

## 새로운 생체적합성 폴리펩티드공중합체의 합성과 혈액적합성에 관한 연구 : 측쇄에 에틸렌글리콜을 함유하는 폴리펩티드 공중합체의 혈액적합성

姜仁圭\* · 朴相東 · 曹鍾守<sup>†</sup> · 成燻吉<sup>‡</sup>

경북대학교 공과대학 고분자공학과

<sup>†</sup>전남대학교 공과대학 고분자공학과

<sup>‡</sup>동국대학교 이과대학 화학과

(1992. 6. 15 접수)

## Synthesis and Blood Compatibility of New Biocompatible Copolypeptides : Blood Compatibility of Copolypeptide Having Ethylene Glycol Oligomers Substituted in the Side Chain

Inn-Kyu Kang\*, Sang Dong Park, Chong Su Cho<sup>†</sup>, and Yong Kiel Sung<sup>‡</sup>

Department of Polymer Science, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

<sup>†</sup>Department of Polymer Engineering, Chonnam National University, Kwangju 502-000, Korea

<sup>‡</sup>Department of Chemistry, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

(Received June 15, 1992)

**요 약.** Poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) (PBLG)와 말단에 아미노기를 갖는 polyethylene glycol (PEG)의 치환반응을 행하여 PEG-grafted PBLG (PEG-g-PBLG)를 합성하였다. 또한 PEG-g-PBLG 필름표면에 ethanolamine (EA)을 치환반응하여 표면에 히드록시그룹을 갖는 PEG-g-PBLG-EA 필름을 얻었다. 폴리펩티드중합체와 혈액성분과의 상호작용에 관한 실험결과, PEG-g-PBLG 상에서의 혈소판의 점착 및 형태변화는 PEG-g-PBLG-EA보다 적게 나타났고, PEG-g-PBLG상에서의 혈장 단백질의 응고시간은 PEG-g-PBLG-EA 또는 PBLG의 응고시간보다 길게 나타났다. 이들 결과는 혈액응고시간 및 혈액응고량을 조사한 실험 결과와 일치하였다. 따라서 폴리펩티드상의 히드록시그룹은 혈액성분과의 상호작용을 강하게 하여 혈액적합성이 저하하는 반면, PEG-g-PBLG는 비교적 좋은 혈액적합성을 나타냄을 알 수 있었다.

**ABSTRACT.** Polyethylene glycol (PEG) grafted poly ( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) (PBLG) was synthesized by the substitution reaction of PBLG and PEG having primary amino groups at both ends. PEG-g-PBLG films containing hydroxyl group were also prepared by the substitution reaction of PEG-g-PBLG film and ethanolamine (EA). Adhesion of platelets and activation of plasma proteins on the copolypeptide films were studied. The results showed that platelets are less adhered and activated on the PEG-g-PBLG than on other polypeptides and plasma recalcification time (PRT) on the PEG-g-PBLG was longer than that on other polypeptides. These results were consistent with those of blood clotting time and thrombus formation on the polypeptides. As a results, PEG-g-PBLG surfaces showed better blood compatibility than PBLG or PEG-g-PBLG-EA surfaces.

### 서 론

최근 합성고분자를 의료용고분자로 이용하고자 하는 연구가 활발하다. 합성고분자를 생체재료로서

사용하고자 할 때 많은 경우 생분해성이 요구되는데 합성폴리펩티드는 생체내에서 효소에 의해 아미노산으로 분해되어 흡수되므로 의료용 재료로서 주목

을 받고 있다. 그러나 합성폴리펩티드 자체만으로는 높은 기계적성질과 투과기능 등을 만족시키기 어렵다. 따라서 폴리펩티드에 제 2의 화학성분을 도입하여 생체기능을 어느 정도 충족시키고자 하는 연구가 행해지고 있다<sup>1-3</sup>.

Poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) (PBLG)의 측쇄에 fluoroalkyl<sup>4</sup> 혹은 dimethylsiloxane oligomer<sup>5</sup>를 도입하여 소수성의 폴리펩티드막을 합성하고 이들의 혈액적합성을 조사한 보고가 있다. 그 결과 극단적으로 소수성인 표면은 흡착단백질의 변형을 초래하지 않고 비교적 혈전형성을 적게하는 것으로 나타났다. 한편 고분자표면이 고도의 친수성을 나타내면 표면에 수화층(hydrated layer)을 형성하며 이러한 표면에서는 혈전형성이 일어나기 어렵다는 보고도 있다<sup>6</sup>. 또한 측쇄를 히드록시그룹으로 치환한 PBLG 함유물은 *in vitro*에서 효소에 의해 분해되는 것으로 밝혀 졌다<sup>7</sup>.

한편, 비이온성의 polyethylene glycol (PEG)은 친수성과 유연성을 나타내므로 고분자의 주쇄<sup>8</sup> 혹은 측쇄<sup>8-12</sup>에 도입하여 항혈전형성을 높이고자 하는 연구가 활발하다.

