

불포화 폴리(3-히드록시알칸오에이트)를 기질로 한 경피제제의 약물방출

이수홍 · 신병철 · 이영하* · 김형우* · 김영백** · 김승수[†]

한국화학연구원 화학소재연구부, *충남대학교 미생물학과, **배재대학교 고분자공학과

(2003년 5월 19일 접수, 2003년 10월 4일 채택)

Transdermal Drug Release of Polymer Matrix of Unsaturated Poly(3-hydroxyalkanoate)

Soo Hong Lee, Byung Cheol Shin, Young Ha Rhee*,
Hyung Woo Kim*, Young Back Kim**, and Sung Soo Kim[†]

Advanced Materials Division, Korea Research Institute of Chemical Technology,

100 Jang dong, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

*Department of Microbiology, Chungnam National University, Gung dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Korea

**Department of Polymer Engineering, PaiChai University, Doma-dong, Seo-gu, Daejeon 302-735, Korea

[†]e-mail : sskim@kriict.re.kr

(Received May 19, 2003; accepted October 4, 2003)

초록 : 불포화 폴리(3-히드록시알칸오에이트) (UPHA)를 생합성하고 이 고분자 매트릭스 내에서의 약물방출 경향을 조사하였다. UPHA의 생합성에 사용된 균주는 *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 29347)이고 탄소원은 10-undecenoic acid를 사용하였으며 산-염기조절방법 배지형태 발효법을 이용하여 미생물 배양을 행하였다. 생합성된 UPHA는 ¹H- 및 ¹³C-NMR, FT-IR, GPC 및 DSC 등을 사용하여 물리 및 화학적 분석을 행하였다. 약물방출 실험은 확산셀을 이용하여 모델약물인 케토프로펜의 방출량을 HPLC를 이용하여 측정하였고 UPHA의 가교도, 패취두께, 경피투과 향상제 등의 영향에 대하여 조사하였다. UPHA의 가교도의 증가에 따라 약물방출 속도가 늦어지고 약물방출 속도가 일정해지는 경향을 나타내었다. 경피투과용 패취의 두께가 두꺼워질수록 약물방출 지속시간이 길어지고 경피투과 향상제인 프로필렌 글리콜의 함량 증가에 따라 방출 속도가 향상되는 경향을 나타내었다.

ABSTRACT : Unsaturated poly(3-hydroxyalkanoate) (UPHA) was biosynthesized and the properties of drug delivery using the polymer matrix were investigated. The biosynthesis of UPHA was carried out by pH-stat fed batch fermentation of *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 29347) grown solely with 10-undecenoic acid as a carbon source. The physical and chemical properties of the biosynthesized UPHA were characterized using NMR, FT-IR, GPC and DSC. The drug release experiments were carried out using HPLC with a diffusion cell for the release amount of ketoprofen as model drug. The effects of crosslinking degree, patch thickness, and enhancer on the drug release were studied. The drug release rate was linearly decreased and consistent with increased crosslinking degree of the polymer matrix. The duration of drug release was enhanced by the increased patch thickness. The drug release rate was increased with increased amount of propylene glycol as an enhancer.

Keywords : unsaturated poly(3-hydroxyalkanoate), drug delivery, transdermal, ketoprofen.

1. 서론

폴리(3-히드록시알칸오에이트) (PHA)는 원핵 미생물들

이 탄소원 및 에너지원으로 세포 내에 축적하는 지방 저장물의 일종이다. 세포 내의 저장물질로서 PHA를 만드는 미생물은 1926년 Lemoigne에 의하여 최초로 발견된 이

후 *Pseudomonas oleovorans*를 비롯한 120여종 이상이 존재하는 것으로 알려져 있다.^{1,5} PHA는 생분해성 폴리에스터로서 토양 속의 미생물이나 효소, 화학적 가수분해 등에 의하여 분해되므로 환경친화성 플라스틱 재료로 응용하기 위한 연구가 널리 진행되고 있다.⁶⁻¹⁰ 또한 PHA는 생합성에 의하여 제조되므로 단량체, 촉매, 중합개시제, 산화방지제 등과 같은 독성을 일으킬 수 있는 화합물의 사용을 배제할 수 있고 생체적합성이 우수한 특성을 지니고 있어 약물전달시스템, 생체이식재료 등과 같은 용도를 위한 생체의료용 소재로 응용하기 위한 연구도 행해지고 있다.¹¹

