

Polypeptide계 인공 피부의 합성과 특성

김선정* · 민동선* · 김계용*

= Abstract =

Synthesis and Characterization of Artificial Skin based on Polypeptides

Seon-Jeong Kim* · Dong-Sun Min* · Kea-Yong Kim*

In order to evaluate the artificial skin for burn wound covering materials, copoly(N-carbobenzoxy-L-lysine-L-leucine)s were prepared by polymerization of N-carbobenzoxy-L-lysine anhydride and L-leucine anhydride in homogeneous solvents using triethylamine as an initiator. The synthetic polypeptides and the extery type polyurethane(PU) of medical grade were used as the sheet type membranes were prepared; monolayer membranes were composed of only the polypeptides, bilayer membranes and blend membranes were controlled by composition of the polypeptides and PU. Test of the swelling degree, mechanical tensile strength, elongation, oxygen permeability, water-vapor loss and in vitro degradation treated by protease TV of samples of artificial skin were measured by adequate methods so as to mechanical, physincal characterization and biodegradation. As a result, all the values of samples were found to be similar to desired value of skin which was nature. The Artificial skin based on polypeptides can be considered as ideal burn wound covering materials.

1. 서 론

화상이나 열상으로 입은 상처의 치료방법으로 환자 자신의 피부를 이식하는 자가이식(autograft), 타인의 피부를 이식하는 동종이식(homograft) 그리고 동물의 피부를 이식하는 이종이식(heterograft or xenograft) 등의 세가

지 방법이 있다. 이 세가지 방법중에서 자가이식이 가장 이상적이지만 피부를 채취하는 부위와 양에 제한을 받으며, 채취부위가 새로운 손상 부위로 남게되는 결점이 있다. 또 동종이식 이종이식의 경우에 생체내의 거부반응이 일어나기 때문에 사용하는데 제약을 받고 있다.^{2,3} 그러므로 성능이 우수한 인공피부의 개발이 시급한 실정에 있다.

인공피부는 다음과 같은 조건들을 갖추어야 한다.^{3,4,5}

(1) 상처부위에서 수분증발량을 적당하게 조절하여 과다수분 증발로 인한 탈수증과 합병증을 방지하고 수분증발을 억제하여 상처분비액의 염증형성으로 치료기간을

(접수 : 1987년 5월 25일)

* 한양대학교 공업화학과

Dept. of Industrial Chemistry, Hanyang University

장기화하지 않아야 한다.

(2) 환부에서 생체조직에 부착성이 있어야하고 체액의 흡수성이 있어야 한다.

(3) 만족할만한 강도와 신장율 등의 기계적 성질을 지녀야 한다.

(4) 적당한 통기성이 있어야한다.

(5) 화상부위의 염증을 방지하며 분해물이나 용출물이 독성을 갖고있지 않아야 한다.

(6) 환부에 세균감염을 방지할 수 있어야 한다.

인공피부에는 크게 나누어 두가지 종류가 있다.^{2,3,6} 첫째는 화상부위에 부착하여 세균감염을 방지하고 적당한 수분증발과 흡수성을 갖춘 단기간 사용하는 인공피부가 있다. 둘째는 단기간용 인공피부를 개량하여 항원성과 독성이 없는 물질의 생체분해성을 지닌 장기간 사용하는 인공피부가 있다.

현재까지의 인공피부는 silicon rubber, nylon, collagen 및 돈피 등을 원료로 foam, film, sponge, laminate 등의 여러가지 형태로 제조하였으나 모두 장단점을 지니고 있다.^{2,4,7}

본 연구에서는 생체중의 단백질을 구성하는 아미노산 중의 L-lysine과 L-leucine을 사용하여 polypeptide를 합성한 다음 이것과 의료용 ester type polyurethane 으로 monolayer막, bilayer막 및 blendmer막을 제조하였다. 이 막들의 인공피부로서 사용가능성을 검토하기 위하여 팽윤도, 인장강도, 신장율, 산소 및 수증기투과성 그리고 생체분해성 등을 실험하였다.^{4,8,9,10}

2 실험

2-1. 시 약

L-leucine과 N-carbobenzoxy-L-lysine은 감압건조하였으며, tetrahydrofuran, dioxane, n-hexane, ethylacetate, benzene 등은 탈수 정제하여 사용하였다. carbobenzoxy chloride와 triethylamine 등은 일본 화광순약공업(주) 제품의 특급시약을 그대로 사용하였다.

