

Poly(L-leucine)/poly(ethylene oxide)/poly(L-leucine) triblock copolymers as wound dressing

조종수, 김현정, 이 현철*, 김성호**

전남대학교 고분자공학과, *전남대학교 의과대학 미생물학연구실, **조선대학교 약학과

ABSTRACT

Poly(L-leucine)(PLL)/poly(ethylene oxide)(PEO)/poly(L-leucine)(PLL) block copolymers were synthesized by polymerization of L-leucine N-carboxyanhydride with diamine-terminated PEO for possibility of wound dressing which may have several advantages such as 1) increase of solubility, 2) control of biodegradation, 3) absorption of body fluid, 4) non-immunogenic effect than PLL homopolymer wound dressing already commercialized. Water content increased with an increase of PEO content in the block copolymer due to the hydrophilicity of PEO. Release of silver sulfadiazine(AgSD) from AgSD loaded wound dressing increased with an increase of PEO content in the block copolymer. It was found that the number of *Pseudomonas aeruginosa* decrease with an increase of PEO content due to the fast release of antibacterial agents with an increase of PEO content in the block copolymer.

서론

피부는 체내 보호, 체온 조절, 세균 감염 방지, 지각, 분비 등의 중요한 기능을 수행하는 기관으로 광범위 창상을 입은 경우 생명의 위협까지 받게 된다. 이 경우 환자의 전신 상태의 악화나 체피 가능한 피부에 제한이 있어 전체 피부결손부를 자가식피로 피복하는 것이 불가능하므로 자가식피가 가능할 때까지 일시적 피복보호를 위한 wound dressing이 필요하다.(1)

Wound dressing은 창상 부위의 수분이나 체액의 손실을 막아 심한 탈수 증세로 인한 생명의 위협과 외부로부터의 세균의 침입을 막고, 장면에 존재하는 세균의 증식을 억제하여 새로운 조직의 재생을 촉진할 수 있어야 한다.(2)

지금까지의 wound dressing으로는 gauze, 동결 건조된 돼지피부(3), polyurethane 막(4), silicon 막

(5)등이 사용되었는데, 이것들은 피부가 완전히 재생될 때까지 여러 번 갈아주어야 하므로 써 환자에게 고통을 주고, 연고나 크림 등을 창상면에 직접 바른 후에 wound dressing을 covering하므로 써 조직에 손상을 주어 조직의 재생이 지연되며, 창상이 심한 경우에는 적용 할 수 없는 문제점을 안고 있다. 이러한 점을 보완하기 위하여 Kuroyanagi는 wound dressing에 drug delivery system(DDS) 개념을 도입하여 피부가 재생될 때 까지 피복보호를 할 수 있는 Poly(L-leucine)(PLL) spongy matrix 형태의 wound dressing을 개발하였다(Epicuel[®]) (6).

PLL wound dressing은 뛰어난 생체 적합성과 측쇄에 관능기를 가지고 있지 않아 분해후에 독성 물질을 생성시키지 않고, 동결건조 방법에 의하여 쉽게 sponge구조가 만들어지며, 항균제를 원하는 양만큼 변성없이 혼합할 수 있는 등의 장점이 있는 반면에, 너무 소수성이 강하여 생분해성과 약물방출속도의 조절이 어려운 단점을 안고 있다.

본 실험에서는 이러한 단점을 보완하기 위하여 poly(ethylene oxide)(PEO)와 PLL과의 블록공중합체를 합성하여 PLL의 생분해성과 약물방출 속도를 조절할 수 있고 PEO의 친수성으로 인하여 체액을 흡수하므로써 체액의 손실을 막고, 고분자의 유기 용매에 대한 용해도와 생체접착성을 증가시켜 주며, PLL단독보다 더 뛰어난 non-immunogenic effect를 기대 할 수 있는 wound dressing을 제조하려는 데에 있다.

