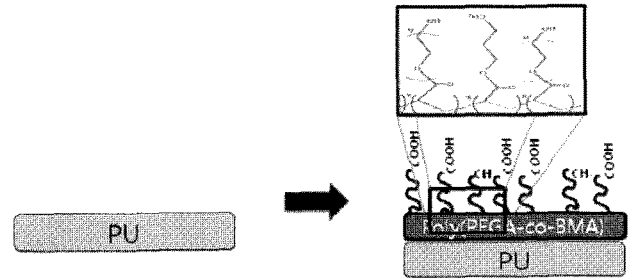


Figure 1. Schematic expression of the preparation of poly(PEGA-co-BMA)-coated PU surface.

관내피세포의 포획을 통한 완벽한 *in vivo* 내피세포화를 유도하는 이상적인 인공혈관 그래프트의 제조를 위한 획기적인 방법을 제시할 것으로 기대하고 있다.

실 험

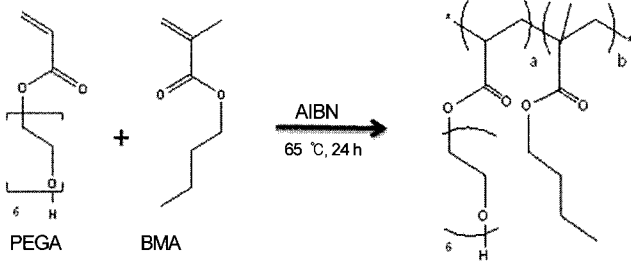
시약 및 재료. 공중합체의 단량체로 사용되는 poly(ethylene glycol) acrylate (PEGA, $M_w \sim 375$)와 butyl methacrylate (BMA)가 Aldrich사에서 구입되었다. 촉매로 사용되는 azobisisobutyronitrile (AIBN)과 succinic anhydride, 4-dimethylaminopyridine (DMAP), triethylamine (TEA), *N*-hydroxysuccinimide (NHS), anhydrous *N,N*-dimethylacetamide (DMAc), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)는 Aldrich사에서 구입되어 그대로 사용되었다.

Polymer Technology Group (Berkeley, CA)에서 구입된 폴리우레탄(Bionate 90A)은 다음과 같은 solvent casting 과정을 통해 필름 형태로 제작되었다. 폴리우레탄 비드가 20% (w/v)의 MEK가 포함된 DMAc에 녹여진 후, 스테인레스 스틸 주형틀에서 48시간 동안 진공상태에서 유지되었다. 제조된 필름의 두께는 0.23~0.48 mm로 측정되었다. 제조된 필름은 지름이 8 mm의 원형으로 잘라내었고, 종류수로 3번 세척한 후 진공상태에서 건조되었다.

CD34 monoclonal antibody (CD34 mAb)는 Biologend사(San Diego, CA)에서 공급받았고, ELISA를 위해 phosphatase-labeled rat Immunoglobulin G (IgG)는 R&D systems (Minneapolis, MN)에서 구입되었다.

Poly(PEGA-co-BMA) 중합. Poly(poly(ethylene glycol) acrylate-co-butyl methacrylate) [poly(PEGA-co-BMA)]는 Scheme 1과 같이 중합되었다. 20 wt%의 농도로 PEGA와 BMA가 톨루엔에 녹여진 후 65 °C에서 질소를 흘려주면서 30분 동안 유지되었다. 질소로 채워진 반응 용액의 플라스크에 0.15 wt%의 AIBN이 첨가되고, 24시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 종료된 반응 용액을 메탄올에 부어 침전시키고, 얻어진 침전물을 3회 이상 메탄올로 세척한 후 진공 건조시켰다. 얻어진 공중합체는 화학적 구조 분석을 위해 ¹H-NMR로 분석되었다.

PEG 말단의 활성화 및 CD34 mAb 고정화. PEG 말단의 카르복실화를 위해 다음과 같이 수행하였다. Dioxane 30 mL에 중합된 공중합체와 succinic anhydride, TEA, DMAP를 녹인다. 완전히 녹여진 반응 용액이 담긴 플라스크에 질소를 충전시키고 상온에서 18시간 동



Scheme 1. Synthesis of poly(PEGA-*co*-BMA) copolymer via radical polymerization.