불포화 폴리(3-히드록시알칸오에이트) (UPHA)는 고분자 결합지에 탄소-탄소 이중결합을 가지고 있어 가교반응이 가능하고 유리 전이 온도 (T_g)가 약 -50 °C로서 상온에서 접착력을 나타내는 점성이 높은 액상 고분자 물질이다.¹² 본 연구에서는 UPHA의 이와 같은 특성을 이용하여 경피투과용 약물전달시스템에 응용하기 위한 기초연구로서 가교화 UPHA 고분자 매트릭스에서의 약물방출 경향을 조사하였다. 경피투과용 약물전달시스템은 경구투여시 부작용을 나타내는 약물이나 지속적인 투여가 필요한 약물을 피부를 투과하여 체내에 전달시키는 방법이다. 이 경피투과용 약물전달시스템에는 피부에 부착시키기 위해 필연적으로 접착제가 사용되고 있는데 현재 이 접착제 소재로 주로 사용되고 있는 고무나 아크릴 수지는 피부발진, 알레르기 등과 같은 피부자극성이 있는 단점을 가지고 있다.

이에 보다 생체적합성이 우수하고 T_g 가 낮아 접착제로 사용하기 위해 유기용매가 필요 없는 생체유래 고분자인 UPHA를 경피투과용 약물전달시스템의 접착제 및 약물 저장소로의 응용하기 위해 연구를 행하였다. 본 연구에서는 경피투과용 소염진통제로 널리 사용되고 있는 케토프로펜을 모델약물로 사용하였다.

2. 실험

시약 및 재료. 본 연구에 사용된 시약인 10-undecenoic acid, 과산화벤조일 (BPO), 케토프로펜, 클로로포름, 아세토니트릴, 프로필렌 글리콜 등은 모두 Aldrich사의 특급 또는 분석용 시약을 사용하였다. 한편 미생물 배양에 사용된 E^* 배양액은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 1.10 g/L, K_2HPO_4 5.80 g/L, KH_2PO_4 3.70 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.37 g/L와 미량원소 용액 3 mL을 혼합하여 제조하였다.¹² 미량원소용액은 증류수 1 L당 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.29 g/L, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1.98 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.67 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.78 g/L, $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.81 g/L, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.17 g/L 등을 혼합하여 제조하였다.

UPHA의 생합성. UPHA는 Kim 등의 방법을 사용하여 생합성하였는데 그 방법은 다음과 같다.¹² 본 연구에 사용된 균주는 *Pseudomonas oleovorans* (ATCC 29347)으로 균주 보관 및 배양을 위해 배지 L당 3 g의 옥탄산을 단일 탄소원으로 한 E^* 배양액에서 일주일 간격으로 계대 배양하였다. 다음 10000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 얻은 균주를 동결 건조하여 -70 °C에서 보관하여 사용하였다. 불포화기를 함유하는 PHA를 생합성하기 위하여 종균 배지로 2 g/L 10-undecenoic acid가 포함된 E^* 배양액을 사용하여 250 rpm에서 20시간 배양한 후 발효 배지 부피의 10 vol%의 양으로 발효조에 접종하였다. 본 배양은 배양시 세포의 생장을 높이기 위하여 산-염기조절방법 배취형태 발효법을 사용하였다. 용존산소량을 조절하기 위하여 교반속도를 350에서 700 rpm까지 조절하였으며 배양온도는 30 °C, pH는 7.0, 통기량은 0.7 vvm이었다. 배양 전 기간 동안 균주의 성장양상은 660 nm에서 광학밀도를 측정함으로 결정하였다.

배양이 끝난 균체를 수득하기 위해 10000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻어 균주들을 열린 후 동결건조기 (FD5505S, IIsin Co.)를 이용하여 동결 건조하여 건체량을 측정하였다. 동결 건조하여 얻은 건조세포에서 UPHA를 추출하기 위해 적당량의 모래와 함께 막자사발에 넣고 곱게 갈아 thimble filter (Advantec Co.)에 넣고 여과한 다음 클로로포름을 이용하여 Soxhlet 여과를 행하였다. 추출된 UPHA는 메탄올에 3회 침전시켜 정제하였다.

