

폴리에틸렌글리콜이 그래프트된 폴리우레탄 디바이스로부터 안지오텐신 및 α -아밀라제의 방출

하정헌 · 김성호[†]
조선대학교 약학대학
(1989년 11월 5일 접수)

In Vitro Release of Angiotensin and α -Amylase from Polyethylene Glycol-Grafted Polyurethane Devices

Chung Hun Ha and Sung Ho Kim[†]

College of Pharmacy, Chosun University, Kwang-ju 501-759, Korea

(Received November 5, 1989)

The release of angiotensin and α -amylase from monolithic devices of different molecular weight of polyethylene glycol (PEG) grafted polyurethane copolymer was investigated. Water-soluble PEG grafted polymer provided a controlled release of angiotensin and α -amylase. The release rate of angiotensin and α -amylase could be controlled by varying the molecular weight of PEG grafted. The release mechanism may be associated with the creation of pore or domain through the devices following the gel swelling and self-aggregation by PEG grafted polymer. Hydrophobic polyurethane grafted with PEG can provide a biomaterial for prolonged release of angiotensin and α -amylase from angiotensin and α -amylase blended system.

Keywords—angiotensin, α -amylase, prolonged release, nonthrombogenic polymer, PEG grafted polyurethane, copolymer

단백질 및 펩티드계에 속하는 약물들은 경구적으로 투여하면 위장관에서 변성 또는 분해되며 위장관 막을 통한 흡수율이 매우 낮아 저조한 생리적 활성율을 보인다. 한편 비경구적인 주사제는 매우 짧은 생리적 반감기를 가지고 있어¹⁾ 지속적인 유효 혈중농도를 유지하기 위해서는 연속적인 투여가 필요하며 또한 지속적인 치료효과를 얻기 위해서는 방출율을 조절할 수 있는 고분자 매트릭스를 이용한 제제개발이 필요하다.

폴리아크릴아미드, 폴리비닐피롤리돈, ethylenevinyl acetate 등과 같은 고분자가 단백질과 펩티드계 약물의 방출제어 연구에 사용되고 있다.¹⁻⁴⁾ 의료용 고분자로 널리 사용되고 있는 소수

성인 폴리우레탄(이하 PU로 약함)은 우수한 생체적합성과 기계적 물성을 가지고 있으므로 인공 장기 개발의 재료로서 이용되고 있으며 PU의 표면성질과 관련된 많은 연구가 진행되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 친수성 약물이 분산된 소수성 고분자에서 약물이 방출되는 것은 어려운 문제이므로⁸⁾ 친수성 약물을 방출시키기 위해서는 염화나트륨, 글리세린, 알긴산나트륨, raffinose, 폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드와 같은 수용성 첨가제를 병용하여 약물의 방출을 증가시켰다.⁹⁻¹²⁾

현재 의용 재료로 널리 쓰이고 있는 PU의 조성을 변화시킴으로써 우수한 기계적 강도와 항응

[†] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로.

혈성을 가진 중합체를 얻을 수 있으므로⁶⁾ 본 연구에서는 PU 표면에 친수성 고분자인 폴리에틸렌글리콜(이하 PEG로 약함)을 그래프트시켜 만든 PU 매트릭스로부터 단백질 및 펩티드계 약물의 서방성 제제 및 재료 개발을 위한 첫 단계로서 *in vitro* 에서 그래프트된 PEG의 분자량이 안지오텐신과 α -아밀라제의 방출에 미치는 영향을 검토하였다.

실험방법

재료 및 기기

폴리우레탄(biomer, Ethicon Co., U.S.A.), 폴리에틸렌글리콜(PEG, 분자량 600, 6000, 20000, Sigma Chem. Co., U.S.A.), 디메틸아세타미드(DMAC, Tokyo Kasei Co., Japan), 헥사메틸렌디이소시아네이트(HMDI, Tokyo Kasei Co., Japan), stannous octoate(Dow Corning Co., U.S.A.), 안지오텐신(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 및 α -아밀라제(Sigma Chem. Co., U.S.A.) 등을 사용하였으며 기기로서는 자외부-가시부 분광광도계(Shimadzu UV 240A, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다.