안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 용매는 투석을 통해 정제하고 진공 건조하여 얻을 수 있었다. 얻어진 카르복실화된 공중합체는 사전에 제조된 폴리우레탄 필름에 코팅하여 샘플 제조에 사용되었다. 준비된 고분자가 코팅된 샘플을 MES 버퍼 용액(30 mL)에 넣고, EDC (0.001 mol)와 NHS(0.0015 mol)를 첨가한 후 1시간 동안 상온에서 교반시킨다. 표면이 활성화된 샘플들은 증류수로 세척 과정을 거치고 PBS 용액(10 mL)에 넣고 CD34 mAb(150 μ g)을 첨가하여 24시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응이 끝난 폴리우레탄 필름은 증류수로 세척된 후 상온에서 진공 건조되었다.

추가로, 항체 고정화 효율을 비교하기 위한 대조군으로 PEG가 그 래프트된 폴리우레탄 필름에 CD34 mAb가 고정화된 샘플(PU-PEG-CD34)을 자체적으로 개발한 기존의 방법에 따라 제조하였다.^{15,16}

물 접촉각 측정. 개질된 표면의 젖음성을 조사하기 위하여 contact angle goniometer (GBX Inc., France)를 이용한 Sessile drop법이 수행되었다. 하나의 물방울(약 1 μ L)이 마이크로시린지를 사용하여 샘플 표면에 놓여진다. Goniometer에 장착된 현미경에 부착된 Vernier calipers를 이용해 물방울과 표면간의 접촉각이 측정되게 된다. 25 °C에서 각 샘플 당 10회 접촉각이 측정되었다.

표면의 화학적 조성 측정. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)를 이용해 개질된 표면의 화학적 조성을 측정하였다. XPS 스펙트럼은 ESCALAB MK-II spectrometer (VG Scientific Ltd, UK)를 이용하여 Mg K α X-ray 광원(1486. eV photons)과 400 W의 전력에서 획득되었다. Core-level 신호는 90°의 photoelectron take-off angle에서 측정되었다.

표면 형태의 관찰. Atomic force microscopy (AFM)를 이용하여 개질된 표면의 미세형태의 변화를 관찰하였다. 100 μ m piezo-electric scanner가 장착된 Autoprobe microscope (Park Scientific Instruments사(PSI, USA))을 이용하여 측정되었다. 사진은 Si₃N₄의 integrated pyramidal tip (Microlever™, PSI)을 지탱하는 triangular cantilever (force constant of 0.05 N/m)를 가지고 공기 중에서 접촉모드로 얻어졌다. 배경의 경사도를 제거하기 위해 second-order flattening을 사진에 적용하였고, topographical data에서 average roughness (RMS)가 계산되었다.

표면 카르복실기의 정량. 공중합체가 코팅된 표면에 도입된 카르복실기의 양이 toluidine blue법에 의해 측정되었다. 0.01 M NaHCO₃ 용액에 5 mL의 toluidine blue가 첨가된 용액에 샘플을 담그고 40 °C에서 1시간 동안 유지시켰다. 용액이 제거되고 신선한 NaHCO₃ 용액으로 3회 조심스럽게 세척한 후 50% (v/v) 아세트산 용액 5 mL에 넣

고 40 °C에서 30분간 유지시켜 준다. 처리가 완료된 아세트산 용액의 흡광도가 UV 분광기에 의해 630 nm의 파장에서 측정된다.

ELISA에 의한 CD34 mAb 활성 측정. 표면에 고정화된 CD34 mAb의 활성이 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)에 의해 측정되었다. 간략히 요약하면, CD34 mAb의 기준 용액이 50 μ g/mL에서 10 ng/mL의 범위에서 10회의 희석 과정을 통해 제조되었다. 준비된 모든 샘플들을 48 well-plate에 넣은 후에, 1% BSA가 용해된 PBS(300 μ L/well)에 1시간 동안 충분히 잠기도록 유지시킨 후, 꺼내어 Tris buffer로 3회 이상 세척했다. 세척 후, CD34 mAb와 특이적으로 반응하는 alkaline phosphatase labeled anti-rat IgG primary antibodies의 1 : 500 희석(300 μ L/well) 결합된 primary antibody의 alkaline phosphatase가 para-nitrophenyl phosphate (pNPP) buffer와 37 °C에서 20분간 유지시키고 microplate reader를 이용하여 405 nm의 파장에서 흡광도를 측정했다.

