

## 저밀도 지방단백질 제거용 고분자의 제조 및 특성

박기동·이원규·한동근·김철희\*·김진규\*\*·김영하†

한국과학기술연구원 고분자화학연구팀, \*인하대학교 고분자공학과, \*\*서울대학교 임상병리학교실  
(1995년 2월 24일 접수)

## Preparation and Characteristics of Polymeric Low Density Lipoprotein (LDL) Binders

Ki Dong Park, Won Kyu Lee, Dong Keun Han, Chul Hee Kim\*,  
Jin Kyu Kim\*\*, and Young Ha Kim †

Polymer Chemistry Lab., Korea Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

\*Dept. of Polym. Sci. and Eng., Inha Univ., Inchon, Korea

\*\*Dept. of Clinical Pathology, Seoul National Univ. Hospital, Seoul, Korea

(Received February 24, 1995)

**요약** : Type IIa 가족성 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료를 위해 셀룰로오스 및 glass beads의 기질에 음이온성 술폰산기를 그래프트시킨 저밀도 지방단백질 (LDL) 제거용 고분자를 제조하였다. 제조된 제거제들은 FTIR, <sup>1</sup>H-NMR 및 원소분석기로 분석하였으며 사람의 혈청으로부터 그들의 LDL 흡착능을 평가하였다. 그래프트된 술폰산기의 함량은 기질 및 개질방법에 따라  $6.6 \times 10^{-5} \sim 3.9 \times 10^{-4}$  mol/g 이었으며 LDL 흡착정도는 술폰산화 제거제가 미처리 control에 비해서 상당히 높게 나타났다. 특히 glass beads에 dextran sulfate (DS)를 고정화시킨 Glass-TEOS-DS는 LDL 값이 48% 까지 크게 감소하여 효과적으로 LDL을 제거할 수 있음을 확인하였다.

**Abstract** : In order to utilize the LDL binders for the treatment of the type IIa familial hypercholesterolemia (FH) patients, polymeric low density lipoprotein (LDL) binders were prepared by grafting negatively charged sulfonate groups to cellulose and glass beads. The resulting LDL binders were characterized by FTIR, <sup>1</sup>H-NMR, and elemental analysis and their lipid binding capacity was assessed from human serum. The content of introduced sulfonate groups was  $6.6 \times 10^{-5} \sim 3.9 \times 10^{-4}$  mol/g, depending on substrates and modification methods. The LDL adsorption to sulfonated binders, in general increased as compared with untreated controls. Especially, dextran sulfate-grafted glass beads (Glass-TEOS-DS) have shown to decrease LDL level upto 48% among various LDL binders. This result indicates that LDL is selectively and effectively eliminated by a Glass-TEOS-DS, which can be applied for LDL apheresis.

**Keywords** : polymeric LDL binders, surface modification, LDL apheresis.

### 서론

혈액 중에 콜레스테롤치가 높아져서 동맥혈관에 쌓이면 동맥경화성 질환인 고콜레스테롤 혈증 (hypercholesterolemia)을 일으킬 수 있는데 이는 협심증, 심근경색증, 뇌경색증, 및 말초혈관 질환과

같은 심혈관계 질환의 원인이 되는 것으로 알려져 있다. 사람의 혈청을 특정 밀도의 용매로 초원심분획하면 지방단백질은 특정 영역의 밀도에 모이게 되는데 이를 chylomicron, VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein) 및 HDL (high density lipoprotein)로 분류할 수

있다. 이 중 LDL에 가장 많은 콜레스테롤이 함유되어 있으므로 혈중 콜레스테롤치를 감소시키기 위해서는 LDL치를 감소시켜야만 한다.

현재 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료법으로 식이요법, 약물치료, 체외순환법 및 외과적 수술법이 단계적으로 실시되고 있다. 식이요법<sup>1</sup>의 기본 원리는 식이에 함유된 콜레스테롤 섭취량과 간에서 생합성되는 콜레스테롤 양을 조절하여 LDL의 증가를 막는 것이고 약물요법은 식이요법, 운동, 금연에도 불구하고 LDL 콜레스테롤치가 190 mg/dL 이상인 환자에게 bile acid sequestrants,<sup>2</sup> nicotinic acid<sup>3</sup>와 같은 약물의 투여와 식이요법을 병행, 치료하는 것이다. 위의 방법으로도 치료가 되지 않을 경우, 특히 가족성 type IIa 고지혈증 환자는 체외순환법으로 지방단백질을 제거하면서 약물요법을 병행한다. 체외순환법에는 혈액의 세포 성분으로부터 혈장을 분리한 다음 이를 제공된 신선한 혈장으로 대체시키는 혈장교환법,<sup>4</sup> LDL에 대한 높은 보유력과 정밀한 cutoff치를 갖는 분리막으로 혈장을 여과하는 이중여과 혈장반출법,<sup>5</sup> LDL과 착물을 이룰수 있는 sulfated polysaccharide,<sup>6-8</sup> heparin,<sup>9,10</sup> antibody<sup>11</sup> 등을 이용하여 선택적으로 제거시키는 LDL 분리반출법이 많이 연구되고 있다. 외과적인 수술법으로는 partial bypass<sup>12</sup>와 portacaval shunt법<sup>13</sup>이 알려져 있으나 고콜레스테롤 혈증이 심할 경우에는 간이식이나 유전자 대체 요법이 고려되고 있다.