실험

1. 시료

분자량 2,000인 Amine-terminated PEO(ATPEO)는 Texaco Chem.의 제품을 chloroform에 녹여 diethyl ether와 hexane(50/50 v/v)로 침전시켜 정제하였고, 이것을 L-leucine N-carboxyanhydride(LL-NCA)의 중합개시제로 이용하였다. LL-NCA는 Goodman 등의 방법에 의하여 phosgene을 이용하여 제조하였다(7).

기타 시약은 특급시약을 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

2. PLL/PEO/PLL(LEL) block copolymer의 합성
LEL공중합체는 LL-NCA와 ATPEO의 전체농도를 3%(v/v)로하여 dichloromethane에 넣고 25°C에서 72시간동안 ATPEO를 개시제로 하여 LL-NCA를 중합시켜 제조한다.

반응혼합물을 diethyl ether에 침전시킨 후 이것을 vacuum oven에서 건조시켰다.

3. Infrared spectroscopy(IR)의 측정

IR은 Bruker IFS-66 FT-IR 분광계를 사용하여 측정하였다.

4. Nuclear magnetic resonance(NMR)의 측정

NMR은 Braker WP 80 SY FT-NMR 분광계를 사용하여 측정하였다.

5. PLL/PEO/PLL spongy matrix의 제조

PLL/PEO/PLL block copolymer를 70°C의 oil 중탕에서 benzene(1wt-%)에 넣어 녹인 후, 이 용액에 원하는 양만큼의 silver sulfadiazine(AgSD)를 넣고 균일하게 분산시킨 후, 기계적 지지체로서의 nylon mesh를 mold에 간 후 용액을 붓고 실온에 방치시키면 gel

상태가 된다 gel 표면을 hair-drier를 이용하여 benzene을 날려보내 얇은 skin 층을 만든 후, 동결 건조시켜 만들었다.

6. 함수율 측정

PLL/PEO/PLL sponge의 함수율을 37°C의 증류수에서 측정하였다. 소정의 시간에 수화된 시료의 표면수를 필터지로 닦은 후 무게 증가법에 의하여 측정하였다. 함수율은 $(W_s - W_d) / W_s \times 100$ 의 식으로 구하였다.

(W_s : 습윤시의 무게, W_d : 건조시의 무게)

7. In vitro에서의 약물 방출 실험

AgSD-impregnated wound dressing을 Porer(지름 : 1.8cm, 두께 : 2mm)를 이용하여 절단한 후, phosphate buffer solution(PBS)(0.1M, pH=7.4) 10 ml를 20ml vial에 넣고 이것에 담근다. 이것을 37°C의 shaking incubator에서 일정한 시간 간격으로 새로운 PBS를 바꾸어 주면서 약물의 농도를 265nm에서 UV-spectrometer를 이용하여 측정하였다.

8. Agar에서의 항균력 test

1.0% agar제조후에 45°C water bath에서 agar 16ml와 1ml Top agar에 Pseudomonas 희석액

$(10^3, 10^4, 10^5 \frac{\text{density}}{\text{cm}^3})$ 을 넣은 용액을 vortexing

시켜 균일하게 혼합시킨후에 지름 9cm의 plate에 plating시킨다. 일정한 크기로 자른(2×2cm)후, control (gauze+vaseline)과 AgSD를 $50\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 함유한 PLL, LEL-1(PEO:17mol%), LEL-2(PEO:29mol%) 각각을

균은 plate 위에 인고 2일간 37°C에서 배양시킨후에 각각의 시료를 떼어내고, 그 밑 부분을 1.6cc Porer를 사용해 절단 한 후에 homogenization 시켜 series 별로 희석시킨 용액을 1일 이상 37°C에서 배양시킨 후에 colony 수를 측정하였다.