결과 및 토론

중합된 Poly(PEGA-*co*-BMA)의 특성 분석. 라디칼 중합에 의해 합성된 poly(PEGA-*co*-BMA)의 구조 분석을 위해 ¹H-NMR을 측정하였으며, 그 스펙트럼이 Figure 2에 보여진다.

PEG의 -CH₂- 피크(1, 2)와 butyl기의 -CH₂-와 -CH₃- 피크(3-6)가 분리되어 확인되었으며, 중합된 아크릴레이트의 -CH-와 -CH₂-, -CH₃- 피크가 중첩되어 관찰되었다. 각각의 proton 자기 공명 피크들은 예상한 것과 같이 단량체들이 중합되었음을 증명하였으며, 피크의 적분값을 통해 공중합체내 PEGA와 BMA의 비율을 예측할 수 있었다. Table 1은 그 결과를 요약하여 보여주는데, 첨가된 단량체의 비율에 비례하여 공중합체의 비율이 결정되었는데, 이것은

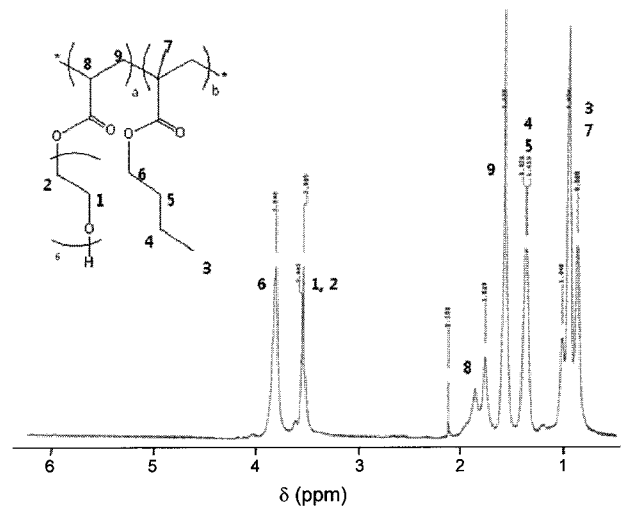


Figure 2. ¹H-NMR spectrum of poly(PEGA-*co*-BMA).

Table 1. Synthetic Results of Poly(PEGA-*co*-BMA)

Trial	Feed ratio (PEGA/BMA)	Copolymer composition (PEGA/BMA)
1	1/9	1/2.6
2	1.5/8.5	1/1.7

첨가된 단량체의 농도를 조절하여 공중합체의 조성을 조절할 수 있음을 말해준다. 특히, BMA가 PEGA에 비해 훨씬 다량으로 첨가되었음에도 불구하고 실제로 중합된 공중합체의 조성에서 낮은 이유는 BMA 단량체가 PEGA에 비해 낮은 분자량을 가졌음에도 라디칼 중합 과정에서 반응성이 낮음을 의미한다. 이러한 결과는 아크릴레이트와 메타크릴레이트간의 반응성의 차이가 주된 요인인 듯 하며, 중합 용매인 톨루엔과 단량체들간의 친화도도 영향을 주었을 수 있다. 두 종류의 공중합체가 중합되었으며, 코팅의 용이성을 고려하여 1번 공중합체가 선택되어 그 다음의 반응에 이용되었다.

카르복실기가 도입된 폴리우레탄의 표면 정량. 항체 고정화를 위해, 중합된 poly(PEGA-co-BMA) 공중합체에 포함된 PEG의 말단이 카르복실기로 치환되었다. 치환된 카르복실기는 ¹H-NMR을 통해 확인하였으며, Figure 3에서 보이는 것과 같이 약 2.6 ppm에서 결합된 succinic anhydride의 -CH₂- 피크의 존재를 통해 말단의 카르복실화가 확인되었다.

