

카테콜 함유 생체모방 점막접착형 고분자의 합성 및 특성 연구

박동진 · 이상진 · 이상천*†

경희대학교 나노의약생명과학과, *경희대학교 치의학전문대학원 약안면생체공학과
(2013년 4월 26일 접수, 2013년 5월 9일 수정, 2013년 5월 10일 채택)

Synthesis and Characterization of Catechol-Containing Biomimetic Mucoadhesive Polymers

Dong Jin Park, Sang Jin Lee, and Sang Cheon Lee*†

Department of Life and Nanopharmaceutical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea
*Department of Maxillofacial Biomedical Engineering and Institute of Oral Biology, School of Dentistry,
Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

(Received April 26, 2013; Revised May 9, 2013; Accepted May 10, 2013)

초록: 점막접착 기능은 인체의 다양한 장기에 적용되는 의료용 접착체에 요구되는 중요한 특성이며, 점막접착 기능을 갖는 고분자를 개발하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근 많은 연구자들이 생체모방 기술을 통한 점막 접착형 고분자를 개발하고 있고, 그 중 해양 부착 생물인 홍합의 접착 기능 및 특성이 접착제 연구의 주요 대상이 되어왔다. 본 연구에서는 홍합 접착 물질 속에 과량 존재해 표면 접착 기능을 발현하는 카테콜 구조가 도입된 생체 모방형 고분자를 합성하였고, 핵자기공명분광법 및 젤투과크로마토그래피를 사용하여 분석하였다. *In vitro* 상에서 돼지의 소장점막하조직 sheet를 준비하여 전단 시편을 제작하고 점막접착력을 측정하였다. 점막접착형 고분자는 현재 상업적으로 사용되고 있는 대조군인 피브린글루와 비교할 때 월등한 접착력을 보였다. 또한, 다양한 인자를 변화시키며 최적의 점막접착력을 나타내는 조건을 확립하였다. 이러한 결과들을 토대로 우수한 점막접착형 특성을 나타내는 고분자를 개발하였고 다양한 임상적용 및 의료용 기기에 도입가능한 소재의 기초연구를 수행하였다고 사료된다.

Abstract: Mucoadhesive property is the major function as an adhesive for medical devices, and therefore, these days many researches have conducted to develop polymers having this property. Recently, biomimetic technology has been used for developing mucoadhesive polymers. Among many technologies, mussel-inspired approaches have received noticeable attention because of its thread's strong adhesive characteristics. In this study, we synthesized mucoadhesive biomimetic polymers employing catechol structures which are abundant in mussel adhesive proteins, and their structures and molecular weights were characterized by using nuclear magnetic resonance spectroscopy and gel permeation chromatography. To evaluate *in vitro* mucoadhesive strength, the sheet type of the small intestinal porcine submucosa was prepared. Compared to commercial fibrin glue adhesives, catechol-containing mucoadhesive polymers showed enhanced adhesive strength. The study of adhesive strength with considering diverse factors, such as temperature, pressure, and oxidant amount indicated that mussel-inspired mucoadhesive polymer could be a promising candidate for an adhesive in various biomedical applications.

Keywords: mussel, biomimetic, mucoadhesive, catechol.

서 론

점막접착 기능을 발현하는 의료용 고분자는 다양한 기술 및 인체내 의료용 기기 적용에 광범위하게 사용되고 있다.¹ 임상적인 사용이 가능하기 위해선 생체적합성이 우수하고 충분한 점막접착력을 가진 접착제가 필요하다. 이러한 접착물

질을 개발하기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있는데, 그 중 임상적으로 사용하고 있는 피브린글루(fibrin glue)는 뛰어난 생체적합성을 가지고 있지만 조직표면에서의 접착능력이 떨어지는 단점을 가지고 있다.^{2,3}

최근 여러 연구자들이 생체모방(biomimetic) 기술을 통한 점막접착형 고분자를 개발하고 있다.^{4,5} 그 중 홍합(mussel)은 해양 부착 생물로서 수중에서 다양한 표면에 접착이 가능한 독특한 특성으로 인해 접착제 연구의 주요 대상이 되어왔다.⁴ 홍합의 발에서 분비된 실(thread)은 물속에서 바위 표면

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: schlee@khu.ac.kr

에 강력히 접착하는데 이 실들은 3,4-dihydroxy-*L*-phenylalanine(DOPA) 카테콜 전구체를 많이 포함하고 있다.^{6,7} 이러한 이유로 홍합을 이용한 생체모방물질로서 DOPA는 잠재적인 내수성 생체접착제로 여겨져 왔다.⁸ 또한 DOPA는 인체에 무해하며 면역반응을 거의 유도하지 않는다고 알려져 있다.⁹ 홍합의 실이 발현하는 접착기능에 대한 명확한 메카니즘 이해는 아직 이루어지지 못하였으나, 실에 많이 존재하는 DOPA 부분이 산화제나 효소에 의하여 축진된 상호결합에 의해 접착력이 생긴다고 보고되어 왔다.^{10,11}

