

폴리우레탄 표면의 광화학적 공유결합을 이용한 새로운 LK 고정화 방법에 관한 연구

김현정,^{1,3} Yasuhide Nakayama,² 심재희,^{1,3} 유규하,^{1,3} 김종원,^{1,3}
Takehisa Matsuda,² 민병구¹

¹서울의대 의공학 연구소; ²일본 국립 중앙 순환기 연구센터; ³바이오 메드랩

A novel method with photochemical reaction for LK immobilization on the polyurethane surface

H. J. Kim,^{1,3} Y. Nakayama,² J. H. Shim,^{1,3} G. H. Ryu,^{1,3} J. Kim,^{1,3}
T. Matsuda² and B. G. Min¹

¹Institute of Biomedical Engineering, College of Medicine, Seoul National University;

²National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka 565, Japan;

³Biomedlab. Co., Seoul, Korea

요약

광반응을 이용하여 fibrinolytic 활성을 보이는 LK (lumbrokinase) 를 생체재료인 PU (polyurethane) 표면에 고정화하는 방법에 관하여 연구하였다. 먼저 PU표면에 amino 작용기를 도입하기 위하여 side chain 작용기로 phenylazide 와 amino작용기를 갖는 AzPhPAL을 이용하였으며 광반응은 266nm 이상의 UV light을 약 1분간 조사시키는 방법을 이용하였다. LK를 amino작용기가 유도된 PU 표면에 공유결합시키기 위하여 amide결합 형성시 사용되는 수용성 carbodiimide인 EDC를 이용하였다. ESCA측정시, AzPhPAL으로 공유결합시킨 경우 반응하지 않은 PU표면에 비하여 N/C가 0.1717로, LK 고정시 S/C가 0.0043로 증가된것을 알 수 있었다. 이것으로부터 AzPhPAL과 LK가 PU표면에 공유결합된 것을 확인할 수 있었으며 static contact angle 측정으로 표면개질된 PU표면이 소수성에서 친수성으로 변화된 것을 확인할 수 있었다. 또한 공유결합된 LK의 활성을 확인하기 위하여 fibrin plate test를 실시하였는데 그 결과 고정화된 후에도 LK의 활성이 존재함을 알 수 있었다.

서론

Printing, coating, fiber, membrane 그리고 biomedical technology를 비롯한 많은 분야에서 폴리머의 표면개질화 방법은 중요하게 논의되어왔다. 최근에는 그 방법의 일환으로 surface chemical reaction in solvent,[1,2] physical deposition,[3] 또는 coating, surface graft polymerization[4-12]이 개발되고 있다. 이러한 방법에서 surface graft polymerization은 biomedical application [7,8]과 관련하여 밀접하게 연구되어 왔으며 그때 사용되는 방법으로, 최근에는 gamma-ray irradiation[7] 또는 plasma, glow discharge[9]를 이용하여 peroxide와 같은 radical을 발생시켜 표면개질하는 방법이 보고되었다. 그러나 실질적으로 이러한 표면개질화 방법은 다음과 같은 문제점을 제시하는데, 우선적으로 복잡한 3차원적 폴리머 모형물에 적용하기 위해서는 반응 공정상 폴리머의 bulk 성질을 변화시키지 않고 원하는 부위만을 개질해야하나 그러한 점이 위의 방법으로는 어려우며 또한 free radical을 이용하는 방법은 사용되는 폴리머에 따라 의존적이므로 그 방법상 한계를 갖는다. 그러므로 본 논문에서는 위에 제시한 여러 문제점을 보완한 방법으로, 특히 생체 재료의 표면개질에 있어서의 그 응용범위가 넓다고 할 수 있는, photochemical reaction을 이용한 폴리머

표면개질방법을 연구하였다. 합성된, side chain으로 photoreactive phenylazido group을 갖는, aminated polymer를 수용액상태에서 폴리머 표면에 casting한 후 특정 파장의 UV light로 반응시킴으로써 표면에 최종적으로 공유결합된 작용기를 도입할 수 있었다. 이러한 폴리머의 표면 개질 방법을 통하여 지렁이 (*Lumbricus rubellus*)에서 추출한 fibrinolytic 효소를 생체 재료인 polyurethane 표면에 고정화 하였다. Lumbrokinase 로 불리는 이 효소는 plasminogen activator activity와 fibrinolytic activity를 갖는, 높은 온도 (70°C)와 넓은 pH범위(pH 2-11)에서도 매우 안정한 단백질이므로 이 단백질을 생체 재료로 사용되는 표면에 위의 방법을 이용하여 고정화하는 것은 인공장기로 사용되는 폴리머의 항혈전성을 향상시킬 것으로 기대된다.