PEG 말단에 CD34 mAb를 결합시키기 위해 카르복실기를 활성화하는 반응 단계가 있으나, 결합의 불안정성과 표면에 노출된 작용기만을 활성화시키기 위해 폴리우레탄 필름에 코팅한 후에 활성화 반응을 수행하였다. 정확한 항체 고정화 효율을 예측하기 위해, 코팅된 폴리우레탄 표면에 존재하는 카르복실기를 정량하였으며, 빗모양(comb-type)의 poly(PEGA)를 활용하여 획기적으로 증가된 항체 고정화 효율을 증명하기 위해 대조군으로 이전 연구에서 개발된 PEG-grafted 폴리우레탄 표면에 존재하는 아민기도 함께 정량하였다. Table 2에 그 결과가 제시되었는데, poly(PEGA-co-BMA)가 코팅된 표면이 PEG가 그래프트된 표면에 비해 무려 10³배 이상 증가했음을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과는 PEG가 그래프트된 표면에서 수행된 연

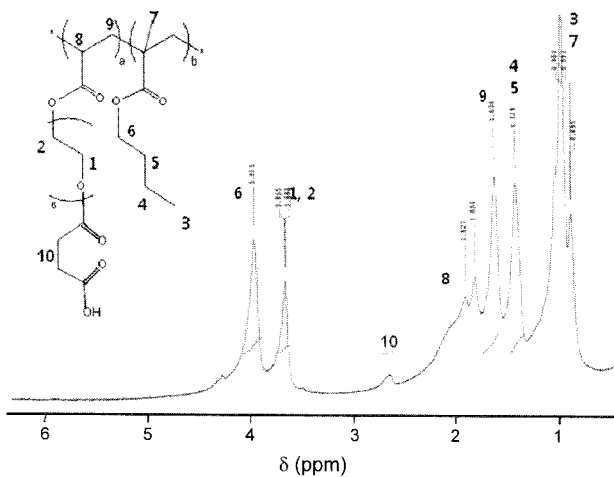


Figure 3. ¹H-NMR spectrum of poly(PEGA carboxylate-co-BMA).

Table 2. Surface Density of Functional Groups and CD34 mAb, and the Ratio on Modified Polyurethane Surfaces

Sample	Functional group (A, μmol/cm ²)	CD34 mAb (B, ng/cm ²)	C=B/A ratio(C, %)
PU-PEG	4.08±0.54	6.6±0.8	4.0×10 ⁻⁵
PU-PPB	4.42×10 ³ ±0.32	156.1±9.0	8.8×10 ⁻⁸

구에서 드러난 극히 낮은 항체 표면밀도의 문제가 개선되었음을 말해준다.

각각의 표면이 활성화된 후, CD34 mAb가 화학적으로 고정화되었고, 그 정량값이 Table 2에 제시되었다. 항체의 표면밀도는 poly(PEGA-co-BMA)가 코팅된 표면에 평방 cm 당 156 ng 정도가 존재하는 것으로 측정되었으며, 이는 PEG가 그래프트된 표면과 비교해 23배 이상 높은 수준이며, 이는 polyPEGGA 고분자가 다량으로 표면에 존재하며 정량 결과에서 보듯이 활성화된 PEG 말단의 밀도 또한 상대적으로 높기 때문으로 생각된다. 그러나, 표면에 활성화된 PEG 말단의 밀도에 대한 고정화된 CD34 mAb의 표면밀도의 비율을 보면 공중합체가 코팅된 표면이 극단적으로 낮음을 볼 수 있는데, 이는 고농도의 고정화 사이트가 표면에 존재하지만, 항체 고정화의 효율은 매우 낮다는 것을 의미한다. 이러한 결과는 고농도의 PEG 말단을 가진 표면의 고정화 반응 과정에서의 입체장애나, poly(PEGA)의 구조적 특성, PEG 말단의 활성화 반응의 낮은 효율, 그래프트 표면과 코팅 표면의 특성에 의한 정량값의 차이 등에서 그 원인을 찾을 수 있을 것이다.