본 연구에서는 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료를 위하여 선택적으로 LDL을 흡착, 제거시킬 수 있는 여러가지의 LDL 제거제를 제조하였다. 기질로 사용된 셀룰로오스 및 glass beads를 여러가지 방법으로 술폰산화시킨 다음 사람 혈청에서 LDL에 대한 *in vitro* 흡착거동을 검토하였다.

## 실 험

**재 료.** 셀룰로오스 (상품명: AVICEL, microcrystalline)는 친화약품사 제품으로 50℃에서 감압

건조하여 사용하였으며, 이후 Cell로 표기하였다. Glass beads는 Sigma사의 제품 (Type I, 75-150 micron)으로, 진한 염산과 진한 질산의 3:1 혼합용액으로 4시간 이상 처리한 다음 증류수로 여러번 세척한 후 진공건조하여 사용하였다. Hexamethylene diisocyanate (HMDI)와 toluene diisocyanate (TDI)는 각각 Aldrich사의 1급 시약을 감압증류하여 사용하였다. Aminopropyl-triethoxysilane (APS), isocyanatopropyl-triethoxysilane (IPS) 및 tetra-ethyl-orthosilicate (TEOS)는 각각 Aldrich사, United Chemical Technology사 및 Sigma사의 제품을 그대로 사용하였다. Poly(vinyl alcohol) (PVA, 분자량: 124,000~186,000)와 poly(allyl amine) hydrochloride [PALA, 분자량: 10,000(10K) 및 55,000(55K)]는 Aldrich사의 제품으로 PALA의 HCl을 염기로 제거한 후 사용하였고 poly(ethylene oxide) [PEO, 분자량: 1,000(1K)]는 일본 Wako Pure Chemical사의 1급 시약을 각각 재결정하여 사용하였다. 1,3-propane sultone (PST)과 poly(styrene sulfonic acid) (PSSA)는 Aldrich사의 제품을, dextran sulfate (DS)와 heparin (Hep)은 Sigma사의 제품을 그대로 사용하였다. 촉매인 stannous octoate와 dibutyltin dilaurate는 각각 Sigma사와 Aldrich사의 1급 시약을 그대로 사용하였으며 그 외의 용매들은 1급 시약을 그대로 사용하였다.

### LDL 제거제의 제조.

#### 셀룰로오스를 기질로 한 제거제의 제조.

**Cell-PALA-SO<sub>3</sub>의 제조:** Fig. 1은 Cell-PALA-SO<sub>3</sub>의 제조과정을 나타낸 모식도이다. 먼저 50℃에서 48시간 동안 감압건조시킨 셀룰로오스 5 g을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 분산시키고 HMDI 21.78 g (0.13 mol)과 stannous octoate를 0.25 mL 첨가한 후 60℃에서 2시간 반응시켰다. 얻어진 생성물을 DMSO와 ethyl ether로 각각 세척한 후 실온에서 24시간 동안 진공 건조하여 Cell-HMDI를 제조하였다. PALA10K (또는 55K) 1 g을 100 mL의 DMSO에 용해시킨 다음 앞서 제조한

Cell-HMDI 5 g과 dibutyltin dilaurate 2.5 mL를 첨가한 후 50℃에서 24시간 반응시켰다. 생성물을 DMSO와 메탄올로 각각 세척한 후 실온에서 24시간 동안 진공건조시켜 Cell-PALA를 제조하였다. 얻어진 Cell-PALA 5 g을 DMSO에 분산시키고 PST 10 g (0.082 mol)을 첨가한 다음 60℃에서 24시간 동안 반응시킨 후 DMSO와 아세톤으로 세척하여 Cell-PALA-SO<sub>3</sub>를 제조하였다.