본 연구실에서는 PBLG의 측쇄에 에틸렌글리콜 올리고머를 도입하고 그 후 에탄올아민과 반응시켜 히드록시그룹을 도입하므로써 고탍수질의 폴리펩티드공중합체를 합성한 바 있다<sup>13,14</sup>. 이들 고탍수질을 이용한 약물방출특성에 관한 연구에서 5-fluorouracil의 고분자매트릭스로부터의 방출은 기질의 수팽윤성에 크게 의존하는 것이 확인되었다<sup>15</sup>. 본 연구에서는 이들 친수성폴리펩티드와 혈액과의 상호작용을 조사하여 혈액적합성 재료로서의 가능성을 평가하고자 한다.

## 실 험

### 재 료

벤질알코올과 L-글루탐산은 일본 Wako사의 특급 시약을 polyoxyethylene bis(6-aminoethyl) (PEG, MW: 3350)은 Sigma 제품을 사용했다. 아세트산에틸, 헥산, 트리에틸아민 (TEA), 디메틸포름아미드, 테트라히드로퓨란 등의 유기용매는 Tokyo Kasei 혹은 Wako 제품을 일반정제법에 의해 증류하여 사용하였다.

### 기 기

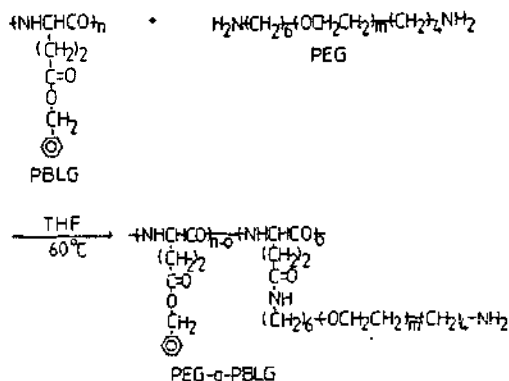
핵자기공명스펙트럼은 80 MHz Bruker Spectrospin을 사용하여 CDCl<sub>3</sub>에서 테트라메틸실란을 표준물질로 사용하여 측정하였다. 중합체표면의 적외흡수스펙트럼은 Jasco 0033 분광광도계에 ZnSe reflection element를 장착시켜 측정하였다.

### PBLG의 합성

L-글루탐산(30 g)과 벤질알코올(300 ml)을 혼합하고, 진한염산(50 ml)을 측매로 하여  $\gamma$ -benzyl L-glutamate(15.5 g)를 합성하고, 포스젠법에 의해  $\gamma$ -benzyl L-glutamate-N-carboxyanhydride ( $\gamma$ BLGNCA)를 합성했다. 단량체인  $\gamma$ BLGNCA(10 g)를 디클로로메탄(400 ml)에 녹이고 측매로서 트리에틸아민을 넣고 실온에서 개환중합을 행하여 PBLG를 합성하였다<sup>4</sup>.

### PBLG와 폴리에틸렌글리콜 (PEG)의 그라프트반응

PEG가 그라프트된 PBLG (PEG-g-PBLG)의 합성은 Scheme 1에 나타내는 바와 같이 행하였다. 즉 양말단에 아미노기를 갖는 PEG(2.2 g)와 PBLG(2 g)를 테트라히드로퓨란(60 ml)에 녹인 후 60°C에서 20시간 치환반응을 행하였다. 도입된 PEG의 함량은 PEG의 아미노핵실기의 메틸렌수소(1.3 ppm)와 PBLG 측쇄의 벤질기중의 메틸렌수소의 핵자기공명스펙트럼에서의 적분치를 비교하여 계산하였으며 그라프트공중합체의 수소핵자기공명스펙트럼은 이전의 연구에서 보고하였다<sup>13</sup>. 얻어진 PEG-g-PBLG 중합체는 디메틸포름아미드, 테트라히드로퓨란, 클로로포름 등의 유기용매에 용해하였다.



Scheme 1.

**PEG-g-PBLG 필름과 에탄올아민 (EA)의 표면반응<sup>16</sup>**

PEG-g-PBLG(1 g)를 클로르포름(25 ml)에 녹여 3 wt% 용액으로 한 후, 이 용액을 유리판에 유연시켜 용매를 제거하므로써 필름(7×2 cm)을 만든다. 이 필름을 60°C의 에탄올아민에 넣고 5시간 동안 필름표면의 치환반응을 행하였다. 그 후 필름을 메탄올로 3회 세척하고 다시 증류수로 씻어 미반응의 EA를 제거하였다. 표면에 도입된 FT-ATR-IR (Fourier Transform attenuated total reflection Infra-red) 스펙트럼에서 1720 cm<sup>-1</sup>의 에스테르피크의 강도가 현저히 감소하는 것으로부터 확인하였다.