공중합체가 코팅된 폴리우레탄 표면의 물리화학적 특성 분석. Poly(PEGA-co-BMA)로 코팅된 표면과 그 위에 CD34 mAb가 고정화된 표면의 물리화학적 분석을 위해 XPS, 물 접촉각 및 AFM 분석이 수행되었다. XPS는 표면의 화학적 특성을 각 원소의 조성 뿐만 아니라 결합 형태가 다른 한 원소의 조성의 정보도 제공해 준다. CD34 mAb의 고정화를 증명하기 위하여 측정되었으나 상대적으로 낮은 CD34 mAb의 함량으로 인해 매우 미세한 변화만을 관찰할 수 있었으며, 이런 이유로 narrow scan 스펙트럼의 분석은 수행되지 않았다. 코팅층을 구성하는 공중합체에 포함되지 않은 질소 원소가 항체가 고정화된 표면에서 관찰됨을 확인할 수 있었으며, 이는 간접적으로 항체의 표면 고정화를 증명하는 결과라고 할 수 있다(Figure 4).

물 접촉각 또한 표면의 젖음성, 즉, 친수/소수성을 통해 개질된 표면의 물리적 특성을 알 수 있게 해준다. Figure 5는 개질된 폴리우레탄 표면의 물 접촉각을 보여준다. 본 연구진에서는 이전 연구에서 PEG가 그래프트된 폴리우레탄 표면과 그 위에 CD34 mAb를 고정화하였다. 그 연구에서 측정된 결과에서 폴리우레탄 표면은 약 63°의 물 접촉각을 나타냈으며, PEG를 고정화한 후 42°까지 물 접촉각이 낮아지면서 표면이 친수화되었다. 그러나, 본 연구에서 공중

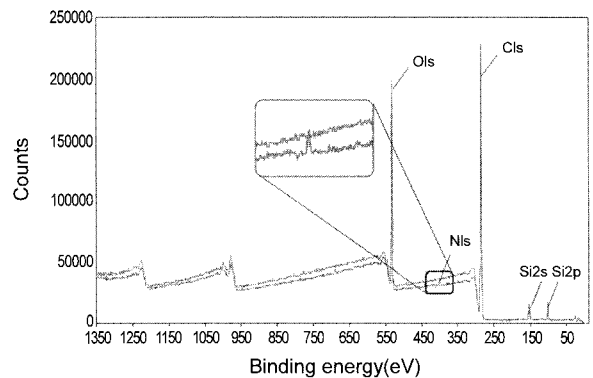


Figure 4. X-ray photoelectron wide scan spectra of PU-PPB and PU-PPB-CD34 surfaces.

합체로 코팅된 폴리우레탄 표면은 폴리우레탄 표면과 거의 유사한 접촉각을 나타내었다. 이는 poly(PEGA)사슬이 많이 도입되었더라도, PEG 보다는 소수성 성질을 가지며, 중합체내 poly(BMA) 사슬이 PEG 사슬의 친수성을 상쇄시켜 주는 역할을 했기 때문인 것으로 추론된다. 코팅된 표면에 CD34 mAb의 고정화는 PEG 그래프트된 표면

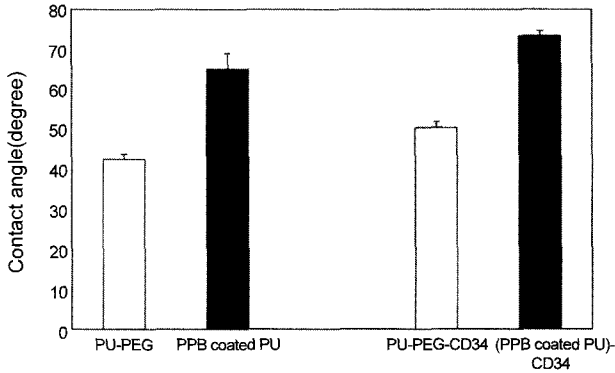


Figure 5. Water contact angles of modified surfaces.