결과 및 고찰

PLL/PEO/PLL block copolymer는 dichloromethane에서 ATPEO를 개시제로 하여 LL-NCA의 중합에 의하여 제조되었다.(Scheme1)

Scheme 1 :

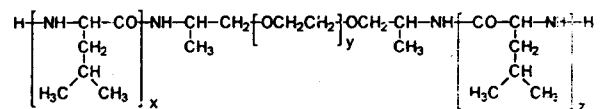
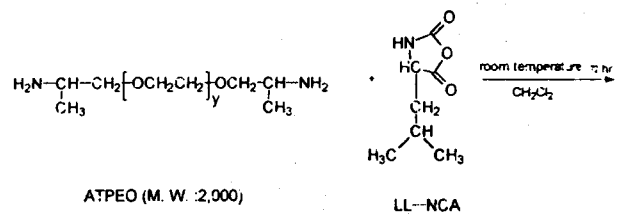


Table 1.에 ^1H NMR에서 측정된 copolymer들의 수 평균분자량과 PEO의 함량을 나타내었다.

copolymer composition은 ^1H NMR spectrum에서 PLL block의 methyl proton signal(0.95ppm)의 peak강도와 PEO block의 methylene proton signal(3.9ppm) peak 강도로부터 측정되었다.

Poly(L-leucine)/poly(ethylene oxide)/poly(L-leucine)triblock copolymers as wound dressing

Table 1. Characterization of PLL homopolymer and LEL block copolymers prepared

Polymer	content of monomeric units in mol -% a)		\overline{M}_n
	PEO	PLL	
PLL	0	100	300,000
LEL-1	17.4	82.6	25,900
LEL-2	28.6	71.4	14,500

a) content of monomeric units in the block copolymer estimated by ¹H NMR measurement.

FT-IR의 결과에서 LEL-1과 LEL-2의 흡수대가 PLL과 같은 1650 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹, 그리고 615 cm⁻¹에서 amide peak가 나타나는 걸로봐서 block copolymer들이 α-helix 구조를 형성하고 있음을 나타내었다.

PEO함량에 따른 PLL/PEO/PLL wound dressing의 37°C 증류수에서의 시간에 따른 함수율 변화를 Fig 1.에 나타내었다. 함수율의 결과는 PEO의 함량이 클수록 증가하였는데, 이것은 PEO의 친수성에 의한 것으로 생각 된다.

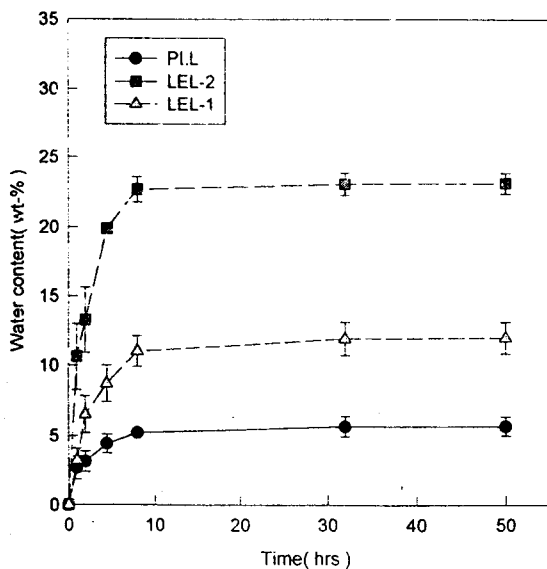


Fig 1. Water content of PLL homopolymer and LEL block copolymers wound dressing against PEO content(M. W. pf PEO :2000)

Fig 2.에 PEO의 함량에 따른 PLL/PEO/PLL wound dressing으로부터의 AgSD의 방출량을 시간에 대하여 나타내었다. AgSD의 방출량은 PEO의 함량이 많을수록 빠른 속도로 방출되었다.

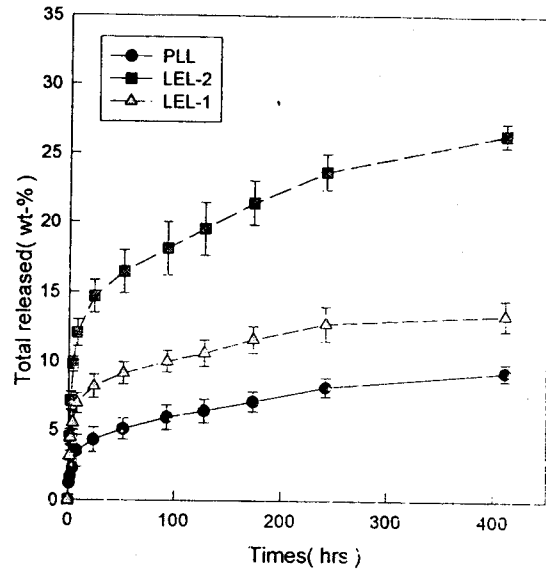


Fig 2. Released of AgSD from AgSD loaded synthetic wound dressing composed of PLL/PEO/PLL spongy matrix(drug loading : 20wt%)