물리 및 화학적 특성조사. 생합성된 UPHA의 화학적 구조를 조사하기 위하여 ^1H - 및 ^{13}C -NMR (Bruker, Avance 500), FT-IR (Bio-Rad Digilab, FTS-165) 등으로 분석하였다. 한편 UPHA의 분자량 분포를 조사하기 위하여 젤 투과크로마토그래피 (GPC, Alliance 2690, Waters) 분석을 행하였다. 가교반응에 따른 고분자의 가교도 및 열적 성질 변화를 조사하기 위하여 FT-IR 및 DSC (DSC 2910, TA Instruments) 분석을 행하였다. 가교반응에 따른 고분자의 점착력 변화를 조사하기 위하여 T-peel 시험 (ASTM D 1876-72)을 인스트론형 만능 시험기 (UTM 4482, Instron)를 사용하여 측정하였다. 이 때 crosshead 속도는 50 mm/in이었고 측정시료의 폭은 20 mm이었다.

케토프로펜 경피투과용 패취의 제조. UPHA를 클로로포름에 녹여 10 wt% 용액을 만든 다음, 이 용액에 고분자 대비 1 wt%의 BPO를 혼합하고 교반하여 완전히 용해하였다. 모델약물로 사용된 케토프로펜을 일정량 넣고 충분히 교반하여 용해시켰고 방출가속제 영향을 조사하기 위하여 일정량의 프로필렌 글리콜을 혼합하여 실험하였다. 다음 폴리에틸렌테레프탈레이트 backing material에 300 μm 의 두께로 필름주조를 하고 용매를 상온에서 증

분히 건조시켜 경피투여용 패취를 제조하였다. UPHA 고분자를 가교시키기 위해 패취를 40 °C에서 24시간 방치하여 안정화시킨 다음, 80 °C에서 0, 4, 8, 12 및 24 시간동안 반응시켰다.

In vitro 약물방출 실험. 경피투여용 패취를 셀룰로스 분리막에 접착시킨 다음, 이를 확산셀 (약물투과면적 = 0.785 cm²; 부피 = 3.6 mL)에 고정시킨 후 셀 내에 생리 식염수 (Ph=7.2)를 채운 후 37 °C에서 방출실험을 행하였다. 시간에 따른 약물의 방출량은 마이크로 BondaakTM C₁₈ column (3.9×300 mm, Waters)을 사용하여 고성능액체크로마토그래피 (HPLC, 880-PU, JASCO)로 측정하였다. 이 때 이동상 유속은 2.0 mL/min이었고, UV 검출기 (JASCO 870, JASCO)로 258 nm 파장에서 분석하였다. 이동상은 NaH₂PO₄ · 2H₂O 3.1202 g과 Na₂HPO₄ 2.8392 g에 증류수를 가하여 1 L로 맞춘 다음, H₃PO₄를 첨가하여 pH가 3.0이 되게 한 후 아세트로나이트릴 820 mL 첨가하여 제조하였다. 측정된 케토프로펜의 양은 약물의 농도에 따른 HPLC 피크 면적의 변화를 검량하여 결정하였다.

3. 결과 및 토론

UPHA의 물리 및 화학적 특성. PHA의 생합성 메카니즘은 아직 확실히 밝혀지지 않았으나 acetoacetyl-CoA reductase, PHA synthetase 등과 같은 미생물 체내에 있는 효소들에 의하여 합성되어지는 것으로 알려져 있다.¹¹ 이와 같이 합성된 PHA는 배양환경에 따라 그 화학적 구조가 달라질 수 있다.^{12,13} 본 연구에서 생합성된 UPHA의 화학적 구조를 조사하기 위하여 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, FT-IR 등으로 분석하였다. Figure 1의 ¹H-NMR 스펙트럼

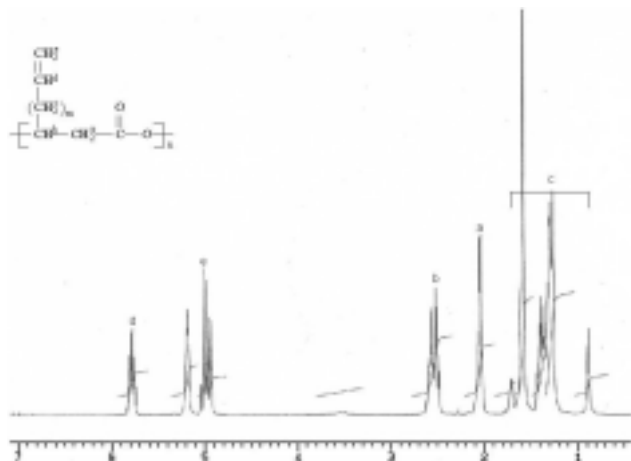


Figure 1. ¹H-NMR spectrum of unsaturated poly(3-hydroxyalkanoate). Solvent: CDCl₃.