2-2. 합 성

N-carbobenzoxy-L-lysine의 합성¹¹

L-lysine의 측쇄에 있는 아미노기를 보호하기 위하여 L-lysine·HCl 10g, CuCO₃·Cu(OH)₂·H₂O 15g 및 H₂O 100ml를 둥근바닥 플라스크에 넣고 1시간정도 가열 반응시킨 다음 2G3로 여과한 여과액에 NaHCO₃ 10.08g과 C₆H₅CH₂COC1 12ml를 넣고 6시간 반응시켰다. 반응 후 2G2를 사용하여 침전물을 여과하고 증류수, 아세

톤 및 에탄올로 세척하였다. 반응 생성물을 증류수 250ml에 현탁시킨 후 6N HCl 412ml에 넣어 용해시켰다. H₂S gas를 2시간 주입시킨 후 여과하여 CuS를 제거하고 1N HCl로 수 회 세척하였다. 그 다음 얼음 중탕에서 여액을 pH6.5로 조절하여 생성하는 침전물을 -20℃에서 하룻밤 방치하고 여과한 후 여과물을 감압 건조하였다.

2-3. NCA(N-carboxy anhydride)의 합성 및 중합

N-carbobenzoxy-L-lysine NCA와 L-leucine NCA는 각각 포스겐법으로 합성하였다.^{12,13} N-carbobenzoxy-L-lysine NCA와 L-leucine NCA를 균일계 용매인 benzene과 dioxane을 혼합용매로 두 NCA의 조성물비를 90:10, 75:25, 50:50 및 25:75로 변화시키면서 삼차아민인 triethylamine을 중합개시제(A/I=50, A는 NCA의 몰수이고 I는 개시제의 몰수이다)로 25℃에서 3일 동안 반응시켜 copolypeptide를 제조하였다.

2-4. 막의 제조

Monolayer막은 디옥산 용매로 3wt%의 copolypeptide계막용 용액을 만들어 이 막용액을 유리판에 유연시켜 제조하였다. 막의 두께는 40-60μm 범위였다.

bilayer막은 copolypeptide계막용액을 유리판에 유연시킨 후, 그 뒷면에 디옥산에 용해한 15wt%의 의료용 ester type polyurethane 용액을 유연시켜 제조하였다. blendmer막은 polypeptide와 PU을 무게비율로 디옥산에 용해시켜 제막하였다. 그리고 각 시료의 조성을 표.1에 나타내었다.

Table 1. Composition of samples

M1 ;	N-carbobenzoxy-L-lysine:L-leucine=	90:10(mole ratio)
M2 ;	"	75:25(")
M3 ;	"	50:50(")
M4 ;	"	25:75(")
B 1 ;	polypeptide(M1) and polyurethane	
B 2 ;	polypeptide(M2) and polyurethane	
BL1;	polypeptide(M3) :polyurethane=	7:3(weight ratio)
BL2;	"	5:5(")

2-5. 팽윤도 측정

제조한 시료를 36℃의 유사체액(PECF)에 2주일간 침지시킨 후 무게를 측정하여 다음 식으로부터 팽윤도를 계산하였다.

$$Q_w(\%) = \frac{X_2 - X_1}{X_1} \times 100$$

Q_w (%) : 시료의 팽윤도

X_1 (g) : 건조상태의 시료무게

X_2 (g) : 팽윤상태의 시료무게

2-6. 인장강도 및 신장율 측정

건조상태의 시료와 protease IV¹⁴로 36°C, pH5¹⁵ 에서 2주일 동안 분해시킨 시료의 기계적 성질을 측정하였다. 측정기는 Japan Toyo Baldwin Tension UTM-4-100 을 사용하였다.