Fig 3.에 agar plate 상에서의 항균력 test 결과를 나타내었다. 이것은 Pseudomonas aeruginosa의 밀도가 10³/cm² 일때의 결과이다. control은 초기

Pseudomonas aeruginosa의 수(10³)에 비하여 증가하였지만, PLL, LEL-1, LEL-2의 경우는 감소하였다. 그 이유는 PLL, LEL-1, LEL-2가 항균제를 포함하고 있어 항균력을 나타내고 있음을 보여준다. 그리고 항균제가 포함된 PLL, LEL-1, LEL-2 만을 놓고 보면 PEO의 함량이 증가할수록 관찰된 Pseudomonas aeruginosa의 수가 현저하게 감소하였다. 이는 PEO의 친수성에 기인한 결과로 생각된다. 이것은 앞의 약물방출 실험 data와 같은 경향을 나타내고 있다.

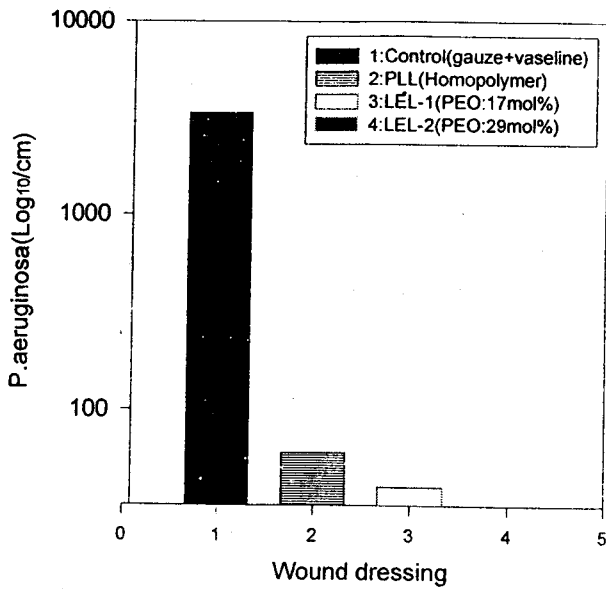


Fig 3. Number of residual P. aeruginosa in the agar plate covered with AgSD-impregnated wound dressing (drug loading : 50 μ g/cm²)

결론적으로 PLL/PEO/PLL wound dressing은 PEO를 PLL에 도입함으로써 약물방출속도와 항균력 등을 향상시켰다.

Reference

1. Yd. Kuroyanagi, Ph D, *Biomaterial*. 1992. vol. 10, NO. 3.
2. Y. Kuroyanagi, *Advances in wound dressing and cultured skin substitute*. 1994. p. 6.
3. Ersek. K. A., Denton D. R., *Ann. Plast. Surg.* 1984. vol. 74 : 269-273.
4. Y. Yasutomi, N. Nakakita, N. Shioya, Y. Kuroyanagi, *Jpn. J. Burn INj.*, 1993, vol. 19 : 102-116.
5. Yannas I.V., Burke J. F., Origill D.P., Skrabut E.M., *science*, 1982, vol. 215 : 174-176.

6. Y. Kuroyanagi, E. Kim, M. Kenmochi, H. Kageyama, M. Nakamura, A. Takeda, N. shioya, *J. Applied Biomater.*, 1992, vol. 3 : 153-161.

7. W. D. Fuller, M. S. Verlander, M. Goodman, *Biopolymers*, 1976, vol. 15, 869.