폴리우레탄에의 폴리에틸렌글리콜 그래프팅

일정량의 PU를 DMAC에 용해하여 $60 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 유리판 위에서 casting 하여 sheet를 제조한 후 유리판에서 분리하여 24시간 동안 진공 건조하였다. 일정한 크기($2 \times 6 \times 0.24$ cm)의 PU sheet 표면에 김 등⁶⁾의 방법에 따라서 헥사메틸디이소시아네이트를 결합시키고(biomer-HMDI) 이에 친수성 PEG를 결합시켜 소수성과 친수성 성질을 가지는 고분자(biomer-HMDI-PEG)를 제조하여 고분자 매트릭스로 사용하였다.

디바이스 제조

고분자 매트릭스에서의 약물 방출은 약물의 입자도가 영향을 미치므로¹³⁾ 본 실험에서는 α -아밀라제를 200호체로 사과하여 입자경이 $74 \mu\text{m}$ 이하인 α -아밀라제와 사과하지 않은 안지오텐신 그리고 PEG로 그래프트한 PU를 중량비로 혼합하

여 제조하였다. 고분자 매트릭스는 안지오텐신과 α -아밀라제의 일정량을 PU-PEG의 DMAC 용액에 균일하게 분산시킨 다음 유리판 위에서 Creque 등의 방법¹⁴⁾에 따라서 -20°C 에서 냉동시킨 다음 24시간 동안 20 mmHg에서 진공 건조시켰다. 매트릭스를 유리판에서 분리한 후에 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 24시간 동안 진공 건조시켰다. 이 매트릭스로부터 원판형 매트릭스(지름 $1.46 \text{ cm} \times$ 두께 0.023 cm)을 제조하여 본 실험에 사용하였다.

고분자 매트릭스로부터의 약물 방출

고분자 매트릭스로부터의 안지오텐신과 α -아밀라제 방출량을 측정하였다. 디바이스 표면에 부착된 이물질 등을 제거하기 위해서 0.15 M 염화나트륨용액으로 세척하고 안지오텐신과 α -아밀라제 방출량을 측정하기 위하여 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 0.15 M 염화나트륨용액 50 ml을 사용하여 감속교반기를 이용하여 1500 rpm의 일정한 속도로 교반하였다. 일정시간 간격으로 2 ml의 검액을 취한 후 동량의 방출액을 교환시켜 주었다. 채취한 검액 중의 안지오텐신은 파장 207 nm, α -아밀라제는 파장 197 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 방출 실험이 진행되는 동안에는 항상 sink condition이 유지되도록 하였으며 모든 실험은 3회 행하였다.

함수율 계산

함수율은 건조 및 습윤된 상태의 디바이스의 무게를 달아 산출하였다.

실험결과 및 고찰

10% 안지오텐신과 10% α -아밀라제를 함유한 PU-PEG monolithic device로부터의 안지오텐신과 α -아밀라제의 방출실험을 행한 결과를 Table I 및 II에 나타내었다. PEG가 결합되지 않은 PU에 분산된 안지오텐신 monolithic device는 매우 낮은 안지오텐신 방출율과 함수율을 보이고 있으나 수용성 고분자인 PEG를 결합시킨 「안지오텐신-PU-PEG」 디바이스는 높은 방출율과 높은 함수율을 나타내고 있다. 안지오텐신 PU 디바이스로부터 0.15 M 염화나트륨용액에서 7일간 방출된 안지오텐신의 방출율은 2.03%이고 함수율은 4.52%이나 안지오텐신 PU-PEG 디바

Table I—Effect of PEG Grafting on Angiotensin Release from PU Matrices.

Material	Water content* (%)	Angiotensin fraction released (%)	Cumulative amount of angiotensin released ($\times 10^2$ mg/cm ²)
PU	4.52	2.03	3.40
PU-PEG 600	16.70	24.83	38.04
PU-PEG 6000	18.90	22.98	38.46
PU-PEG 20000	27.58	13.96	20.94

Release experiments were performed in 0.15M NaCl solution for 7 days.

$$\text{*Water content} = \frac{\text{wet weight} - \text{dry weight}}{\text{dry weight}} \times 100$$

Table II—Effect of PEG Grafting on α -Amylase Release from PU Matrices.