2-7. 산소 및 수증기 투과실험

그림.1은 산소투과계수 측정에 사용한 기체투과 장치로 투과 cell내에 시료를 넣어 36°C을 유지하여 측정하

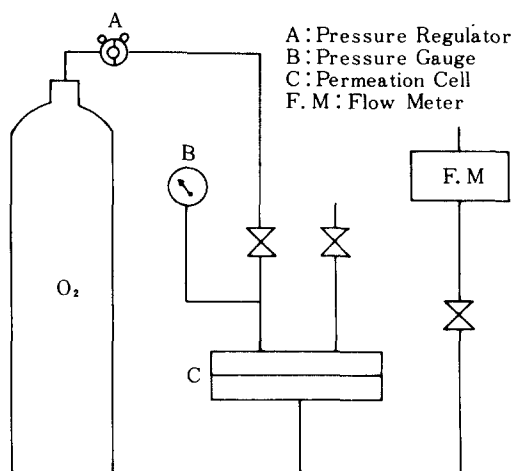


Fig. 1. Apparatus for gas permeability measurement

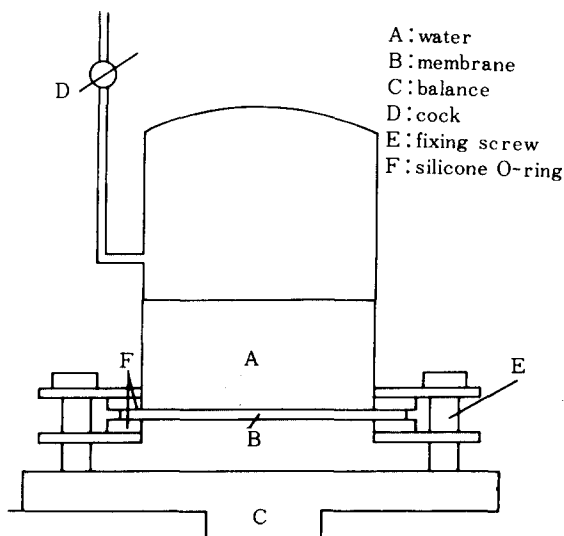


Fig. 2. Apparatus for water permeability measurement

였고 그림.2은 수증기 투과량 측정장치로서 장치내에 일정량의 증류수를 채우고 36°Cincubator내에서 1일을 주기로 증류수 감소량을 측정하였다.

2-8. 생체분해율 측정

Protease IV로 36°C, pH5, 0.1M phosphate buffer 용액을 만든 후 각 시료를 침지시켜 1일 간격으로 시료의 무게 감소를 측정하여 분해율을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 흡수성

표 2는 36°C의 유사체액에 시료를 침지시키고 2주일이 지난 후의 팽윤도를 측정한 결과이다. bilayer 막, blendmer막 그리고 monolayer막의 순서로 팽윤도는 감소하였다. 환부에 부착시킨 인공피부가 흡수성이 없으면 분비액이 상처부위에 피어 염증반응을 촉진하여 상처치료를 장기화시킬 수 있으므로 화상치료용 인공피부는 흡수성을 갖고 있어야 한다.

Table 2. Degree of swelling of monolayers, bilayers and blendmers at 36°C, pseudo-extracellular fluid(PECF)

Sample	Degree of swelling (%)
M1	17.36
M2	14.00
M3	14.18
M4	18.36
B1	67.56
B2	59.00
BL1	43.40
BL2	46.50

3-2. 인장강도 및 신장율의 변화

표 3은 36°C의 유사체액에 인공피부 시료를 2주일간 침지시킨 후 측정된 인장강도와 신장율이다. 모든 시료의 인장강도는 인공피부의 목표치인 1kg/mm² 이상의 값을 나타냈으며, break point에서의 신장율은 polypeptide만을 사용한 monolayer막보다 PU를 이용한 bilayer막과 blendmer막이 더 우수 하였다.

인공피부를 상처부위에 피복하였을 때 상처부위와 밀착성과 유연성이 있어야하므로 기계적 성질이 중요시된다.

Table 3. Tensile strength and elongation of monolayers, bilayers and blendmers

Sample	Tensile strength (kg/mm ²)	Elongation (%)
M1	1.05	33.3
M2	0.96	47.7
M3	1.13	36.7
M4	0.99	42.3
B1	1.65	97.0
B2	1.63	84.6
BL1	1.49	63.3
BL2	1.53	99.9

표 4는 protease IV를 사용하여 36°C, pH5인 0.1M phosphate buffer 용액에서 2주일동안 분해시킨 후 시료들의 인장강도 및 신장율을 측정한 값이다.