**Cell-PEO-PALA-SO<sub>3</sub>의 제조 :** TDI-PEO-TDI의 제조과정은 Fig. 2에 나타낸 것처럼 먼저 PEO1K 5 g (0.005 mol)과 TDI 5 g (0.025 mol)을 각각 100 mL와 50 mL의 벤젠에 용해시킨 다음 60℃, 질소 기류하의 TDI 용액에 PEO 용액을 서서히 적하시킨 후 stannous octoate 2.5 mL를 첨가하고 50℃에서 24시간 동안 반응시켰다. 반응 후의 용액을 ethyl ether에 침전시킨 후 24시간 동안 실온에서 진공건조하여 TDI-PEO-TDI를 합성하

였다. 계속해서, 얻어진 TDI-PEO-TDI를 벤젠에 녹이고 충분히 건조시킨 셀룰로오즈 5 g과 stannous octoate 2.5 mL를 첨가한 다음 24시간 반응시킨 후 벤젠과 ethyl ether로 각각 세척하고 진공건조하여 Cell-PEO-NCO를 제조하였다. Cell-PEO-PALA-SO<sub>3</sub>는 Cell-PEO-NCO 5 g을 DMSO 200 mL에 분산시킨 다음 Cell-PALA-SO<sub>3</sub>의 제조 방법과 동일한 조건으로 PALA10K (또는 55K)와 PST를 순차적으로 그래프트시켜서 제조하였다.

**Glass beads를 기질로 한 제거제의 제조.**

**PVA-SO<sub>3</sub>의 제조 :** PVA 5 g ( $3.23 \times 10^{-5}$  mol)

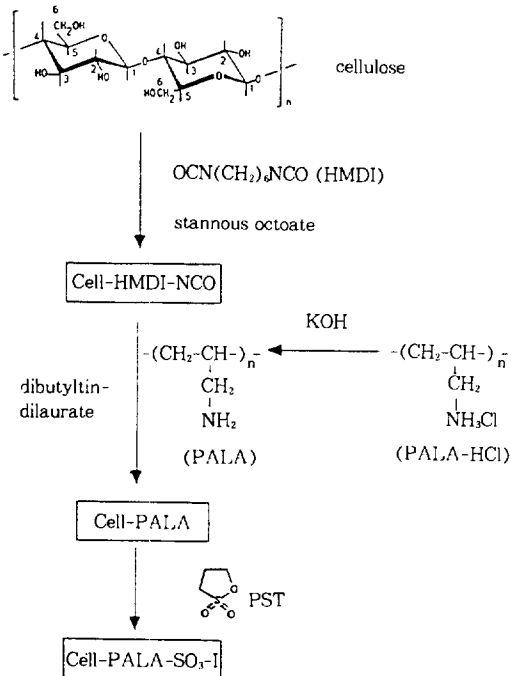


Fig. 1. The synthetic procedures of Cell-PALA-SO<sub>3</sub>.

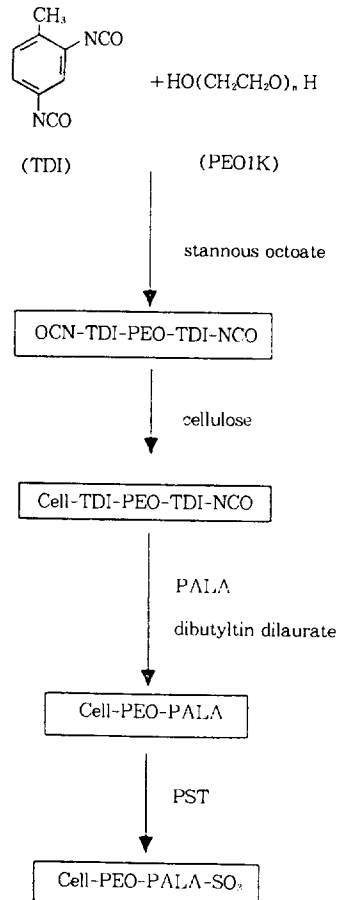


Fig. 2. The synthetic procedures of Cell-PEO-PALA-SO<sub>3</sub>.

을 85°C에서 200 mL의 DMSO에 녹이고  $K_2CO_3$  15.7 g (0.114 mol)을 가하여 염의 형태로 만든 다음 PST 27.7 g (0.227 mol)을 가하여 20시간 더 반응시켰다. 생성물을 isopropanol에 침전, 여과하여 물에 녹이고 이를 투석막 (Spectra CE membrane, 분자량 cutoff=3,500)을 이용하여 투석한 후 동결건조하여 PVA-SO<sub>3</sub>를 얻었다.