**수분흡수율**

PBLG 및 PEG-g-PBLG 0.4 g을 각각 클로르포름 10 ml에 녹여 유리판에 유연시키고, 실온에서 대부분의 용매를 증발시켰다. 적외선램프(약 60°C) 하에서 가열 건조 후, 이 유리판을 증류수에 담구어 필름을 분리하였다. 분리된 필름은 최종적으로 실온에서 24시간 진공 건조하였다. PEG-g-PBLG 필름표면에 EA를 반응시킨 필름 및 상기 방법으로 제조한 두께 150 μm인 필름(1×1 cm)의 건조상태의 무게(W<sub>0</sub>)를 측정 한 후 증류수에 침적시켰다. 일정시간 후 필름을 꺼내어 표면의 수분을 제거하여 무게를 측정하였다. 이 조작을 반복하여 더 이상의 무게 증가율이 없을 때의 팽윤된 필름무게(W)를 측정하여 다음 식에 의해 수분흡수율을 계산하였다<sup>15</sup>.

$$\text{수분흡수율 (\%)} = (W - W_0) \times 100 / W_0$$

**접촉각 측정**

표면에 EA를 도입한 필름(PEG-g-PBLG-EA), PEG-g-PBLG 그리고 PBLG 필름의 공기측 표면에 micro syringe를 이용하여 작은 물방울(약 3 μl)을 부착시키고 고분자표면과 이루는 접촉각을 측정하였다. 한 가지 시료에 대해 위치를 바꾸어가며 5번 이상 측정하여 그 값의 평균을 접촉각으로 사용하였다<sup>17</sup>.

**혈액응고 실험**

**Imai-Nose method<sup>18</sup>.** 시험하고자 하는 PBLG 및 PEG-g-PBLG 시료를 클로르포름에 2 wt%로 녹여 watch glass(직경: 7.5 cm)에 유연시킨다. 대부분의 용매를 자연증발시키고 적외선 조사하(약 60°C)에

4시간 동안 가열 건조한 후 24시간 진공 건조하였다. 또한 PEG-g-PBLG를 watch glass에 코팅한 후 EA를 과량으로 접촉시켜 60°C에서 5시간 치환반응시킨 후 메탄올과 증류수로 충분히 씻은 후 건조하여 PEG-g-PBLG-EA 시료를 제조하였다. 혈액 실험에 앞서 시료를 증류수와 2시간 접촉시켜 팽윤시킨 후 tissue paper로 표면의 수분을 제거한 후 사용하였다. 37°C로 조절된 incubator에 시료를 올려 놓고 건강한 사람의 혈액을 채취하여 혈액응고방지제인 ACD (citric acid + sodium citrate + dextrose)를 10% 첨가하여 실험에 사용하였다. 혈액 200 μl를 마이크로 피펫으로 취하여 시료가 코팅된 watch glass에 접촉시킨다. 0.1 mol CaCl<sub>2</sub> 수용액을 50 μl 도입하여 일정하게 섞어줌으로써 혈액응고 반응을 개시한다. 반응개시 후 15분 경과하면 형성된 혈전에 적당량의 증류수를 가하여 혈액응고반응을 정지시키고 생성된 혈전을 분리하여 37% 포름알데히드 용액에 10분간 담구어 혈전의 고정화를 행한다. 그 후 tissue paper로 수분을 제거하고 생성된 혈전의 무게를 측정하였다. 비교시료로서 시료를 코팅하지 않은 watch glass를 사용하여 동일한 실험을 행하고 비교시료에 의해 형성된 혈전의 무게를 100으로 하여 폴리펩티드상에서의 혈전의 상대적인 양을 계산하였다.

**Lee-White method<sup>19</sup>.** PBLG 및 PEG-g-PBLG를 각각 0.4 g씩 클로르포름(14 ml)에 녹인 후 시험관(직경 1.2 cm, 길이 5 cm)의 밑부분에서 4 cm 높이 까지 코팅을 행하였다. 또한 PEG-g-PBLG를 코팅한 시험관에 EA(6 ml)를 넣고 60°C에서 5시간 반응시켰다. 그 후 메탄올 및 증류수로 미반응 EA를 씻어 시료로 사용하였다. Preswelling시킨 시료를 37°C로 조절된 항온조에 incubation 시킨다. 건강한 사람의 혈액 1 cc(혈액응고방지제를 포함하지 않는 혈액)를 채취하여 시료가 코팅된 시험관에 주입하였다. 4분이 지난 후 매 30초 마다 시험관을 약 45° 정도로 기울였을 때 혈전이 한 덩어리가 되어 흐름성이 완전히 중단될 때까지의 시간을 측정하였다. 이때 시간의 측정은 혈액을 채취한 순간부터 계산하였다.

**칼슘재침가 응고시간.** 시료는 Lee-White법에서 행한 것과 동일하게 하여 제조하였다. 먼저 건강한 사람으로부터 혈액을 채취하여 혈액응고방지제(ACD)를 넣어주고 2000 rpm으로 20분간 원심분리

하여 platelet rich plasma (PRP)를 얻은 후, 이것을 다시 5000 rpm으로 20분간 원심분리 시키므로서 platelet poor plasma (PPP)를 얻었다. 시료가 코팅된 시험관을 preswelling 시킨 후 PPP를 100  $\mu$ l 주입하고 0.025 mol의  $\text{CaCl}_2$  수용액(100  $\mu$ l)을 넣어 혈액이 응고할 때까지의 시간을 측정하여 plasma recalcification time (PRT)으로 사용하였다.