본 연구에서는 이러한 자연적 특성을 모방한 DOPA의 카테콜(catechol) 구조가 도입된 접착형 고분자를 개발하는데 초점을 두었다. DOPA 구조가 표면에 접착하는 현상은 우선적으로 구조 내 카테콜의 두 히드록실(hydroxyl)기가 물질 표면에 결합하고, 그 후 산화에 의해 퀴논(quinone)으로 바뀌며 퀴논 분자간 화학결합 및 DOPA의 일차아민과 퀴논과의 연쇄적인 네트워크 형성반응을 통해 이루어진다. 또한 최근 카테콜 그룹의 두 hydroxyl 그룹은 점막의 글라이코프로테인의 글루코오스와 강력한 multiple 수소결합을 한다는 연구보고가 있었다.¹² 따라서 카테콜 구조가 도입된 고분자는 적절한 산화제로 유도 축진된 가교반응으로 인한 점막접착능력의 향상을 기대할 수 있다. 또한 인체적용을 위해 물에 용해가 가능한 고분자 형태로 개발하는 것이 중요하고, 적용 후 카테콜 산화에 의해 가교 및 접착특성이 발현되도록 설계된 고분자가 확보되어야 한다. 따라서 친수성이 부여된 카테콜 함유 고분자를 위해 생체적합성 poly(ethylene glycol) (PEG)를 고분자 골격의 주 성분으로 도입하는 것이 고려되었다.

본 연구에서는 카테콜 구조가 도입된 홍합 생체모방형 친수성 고분자를 합성하였고 이를 핵자기공명분광법 및 젤투과 크로마토그래피로 분석하였다. 또한 돼지의 소장점막하조직(SIS, small intestinal submucosa)을 sheet 형태로 가공하여 전단 시편을 준비한 후 universal testing machine(UTM)을 이용하여 점막접착력을 측정하였다. 카테콜을 함유한 점막접착형 고분자는 현재 상업적으로 사용되고 있는 대조군인 피브린글루와 비교할 때 월등한 점막접착력을 보였다. 또한 다양한 인자들을 고려한 점막접착 환경에서 접착력을 평가하여 최적의 접착력을 갖는 조건을 확립하였다.

실 험

시약. Dopamine hydrochloride, sodium borate($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), sodium bicarbonate(NaHCO_3), methacrylate anhydride, PEG methyl ether methacrylate(M.W.: 1100) (PEG-MA), sodium periodate (NaIO_4), ferric nitrate, 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride(EDC)는 Aldrich사(Milwaukee, WI)에서 구입한 후 부가적인 정제과정 없이 사용하였다. Azobisisobutyronitrile(AIBN)은 Aldrich사에서 구

입한 후 methanol에서 재결정한 후 사용하였다. 실험에 사용된 물은 MilliQ Plus 기기를 상용하여 증류하였고, 탈 이온화시킨 후, 역 삼투압 법에 의해 정제하였다. Ethyl acetate(EA), hexane, tetrahydrofuran(THF), methanol, *N,N*-dimethylformamide(DMF) 등의 용매를 포함해 실험을 위해서 분석용 등급의 시약을 사용하였다. 피브린글루는 Baxter에서 구입해서 사용하였다.

접착형 수용성 고분자 합성. Catechol Monomer(Catechol-MA)의 합성: 중합이 가능한 catechol 화합물을 합성하기 위해 catechol methacrylamide(Catechol-MA)를 합성하였다.¹³ Dopamine hydrochloride(50 g), $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (100 g), NaHCO_3 (80 g)을 증류수(D.W.) 500 mL에 함께 용해시켰다. 질소가스로 20분 동안 버블링해 준 후, 수용액에 methacrylate anhydride(49 g)의 THF(250 mL) 용액을 천천히 떨어뜨렸다. 1 M NaOH를 사용하여 pH 8로 맞춘 후 14시간 동안 질소 가스 하에 상온에서 반응시켰다. 생성물은 filtering을 통하여 미반응 물질들을 제거하고, EA(25 mL)로 washing 하였다. 생성물을 6 M HCl를 사용하여 pH 2로 만들어 준 후 EA(1000 mL)로 추출하였다. 무수 MgSO_4 로 잔존하는 수분을 제거한 후 rotary evaporator로 EA를 제거하여 최종부피를 500 mL로 만들었다. 그 후 생성물을 hexane에 침전으로 얻어, 냉장시켜 재결정화시켰다. 침전물을 filtering으로 얻어낸 후 EA(400 mL)에 녹이고 다시 한번 hexane에 재침전시켰다. 얻어낸 생성물을 filtering 후 상온에서 진공 건조시켜 최종 생성물인 catechol-MA 얻었다.

Catechol-MA와 PEG-MA의 공중합 반응: Catechol을 함유한 점막접착형 수용성 고분자 poly(catechol methacrylamide-co-EG methacrylate) (CA-PEG)를 합성하기 위해 catechol-MA와 PEG-MA를 자유라디칼 중합반응으로 공중합시켰다. PEG-MA를 DMF에 용해시킨 후, catechol-MA를 함께 용해시켰다. 그 후 온도를 60 °C로 올려준 후 라디칼 개시제인 AIBN을 첨가하고 3시간 동안 600 rpm으로 stirring을 하였다. 반응 후에 온도를 실온으로 내린 후, 반응물을 diethyl ether에서 침전으로 얻어 filtering 후에 상온에서 진공건조하여 최종 생성물인 CA-PEG 고분자를 얻었다.