**Glass-APS-PVA-SO<sub>3</sub>와 Glass-IPS-PVA-SO<sub>3</sub>의 제조:** 전처리된 glass beads를 APS/톨루엔 용액 (5%, v/v)에 넣고 상온에서 24시간 동안 교반시킨 다음 여과하고 아세톤으로 세척하여 Glass-APS를 제조하였다. 얻어진 Glass-APS를 DMSO에 분산시킨 후 HMDI를 첨가하고 40°C에서 2.5시간 반응시켜 Glass-APS-HMDI를 제조하였다. 여기에 이미 제조된 PVA-SO<sub>3</sub>를 상온에서 24시간 반응시켜 Glass-APS-PVA-SO<sub>3</sub>를 제조하였고 APS 대신 IPS를 사용, Glass-IPS-NCO를 제조한 다음 Glass-APS-PVA-SO<sub>3</sub>와 같은 방법으로 Glass-IPS-PVA-SO<sub>3</sub>도 제조하였다.

#### Sol-gel법에 의한 제거제의 제조.

Glass beads와 반응시키고자 하는 물질 (Hep, PSSA 및 DS)을 TEOS와 일정한 비율로 0.15 M HCl 용액에 녹이고 졸상태가 될 때까지 교반하였다. 전처리된 glass beads를 이 용액에 48시간 동안 상온에서 젤화시켜 각각 Glass-TEOS-Hep, Glass-TEOS-PSSA 및 Glass-TEOS-DS를 제조하였다.

#### 구조 분석.

**FTIR 분석:** 합성된 PVA-SO<sub>3</sub>의 화학조성을 Fourier transform infrared spectrometer (FTIR, Mattson Alpha Centauri)로 분석하였다.

**<sup>1</sup>H-NMR 분석:** 합성된 PVA-SO<sub>3</sub>를 DMSO-d<sub>6</sub>에 녹인 후 proton nuclear magnetic resonance spectrometer (<sup>1</sup>H-NMR, Varian Gemini 300 MHz)로 분석하였다.

**황 분석:** SO<sub>3</sub>기가 도입된 재료들의 황 함량은 원소분석기 (Leco Model CS-344)를 이용하여 정량하였다.

**NCO기의 함량분석:** 시료 0.1 g에 과량의 n-dibutyl 아민을 가하여 약 20분 동안 반응시킨 후 미반응 아민을 0.01 N HCl 용액으로 역적정하였다. 이때 지시약은 bromocresol green (약 2-3 방울)을 사용하였으며 용액이 blue (알칼리)에서 green (중성)으로 변할 때를 end point로 하여 시료의 단위 g 당 NCO기의 mol수를 구했다.

**NH<sub>2</sub>기의 함량분석:** 시료 0.1 g에 0.01 N HCl 용액을 가하여 아민기와 반응시킨 다음 pH를 3.0으로 조정하였다. 반응 후 남아있는 미반응 HCl에 0.01 N NaOH 용액을 가하면서 전위차 역적정 (potentiometric back titration)하여 시료의 단위 g당 NH<sub>2</sub>기의 mol수를 구했다.

**SO<sub>3</sub>기의 함량분석:** Methylene blue (MB) 용액의 농도에 따른 664 nm에서의 UV 흡수도 변화를 나타내는 검량곡선을 만든다. 시료 0.1 g을  $5.0 \times 10^{-5}$  M의 MB 용액 5 mL에 1시간 침적 시키고 원심분리기로 시료와 용액을 분리한 다음 여액을 취하여 흡수도를 측정함으로써 SO<sub>3</sub>기를 정량하였다.

#### 지방단백질의 분석.

**흡착시험방법:** 여러종류의 LDL 제거제를 phosphate buffered saline (PBS, 0.85%, pH=7.4)으로 equilibration시킨 다음 최종 농도가 2.5 g/dL가 되도록 조절하였다. Polystyrene tube (20 mL)에 사람의 혈청을 5 mL 취한 후 여기에 PBS에 희석한 LDL 제거제 용액 250  $\mu$ L를 첨가하였다. 계속해서 37°C에서 격렬하게 흔들면서 30분간 황은 처리한 다음 2500 rpm으로 10분간 원심한 후 상층액을 취하여 미흡착된 지방단백질을 각종 지질검사를 행하여 분석하였다. 최소한 2회 이상 측정한 후 평균값을 구하였다.