Material	Water content (%)	α -Amylase fraction released (%)	Cumulative amount of α -amylase released ($\times 10^2$ mg/cm ²)
PU	4.39	3.54	6.03
PU-PEG 600	19.46	37.27	59.10
PU-PEG 6000	24.72	30.05	55.50
PU-PEG 20000	35.43	28.14	42.70

Release experiments were performed in 0.15M NaCl solution for 7 days.

이스에서 결합된 PEG 분자량에 따른 안지오펜신의 방출은 PEG 600의 경우 24.83%, PEG 6000의 경우 22.98% 및 PEG 20000의 경우는 13.96%를 나타내고 있으며 함수율은 Table I에서와 같이 PEG 분자량이 커지면 함수율이 증가되는 경향을 나타내고 있으나 함수율의 증가로 인한 비례적인 방출을 증가는 나타나지 않았다.

또한 PU 디바이스로부터 α -아밀라제의 방출율은 Table II에서와 같이 3.54%이었으며 함수율은 4.39%이었다. 이에 대비하여 친수성 PEG 고분자를 결합시킨 PU-PEG 디바이스로부터 α -아밀라제의 방출은 현저히 증가하였다. PEG 600의 경우는 37.27%, PEG 6000의 경우 30.05%, 그리고 PEG 20000의 경우는 28.14%를 나타내고 있으며 함수율은 Table II와 같이 PEG의 분자량이 증가함에 따라 함수율은 증가되었다. 그러나 「안지오펜신-PU-PEG」 디바이스에서와 같이 「 α -아밀라제-PE-PEG」 디바이스에서도 함수율이 증가하였으나 방출율은 비례적으로 증가되지는 않았다.

「안지오펜신-PU」와 「 α -아밀라제-PU」 디바이스로부터의 약물 방출은 방출액과 직접 접촉하는 디바이스 표면에 존재하는 안지오펜신과 α -아밀라제가 주로 방출되기 때문에 낮은 방출율을 나타내고 있다. 그리고 casting 과정에서 형성된 입자의 크기가 증가하면 방출율이 증가되며 특히 고분자 매트릭스안에 형성된 많은 channel이나 세공이 서로 연결되어 있어서 약물이 확산되어 세공을 통하여 방출하게 된다.¹⁴⁾ 이 디바이스들이 Fig. 1 및 2에서와 같이 방출액과 접촉하는 초기에 burst 효과를 나타내는 것은 일반적인 monolithic dispersed matrix에서 나타나는 특성과 같다.

안지오펜신 또는 α -아밀라제를 분산시킨 PU-PEG 디바이스의 표면에 부착된 또는 방출액과 접촉할 수 있는 내부의 안지오펜신과 α -아밀라제에 의해서 방출 초기에 burst 효과를 보이며 폴리펩티드가 매트릭스 밖으로 확산되기 위해서는 초기에 매트릭스가 물을 흡수하여 폴리펩티드가 용해되어야 한다.¹⁵⁾ 안지오펜신과 α -아밀라제의 디바이스 내부 입자들은 연차적으로 용해되어 방출

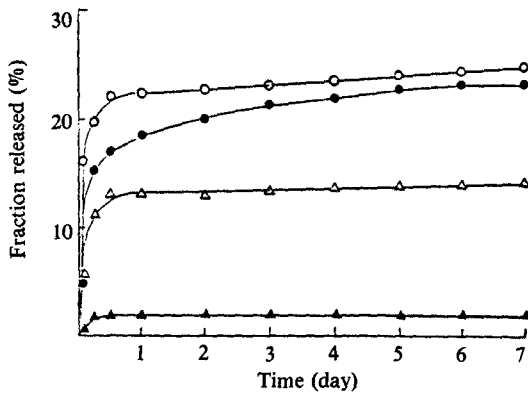


Figure 1—Fractional release of angiotensin from PEG-grafted polyurethane matrices with 10% drug loading.
Key: ▲, polyurethane (PU); ○, PU-PEG 600; ●, PU-PEG 6000; △, PU-PEG 20000