**혈소판 부착실험<sup>20</sup>.** 시료의 제조는 micro cover glass를 사용한 것을 제외하고 Lee-White법에서 채택한 것과 동일한 방법을 사용하였다. 건강한 사람의 혈액을 채취하여 ACD를 10% 넣은 후 1200 rpm으로 10분간 원심시켜 PRP를 얻었다. 시료가 코팅된 micro cover glass(15 mm)를 preswelling 시킨 후 PRP 50  $\mu$ l를 접촉시켜 5분간 정치한다. 그 후 인산완충 용액으로 가볍게 rinsing한 후 50, 70, 90, 100% 에탄올로 순차적으로 탈수한 후 포르말린으로 고정화하여 자연건조하였다. 혈소판이 부착된 시료를 gold coating한 후 주사형 전자현미경(scanning electron micrograph, SEM)으로 집착혈소판의 형태(morphology)를 관찰하였다.

### 결과 및 고찰

본 연구에서는 PBLG, PEG-grafted PBLG 및 필름표면에 히드록시기를 갖는 PEG-g-PBLG-EA를 합성하고, 이들 필름의 표면적흡성과 수분흡수율을 측정하였다. 합성한 3종류의 폴리펩티드막의 *in vitro* 혈액적합성을 조사하기 위해 혈액응고시간(whole blood clotting time), 혈전형성량(thrombus formed), 칼슘재침가 응고시간(recalcification time) 및 혈소판부착실험(platelet adhesion)을 행하였다.

**중합체의 합성 및 표면성질.** 이전의 보고<sup>13</sup>에서 양말단에 아미노기를 갖는 PEG와 PBLG와의 치환 반응을 행하고 이들의 디옥산중에서의 점도거동을 살펴보았다. 치환반응된 공중합체의 본성점도값은 PBLG 단독중합체보다 적은 값을 나타냈다. 치환반응에 사용된 PEG는 말단에 아미노그룹을 갖고 있으므로 그래프트, 분자내가교 또는 분자간가교 반응이 가능할 것이다. 그러나 PEG의 말단아미노기중 한쪽 혹은 양쪽 모두가 반응에 참여했는지를 확인하는 것은 현재로서는 불확실하다. 다만 치환반응된 공중합체의 유기용매에 대한 용해성이 떨어질 경우

부분적인 가교반응이 생겼을 것으로 볼 수 있을 것이다. 이전의 보고에서는 한쪽 말단에만 아미노기 또는 히드록시기를 갖는 PEG를 사용하여 PEG-grafted PBLG를 합성하였으므로 이것과 구별하기 위해 양말단에 아미노기를 갖는 PEG와 PBLG를 반응시킨 공중합체를 PEG-c-PBLG로 표기한 바 있다. 본 연구에서는 PEG와 PBLG의 치환반응체를 PEG-g-PBLG로 표기하기로 한다.

Marchant 등<sup>1</sup>은 PBLG 필름을 에탄올아민 및 diaminododecane 혼합액과 반응시켜 중합체표면의 친수화를 행하였다. 또한 Yano 등<sup>16</sup>은 PBLG 필름과 EA의 치환반응시간을 조절하여 친수성이 다른 PBLG 필름을 만들고, 이들 필름표면에서의 혈액응고율에 대해 고찰하였다. PEG-g-PBLG와 EA를 bulk 반응하여 얻은 공중합체는 DMF/ $\text{H}_2\text{O}$  혼합용액에만 녹으며 매우 높은 평윤도를 나타낸다<sup>15</sup>. 본 연구에서는 중합체의 bulk 특성은 유지하고 표면성질만을 바꾸어 주기 위해 PEG-g-PBLG 필름과 EA의 표면반응을 행하여 표면에 히드록시기가 도입된 PEG-g-PBLG-EA 필름을 얻었다. Fig. 1에는 PEG-g-PBLG 필름과 PEG-g-PBLG-EA 필름의 FT-ATR-IR 스펙트럼을 나타냈다. 표면에 에탄올아민이 치환반응된 PEG-g-PBLG-EA의 스펙트럼 (b)에서는 에스테르의 카르보닐기에 기인하는  $1720\text{ cm}^{-1}$ 의 흡수가 감소하였다. 이것은 에탄올아민이 치환반응되어 벤질에스테르기가 소멸하였기 때문이다. PBLG 필름과 EA를 반응시킬 때 초기 6기간 동안에는 치환반응이 매우 적게 일어나고 그 이후부터 급속하게 일어난다는 보고<sup>16</sup>가 있다. 이것은 PBLG 필름이 소수성이므로 초기에는 EA의 확산이 어렵기 때문이라고 설명하고 있다. 본 연구에서의 PEG-g-PBLG는 PBLG보다 친수성이므로 초기의 EA의 확산속도가 빠를 것으로 예상되어 반응시간을 5시간으로 하였다. ATR-IR의 경우 극표면과 함께 깊은 표면층까지 관찰되므로 정량적인 분석은 행하지 못하였고 Fig. 1에 나타내는 것처럼 정성적으로 EA의 도입을 확인하였다. Table 1에는 PBLG, PEG-g-PBLG 및 PEG-g-PBLG-EA 표면에서의 물의 접촉각과 수분흡수율을 나타냈다. PBLG의 물의 접촉각은  $68^\circ$  이었으나 에틸렌글리콜을 63 M 퍼센트 함유하는 PEG-g-PBLG는  $45^\circ$ 를 나타냈다. 한편 PEG-

g-PBLG 필름을 에탄올아민과 반응시켜 표면에 히드록시기를 도입한 PEG-g-PBLG-EA는 30°를 나타냈다.