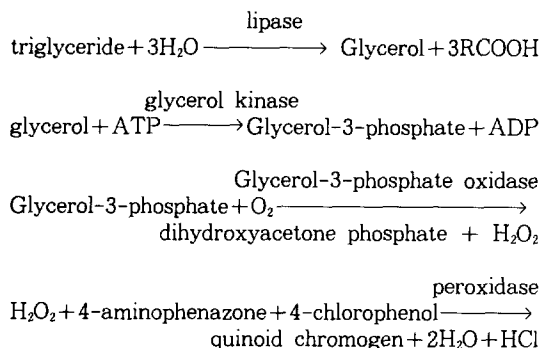
#### 지질검사방법.<sup>14</sup>

##### 총 콜레스테롤 (TC)의 측정: 산화효소법

콜레스테롤-에스테르를 가수분해하여 free cholesterol로 변화시킨 다음 cholesterol oxidase (COD)를 작용시키면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 생성되는데 이를 dye (EMST-aminoantipyrine)와 반응시킨 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 트리글리세리드(TG)의 측정 : 산화효소법

트리글리세리드를 가수분해하여 생긴 glycol을 아래와 같은 일련의 효소반응을 통하여 비색 정량하였다.



### HDL 콜레스테롤의 측정 : dextran sulfate, MgCl<sub>2</sub>

#### 침전법 (+ 산화효소법)

혈청에 dextran sulfate와 Mg를 가해서 HDL 이외의 지단백을 불용성 복합체로 만들어 침전시킨 후 총 콜레스테롤에서의 방법과 동일하게 효소반응시킨 다음 흡광도를 측정하였다.

**VLDL 및 LDL 콜레스테롤의 계산 :** 다음의 Friedewald 식에 의해서 계산하였다.<sup>14</sup>  $\text{VLDL} = \text{TG}/5$ ,  $\text{LDL} = \text{TC} - (\text{HDL} + \text{VLDL})$

## 결과 및 고찰

본 연구의 목적은 type IIa 가족성 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료를 위한 체외순환용 LDL 제거제를 제조하는데 있다. 셀룰로오즈 및 glass beads와 같은 기질에 sulfate나 sulfonate기를 도입함으로써 이들의 음이온과 LDL의 양전하를 띤 단백질의 일부분 및 2가 양이온의 연결에 의한 음전하를 띤 단백질의 일부분과의 이온 상호작용에 의해서 LDL을 흡착, 제거하는 것이다.

**반응 중간체의 합성.** Fig. 3은 PVA-SO<sub>3</sub>의 FTIR 스펙트럼을 나타낸 것으로 주사슬인 PVA의 OH기가 3400~3500 cm<sup>-1</sup>에서 넓은 피크를

보이고 도입된 PST의 특성 피크인 비대칭 및 대칭 SO<sub>3</sub>기가 각각 1190 및 1041 cm<sup>-1</sup>에서 나타난 것으로부터 합성을 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼으로 부터는 3.5~4.5 ppm에 보인 PVA의 -CH<sub>2</sub>- 및 -CH-기 그리고 1.5 ppm에서 PST의 개환에 의한 -CH<sub>2</sub>기의 proton을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 또한 원소분석 결과 PVA-SO<sub>3</sub>의 황 함유량은 7.78 wt%로 나타났는데 이는 PVA의 관능기 2개 중 하나가 SO<sub>3</sub>기로 치환되었음을 의미한다.

**Cell-NCO의 제조.** 셀룰로오즈를 기질로 사용한 경우 셀룰로오즈의 hydroxy기와 HMDI의 한쪽 이소시아네이트 (NCO)기와의 반응을 통해서 우레탄기를 형성하게 하면 다른 쪽 말단에 반응할 수 있는 NCO기가 남게 된다. APS와의 반응에서

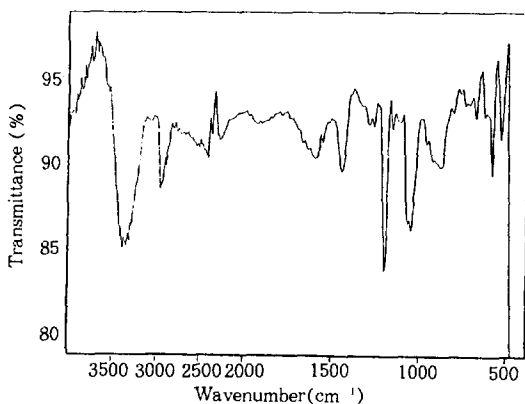


Fig. 3. IR spectrum of PVA-SO<sub>3</sub>.

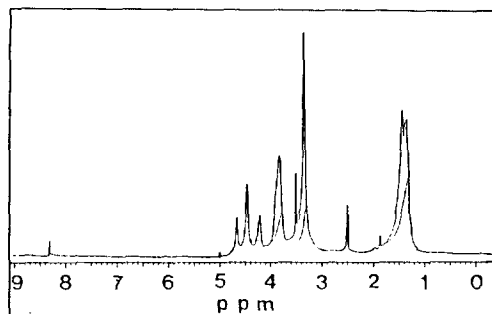


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of PVA-SO<sub>3</sub>.