인공피부는 상처부위에서 분비되는 체액중에 존재하는 분해효소에 의해 분해가 일어나 인공피부의 강도 및 신장율은 원래의 값보다 감소하게 된다. 체액중에 존재하는 단백질 분해효소인 protease IV로 in vitro 분해 실험을 한 결과 monolayer막이 가장 크게 인장강도와 신장율이 감소하였으나 시료들은 일정한 형태를 유지하고 있었다.

Table 4. Effect of tensile strength and elongation of monolayers, bilayers, and blendmers treated by protease IV at 36°C, pH5 and 15 days

Sample	Tensile strength (kg/mm ²)	Elongation (%)
M1	0.79	21.0
M2	0.64	13.3
M3	0.88	26.6
M4	0.74	15.0
B1	1.30	71.2
B2	1.24	65.0
BL1	0.90	51.6
BL2	1.74	65.0

3-3. 산소 및 수증기 투과성

표 5는 36°C에서 산소투과계수의 측정값이다. 그림 3은 시간변화에 따른 수증기 투과율이고 표 6은 36°C에서 2주일이 경과된 후 시료들의 수증기투과율 값이다. 인공피부 목표치의 산소투과특성은 계수가 10⁻⁸ 10⁻⁷cm³·(STP)·cm/cm²·sec·cmHg값으로 blendmer막이

그 값을 만족하였고 수증기 투과율은 인공피부의 목표치가 350g/m²/day이상이므로 모든 시료들이 목표치를 만족시켰다.

인공피부는 환부에서 통기성이 있어야하며 정상피부와 비슷한 수부증발 특성을 지녀야 한다.

Table 5. Oxygen permeability of monolayers, bilayers and blendmers.

Sample	Permeability (cm ³ (STP) cm/cm ² sec cmHg)
M1	1.40×10 ⁻⁹
M2	2.04×10 ⁻⁹
M3	1.71×10 ⁻⁹
M4	2.96×10 ⁻⁹
B1	1.35×10 ⁻⁹
B2	1.96×10 ⁻⁹
BL1	4.69×10 ⁻⁸
BL2	1.32×10 ⁻⁸

Table 6. Water vapor loss of monolayers, bilayers and blendmers at 36°C.

Sample	Water Vapor loss (g/m ² /day)
M1	431.7
M2	471.8
M3	447.3
M4	430.3
B1	339.1
B2	366.5
BL1	561.9
BL2	791.2

3-4. 생체 분해성

그림 4는 체액에 존재하는 단백질 분해효소 protease IV를 사용하여 시료들의 분해정도를 측정한 값이다.

표 7은 36°C, pH5, 0.1M phosphate buffer 용액에서 protease IV로 분해시킨 각 시료가 2주일이 지났을 때의 분해율 값이다. 각 시료는 처음부터 2일까지는 분해가 빨랐으나 그 이후는 완만하였다. 분해율은 blendmer막, bilayer막 그리고 monolayer막 순서로 증가하였다.

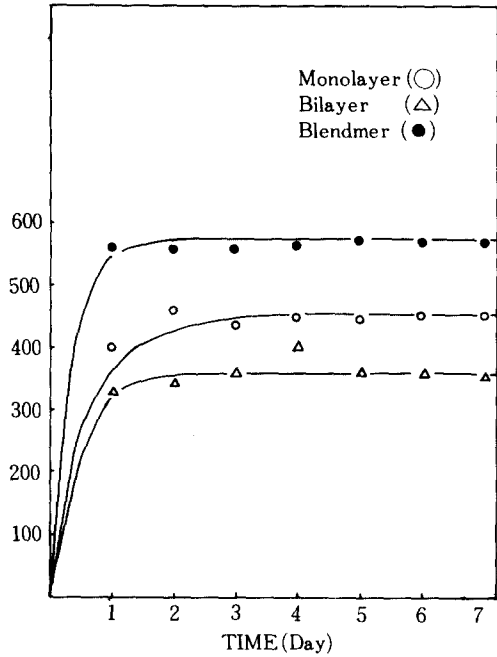


Fig. 3. Water vapor loss of monolayer, bilayer and blendmer at 36°C vs. time.