물의 접촉각은 소수성 표면일수록 커지고 친수성 표면에서는 작아진다. 따라서 본 실험에서 사용한 3종류의 중합체표면의 친수성은 PEG-g-PBLG-EA <

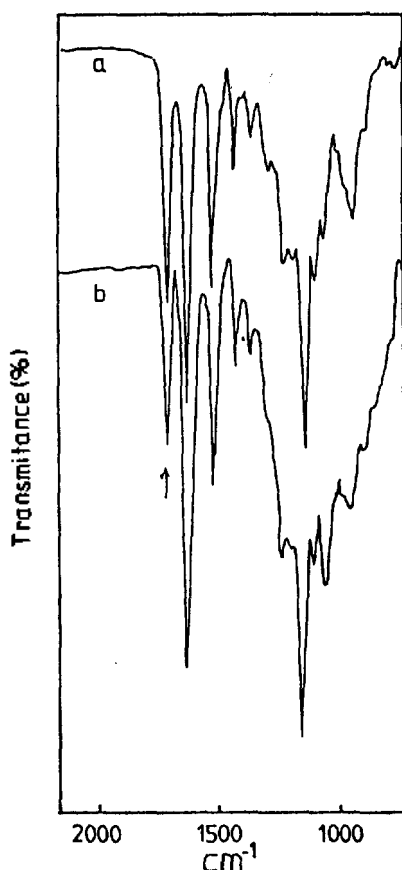


Fig. 1. FT-ATR-IR spectra of the PEG-g-PBLG film (a) and PEG-g-PBLG film treated with ethanolamine (b).

PEG-g-PBLG < PBLG의 순으로 작아짐을 알 수 있다. 또한 필름의 팽윤성을 나타내는 수분흡수율의 값을 비교해 볼 때 PBLG는 3퍼센트로서 팽윤성이 자극히 낮음을 알 수 있다. PBLG 측쇄에 친수성의 에틸렌글리콜이 63몰 페센트 함유됨으로써 수분흡수율은 16퍼센트로 증가하였다. 한편 폴리펩티드공중합체 필름을 에탄올아민으로 5시간 처리하므로써 처리된 필름의 수분흡수율은 71퍼센트로 대폭증가하였다. 이것은 막표면에 히드록시기가 대량 존재하여 물과의 상호작용이 증가하고, 그 결과 막표면에서의 물의 확산이 용이해진 것이 주요한 원인이라고 생각된다.

**중합체의 *in vitro* 혈액적합성.** 각종 고분자표면의 혈액적합성을 평가하는 방법으로 혈액을 표면에 일정시간 접촉시킨 후 생성된 혈전의 무게를 측정하는 Imai-Nose법과 시험관에 고분자를 코팅한 후 혈액을 접촉시켜 응고될 때까지의 시간을 측정하는 Lee-White법이 자주 이용되고 있다. 본 연구에서 합성된 폴리펩티드중합체의 혈액친화성을 검토하기 위해 상기 두 가지 방법 모두를 실시하여 비교하였다. Fig. 2에는 PBLG를 코팅한 watch glass에 혈액을 접촉시켰을 때 생성된 혈전의 무게와 접촉시간의 관계를 나타낸 결과이다. 혈전의 양은 접촉시간 15분까지 크게 증가하였으나 그 이후부터는 증가속도가 매우 완만하였다. 따라서 중합체 표면의 혈전형성율을 비교하기 위해 시료와 혈액의 접촉시간을 15분으로 고정한 후 합성된 폴리펩티드중합체의 혈액응고실험을 행하였다. Fig. 3은 폴리펩티드중합체 표면에 혈액을 15분간 접촉시켰을 때 생성된 혈전의 양을 glass와 비교하여 나타낸 결과이다. PBLG 단독중합체는 약 87%의 혈전형성량을 나타내었고 에틸렌글리콜을 함유하는 PEG-g-PBLG는 77%을 나

Table 1. Water contact angles and degree of water absorption of copolyptide films

Sample	BLG unit (mol %)	EG unit <sup>b</sup> (mol %)	Water contact angles(°)	Degree of water absorption(%)
PBLG	100	0	68 ± 3	3 ± 2
PEG-g-PBLG	37	63	45 ± 3	16 ± 3
PEG-g-PBLG-EA <sup>a</sup>	—	63	30 ± 5	71 ± 4

<sup>a</sup>Prepared by treatment of PEG-g-PBLG film with ethanolamine (EA) for 5 h at 60°C. <sup>b</sup>Experimental error is within 10%.