유리표면의 OH기와 APS에 있는 3개의 ethoxy를 반응시키면 말단에는 APS의 아민기가 남게 되는데 이 아민기와 HMDI를 반응시켜 NCO기를 도입시켰으며 또한 IPS와의 반응에서는 NCO기가 직접 도입되게 된다. Table 1은 각 재료에 도입된 NCO기의 함량을 나타낸 것이다. Cell-HMDI의 경우 60℃에서 2시간 반응한 경우가 가장 높은 NCO 함량을 보였으며 2시간이 경과하면서 NCO의 함량이 감소하는 것은 그래프트된 NCO기의 가교나 bridging에 기인한 것으로 사료된다.<sup>15</sup> 여러 시료중 Glass-IPS의 NCO 함량이 가장 높은데 이는 유리 표면의 OH 함량이 다른 기질에 비해 많기 때문이며 Glass-APS의 경우는 앞의 경우보다 한 단계 반응을 더 거치기 때문에 상대적으로 그 값이 낮아졌다. 또한 PEO를 도입시킨 경우 가장 낮은 NCO기 함량을 나타내는데 이는 먼저 TDI-PEO-TDI를 합성한 후 셀룰로오스에 그래프트시켰기 때문에 PEO 유도체의 상대적 고분자량에 기인한 입체장애로 인하여 반응물질 중 가장 낮은 그래프트율을 보인 것으로 추측된다.

**Cell-PALA의 제조.** NCO기가 도입된 기질에 PALA를 그래프트시키면 PALA의 사슬내에 있는 하나의 아민기가 반응하여 결합을 하고 나머지 아민기는 술포산화되므로 그 함량에 따라 LDL 제거능이 달라지기 때문에 보다 많은 양의 아민기가 치환되는 것이 바람직하다. Fig. 5는 Cell-HMDI-PALA의 반응 시간에 따른 아민기의 함량 변화를 나타낸 것이고 Table 2는 각 재료들의 아민 함량을 정리한 것이다. 도입된 아민 함량은 50℃에서 24시간 반응시 최대치를 보였다. 대체로 PALA의 분자량이 증가함에 따라서 아민기의 그래프

트율이 증가하는 것은 당연한 것으로 이것은 PALA55K가 PALA10K 보다 아민기가 많아 미반응 아민이 많이 남아있기 때문이다. 또한 가장 낮은 NCO기 함량을 보였던 Cell-PEO1K-PALA가 비교적 높은 아민기 함량을 보이고 있는데 이는 전술한 바와 같이 PEO를 도입시킴으로서 셀룰로오스에서 분자량만큼 멀리 떨어져 있어서 반응하는데 입체장애를 적게 받고 PEO의 사슬 유동성에 기인하여 말단의 NCO기가 PALA와의 접촉이 용이해졌기 때문으로 사료된다.

**Cell-PALA-SO<sub>3</sub> 제조.** Table 3은 아민기가 도입된 시료를 술포산화하여 그 치환된 정도를 나타낸 것이다. 개질방법에 따라 술포산기의 함량이  $6.6 \times 10^{-5} \sim 3.9 \times 10^{-4}$  mol/g을 보였다. 또한 PALA의 분자량이 증가할수록 그리고 spacer로 친수성의 유연한 PEO가 도입된 경우가 술포산기의 함량이 증가하였다. 이러한 결과는 전술한 Cell-PALA의 경우와 같은 이유로 설명될 수 있다.

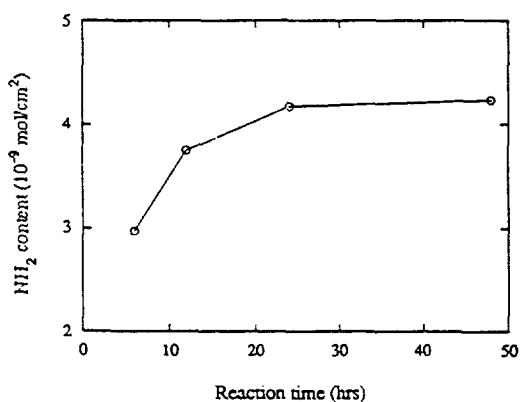


Fig. 5. The NH<sub>2</sub> content vs. reaction time for Cell-HMDI-PALA.