실험 방법

materials

solvents 와 모든 reagents는 Wako Pure chemicals Inc. (Osaka, Japan)으로부터 구입하였고 Poly(allylamine hydrochloride)는 NittoBoseki Co., Ltd.(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Dialysis를 하기 위한 seamless cellulose tube (cutoff MW: approximately 12,000)는 Viskase Sales Corp.(Chicago, IL)에서 구입하였다.

Preparation of Photoreactive Poly(allylamine) (AzPhPAL)

4-azidobenzoic acid (0.29g(1.8mmol; equiv for each monomer unit), 0.58g(3.6mmol), 0.87g(5.3mmol))를 각각 10ml의 DMF에 녹여 ice bath에서 stirring하면서 녹인다. 4-azidobenzoic acid가 DMF에 완전히 용해되면 1-ethyl-3-(3(dimethylamino)propyl)carbodiimide hydrochloride (EDC; 0.42g (2.2mmol), 0.84g (4.4mmol), 1.26g(6.6mmol))를 각각 50ml의 DMF에 녹인 후 반응용기에 첨가한다. poly(allylamine hydrochloride)는 0.93g(10mmol; equiv for each monomer unit)을 취해 10ml의 증류수에

완전히 녹인 후 여기에 0.2g의 KHCO_3 를 첨가하여 중화시킨다. 이렇게 만든 poly(allylamine hydrochloride)용액 10ml을 처음 반응이 시작된 후 30분이 경과되었을때 각각의 위의 반응 용기에 첨가한다. 4시간이 경과된 후에는 ice bath를 제거해도 되며 상온에서 stirring하면서 24시간 계속 반응시킨다. 반응이 끝나면 각각의 반응용액을 seamless cellulose tube에 넣어 3일동안 증류수에서 dialysis한다. dialysis한 후 합성된 polymer는 freeze dry를 실시하여 하얀 고체상태로 얻어낸다. (yield 0.66g, 0.90g, 1.04g) (Fig. 1)

Surface Graft Copolymerization

Water과 EtOH 혼합용액 (1:2, v/v)에 AzPhPAL-II (0.1 or 1 %, w/v)를 녹인 후, 일정량 취하여 Polyurethane®(PU) sheet(10 x 20 mm, pellathane 2363-80A; Dow Chemical Co.)에 casting한 후 24시간동안 공기중에서 건조시킨다. AzPhPAL-II로 casting된 PU sheet는 5 cm(intensity; 4.5 mW/cm²)의 거리에서 the aid of a cutoff filter(Toshiba UV-27, Tokyo, Japan)를 장치한 Xenon lamp(Ushio UXL-500D:500W, Tokyo, Japan)로 266 nm 이상의 UV light를 사용하여 1분동안 조사시킨다. UV를 조사시킨 후 PU sheet는 증류수와 EtOH로 계속하여 씻어 반응하지않은 AzPhPAL-II를 제거한다.

Immobilization of Protein

UV를 처리한 PU sheet는 Lumbrokinase(LK)를 고정화하기 위하여 다음과 같은 처리를 하였다. PBS(pH 4.5) 19 ml에 LK 용액(Tris Buffer pH 8.0) 1 ml를 첨가한 후 1N HCl로 pH 4.5가 되도록 조절한다. UV light로 처리한 PU sheet (1 x 2 cm, 6 조각)를 넣은 후, 연속하여 EDC 0.035g를 첨가한 후 25°C 에서 3시간 동안 반응시킨다. 세척은 PBS(pH4.5)로 30 분간 2회, 24시간 1회 실시한다. 그리고 salt를 제거하기 위하여 마지막 세척을 증류수로 한다. LK를 반응시킨 sheet는 24시간 진공감압하에서 건조 시킨다.