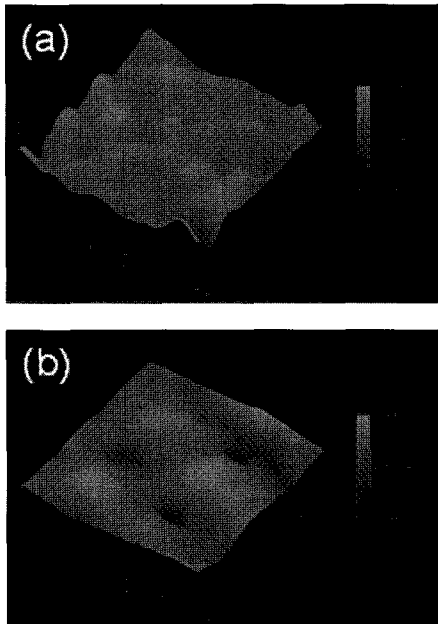


Figure 6. Atomic force microscopic images of (a) PU-PPB; (b) PU-PPB-CD34 surfaces.

과 유사하게 약간 높아진 물 접촉각을 나타냈으며, 이는 약간의 소수성을 가지는 CD34 mAb의 존재와 친수성을 주는 PEG 사슬과 그 말단이 물과의 접촉에서 차단됐기 때문일 수도 있다.

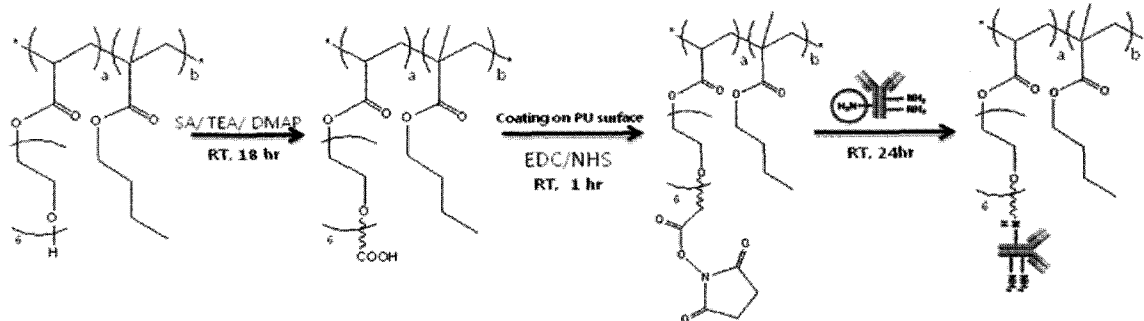
Figure 6에서 보여지듯이, 측정된 AFM 사진은 CD34 mAb가 고정화된 표면(b)과 그렇지 않은 표면(a)의 표면 거칠기(roughness)와 미세 형태(morphology)를 관찰하여 비교할 수 있게 해준다. 기본적으로 두 표면 간의 미세 형태와 표면 거칠기의 변화가 다음과 같이 뚜렷하게 관찰됨을 알 수 있다. 첫째, 사진 (a)에 비해 사진 (b)의 봉우리가 높아졌음을 관찰할 수 있는데, 이는 CD34 mAb가 고정화되어 나타난 것으로 판단할 수 있다. 둘째, 거칠기의 변화에서 관찰되는데, 사진 (a)의 경우 굴곡이 많지만, 사진 (b)의 경우 굴곡이 심하지만 많지 않음을 확인할 수 있으며, 이것은 상대적으로 큰 분자량을 가진 항체의 존재로 인해 생긴 것으로 추론할 수 있다. 이러한 결과는 실제 생체 내 환경과 접촉시에 생기는 생체계면에서 일어나는 현상과 연관지을 수도 있다. 일반적으로 혈액과 접촉시, 거친 표면의 경우 혈장 단백질의 흡착과 혈소판의 점착을 증가시킨다고 알려져 있다.²⁷⁻²⁹

여러 가지 표면의 물리화학적 특성 분석 결과를 기초로 공중합체로 코팅된 표면에 CD34 mAb가 고정화되었음을 확인함과 동시에, 생체내 환경과 접촉시 발생할 수 있는 여러 현상에 대한 기본 자료로 활용될 수 있을 것이다.