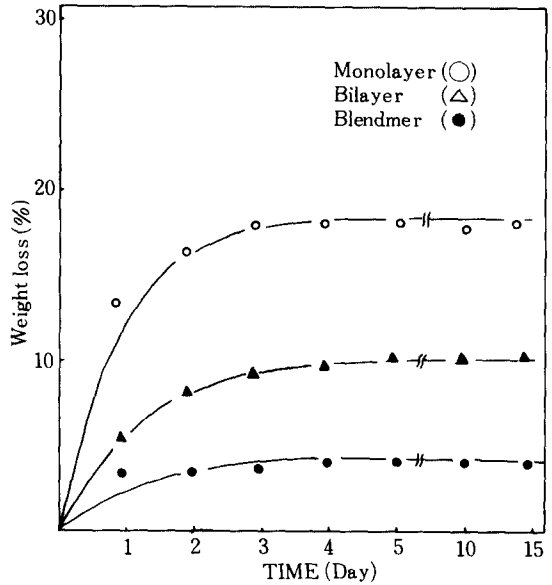


Fig. 4. Effect of the biodegradation of monolayers, Bilayer and blendmer treated by protease IV at 36°C and pH5 vs. time.

Table 7. Effect of the biodegradation of monolayers, bilayers and blendmers treated by protease IV at 36°C, pH5 and 15 days.

Sample	Biodegradation (%)
M 1	17.88
M 2	28.80
M 3	16.49
M 4	26.61
B 1	9.03
B 2	6.79
BL 1	4.02
BL 2	3.77

인공피부는 적당한 분해가 일어나면서 상처부위의 조직과 일체화되고 밀착성도 생겨야한다. 그런데 그 분해 정도는 기계적성질이 크게 저하되지 않는 범위내에서 생체분해가 일어나야 한다.

4. 결 론

L-leucine과 L-lysine을 원료로 인공피부를 제조하여 기계적, 물리적성질 및 생체분해성을 검토하였다. 흡수성은 monolayer막 보다 bilayer막과 blendmer막이 컸으며 인장강도는 인공피부의 목표치를 만족시켰으며 생체분해 실험 후에는 분해실험 전의 시료의 값보다 약간 감소하였다. 신장율은 인공피부의 목표치에는 약간 못 미쳤으나 사용가능성의 값을 나타냈으며 수증기 투과율은 인공피부의 목표치를 만족시켰고 산소투과성은 blendmer 막만이 그 목표치를 만족시켰다. 생체분해성은 monolayer막이 가장 컸지만 인공피부로서 사용가능하게 그 형태를 유지하고 기계적 성질이 크게 저하되지 않아서 사용가능한 값을 나타냈다. 각 시료들은 물리적 특성, 기계적 특성 및 생체분해성의 실험에서 대부분 정상피부와 비슷한 인공피부로서의 목표치를 만족시켰다. 따라서 앞으로 시행하게 될 인공피부의 생체적합성 실험인 동물실험에서도 좋은 결과가 기대된다. 보만은

참 고 문 헌

- 1) P.M. Neumann, J. Biomed. Mater. Res., 15, 9(1981)
- 2) I.V. Yannas and J.F. Burke, J. Biomed. Mater. Res., 14, 65(1980).
- 3) G.B. Park, biomat., Med. Ddev., Art. Org., 6(1), 1(1978)
- 4) 相羽誠一, 高分子論文集 39, 299(1982)
- 5) 富士原行彦, 工業材料 33(10), 50(1985)
- 6) Sylwester G, Aalbert J. Pennings Markromol. Chem., Rapid Com., 4, 675(1983)
- 7) Ee, Aubrey Woodroof, Burn Wound Covering, CRS Press.
- 8) 算浦憲彦, 高分子論文集 42, 481(1985)
- 9) 富士原行彦, 技能材料 2(4), 15(1982)
- 10) Helen R. Dickinson and Hiltner, J. Biomend. Mater. Res., 15, 591(1981)
- 11) 加藤哲夫, ペプチド合成, 丸善(株)出版
- 12) R.B. Woodward, J.Am. Chem. Soc., 69, 1551(1947)
- 13) Ephrain Datchalski, J. Am. Chem. Soc., 70, 2094(1948)