Table 1. NCO Content of the Modified Substrate

| Sample             | NCO Content (mol/g)   |
|--------------------|-----------------------|
| Cell-HMDI          | $1.66 \times 10^{-4}$ |
| Cell-TDI-PEO1K-TDI | $9.00 \times 10^{-5}$ |
| Glass-APS-HMDI     | $1.30 \times 10^{-3}$ |
| Glass-IPS          | $1.74 \times 10^{-3}$ |

Table 2. NH<sub>2</sub> Content of the Modified Cellulose

| Sample             | NH <sub>2</sub> Content (mol/g) |
|--------------------|---------------------------------|
| Cell-PALA10K       | $5.66 \times 10^{-5}$           |
| Cell-PALA55K       | $9.90 \times 10^{-5}$           |
| Cell-PEO1K-PALA10K | $4.39 \times 10^{-5}$           |
| Cell-PEO1K-PALA55K | $4.59 \times 10^{-5}$           |

**Table 3.** SO<sub>3</sub> Content of Various LDL Binders

| Sample                             | SO <sub>3</sub> Content (mol/g) |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Cell-PALA10K-SO <sub>3</sub> - I   | $6.60 \times 10^{-5}$           |
| Cell-PALA55K-SO <sub>3</sub> - II  | $8.31 \times 10^{-5}$           |
| Cell-PEO1K-PALA10K-SO <sub>3</sub> | $3.65 \times 10^{-4}$           |
| Cell-PEO1K-PALA55K-SO <sub>3</sub> | $3.86 \times 10^{-4}$           |

**Table 4.** The Content(%) of Residual Lipid\* after Adsorption by Binders

| Binder                        | TC  | TG  | HDL | LDL | VLDL |
|-------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| Cellulose                     | 87  | 78  | 45  | 100 | 80   |
| Cell-PALA10K-SO <sub>3</sub>  | 92  | 89  | 86  | 93  | 91   |
| PVA-SO <sub>3</sub>           | 82  | 78  | 100 | 50  | 77   |
| Glass-APS-PVA-SO <sub>3</sub> | 98  | 95  | 87  | 100 | 95   |
| Glass-IPS-PVA-SO <sub>3</sub> | 100 | 100 | 87  | 100 | 100  |
| Glass-TEOS-PSSA               | 76  | 68  | 53  | 85  | 68   |
| Glass-TEOS-Hep                | 94  | 95  | 100 | 90  | 93   |

\*TC : total cholesterol, TG : triglyceride, HDL : high density lipoprotein, LDL : low density lipoprotein, VLDL : very low density lipoprotein.

**LDL 제거제의 평가.** 본 연구에서 제조된 10여종의 LDL 제거제는 정상인의 혈청을 사용하여 *in vitro* 에서 각종 지질종목의 변화정도를 서울대병원 임상 병리학교실에서 검사하였다. Table 4에 여러가지 방법으로 제조된 LDL 제거제중 6종의 재료에 대한 결과를 나타내었다. Control로 사용한 셀룰로오르는 VLDL의 값이 다소 감소하였으나 LDL은 전혀 흡착되지 않았고 여기에 PALA10K-SO<sub>3</sub>를 그래프트시킨 것은 HDL, VLDL과 LDL이 동시에 감소하였으나 HDL의 값이 더 많이 감소하여 LDL 제거제로의 효과는 기대할 수 없다. 이는 PALA의 술 폰산화가 90%밖에 이루어지지 않았으므로 남아있는 10%의 양이온성 아민기가 LDL과 정전기적 반발을 일으켰기 때문으로 생각된다.

Sol-gel법에 의해 PSSA를 glass beads의 표면에 고정화한 Glass-TEOS-PSSA도 역시 HDL, LDL과 VLDL이 더욱 많은 감소를 나타냈다. HDL은 LDL의 재순환 역할을 하고 지방단백질의 대사에 필요한 단백질의 대사와 저장에 관여하기 때문에 HDL의 감소는 LDL 제거제로서의 의미를

**Table 5.** The Content (%) of Residual Lipid after Adsorption by Glass-TEOS-DS

| Amount of Sample (mg) | TC | TG | HDL | LDL | VLDL |
|-----------------------|----|----|-----|-----|------|
| 500                   | 88 | 83 | 98  | 88  | 82   |
| 1000                  | 68 | 66 | 92  | 57  | 66   |
| 2000                  | 67 | 65 | 96  | 48  | 66   |

반감시킨다. 이에 비해 Glass-TEOS-Hep과 PVA-SO<sub>3</sub>는 HDL의 감소가 전혀없는 반면에 LDL (90 및 95%)과 VLDL (93 및 77%)의 값이 감소하여 좋은 LDL 제거 효과가 있는 것으로 나타났다. 그러나 PVA-SO<sub>3</sub>가 높은 LDL 제거 효과를 나타냈음에도 이를 glass 표면에 공유결합 시킨 Glass-APS-PVA-SO<sub>3</sub>와 Glass-IPS-PVA-SO<sub>3</sub>는 LDL이 전혀 흡착되지 않는 것으로 조사되었다. 이는 glass 표면에 도입된 PVA-SO<sub>3</sub> 농도가 LDL을 흡착시키기에 충분치 않기 때문으로 생각된다.