CD34 mAb의 활성과 고정화 효율의 비교 분석. Scheme 2와 같이, 최종적으로 코팅된 표면에 고정화된 CD34 mAb의 활성을 측정하였으며, 대조군으로 PEG가 그래프트된 표면에 CD34 mAb와 헤파린 + CD34 mAb가 고정화된 샘플을 대조군으로 제조하여 비교하였고, 그 결과는 Table 3에 요약하였다. 이전 연구에서 개발된 대조군 샘플은 표면에 도입된 PEG양을 고려하여 본 연구에서 개발된 샘플보다 감소된 양을 첨가하였다. 결과는 코팅된 표면이 첨가된 양을 감안하더라도 상당히 높은 항체 표면밀도를 보여 주었으며, 헤파린에 의한 표면밀도 증가 효과와 비교할 수 없을 정도로 높은 항체 활성도를 나타내었으며, 그 경향도 정량값(Table 2)과 유사하였다. 일반적으로

Table 3. Biological Activity of CD34 mAb Immobilized onto PU-PEG and PU-PPB Surfaces, as Determined by ELISA

Surface	Feed amount (µg/mL)	Bioactive amount (ng/cm ²)
PU-PEG	7.5	5.56
PU-PEG/Hep	7.5	12.43
PU-PPB	15	156.05



Scheme 2. Immobilization of CD34 monoclonal antibody (mAb) on poly(PEGA-co-BMA)-coated surface.

ELISA의 측정 오차가 있음을 감안하더라도 상당한 활성의 증가를 보였음을 알 수 있으며, 그런 오차는 모든 샘플에 동등하게 적용되므로 상대적인 비교를 위해 문제가 되지 않을 것이다. 이러한 결과가 나타난 이유로는 여러 가지를 생각해 볼 수 있는데, 첫째로, 10³배나 많이 도입된 활성화된 PEG 사슬이 많은 CD34 mAb를 고정화시켰다고 생각할 수 있으며, 둘째로, 아민기 말단을 가진 PEG 그래프트 표면은 항체의 화학적 활성화 과정이 요구됨으로 카르복실기 말단이 활성화되는 poly(PEGA-co-BMA) 코팅 표면보다는 항체의 안정성에 큰 영향을 줄 수 있다. 이 외에도, 고정화된 CD34 mAb의 배향이 실제 표면에서의 활성과 연관성이 크다고 알려져 있으며, 이는 제조된 두 종류의 표면과 어떤 관련성이 있는지 예측할 수는 없으나 표면에서의 항체의 활성화에 큰 영향을 미친다.

결론

본 연구의 목적은 *in vivo* 혈관내피세포화가 가능한 CD34 mAb가 고정화된 폴리우레탄 소재를 개발하는데 있으며, 이를 위해 poly(PEGA-co-BMA) 공중합체를 중합하여 코팅한 후, 항체를 고정화한 후 그 표면의 특성을 측정하여 분석하였다. 공중합체로 코팅한 표면은 PEG 사슬이 직접 고정화된 표면에 비해 항체 고정화 효율에서 우수한 결과를 보였으며, 항체의 표면밀도도 크게 증가시켰다. 이러한 결과는 본 연구에서 개발된 CD34 mAb가 도입된 폴리우레탄 표면의 *in vitro* 세포 실험 및 *in vivo* 동물 실험을 통한 효능 평가에 적용할 수 있도록 기대하게 한다. 또한, 본 논문에서 제시된 방법은 폴리우레탄 표면만이 아닌 다양한 혈관 그래프트 소재에도 응용될 수 있으며, 또한 CD34 mAb 대신 다른 항체나 단백질, 펩타이드 등에도 적용되어 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업(과제 고유번호: A050082)과 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업의 지원으로 수행된 연구임(과제고유번호: 2009-0093826).

참고 문헌

1. M. H. Davidson, *Am. J. Manag. Care*, **13**, S260 (2007).
2. W. Rosamond, K. Flegal, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, and N. Haase, *et al.*, *Circulation*, **117**, 25 (2008).
3. B. Bhargava, G. Karthikeyan, A. S. Abizaid, and R. Mehran, *BMI*, **327**, 274 (2003).
4. M. R. Ward, D. J. Stewart, and M. J. Kutryk, *Catheter Cardiovasc. Interv.*, **70**, 983 (2007).
5. R. D. Sayers, S. Raptis, M. Berce, and J. H. Miller, *Br. J. Surg.*, **85**, 934 (1998).