폴리우레탄 표면의 광화학적 공유결합을 이용한 새로운 LK 고정화 방법에 관한 연구

Fibrinolytic Test of LK-immobilized PU sheet

0.05M NaCl을 포함하고 있는 0.2M Borate buffer에 fibrinogen을 0.8% 되도록 첨가한 후 37°C 에서 30분동안 녹인다. 이 용액을 filter한 후 thrombin 5U과 함께 petri dish에 붓고 실온에서 2시간 굳힌 후 사용한다. LK가 고정된 PU sheet를 fibrin plate에 놓고 37°C 에서 2시간 동안 항온처리한다. LK가 고정된 PU sheet 위치에 생긴 clear zone을 확인 함으로써 고정화된 LK의 활성을 확인한다.

Surface Characterization

AzPhPAL과 LK를 처리한 PU sheet의 wettability는 sessile drop technique을 사용하여 Contact angle meter(CA-D, Kyowa Kaimenkageku Co., Ltd, Tokyo, Japan)로 측정하였다. 또한 표면의 원소 성분 분석은 MgK x-rays를 사용한 x-ray photoelectron spectroscopy(ESCA-750, shimadzu, Kyoto, Japan)로 실시 하였다.

결과

LK를 PU표면에 공유결합으로 고정화 하기위해서 photoreactive aminated polymer인 AzPhPAL을 이용하였다. 특정 파장의 UV light를 조사하여 AzPhPAL을 PU 표면에 공유결합시킨 후 유도된 amino작용기를 LK의 carboxyl작용기와 EDC를 사용하여 결합하였다. 위의 각 단계반응을 ESCA를 실시하여 확인하였으며 고정화된 LK의 활성을 알아보기 위하여 fibrin plate test를 하였다. 또한 static contact angle로 표면의 wettability를 측정하였다. 먼저, 사용된 AzPhPAL은 4-azidobenzoic acid와 poly(allylamine hydrochloride)을 EDC를 사용하여 DMF용매내에서 합성 하였으며 합성된 AzPhPAL에 존재하는 phenylazido작용기는 4.4%임을 알 수 있었다 (Fig. 2). PU sheet표면에 AzPhPAL을 thin layer로 casting하는 작업은물과 에탄올의 혼합용매를 이용하였으며 그때 AzPhPAL의 농도는 1mg/ml AzPhPAL의 용액으로 하였다.

친수성인 물만을 사용하는 것 보다 물보다 소수성인 에탄올을 함께 사용하는 것이 AzPhPAL를 소수성인 PU표면에 casting 하는데 용이하였다. 물과 에탄올에 용해시킨 AzPhPAL을 10, 100 ml 취하여 PU sheet표면에 처리한 후 공기 중에서 완전히 건조하였다. 건조시킨 PU sheet는 UV light(>266 nm)를 1분동안 조사시킨 후 물과 에탄올을 이용하여 완전히 세척하였다. 단백질인 LK는 EDC반응으로 amide결합을 통해 고정화 하였고 이와같이 반응시킨 PU sheet의 표면 원소 성분분석을 위하여 ESCA를 실시하였다 (Table 1).

ESCA분석시, AzPhPAL을 처리하지 않은 PU sheet와는 달리 AzPhPAL처리하여 UV light를 조사한 것은 다음과 같은 차이를 보였다 (Fig. 3). (1) N1s peak이 증폭되었으며 그 구조도 subpeak 두 개 (399.9 eV, 401.6 eV)로 변화되었다. (2) C1s peak에서는 carbamate구조의 C에 해당하는 subpeak(290.2 eV)이 사라졌다. (3) O1s peak은 현저하게 감소하였고 구조도 subpeak 두개 (531.6, 533.4 eV)로 변화였다. 이는 AzPhPAL의 반응으로 인해 원래 PU sheet에 노출되었던 O가 줄어들었기 때문이다. 위의 ESCA 분석 결과로부터 AzPhPAL이 PU sheet표면에 공유결합이 잘 형성되었다는 것을 알 수 있었다. 100 ml의 AzPhPAL을 처리한 후 LK를 반응시킨 PU sheet는 LK를 반응시키기 전과 다음과 같은 차이를 보였다 (Fig. 4). LK 반응시 (1) N1s에서는 399.9 eV의 subpeak이 매우 증폭되었다. (2) C1s 에서는 288.5 eV의 subpeak이 증폭되었는데 이는 amide 결합의 C 존재를 보여주는 결과였다. (3) LK를 반응시키지 않았을때와는 다르게 S2p peak (164.6eV) 가 나타났다. 이와같은 사실은 LK가 AzPhPAL을 통해 PU sheet 표면에 고정화되었음을 말해주는 결과이다.