Table 5는 본 연구에서 제조한 여러 제거제 중 가장 좋은 LDL 제거효과를 나타낸 Glass-TEOS-DS의 흡착실험 결과이다. 재료의 첨가량을 변화시켜 시험한 결과 LDL의 수치가 88%에서 48%까지 그리고 VLDL의 수치는 82%에서 66%까지 크게 낮아진 반면 HDL의 수치는 98%에서 92%로 거의 변화가 없음이 확인되어 아주 탁월한 LDL 제거 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

현재 각 기질의 표면에 보다 많은 술폰산기를 고정화시키기 위한 방법과 glass를 이용한 sol-gel법의 최적화 및 특성분석 그리고 환자의 혈청을 이용한 LDL 제거의 평가가 연구 중에 있다.

## 결 론

Type IIa 가족성 고콜레스테롤 혈증 환자의 치료를 위하여 혈액의 체외 순환용 음이온성 LDL 제거제를 여러가지 방법으로 제조하여 그 특성을 분석하고 또한 지질의 흡착능을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

셀룰로오스 및 glass beads를 기질로 하여 말단에 sulfate/sulfonate기가 있는 새로운 형태의 LDL

제거제를 여러가지 방법으로 제조하였다. 사용된 결합제는 HMDI, TDI, APS 및 IPS로 그래프트된 NCO기는 60℃에서 2시간 반응시 최고치를 보였으며 그 함량은 개질 방법에 따라  $9.0 \times 10^{-5} \sim 1.7 \times 10^{-3}$  mol/g이었다. 많은 관능기를 도입시키기 위하여 사용된 PALA는 50℃에서 24시간 반응한 경우가 최고의 그래프트율을 보였으며 그 함량은  $4.4 \times 10^{-5} \sim 9.9 \times 10^{-5}$  mol/g이었다. 또한 도입된 술폰산기의 함량은 개질 방법에 따라  $6.6 \times 10^{-5} \sim 3.9 \times 10^{-4}$  mol/g을 보였다. 제조된 여러 제거제 중 가장 우수한 LDL 제거 효과를 보인 것은 sol-gel법에 의해 glass beads에 dextran sulfate를 고정화시킨 Glass-TEOS-DS로 HDL의 값은 거의 변화없이 LDL의 값만 48% 까지 감소되었다.

이상의 결과로부터 type IIa 가족성 고콜레스테롤 혈증의 치료를 위해 체외순환용으로 제조된 LDL 제거제, 특히 Glass-TEOS-DS는 콜레스테롤을 많이 함유한 LDL만을 선택적으로 흡착, 제거할 수 있을 것으로 기대된다.

**감사의 글 :** 본 연구는 1994년 과학기술처 기초연구과제(2N12022)로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 이광우, *Medical Tribune*, **487**, 14 (1991).
2. S. Bergstrom, *Fed. Proc.*, **20**, 121 (1961).
3. T. Langer and R. I. Levy, "Metabolic Effects of Nicotinic Acid and Its Derivatives", p. 641, Bern, Haus Huber, 1971.
4. G. R. Thompson, *Apheresis Bulletin*, **1**, 26 (1983).
5. W. P. Olson and M. W. Faith, *Preparative Biochemistry*, **8**(5), 379 (1978).
6. M. L. Girard, *Bull. de l'Academie Nationale de Medicine (Paris)*, **163**(2), 136 (1979).
7. Y. C. Kim and T. Nishida, *J. Biol. Chem.*, **254**(19), 9621 (1979).
8. T. Nishida and U. Cogan, *J. Biol. Chem.*, **245**(18), 4689 (1970).
9. V. W. Armstrong, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **29**, 323 (1983).
10. H. Wieland and D. Seidel, *J. Lipid Res.*, **24**, 904 (1983).
11. W. Stoffel, *Lancet*, November, **7**, 1005 (1981).
12. H. Buchwald, *Circulation*, **28**, 649 (1963).
13. T. E. Starzl, *Lancet*, October, **27**, 940 (1976).
14. W. T. Friedewald and R. I. Levy, and D. S. Fredrickson, *Clin. Chem.*, **18**, 449 (1972).
15. 이원규, 박기동, 한동근, 정서영, 김영하, *의공학회지*, **15**(3), 259 (1994).