6. P. L. Faries, F. W. Logerfo, S. Arora, S. Hook, M. C. Pulling, and C. M. Akbari, *et al.*, *J. Vasc. Surg.*, **32**, 1080 (2000).
7. D. B. Cines, E. S. Pollak, C. A. Buck, J. Loscalzo, G. A. Zimmerman, and R. P. McEver, *et al.*, *Blood*, **91**, 3527 (1998).
8. R. W. Colman, *Hemostasis and thrombosis: basic principles and clinical practice*, 4th ed., Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000.
9. E. A. Jaffe, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **454**, 279 (1985).
10. G. M. Rodgers, *Faseb. J.*, **2**, 116 (1988).
11. U. Hersel, C. Dahmen, and H. Kessler, *Biomaterials*, **24**, 4385 (2003).
12. T. G. Vargo, J. A. J. Gardella, J. M. Calvert, and M.-S. Chen, *Science*, **262**, 1711 (1993).
13. J. A. Neff, P. A. Tresco, and K. D. Caldwell, *Biomaterials*, **20**, 2377 (1999).
14. C. C. Larsen, F. Kligman, K. Kottke-Marchant, and R. E. Marchant, *Biomaterials*, **27**, 4846 (2006).
15. W. S. Choi, J. W. Bae, H. R. Lim, I. K. Kwon, Y. K. Joung, J. C. Park, and K. D. Park, *Macromol. Res.*, **16**, 42, (2009).
16. W. S. Choi, J. W. Bae, H. R. Lim, Y. K. Joung, J. C. Park, and K. D. Park, *Biomed. Mater.*, **3**, 044104 (2008).
17. U. Sigwart, J. Puel, V. Mirkovitch, F. Joffre, and L. Kappenberger, *N. Engl. J. Med.*, **316**, 701 (1987).
18. M. Avci-Adali, A. Paul, G. Ziemer, and H. P. Wendel, *Biomaterials*, **29**, 3936 (2008).
19. M. Deutsch, J. Meinhart, T. Fischlein, P. Preiss, and P. Zilla, *Surgery*, **126**, 847 (1999).
20. J. G. Meinhart, M. Deutsch, T. Fischlein, N. Howanietz, A. Froschl, and P. Zilla, *Ann. Thorac. Surg.*, **71**, S327 (2001).
21. C. Zhu, D. Ying, J. Mi, L. Li, W. Zeng, C. Hou, J. Sun, W. Yuan, C. Wen, and W. Zhang, *Biomaterials*, **29**, 2628 (2008).
22. C. Wilhelm, L. Bal, P. Smirnov, I. Galy-Fauroux, O. Clément, F. Gazeau, and J. Emmerich, *Biomaterials*, **28**, 3797 (2007).
23. J. Ben-Shoshan and J. George, *Pharmacol. Therapeut.*, **115**, 25 (2007).
24. S. Fuchs, A. Motta, C. Migliaresi, and C. J. Kirkpatrick, *Biomaterials*, **27**, 5399 (2006).
25. K. D. Park and S. W. Kim, *Biomedical Application of Polyethylene Glycol Chemistry*, M. Harris, Editor, Plenum Publ., New York, USA, 1992.
26. D. K. Han, K. D. Park, and Y. H. Kim, *J. Biomater. Sci.: Polym. Edn.*, **9**, 163 (1998).
27. K. D. Park, K. Suzuki, W. K. Lee, J. E. Lee, Y. H. Kim, Y. Sakurai, and T. Okano, *ASAIO J.*, **42**, 876 (1996).
28. D. K. Han, K. D. Park, G. H. Ryu, U. Y. Kim, B. G. Min, and Y. H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 23 (1996).
29. D. K. Han, K. D. Park, S. Y. Jeong, Y. H. Kim, N. Y. Lee, H. I. Cho, and B. G. Min, *Biomaterials*, **16**, 467 (1995).