수소핵자기공명분광법. 합성된 catechol-MA와 CA-PEG의 구조 분석 및 합성여부는 proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) 스펙트럼을 통해 확인하였다. 분석용 샘플은 고분자 10 mg을 dimethyl sulfoxide-*d*₆ 1 mL에 용해시켜 준비하였고 400 MHz NMR spectroscope(Bruker Avance 400)를 이용하여 측정하였다.

젤투과크로마토그래피(GPC). 젤투과크로마토그래피를 통해 CA-PEG의 분자량과 분자량 분산도를 측정하였다. GPC 유동상 용매는 THF를 사용하였고, 샘플은 고분자 30 mg을 THF 1 mL에 용해하여 준비해 분자량 측정을 수행하였다. GPC 분석은 Waters® 2414 refractive index detector, 515

high performance liquid chromatography(HPLC) pump, and Styragel® high-resolution(HR) columns(HR1, HR2, and HR4) 이 장착된 GPC 기기를 사용하였고, THF를 유동상으로 하여 1 mL/min의 유속을 이용하여 측정하였다. 분자량 및 분자량 분포는 폴리스티렌 스탠다드를 사용하여 정하였다.

CA-PEG의 가교 특성 평가. 가교 특성을 평가하기 위해 CA-PEG를 D.W.에 600 mg/mL 농도로 용해시키고, 고분자 수용액에 NaIO₄(20 mL, 500 mM)을 넣어준 후 섞어주었다. 그 후 50°C 오븐에 3시간 동안 넣어둔다. 3시간 후 꺼내어 고분자 수용액이 담긴 vial을 vertical 위치로 뒤집어 흐름이 있는 액체인지 또는 유동성이 없는 겔화(gelation)된 상태인지를 조사하였다.

고분자의 접착강도 평가. SIS Sheet의 준비: 돼지의 jejunum을 얻은 후 겉에 붙은 지방을 제거하고 10 cm 크기로 잘라낸 후 saline solution으로 세척하였다.¹⁴ 장막과 장근육을 제거하고 saline solution으로 다시 세척한 후에 -55°C에서 48 시간 동안 동결건조를 하였다. 동결건조 한 후에 freezer mil로 -198°C에서 10~20 µm 크기로 만든 후, 10 mL vial에 3% acetic acid와 0.1% pepsin이 포함된 채로 48시간 동안 stirring 하면서 콜라겐의 비삼중나선구조를 제거하였다. SIS solution을 silicone 몰드를 이용해서 원하는 모양으로 만들어 준 후 10 mM EDC가 첨가된 D.W.와 ethanol(5/95, v/v) 혼합용액에서 24시간 동안 가교 반응을 하였다. 몰드를 40°C 물에 담근 후 동결 건조하였다. 제조된 SIS sheet는 전단시편 제작을 위해 Figure 1과 같이 1×0.5 cm 크기로 잘라 준비되었다.

전단 시편의 제작: Titanium(Ti) plate를 이용하여 고분자의 접착강도를 평가하기 위한 시편을 제작하였다. 우선, Ti plate를 5×0.5 cm 크기로 자르고 SIS를 Figure 2와 같이 위 아래 Ti의 한 쪽 끝에 cyanoacrylate계 접착제인 Krazy Glue(Elmer's

Products Inc., Columbus, OH)로 고정화시켰다. 위 아래 Ti plate에 접착된 SIS 사이에 접착형 소재의 수용액을 도입한 후 UTM을 사용하여 다양한 조건에서 점막 접착력을 평가하였다.

접착강도 측정: CA-PEG를 600 mg/mL 농도로 D.W.에 용해시켜 15 µL를 취한 후 수용액에 0.3 M NaIO₄, 0.3 M ferric nitrate, D.W.를 각각 3 µL씩을 넣어 세가지 조건의 혼합액을 제조하였다. Ti substrate에 SIS를 붙인 시편 2개 사이에 세가지 조건의 혼합액 또는 fibrin adhesive 18 µL를 넣어준 후 38°C 오븐에 3시간 동안 넣었다. 제조된 네 가지 접착물질 ((i) 피브리린글루, (ii) CA-PEG + D.W., (iii) CA-PEG + Fe³⁺, (iv) CA-PEG polymer + IO₄⁻)이 도입된 시편을 universal testing machine(Instron 5544, norwood, MA)으로 전단응력을 평가하였다. ASTM D1002 standard method를 이용해 측정하였으며 각각의 시편을 고정시킨 후 2 mm/min의 속도로 연신시켰다(n=3).