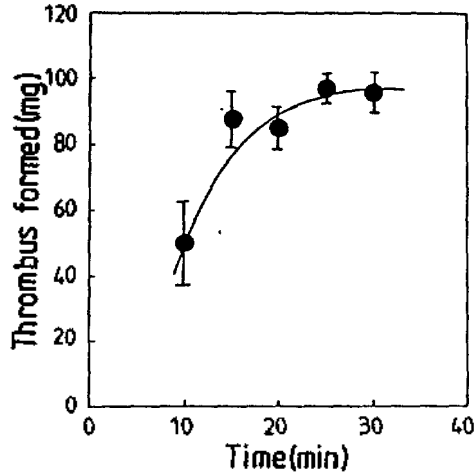


Fig. 2. Thrombus formation on poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate) as a function of incubation time measured by the Imai and Nose method<sup>13</sup>.

타내었다. 그러나 막표면에 히드록시그룹이 도입된 PEG-g-PBLG-EA는 약 93%의 혈전형성을 나타내었다. 한편, Fig. 4에는 Lee-White법에 의해 행한 혈액응고시간의 결과를 나타냈다. Fig. 4의 결과에서 혈액응고 시간이 길수록 혈액적합성이 양호함을 의미한다. 유리시험관에 신선한 혈액(1 cc)을 접촉시켰을 때 8분만에 혈액 모두가 응고되었다. 반면에 폴리펩티드를 코팅한 시험관에 혈액을 접촉시킨 경우 혈액응고 시간이 두배이상 길어졌다. 즉 PBLG 및 PEG-g-PBLG-EA는 약 16분을 나타냈고, PEG-g-PBLG는 19.3분을 나타냈다. 이들 결과는 Fig. 3에서 Imai-Nose법에 따라 행한 결과와 그 경향이 일치하고 있다. PBLG에 에틸렌글리콜이 63 mol% 도입되므로 친수성이 증가함과 동시에 혈액적합성이 개선되었다. Table 1에 나타낸 바와 같이 PEG-g-PBLG-EA의 수분흡수율(71%)은 PEG-g-PBLG(16%)보다 높아 고합수겔임을 알 수 있다. Bruck<sup>6</sup>은 고분자표면이 고합수겔인 경우 비교적 양호한 혈액적합성을 나타낸다고 하였다. 이러한 가설은 본 연구에서 합성한 폴리펩티드중합체에 있어서는 일치하지 않고 있다. 고합수겔인 PEG-g-PBLG-EA의 혈액적합성이 저하되고 있는 것은 표면에 존재하는 히드록시기의 역할이 중요할 것으로 생각된다. 생체적합성 실험에서 비교시료로서 자주 이용되는 glass 표면에는 히드록시그룹이 높은 밀도로 존재하고 있

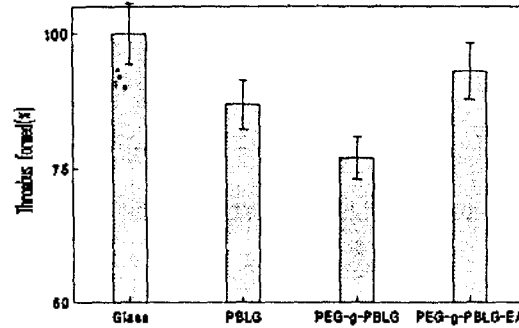


Fig. 3. Thrombus formation on several polypeptides for 15 min incubation measured by the Imai and Nose method<sup>13</sup>.

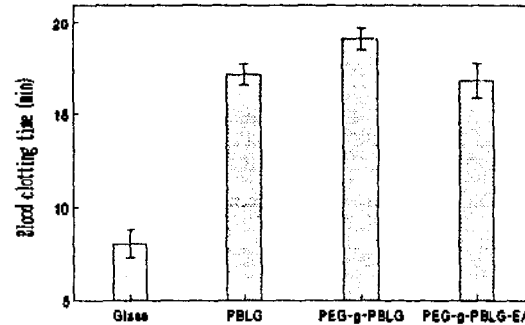


Fig. 4. Whole blood clotting time on several polypeptides measured by the Lee and White method<sup>14</sup>.

다. 또한 glass 표면에서는 섬유아세포의 정착율이 매우 높게 나타나는 것으로 보고되었다<sup>21</sup>. 또한 표면에 히드록시그룹을 갖고 있는 glass가 매우 높은 친수성을 나타내면서도 세포접착율이 큰 것은 glass의 높은 modulus 때문이라는 보고<sup>22</sup>도 있다. PEG-g-PBLG-EA의 경우 높은 팽윤성을 나타내면서 혈액친화성이 낮은 것은 표면에 도입된 히드록시기가 혈장단백질과 강한 상호작용을 하기 때문일 것으로 생각된다.

혈액이 재료와 접촉하여 혈전을 형성하는 과정은 일반적으로 두가지로 설명되고 있다<sup>23</sup>. 첫번째는 혈액에 존재하는 혈액응고계 단백질의 활성화에 의해 가교상의 피브린을 형성하는 과정이고, 두번째는 혈소판이 활성화되어 응집을 유발하는 과정이다. Table 2에는 시료를 코팅한 시험관에 혈액을 원심 분리하여 얻은 혈장단백질을 접촉시키고 칼슘을 첨가한 후 피브린이 형성될 때까지 시간을 측정한다.