Water wettability 측정결과로부터 PU표면이 소수성에서 친수성으로 변화된 것을 확인 할 수 있었다. 즉, 위의 AzPhPAL용액을 10 ml 취하여 처리한 경우 static receding contact angle은

3.40±0.216으로 감소한 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 소수성 phenylazido 작용기와 친수성 amino 작용기를 모두 갖고있는 AzPhPAL이 소수성 PU sheet표면과 반응하고 난 후 최종적으로 친수성 side group인 amino 작용기가 PU표면에 노출된 결과라고 생각된다. 또한 AzPhPAL로 처리된 PU sheet에 LK를 연속하여 처리한 경우 그 값은 1.87±0.287으로 더욱 감소한 것을 알 수 있었다 (Table 2).

고정화된 LK의 활성을 알아보기 위하여 fibrin plate에 LK가 고정화된 PU sheet를 올려놓고 37°C 에서 2시간동안 항온처리하였다 (Fig 5). LK가 고정된 PU sheet가 놓인 위치에 clear zone이 나타나는 것을 확인 할 수 있었으며 이는 공유결합으로 PU sheet표면에 고정화되어 공간적인 주변환경이 바뀐 상태에서 LK가 본래의 활성을 그대로 나타내고 있다는 증거라고 할 수 있다.

토의

본래의 polymer bulk성질을 변화시키지 않으면서 그 목적에 맞는 표면 개질 방법을 찾아내다는 것은 매우 어려운 일이다. 지금까지 x-rays[7], UV light[4,5], glow discharge[9] 방법에 대한 여러 가지 보고가 있으나 실제 복잡한 구조물의 변형없이 수용액 상태에서 완벽한 표면개질방법은 보고된 바 없다. 일반적으로 phenylazido 작용기는 UV light 조사시 azido 작용기가 nitrogen과 photoreactive nitrene 으로 되며 이 triple state의 nitrene은 insertion, addition, abstraction과 같은 반응을 하는 것으로 알려져있다[13]. polymer표면에서 위의 azido 작용기가 UV light에 의해 nitrene 으로 되면 이것은 polymer 표면에서 공유결합으로 고정화된다. 이러한 성질을 이용하여 본 연구에서는 LK를 PU표면에 고정하였으며 전체적인 반응 모식도는 Fig 6. 와 같다. AzPhPAL을 PU표면에 casting할 때 그 두께는 1mm 가 가장 적절하다. 그 이유는 azido작용기를 충분히 nitrene 으로 화학반응시키려면 UV light이 thin

layer를 통과하여야하기 때문이다. PU sheet표면에 1mm 이상으로 casting된 AzPhPAL의 layer는 UV light이 투과되지 않고 polymer위에서 단순히 gelation만을 형성하기때문에 PU sheet 표면과의 공유결합을 유도하기 어렵다. 이러한 관점에서 AzPhPAL 수용액을 원하는 부분에 일정하게 casting하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서 사용한 substrate인 PU sheet는 표면이 소수성이다. 그러므로 에탄올과 물의 혼합액을 사용하여 casting하였는데 이는 에탄올이 물보다 소수성 성질을 갖는 점에 착안한 것이다. AzPhPAL을 PU sheet 표면에 더욱 강하게 공유 결합시키고자 한다면 AzPhPAL의 phenylazido side 작용기의 함량을 더욱 증가시킨 AzPhPAL을 사용하면 가능하다. 그러나 이 경우에는 오히려 소수성인 phenylazido작용기의 함량이 많아짐으로 인해 수용액상에서의 AzPhPAL 용해도를 낮추는, 서로 상반되는 결과를 유발시킨다. 그러므로 수용액 상태에서, 그리고 적용하고자하는 목적에 적절한 phenylazido 작용기의 함량이 요구된다. 일반적으로 최고 phenylazido작용기의 물에대한 solubility는 5mmol로 알려져있다. 그러므로 본 연구에 있어서 적정 농도를 구하는 것이 매우 중요한 일이라 생각되었으며 그 농도를 1mg/ml AzPhPAL를 100ml casting하는 방법을 취하였다. 일반적으로 단백질을 polymer표면에 EDC를 이용하여 반응시킬 경우 Fig 7. 에 제시한 바와 같이 단순 physical adsorption도 동시에 일어날 수 있다. 이것은 소수성을 갖는 두 물질간의 결합으로 이 결합은 polymer 표면에서 박리된다.