에 의하면 UPHA의 주쇄에 있는 메틸렌기의 수소는 2.0 및 2.5 ppm에 나타나고 측쇄의 메틸렌기는 0.9-1.7 ppm에 나타났으며 C=C에 있는 수소는 각각 5.0, 5.2, 5.8 ppm에 나타났다. ¹³C-NMR 스펙트럼에 의하면 UPHA의 주쇄에 있는 카르복실기의 탄소는 169 ppm, 주쇄에 있는 메틸렌기의 탄소는 25 및 70 ppm에 나타났고 측쇄에 있는 메틸렌기의 탄소는 29-39 ppm, C=C에 있는 탄소는 114, 138, 169 ppm에 각각 나타났다. 한편 FT-IR 스펙트럼에서 약 1741 cm⁻¹에 나타나는 C=O stretching 피크로 에스테르기를 확인할 수 있었고, 약 1640 cm⁻¹에 나타나는 C=C stretching 피크로 탄소-탄소 이중결합의 존재를 확인할 수 있었다. 따라서 생합성된 UPHA는 Figure 1에 나타낸 화학구조와 같이 각 반복단위마다 C=C이 있는 폴리에스테르로 추정되어진다.

본 연구에서 생합성된 UPHA의 분자량 분포를 조사하기 위하여 GPC 분석을 행하였다. 그 결과 수평균 분자량은 약 120000 g/mol, 중량평균 분자량은 약 240000 g/mol로서 다분산성이 약 2.0으로 나타났다.

가교시간에 따른 UPHA의 유리 전이 온도 변화를 조사하기 위하여 DSC 분석을 행하였다. Figure 2 및 3에서 보는 바와 같이 미가교 UPHA (RX time = 0 hr)의 T_g는 약 -46 °C로 나타난 데 반하여 가교시간의 증가에 의하여 T_g가 점진적으로 증가하여 24시간 가교시킨 시료는 약 -6 °C로 증가하였다. 이는 가교시간의 증가에 따라 고분자내 가교반응의 증가에 의하여 분자들의 유동성이 감소함으로써 T_g가 증가되는 경향을 나타내는 것으로 사료되어진다.

가교시간에 따른 가교도 변화를 정성 및 정량적으로

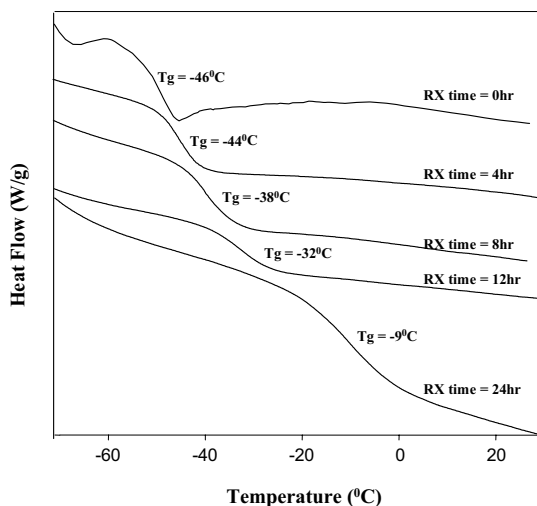


Figure 2. DSC thermograms of control and crosslinked UPHA. RX time: reaction time for crosslinking.

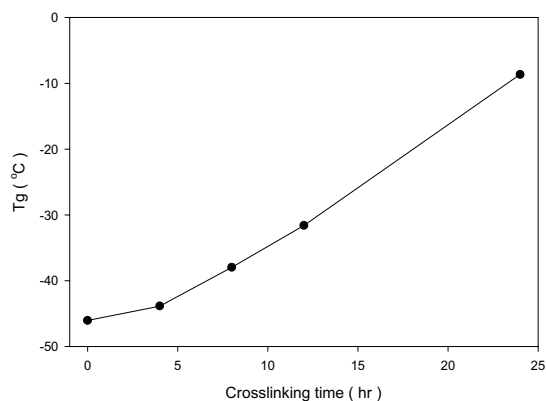


Figure 3. Dependence of T_g on crosslinking time.