결과를 나타냈다. Glass 표면에서의 혈장응고시간은 183초를 나타내었고, PBLG 및 PEG-g-PBLG-EA는 320 및 315초를 각각 나타내었다. 한편, PEG-g-PBLG는 425초로서 혈장응고시간이 대폭 지연되었다. 이와 같은 혈액응고인자에 의한 활성화실험결과는 *in vitro* blood clotting test의 결과(Fig.3 및 Fig.4)와 일치하고 있다. 즉 PEG-g-PBLG는 PBLG 또는 PEG-g-PBLG-EA보다 혈장단백질과의 상호작용이 적으므로 혈액적합성의 면에서 유리하다고 할 수 있다.

Fig.5는 폴리펩티드표면에 혈소판을 5분간 접촉시켰을 때의 부착된 혈소판의 형태를 관찰한 주사형전자현미경 사진이다. PBLG 표면에는 비교적 높은 혈소판부착율이 나타났고 PEG-g-PBLG와 PEG-g-PBLG-EA에서는 혈소판부착율이 낮았다. 혈소판이 재료표면과 강한 상호작용을 하게 되면 부착 후 형태변화가 심하게 나타난다. 이러한 형태변화는 혈소판끼리의 응집을 유발시키며 이때 백혈구와 적혈구도 가담하여 혈액전체가 응고하게 된다. 전자현미경사진으로부터 부착된 혈소판의 형태변화를 살펴본 결과, PBLG 상에서 가장 심하게 일어나고 있고, PEG-g-PBLG는 비교적 형태변화가 적으며

PEG-g-PBLG-EA는 중간정도의 변화를 나타내고 있다. 혈관의 내벽에는 내피세포가 단층(monolayer)을 형성하고 있어 이상적인 항혈전성을 나타내고 있다. 이것은 내피세포층에서는 혈소판이 집착 및 응집을 유발하지 않기 때문이다. 그러나 혈액이 인공재료와 접촉하게 되면 대개의 경우 혈전을 형성하게 되는데, 이때의 혈액응고의 주된 요인은 혈소판이 집착하여 응집하기 때문이다<sup>24</sup>. 따라서 혈소판과 재료표면과의 상호작용에 관한 연구는 혈액적합성재료의 개발연구에서 중요하게 인식되고 있다. Yokoyama 등<sup>8</sup>은 PBLG에 PEG(MW : 900)를 25~30 wt% 그래프트반응시킨 중합체상에서는 임파구의 집착이 매우 적게 일어난다고 보고하였다. 본 연구에서 합성된 PEG-g-PBLG의 PEG 함량을 중량퍼센트로 환산하면 25 wt%이며, 이 중합체는 PBLG 및 PEG-g-PBLG-EA보다 낮은 혈전형성을 나타냈다. 메타크릴산메틸 (MMA)과 PEG(*n*=4, 9, 15, 23, 50, 100)를 측쇄에 갖는 메타크릴산(MnG)과의 공중합체를 이용한 혈소판과의 상호작용에 관한 연구가 행해졌다<sup>12</sup>. 이때 PEG의 중합도가 50과 100인 공중합체 표면에서는 혈소판의 집착이 거의 없었다. 이것은 PEG 체인이 혈액과 접촉하여 충분히 수화되고, 이 수화된 PEG 체인이 혈장단백질과 상호작용하면 PEG 체인의 엔트로피 감소로 반발력이 작용하여 단백질을 밀어내는 것이 원인이 되어 혈소판집착이 억제된다고 설명되고 있다.

항혈전성 고분자재료를 연구하는데 있어서 몇 가지 가설이 제시되어 왔다. 예를 들면 낮은 계면에 너지력을 갖는 재료<sup>25</sup>, 미세상분리구조를 나타내는 재료<sup>26</sup>, 고탍수겔재료<sup>6</sup> 등을 들 수 있다. 본 연구에서는

Table 2. Plasma recalcification time(PRT) of PBLG and copolypeptides

Sample	Water contact angles(°)	Recalcification time(sec)
Glass	25 ± 2	183 ± 17
PBLG	68 ± 3	320 ± 25
PEG-g-PBLG	45 ± 2	425 ± 22
PEG-g-PBLG-EA	31 ± 3	315 ± 15

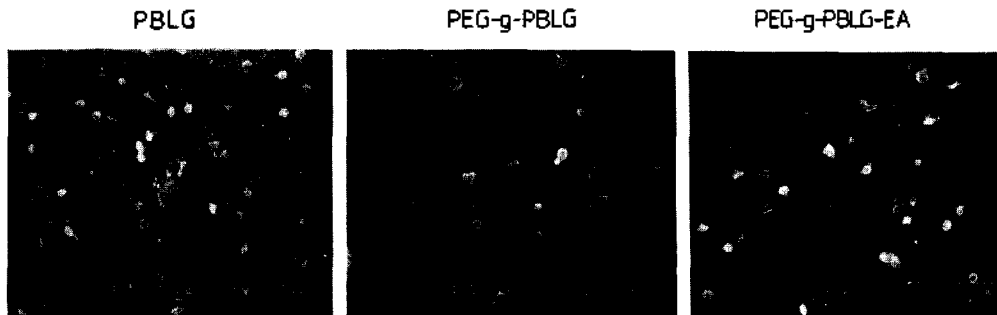


Fig. 5. SEM photographs of human platelets adhered to several polypeptides.