결론적으로, 이러한 단점을 보완하기 위하여 PU 표면위에 LK의 공유 결합 형성을 AzPhPAL을 이용한 amide 결합으로 시도하였으며 이는 생체 적합성을 향상시킨 표면 개질 방법이라 할 수 있다.

참고 문헌

폴리우레탄 표면의 광화학적 공유결합을 이용한 새로운 LK 고정화 방법에 관한 연구

- [1] Allen, P. W.; Marrett, F. M. J. Polym. Sci. 1956, 22, 193
- [2] Hayes, R. A. J. Polym. Sci. 1953, 11, 531
- [3] Mattox, D. M. J. Vac. Sci. Technol. 1973, 10, 47
- [4] Ogiwara, Y.; Kanda, M.; Takumi, M.; Kubota, H. J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed. 1981, 19, 457
- [5] Tazuke, S.; Kimura, H. J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed. 1978, 16, 497
- [6] Bradney, A.; Czuba, M., Jr. Anal. Chem. 1978, 47, 1838
- [7] Chapiro, A. Eur. Polym. J. 1983, 19, 859
- [8] Ishihara, K.; Nakabayashi, N.; Fukumoto, K.; Aoki, J. Biomaterials 1992, 13, 145
- [9] Suzuki, M.; Kishida, A.; Iwata, H.; Ikada, Y. Macromolecules 1986, 19, 1804
- [10] Richards, G. N. J. Appl. Polym. Sci. 1961, 5, 534
- [11] Ushida, E.; Uyama, Y.; Ikada, Y. J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem. 1989, 27, 527
- [12] Samal, R. K.; Iwata, H.; Ikada, Y. Physicochemical Aspects of Polymer Surfaces; Mittal, K. L., Ed.; Plenum Press: New York, London, 1983; Vol. 2, p 801
- [13] Mastuda, T.; Inoue, K.; Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs. 1990, vol XXXVI, M161-164

Materials	1/2 Θ_{adv}	1/2 Θ_{rec}
Non-treated	38.0 ± 0.000	28.5 ± 0.368
casting(10 μ l), UV, washing	37.6 ± 0.873	3.40 ± 0.216
casting(10 μ l), UV, washing, protein	32.2 ± 0.205	1.87 ± 0.287

Table 2. Contact Angle Data in Water

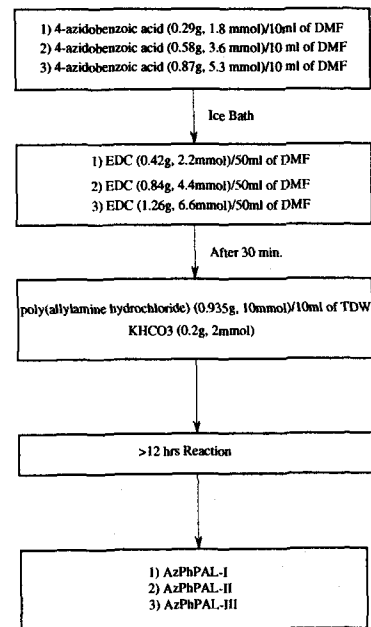


Fig 1. Synthetic route of a photoreactive aminated copolymer, AzPhPAL

samples	N/C	O/C	S/C
Non-treated	0.0247	0.6936	N.D*
Coat (10 μ l), Washing	0.1388	0.4478	N.D*
Coat (10 μ l), UV, Washing	0.1717	0.3804	N.D*
Coat (100 μ l), UV, Washing, Protein	0.2228	0.2833	0.0043

Table 1. Elemental composition ratio of lumbrokinase-immobilized surface from ESCA ; *not detected