다양한 인자 변화에 따른 접착강도 측정. 온도 변화에 따른 접착강도 측정: CA-PEG를 600 mg/mL 농도로 D.W.에 용해시킨 후, 15 µL씩 세 샘플을 취해 0.3 M NaIO₄ 수용액 각각 3 µL씩 넣어 혼합액을 제조하였다. Ti substrate에 SIS를 Krazy Glue로 접착시킨 후 시편 3개에 제조한 세 가지 조건의 혼합액 18 µL를 넣은 후, 25, 37, 45°C 오븐에 3시간 동안 넣었다. 이렇게 제조된 세 가지 접착물질(CA-PEG + IO₄⁻ at 25°C (i), 37°C (ii), 45°C (iii))이 도입된 시편을 UTM으로 전단응력을 평가하였다. 각각의 시편을 고정시킨 후 2 mm/min의 속도로 연신시켰다(n=3).

압력 변화에 따른 접착강도 평가: 상기 언급한 것과 동일하게 과정을 진행한 후, 시편 4개에 제조한 네 가지 조건의 혼합액 18 µL를 넣어준 뒤 37°C 오븐에 3시간 동안 넣었다. 이렇게 제조한 네 가지 접착물질(CA-PEG without pressure (i), CA-PEG with pressure(300 g) (ii), CA-PEG + IO₄⁻ without pressure (iii), CA-PEG + IO₄⁻ with pressure(300 g) (iv))이 도입된 시편을 UTM으로 전단응력을 평가하였다. 각각의 시편을 고정시킨 후 2 mm/min의 속도로 연신시켰다(n=3).

산화제 양 변화에 따른 접착강도 평가: CA-PEG를 600 mg/mL 농도로 D.W.에 녹인 후, 15 µL씩 네 샘플을 취해 50, 100, 200, 300, 500 mM 함량으로 변화시켜 가며 NaIO₄ 수용액을 각각 3 µL씩 넣어 혼합액을 제조하였다. Ti substrate에 SIS를 Krazy Glue로 접착시킨 후 시편 5개에 제조한 다섯 가지 조건의 혼합액 18 µL를 넣어준 뒤 37°C 오븐에 3시간 동안 넣었다. 이렇게 제조한 다섯 가지 접착물질(CA-PEG with 50 mM NaIO₄ (i), 100 mM NaIO₄ (ii), 200 mM NaIO₄ (iii), 300 mM NaIO₄ (iv), 500 mM NaIO₄ (v))이 도입된 시편을 UTM으로 전단응력을 평가하였다. 각각의 시편을 고정시킨 후 2 mm/min의 속도로 연신시켰다(n=3).

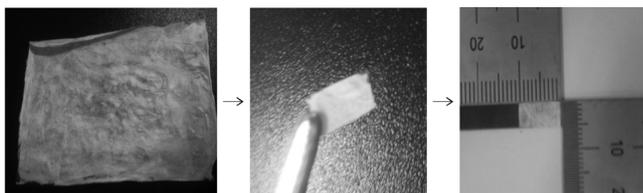


Figure 1. Preparation of SIS sheet.

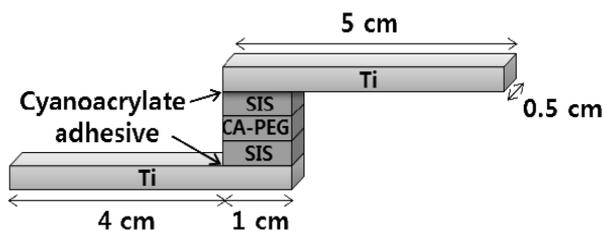


Figure 2. Preparation of lab shear joint.

결과 및 토론

Catechol 함유 접착형 수용성 고분자 합성. Catechol-MA의 합성 및 분석: 접착 특성을 갖는 catechol을 수용성 고분자인 PEG와 중합시켜 CA-PEG polymer를 제조하기 위해, 우선 dopamine을 methacrylate anhydride와 반응시켜 catechol-MA를 합성하였고 반응수율은 80%로 얻어졌다. Catechol-MA는 dopamine 벤젠의 3번 및 4번 위치의 히드록실 그룹을 boron으로 프로텍션하여 친핵성을 제거한 후, basic한 조건에서 dopamine의 일차아민이 methacrylate anhydride를 공격하는 과정을 통해 합성되었다(Figure 3).

Dopamine은 알칼리 pH에서 catechol 히드록실 그룹이 퀴논으로 변환되는 산화반응을 통해 self-crosslinking이 일어나는 특성이 있으므로, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 을 사용하여 catechol 히드록실 그룹의 산화를 억제시킨 후 반응하는 것이 중요하였다. Catechol-MA의 구조분석은 $^1\text{H NMR}$ 을 통해 수행하였다. 그 결과 catechol benzene ring(6.21~6.81 ppm)과 metha 위치의 CH_3 (1.81 ppm) 및 이중결합 수소(5.21 및 5.72 ppm)의 적분값을 통해 catechol-MA의 구조를 확인하였다.