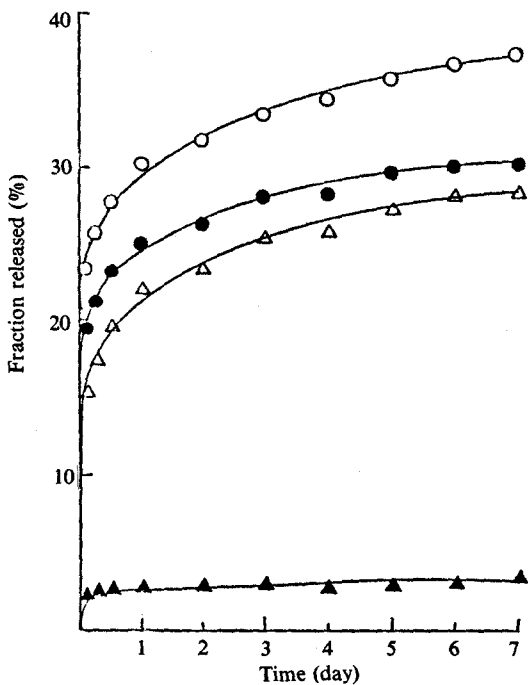


Figure 2—Fractional release of α -amylase from PEG-grafted polyurethane matrices with 10% drug loading.
Key: ▲, polyurethane (PU); ○, PU-PEG 600; ●, PU-PEG 6000; △, PU-PEG 20000

되며 안지오텐신과 α -아밀라제의 방출 후 형성된 불규칙적인 관들의 망상 미세공들에 의해서 용출이 일어난다. 그리고 PU에 친수성 고분자인 PEG 또는 PEG-PPO(polypropylene oxide)의

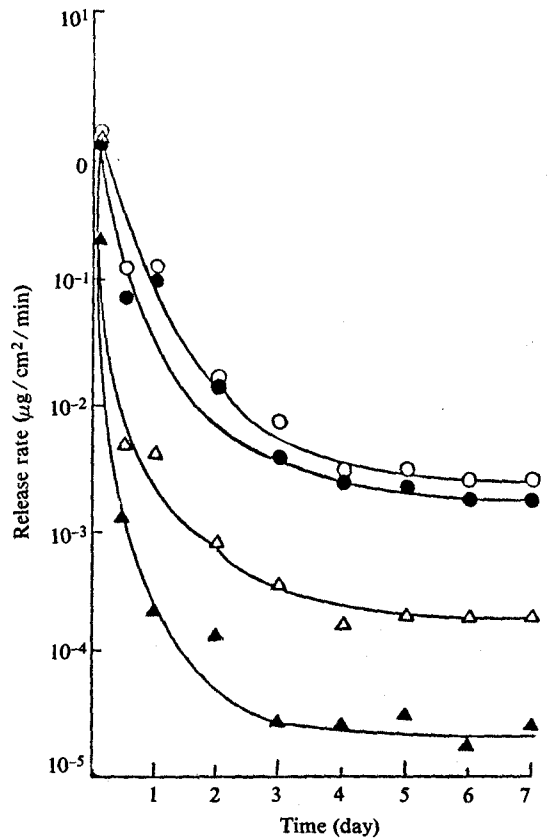


Figure 3—Release rates of angiotensin from PEG-grafted polyurethane matrices with 10% angiotensin loading.
Key: ▲, polyurethane (PU); ○, PU-PEG 600; ●, PU-PEG 6000; △, PU-PEG 20000

첨가량을 증가시키거나 이들의 분자량을 증가시킴으로써 약물의 방출이 증가된다.⁹⁻¹²⁾ 그러나 고분자에 그래프트된 PEG는 용액 내에서 용해되지 않고 겔-팽윤 상태로 존재하며¹⁵⁾ 나선형 필라멘트를 형성한다. 그리고 PEG 분자량 증가에 의해서 중첩율이 증가되며 나선형 안으로 단백질은 확산되고 물은 포획된다.¹⁶⁾