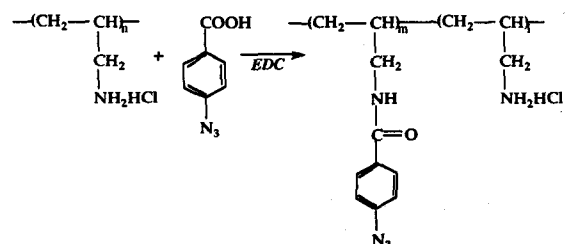


Fig 2. Preparation of photoreactive AzPhPAL

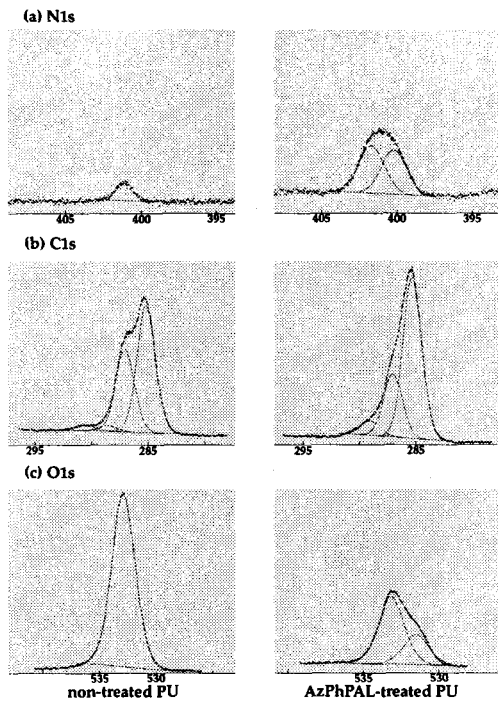


Fig 3. ESCA spectrum of non-treated and AzPhPAL-treated PU surfaces

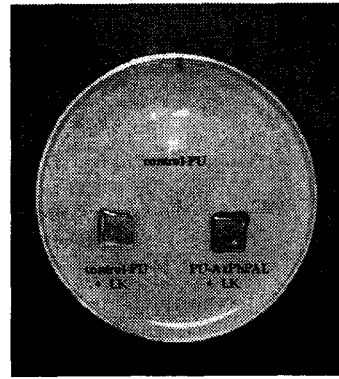


Fig 5. Fibrin Plate Test of LK-immobilized PU

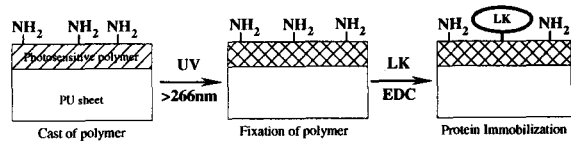


Fig 6. Surface Immobilization of LK

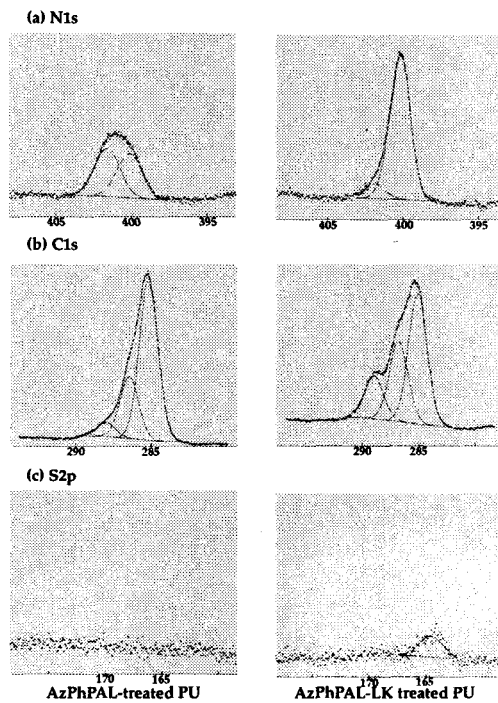


Fig 4. ESCA spectrum of AzPhPAL-treated PU and AzPhPAL-LK treated PU surfaces

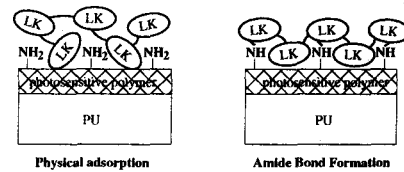


Fig 7. Schematic structure of LK-immobilized PU upon UV reaction