CA-PEG의 합성 및 분석: Catechol-MA 단량체와 PEG-MA의 라디칼 공중합을 통해 CA-PEG를 합성하였다. Catechol-MA와 PEG-MA는 아크릴 이중결합으로 이루어져 있기 때문에 60°C 에서 AIBN를 사용하면 자유라디칼 중합으로 합성이 가능하다(Figure 3). Catechol-MA와 PEG-MA를 AIBN을 통해 중합한 후 $^1\text{H NMR}$ 을 통해 구조를 분석하였다(Figure 4). 그 결과 catechol과 PEG로 구성된 고분자 구조를 확인하였고, catechol의 benzene ring의 수소(6.24~6.78 ppm)와 PEG의 수소(3.55 ppm)의 적분값을 통해 합성한 수용성 접착고분자의 catechol 조성이 27 wt%임을 확인하였다. 접착특성이 뛰어난 홍합단백질의 구성성분 중 catechol 구조가 약 30 wt% 정도 함유되어 있는 것으로 알려져 있다.⁹ 접착력을 발현하는데 catechol 구조가 큰 역할을 하므로, 합성고분자를 제조할 때 홍합단백질에 함유된 catechol 함량만큼 catechol 구조를 함유하도록 디자인 하는 것이 중요하다고 할 수 있다. 본 연구에서는 DOPA 구조 기준으로 27 wt%까지 함량을 증가시

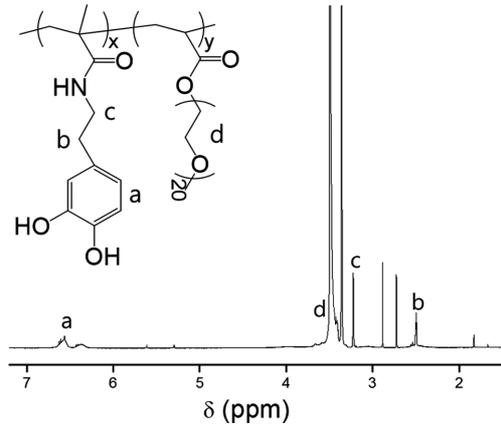


Figure 4. $^1\text{H NMR}$ spectrum of CA-PEG.

킬 수 있었다. 기존에 star 형 PEG 말단에 DOPA 구조를 도입한 연구가 있었으나, DOPA함량이 6 wt% 또는 그 이하로 상당히 낮았다.^{15,16} 따라서 본 연구의 합성방법이 높은 접착성의 고분자를 제조하는데 유용하리라 사료된다.

GPC 분석을 통해 CA-PEG의 분자량 및 분자량 분포를 확인하였다. CA-PEG는 중량평균 분자량(M_w)이 32000 g/mol로 측정되었으며 분자량 분포도(M_w/M_n)는 3.21로 확인되었다.

CA-PEG의 가교 특성 평가. 수용액상에서 CA-PEG는 산화제 존재하에 가교반응이 가능하게 된다. 보통 NaIO_4 , $\text{Fe}(\text{NO}_2)_3$ 등의 산화제를 첨가하면 catechol 그룹의 히드록실 그룹이 퀴논 그룹으로 바뀌면서 연쇄적으로 가교 반응이 일어나게 된다. 따라서 고분자의 농도가 높을 시에 산화제를 첨가하게 되면 화학가교 반응이 일어나면서 하이드로젤 구조가 형성되게 된다. Figure 5는 산화제인 NaIO_4 첨가 전 및 첨가 후의 CA-PEG 수용액의 거동을 조사한 그림이다. NaIO_4 첨가 시 가교가 유발되며 유동성이 없는 젤화가 일어나게 되며, 접촉하는 표면에 강한 접착이 일어나게 될 것으로 기대된다. 다만, 산화제를 필요이상으로 과량 넣게 되면 표면접착 특성이 있는 catechol 하이드록실 그룹이 퀴논으로 100% 변환되게 된다. 따라서 이런 경우는 표면 접착특성이 발현되지 못하고, 고분자 수용액 내부에서만 가교가 일어나는 현상이

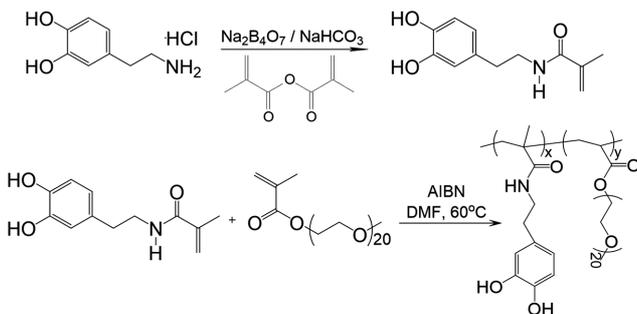


Figure 3. Synthetic scheme of CA-PEG.

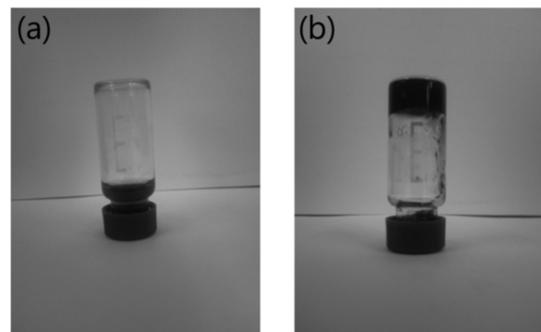


Figure 5. Formation of adhesive gels: before (a); after (b) oxidation.