Table I 및 II에서와 같이 PU에 그래프트된 PEG 분자량이 커짐에 따라서 함유율이 증가한다. Medina 등¹⁷⁾과 Miekka 등¹⁸⁾에 의하면 단백질계 효소들은 PEG에 의해서 응집되며 저농도에서는 고분자 표면에 흡착되는 성질을 가지고 있다. 그러나 PU에 PEG를 그래프트시켜 표면을 친수성으로 변화시키면 혈소판의 흡착이 억제되며

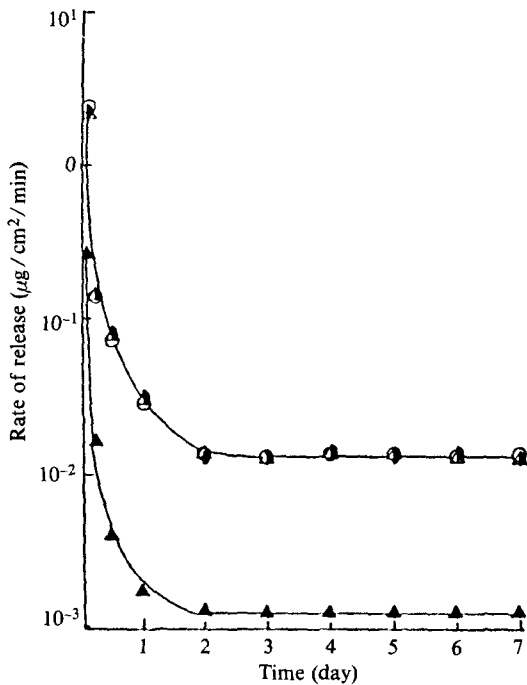


Figure 4—Comparison of release rate of α -amylase from PEG-grafted polyurethane matrices with 10% α -amylase loading.

Key: ▲, polyurethane (PU); ○, PU-PEG 600; ◐, PU-PEG 6000; △, PU-PEG 20000

PEG의 분자량이 증가할수록 이러한 현상이 뚜렷하며 분자의 운동도가 커져서 혈장단백질 및 혈소판 점착이 적게 일어난다고 하였다.⁶⁾ 디바이스 내부에 존재하는 PEG는 겔-팽윤하며 동시에 PEG에 의해서 안지오텐신과 α -아밀라제는 자가응집됨과 동시에 PEG의 임의 나선형 필라멘트 안으로 확산됨으로써 안지오텐신과 α -아밀라제 분자들은 디바이스 밖으로의 확산속도가 낮고 새공형성율이 저하됨으로써 PEG 분자량의 증가에 따라서 방출속도가 감소하는 것으로 보인다.

안지오텐신과 α -아밀라제를 10% 분산시킨 PU 디바이스 및 PU-PEG 디바이스로부터 약물 방출율을 비교하면 α -아밀라제의 방출율이 안지오텐신의 그것보다 다소 큰 것으로 나타났다. 이것은 디바이스에 내재된 약물의 입자도의 차이에 의한 것으로 사료된다. 안지오텐신과 α -아밀라제가 분산된 디바이스들은 4일 후부터 일정한 방출율을 보이고 있으며 (Fig. 3 및 4), 특히 안지오텐신의

생물학적 반감기가 15초인 데¹⁾ 반하여 소수성 고분자인 PU에 친수성 고분자 PEG를 그래프트한 공중합체에 안지오텐신을 분산시킨 디바이스는 지속적인 방출속도를 유지하고 있음을 고려할 때 PU-PEG 디바이스는 지속적인 펩티드계 약물 방출 매트릭스로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

결론

1. 소수성 고분자인 폴리우레탄(PU)에 친수성 고분자 폴리에틸렌글리콜(PEG)을 그래프트시켜 친수성과 소수성 성질을 동시에 갖는 공중합체는 안지오텐신과 α -아밀라제의 지속적 방출에 유효한 매트릭스로 사용될 수 있었다.