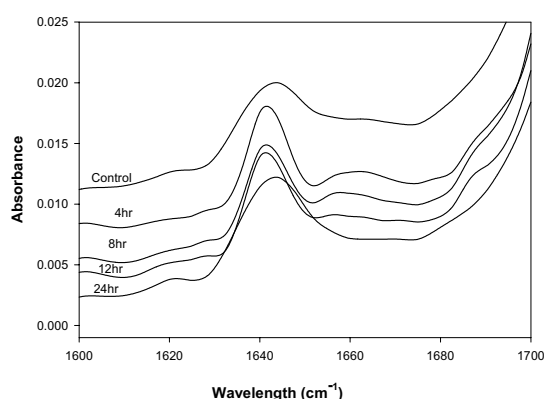


Figure 4. FT-IR spectra of control and crosslinked UPHA.

조사하기 위하여 일정시간 가교반응시킨 케토프로펜 UPHA 패취의 ATR-IR 스펙트럼을 상호 비교하였다 (Figure 4). 그림에서 보는 바와 같이 가교 반응시간이 길어질수록 1640 cm^{-1} 에 나타나는 $\text{C}=\text{C}$ 결합의 피크 강도가 줄어드는 경향을 나타내었다. 이는 반응시간이 증가함에 따라 가교반응에 참여하는 $\text{C}=\text{C}$ 결합의 양이 증가하여 피크 강도가 줄어드는 것으로 고찰되어진다. 미반응 및 가교화 UPHA의 1740 cm^{-1} 에 나타나는 $\text{C}=\text{O}$ 흡수피크 강도에 대한 1640 cm^{-1} 에 나타나는 $\text{C}=\text{C}$ 흡수피크 강도의 비율로부터 상대적인 가교도 변화를 정량적으로 조사하였다. 그 결과, Figure 5에 나타난 바와 같이 반응시간에 따라 가교도가 거의 직선적으로 증가하다 12시간 반응이후에는 증가량이 다소 낮아지는 경향을 나타내었다.

가교시간에 따른 접착력 변화를 T-peel 시험법을 사용하여 측정하였다. 그 결과 Figure 6에 나타난 바와 같이 접착력이 가교시간에 대해 지수 함수적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 가교도의 증가에 따라 접착력이 비례하여 감소하는 것으로 사료되어지고 경피

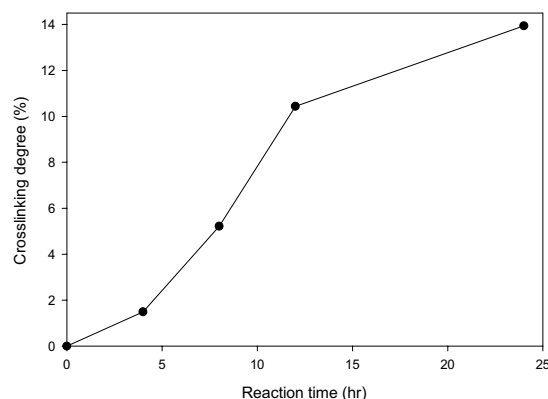


Figure 5. Dependence of crosslinking degree on crosslinking time.

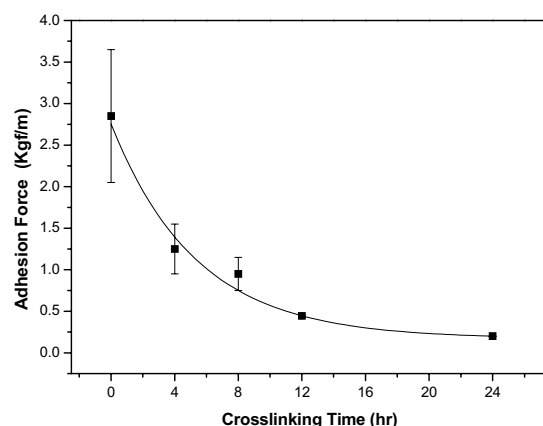


Figure 6. Dependence of adhesion force of UPHA on crosslinking time.

투과용 약물전달시스템에 UPHA를 응용하기 위해서는 적절한 가교시간의 선택이 필요한 것으로 여겨진다.