일어난다. 따라서 최적의 접착특성을 보일 수 있는 산화제의 양을 조사하는 것이 중요하다. 따라서 본 연구에서는 접착강도 평가 시 산화제 양 변화에 따른 실험을 수행하였다.

고분자의 접착강도 평가. CA-PEG의 점막접착 특성 평가: CA-PEG의 점막접착 특성을 평가하기 위해, 임상적으로 쓰이는 접착제인 피브리글루의 점막접착력과 비교해 보았다. 실험법은 lab shear tensile stress를 측정해서 adhesive force를 측정함으로써 비교 평가하였다(Figure 6). 측정 기준으로는 ASTM D1002 표준 방법을 이용하였다. 두 개의 Ti-SIS plate 시편 사이에 적용되는 접착물질로 피브리글루, CA-PEG + D.W, CA-PEG + Fe³⁺ 및 CA-PEG + IO₄⁻ 4가지 시료를 이용해 실험하였다. 여기서 IO₄⁻는 catechol의 히드록실기를 효율적으로 산화시켜서 가장 강한 접착성을 나타냈으며, Fe³⁺ 또한 catechol의 히드록실기를 산화시킴으로써 가교시켜 그 다음 강한 접착성을 나타냈다. 생체접착제로 쓰이는 피브리글루, 마지막으로 산화제를 첨가하지 않은 CA-PEG이 가장 낮

은 접착력을 나타내었다. 흥미로운 점은 현재 사용되고 있는 피브리글루보다 접착력이 100% 이상 향상된 점막접착력을 CA-PEG가 보였다는 점이다. 특히, 산화제 종류에 따른 접착력 변화를 관찰할 수 있었는데, 산화력이 약한 Fe³⁺ 이온 존재 시 CA-PEG 자체의 접착력을 약 170% 증가시켰으나, 강력한 산화제인 IO₄⁻를 썼을 경우, CA-PEG 자체의 접착력보다 무려 310% 이상 증가된 접착력이 관찰되었다.

온도 변화에 따른 접착강도 측정: 접착형 고분자의 상온(25 °C)에서의 접착특성뿐만 아니라, 실제 인체적용시의 온도(37 °C) 및 45 °C에서의 접착특성을 평가하였다. Ti-SIS plate 시편 사이에 쓰이는 접착물질로 IO₄⁻가 첨가된 접착형 고분자 수용액(CA-PEG + IO₄⁻)을 사용하여 실험을 수행하였다. Figure 7에 요약된 바와 같이 온도가 상승함에 따라 점막접착력은 상대적으로 향상된다는 결과를 얻었다. 이 결과는 온도 상승이 카테콜 히드록실기의 산화를 촉진시켜 접착특성을 증가시킨 것으로 사료된다. 고무적인 것은 상온에서 준비된 시료의 접착특성 보다, 체온 조건에서의 접착특성이 향상되는 것으로, 실제 임상 적용 시 소재의 점막접착 특성은 더욱 증가할 것으로 예측된다.

압력 변화에 따른 접착강도 측정: 인체에 적용되는 접착제에 고려되어야 할 점은 시술 또는 의료용 기구 표면에 도입된 접착제가 인체 적용 후 받게 되는 점착압력이다. 이로 인해 단순 접착 특성보다 압력 증가 시의 접착 특성을 평가함으로써 접착강도를 비교할 수 있다. 따라서 점막접착형 고분자 자체의 압력변화에 따른 접착강도 평가 및 산화제인 IO₄⁻ 존재 시 점막접착형 고분자의 압력변화에 따른 접착강도 평가를 수행하였다. Ti-SIS plate 시편 사이에 쓰이는 접착물질로 CA-PEG + D.W. (no weight), CA-PEG + D.W. (weighted), CA-PEG + IO₄⁻ (no weight), CA-PEG + IO₄⁻ (weighted) 4가지 시료를 이용해 실험하였다.