2. PU-PEG 디바이스에 분산된 안지오텐신과 α -아밀라제의 방출은 그래프트된 PEG에 의존하였으며 특히 PEG의 분자량, PEG의 겔-팽윤, PEG 존재시 펩티드의 자가응집에 의존하는 것으로 추정되었다.

3. PU-PEG 디바이스로부터 안지오텐신 및 α -아밀라제의 방출이 지속화되었으며 특히 PU-PEG 디바이스에 분산된 안지오텐신은 생체내 실험에서 지속적 활성이 있을 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 연구를 수행하는데 필요한 일부 경비는 문교부 학술조성비에 의해서 충당되었으며 이에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) R.A. Siegel and R. Langer, Controlled release of polypeptide and other macromolecules, *Pharm. Res.*, **1**, 2-10 (1984)
- 2) R. Langer, R. Siegel, L. Brown, K. Leng, J. Kost and E. Edelman, Controlled release: Three mechanism, *Chemtech.*, Feb., 108-110 (1986)
- 3) R. Langer, Controlled release of macromolecules, *Chemtech.*, Feb., 98-105 (1982)

- 4) R. Langer, L. Brown, E. Edelman and J. Kost, Controlled release and magnetically modulated release of polypeptide: Recent advances, 12th *Int. Symp. on Controlled Release of Bioactive Material*, 11-12 (1985).
- 5) P.W. Heyman, C.S. Cho, J.C. McRea, D.B. Olsen and S.W. Kim, Heparinized polyurethane: *In vitro* and *in vivo* studies, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 419-436 (1985)
- 6) 김영하, 정서영, 한동근, 조학인, 박전홍, 생체 적합성 고분자 재료 개발에 관한 연구 (III). 과학기술처 (1987)
- 7) S.W. Kim, C.D. Ebert, J.Y. Lin and J.C. McRea, Pharmaceutical approaches, *ASAIO*, **6**, 76-87 (1980)
- 8) R. Langer and J. Falman, Sustained release of macromolecules from polymer, in: R.J. Kostlink (ed), *Polymeric Delivery Systems*, Midland macromolecular monographs Vol. 5, Gordon and Breach Science Pub., N.Y., 1978, pp. 175-196
- 9) J.W. McGinity, L.A. Hunk and A.B. Combe, Effect of water soluble carriers on morphine sulfate release from silicone rubber, *J. Pharm. Sci.*, **68**, 662-664 (1979)
- 10) G. Dicolo, V. Carelli, E. Mannipier, M.F. Serafin, D. Vitale and F. Bottari, Effect of different water soluble additives on the sustained release of sulfanilamide from silicone rubber matrices, *IL Farmaco.*, **37**, 377-389 (1982)
- 11) S.H. Kim and S.W. Kim, Heparin release from hydrophobic polymer (1): *In vitro* studies, *Arch. Pharm. Res.*, **1**, 193-199 (1986)
- 12) 유재곤, 전성주, 김성호, 폴리우레탄-폴리에틸렌옥사이드-폴리프로필렌옥사이드 디바이스로부터의 헤파린 방출, *약제학회지*, **18**, 169-174 (1988)
- 13) W.D. Rhine, D.S.T. Tsieh and R. Langer, Polymer for sustained macromolecular release: Procedure to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics, *J. Pharm. Sci.*, **69**, 265-270 (1980)
- 14) H.M. Creque, R. Langer and Falkman, One month of sustained release of insulin from a polymer implant, *Diabetes*, **29**, 37-40 (1980)
- 15) E.W. Merrill and E.W. Salzman, Polyethylene oxide as a biomaterial, *ASAIO*, **6**, 60-64 (1983)
- 16) A. Polson, A theory for displacement of protein and viruses with polyethylene oxide, *Preparative Biochem.*, **7**, 129-154 (1977)
- 17) R. Mediana, J.J. Aragon and A. Sols, Effect of polyethylene glycol on the kinetic behavior of pyruvate kinase and other potentially regulatory liver enzyme, *FEBS*, **1**, 77-80 (1985)
- 18) S.I. Miekka and K.C. Ingham, Influence of self-associated protein on their precipitation by poly(ethylene oxide), *Arch. Biochem. Biophys.*, **191**, 525-536 (1978)