약물방출 경향. 경피투과용 약물전달시스템에는 약물, 경피투과 촉진제 등을 담체 내에 함유시키고 분리막으로 약물의 방출 속도를 조절하는 분리막 조절 경피투과 약물전달시스템, 고분자 매트릭스 상에 약물을 분산시킨 매트릭스 확산제어 경피투과 약물전달시스템, 고분자 매트릭스 및 분리막을 혼용하는 매트릭스-분리막 경피투과 약물전달시스템, 약물을 미세입자에 흡수시켜 실리콘과 같은 고분자 매트릭스에 분산시킨 미소봉합 경피투과 약물전달시스템 등이 있다.¹⁴ 본 연구의 약물전달시스템은 매트릭스 확산제어 경피투과 약물전달시스템의 일종으로써 고분자 매트릭스가 약물전달시스템의 접착제의 역할도 동시에 하는 방법을 사용하였다.

UPHA의 가교반응이 약물방출 경향에 미치는 영향을 조사하기 위하여 UPHA 대비 5 wt%의 케토프로펜을 UPHA 및 BPO 혼합용액에 넣고 $300\text{ }\mu\text{m}$ 두께의 패취

를 제조한 다음, 0, 4, 8, 12 및 24시간 동안 가교반응을 행한 후 약물방출 경향을 조사하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 미가교 UPHA 및 낮은 반응시간의 시료에서는 초기에 빠른 방출 속도를 나타낸 후 점진적으로 방출 속도가 늦어지는 경향을 나타내었다. 한편 가교반응시간이 긴 24시간 반응 시료에서는 방출 속도가 상대적으로 느리며 측정시간 동안 대체로 일정한 방출 속도를 나타내었다. 이와 같이 가교반응시간 증가에 따라 약물방출 속도가 저하되는 것은 UPHA의 가교가 약물의 방출을 제어하기 때문으로 사료된다. 24시간 가교반응을 시킨 시료와 같이 방출 속도가 일정하게 지속되는 것은 지속적이고 일정한 양의 약물을 체내에 공급할 수 있으므로 서방형 약물전달시스템에서 매우 바람직한 현상이다.

UPHA의 가교도가 약물방출 속도에 미치는 영향을 조사하기 위하여 가교도에 따른 초기방출 속도를 조사하였다. Figure 8에서 보는 바와 같이 UPHA의 가교도가 증가할수록 초기방출 속도가 거의 직선적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

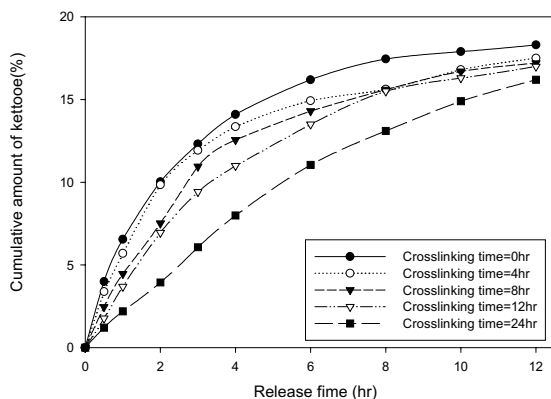


Figure 7. Dependence of cumulative amount of ketoprofen released on crosslinking time.

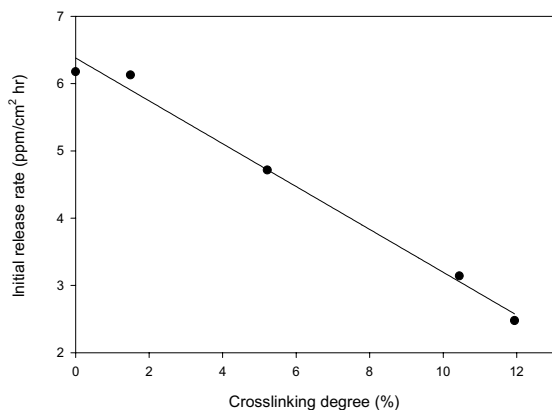


Figure 8. Relationship between initial release rate of ketoprofen and crosslinking degree.