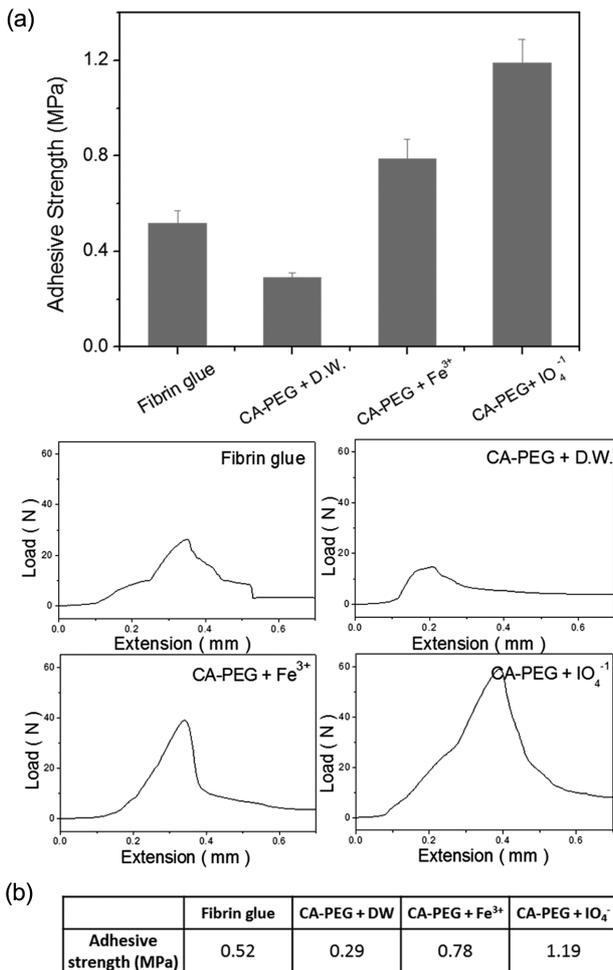


Figure 6. Adhesive strength of mucoadhesive polymer in various conditions (a); load-extension plots of the samples' adhesive strength (MPa) tests (b).

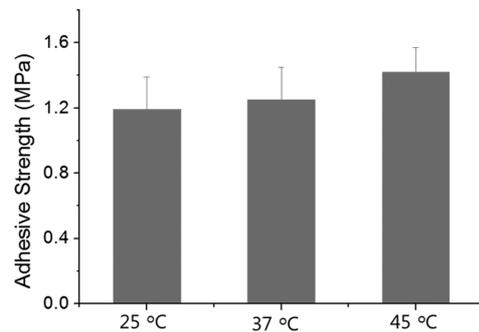
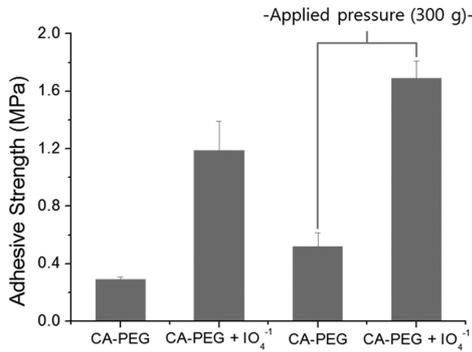


Figure 7. Adhesive strength of mucoadhesive polymer at various temperature.



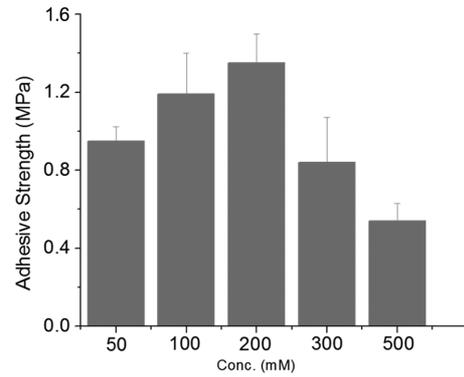
	CA-PEG (No weight)	CA-PEG (Weighted)	CA-PEG + IO ₄ ⁻ (No weight)	CA-PEG + IO ₄ ⁻ (Weighted)
Adhesive strength (MPa)	0.29	0.52	1.19	1.69

Figure 8. Adhesive strength of mucoadhesive polymer with or without applied pressure.

압력 증가를 위해 300 g의 추를 이용하여 접착형 고분자 용액이 도입된 Ti-SIS plate 표면에 1시간 동안 하중을 가하였다. Figure 8에 요약된 바와 같이, 산화제가 첨가되지 않은 고분자의 경우 접착강도가 0.29 MPa였으나 압력이 가해진 고분자의 경우 0.52 MPa로 79.3%의 증가된 접착강도를 보였다. 산화제가 첨가된 경우도 압력증가에 따라 접착력이 향상되는 유사한 경향을 보였다. 산화제가 첨가된 고분자의 경우 접착강도가 1.19 MPa였으나 동일조건에서 압력이 가해진 고분자의 경우 1.69 MPa로 42%의 증가된 접착강도를 보였다. 이 결과는 *in vitro*에서 접착실험을 진행한 경우 측정되는 접착강도보다, 실제 의료용 기구를 통한 인체 적용 시 월등한 접착강도를 보일 것임을 시사하는 실험 결과로 사료된다.

산화제 양 증가에 따른 접착강도 평가: 점막접착형 고분자의 접착특성은 우선적으로 카테콜 그룹의 두 히드록실 그룹이 점막의 글라이코프로테인의 글루코오스와 강력한 multiple 수소결합을 한 후, 접착형 고분자 내에서 카테콜 그룹의 산화에 의한 가교로 발현되게 된다. 따라서 산화제의 종류 및 산화제의 양에 따른 접착강도 특성이 크게 영향을 받게 된다. 앞선 실험을 통해 IO₄⁻를 사용한 경우에 우수한 접착강도가 발현되었으므로, IO₄⁻의 함량변화에 따른 접착강도의 변화를 조사하였다. Figure 9에서 보는 바와 같이, 산화제인 IO₄⁻의 함량을 50, 100, 500 mM로 증가시켜 실험한 결과, 50 mM 산화제 존재 시 0.95 MPa의 접착강도가 100 mM 산화제 존재 시 1.19 MPa로 25% 이상 향상됨을 확인할 수 있었다.