L-글루탐산을 출발물질로하여 얻은 poly( $\gamma$ -benzyl L-glutamate)의 측쇄에 친수성의 폴리에틸렌글리콜을 도입하고, 또한 에탄올아민을 치환반응시켜 팽윤성이 서로 다른 폴리펩티드 중합체를 얻고 이들의 혈액성분과의 상호작용을 조사하였다. 혈장을 이용한 칼슘재침가실험 및 혈소판 점착실험으로부터 폴리에틸렌글리콜을 그래프트시킨 PEG-g-PBLG 중합체는 흡착단백질의 활성화를 억제하고, 혈소판점착을 및 형태변화가 적어 항혈전성이 향상되었음을 알 수 있었다. 한편 PEG-g-PBLG-EA는 고합수율을 나타내는 표면층을 갖고 있지만 표면에 도입된 히드록시그룹의 혈장단백질과의 강한 상호작용으로 인하여 흡착단백질이 활성화하고 점착혈소판의 형태변화도 동반되어 항혈전성이 낮아진 것으로 사료된다.

본 연구는 1991년도 문교부 첨단공학(신소재분야) 학술연구 조성비에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

1. R. Marchant, A. Hiltner, C. Hamlin, A. Rabinovitch, R. Slobodkin, and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, **17**, 301 (1983).
2. T. Kumaki, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 785 (1985).
3. C. S. Cho, S. C. Song, S. P. Suh, K. Y. Kim, S. W. Jang, and Y. K. Sung, *Polymer (Korea)*, **13**, 657 (1989).
4. Y. Ito, K. Iwata, I.-K. Kang, M. Sisido, and Y. Imanishi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 201 (1988).
5. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *Int. J. Biol. Macromol.*, **10**, 169 (1988).
6. S. D. Bruck, *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 173 (1972).
7. T. Hayashi, K. Takeshima, E. Kobatake, and A. Nakajima, *Kobunshi Ronbunshu*, **42**, 777 (1985).
8. M. Yokoyama, T. Nakahashi, T. Nishimura, M. Maeda, and S. Inoue, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, 867 (1986).
9. Y. Mori and S. Nagaoka, H. Takiuchi, T. Kikuchi, N. Noguchi, H. Tanzawa, and Y. Noishiki, *Trans. Am. Soc. Artif. Int. Organs*, **28**, 459 (1982).
10. J. H. Lee, J. Kopecek, and J. D. Andrade, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 351 (1989).
11. Y. H. Kim, K. D. Ahn, S. Y. Jeong, K. D. Park, D. K. Han, and H. I. Cho, "Blood Compatibility of Hydrophilized and Heparinized Polyurethanes", International Biomaterials Science Workshop, Tokyo, "Future Trends of Biomedical Polymers for Diagnostics and Therapeutics", Preprint, pp. 61~64 (1986).
12. S. Nagaoka, Ph. D. Thesis, Kyoto University, Kyoto, 1982.
13. I.-K. Kang, D.-R. Kwon, C.-S. Cho, and Y. K. Sung, *J. Korean Chem. Soc.*, **34**, 199 (1990).
14. I.-K. Kang, D.-R. Kwon, C.-S. Cho, and Y. K. Sung, *J. KOSOMBE*, **10**, 237 (1989).
15. I.-K. Kang, D.-R. Kwon, and Y. K. Sung, *Polymer (Korea)*, **15**, 481 (1991).
16. E. Yano, T. Komai, T. Kawasaki, K. Kaifu, T. Atsuta, Y. Kubo, and Y. Fujiwara, *J. Biomed. Mater. Res.*, **19**, 863 (1985).
17. C. Chiappori, S. Russo, and A. Turturro, *Polymer*, **22**, 534 (1981).
18. Y. Imai and Y. Nose, *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 165 (1972).
19. R. L. Lee and P. D. White, *J. Am. Med. Sci.*, **145**, 495 (1913).
20. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 595 (1988).
21. I.-K. Kang, Y. Ito, M. Sisido, and Y. Imanishi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **23**, 223 (1989).
22. A. S. Hoffman, *J. Biomed. Mater. Res.*, **20**, ix-xi (1986).
23. D. D. Soloman, D. H. Cowan, J. M. Anderson, and A. G. Walton, *J. Biomed. Mater. Res.*, **13**, 765 (1979).
24. S. W. Kim, S. Wisniewski, E. S. Lee, and M. L. Winn, *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, **8**, 23 (1977).
25. S. K. Chang, O. S. Hum, M. A. Moscarello, A. W. Mann, W. Zing, M. J. Leutheusser, and B. Reugsegger, *Med. Progr. Technol.*, **5**, 57 (1977).
26. T. Okano, S. Nishiyama, I. Shinohara, T. Akaie, and Y. Sakurai, *Polym. J.*, **10**, 223 (1978).