이는 초기 점막표면과 카테콜 접착은 유지되면서, 접착형 고분자 내부에서 가교로 인한 접착력이 향상되어 나타나는 현상으로 사료된다. 따라서 산화제의 증가가 접착강도의 증가로 이어졌음을 알 수 있다. 흥미로운 점은 추가적인 산화제의 증가로 200 mM까지는 점막접착력이 증가하나, 그 이상의 농도에서는 오히려 감소하는 경향을 보였다. 500 mM까지



CA-PEG + IO ₄ ⁻	Oxidant amount (NaIO ₄)				
	50 mM	100 mM	200 mM	300 mM	500 mM
Adhesive strength (MPa)	0.95	1.19	1.35	0.84	0.54

Figure 9. Effect of oxidant amount on adhesive strength of mucoadhesive polymer.

IO₄⁻를 증가시킨 경우는, 0.54 MPa로 접착강도의 급격한 감소가 관찰되었다. 이는 접착형 고분자의 카테콜 중 거의 대부분이 귀는 그룹으로 산화되어, 초기 점막과의 접착에 관여하는 catechol 히드록실기의 과도한 손실에 의한 결과로 사료된다. 따라서 접착형 고분자 내에서의 가교는 활발히 일어날 수 있으나, 점막표면과 접촉하고 있는 카테콜 그룹의 두 히드록실기의 함량이 많이 존재하기 어렵다는 것을 시사한다. 따라서, 최적의 점막접착력을 발현하기 위해 산화제 함량을 적절히 조절하는 것이 중요한 요소임을 본 실험을 통해 확인할 수 있었다.

결론

본 연구에서는 홍합의 점착 메커니즘에 중요하게 관여하는 catechol을 함유하는 수용성 고분자를 개발하였다. 합성된 CA-PEG는 산화제 존재 하에 가교되는 특성을 지녔고 임상적으로 사용되고 있는 피브리글루보다 월등한 점막접착력을 나타내었다. 인체 온도에서도 효과적인 접착이 가능함을 확인하였고, 압력이 가해졌을 때 더 높은 접착력을 보이며 산화제 함량을 조절함으로써 최적의 점막접착 특성을 갖는 조건을 확인하였다. 본 연구에서 개발한 점막접착형 고분자 시스템은 다양한 시술 및 담도, 위장관, 식도 등에 적용되는 비혈관계 스텐트와 같이 점막과 접촉하는 다양한 의료용 기구의 인체내 적용에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 지식경제부 소재원천기술개발사업의 연구비 지원(K0006028) 및 2012년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. 2012R1A5A2051388).

참고 문헌

1. V. Grabovac, D. Guggi, and A. Bernkop-Schnurch, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **57**, 1713 (2005).
2. R. Chivers and R. Wolowacz, *Int. J. Adhes. Adhes.*, **17**, 127 (1997).
3. K. H. Siedentop, D. M. Harris, and B. Sanchez, *Laryngoscope*, **98**, 731 (1988).
4. N. Holten-Andersen and J. Waite, *J. Dent. Res.*, **87**, 701 (2008).
5. K. Kamino, *Biochem. J.*, **356**, 503 (2001).
6. H. Lee, S. M. Dellatore, W. M. Miller, and P. B. Messersmith, *Science*, **318**, 426 (2007).
7. J. H. Waite and X. Qin, *Biochemistry*, **40**, 2887 (2001).
8. L. Ninan, J. Monahan, R. L. Strohline, J. J. Wilker, and R. Shi, *Biomaterials*, **24**, 4091 (2003).
9. D. R. Filpula, S. M. Lee, R. P. Link, S. L. Strausberg, and R. L. Strausberg, *Biotechnol. Progr.*, **6**, 171 (1990).
10. M. E. Yu, J. Y. Hwang, and T. J. Deming, *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 5825 (1999).
11. H. Lee, N. F. Scherer, and P. B. Messersmith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 12999 (2006).
12. K. Huang, B. P. Lee, D. R. Ingram, and P. B. Messersmith, *Biomacromolecules*, **3**, 397 (2002).
13. P. Glass, H. Chung, N. R. Washburn, and M. Sitti, *Langmuir*, **25**, 6607 (2009).
14. K. S. Kim, J. Y. Lee, Y. M. Kang, E. S. Kim, G. H. Kim, S. D. Rhee, H. G. Cheon, J. H. Kim, B. H. Min, H. B. Lee, and M. S. Kim, *Biomaterials*, **31**, 1104 (2010).
15. S. A. Burke, M. Ritter-Jones, B. P. Lee, and P. B. Messersmith, *Biomed. Mater.*, **2**, 203 (2007).
16. C. E. Brubaker, H. Kissler, L. J. Wang, D. B. Kaufman, and P. B. Messersmith, *Biomaterials*, **31**, 420 (2010).