경피투여용 패치의 두께가 약물방출 경향에 미치는 영향을 조사하기 위하여 패치의 두께를 70, 250, 500 μm 으로 조절하고 약물의 양은 UPHA 대비 5 wt%, 가교반응시간은 24시간으로 하여 패치를 제조한 후 약물방출 경향을 조사하였다. Figure 9에서 보는 바와 같이 패치 두께가 두꺼울수록 약물방출 지속시간이 길어지는 현상이 나타났다. 이는 패치 두께가 두꺼울수록 패치내에 함유된 약물의 양이 증가되고 이에 따라 약물방출 지속시간이 증가되는 것으로 사료된다.

경피투과용 약물전달시스템에서는 약물의 경피투과를 향상시키기 위하여 에탄올, 이소프로판올, 프로필렌 글리콜, 세틸 팔미테이트 등과 같은 화합물을 경피투과 향상제로 사용되어지고 있다. 이 경피투과 향상제가 약물의 방출에 미치는 영향을 조사하기 위하여 프로필렌 글리콜을 패치에 함유시켜 실험을 행하였다. 이 때 패치 두께는 300 μm , 패치의 가교반응 시간은 24시간으로 하고 프로필렌 글리콜의 함량은 UPHA 무게대비 0.3, 0.7 및 1.0의 비율로 변화시켰다. Figure 10에서 보는 바와

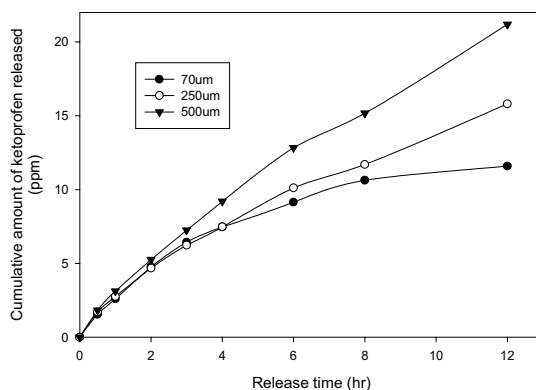


Figure 9. Dependence of cumulative amount of ketoprofen released on patch thickness.

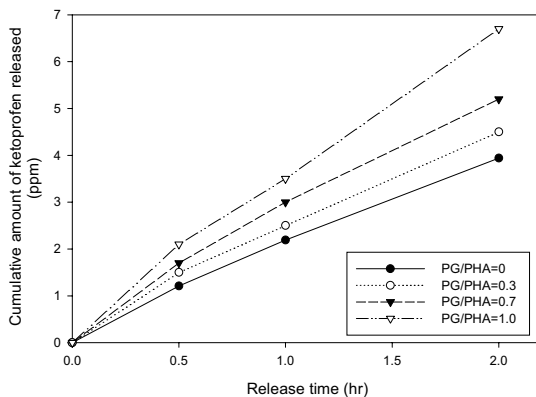


Figure 10. Dependence of cumulative amount of ketoprofen released on propylene glycol contents.

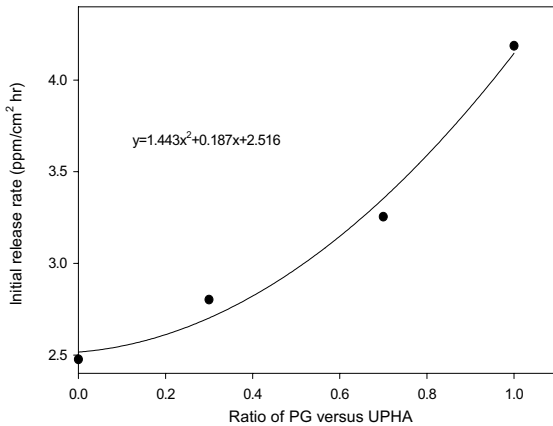


Figure 11. Relationship between initial release rate of ketoprofen and amount ratio of propylene glycol versus UPHA.

같이 향상제의 함량이 증가할수록 약물방출 속도가 증가하는 경향을 나타내었다. 이는 프로필렌 글리콜이 고분자 매트릭스 내에 있는 약물을 용해시켜 약물의 유동성을 향상시킴으로써 방출 속도를 증진시키는 것으로 사료된다. 프로필렌 글리콜의 패취내 함량에 따른 초기 약물방출 속도를 조사한 결과 (Figure 11), 프로필렌 글리콜의 함량에 대해 약물방출 속도가 거의 1차적으로 향상되는 현상을 나타내었다.

4. 결론

미생물 고분자인 UPHA를 생합성하고 이 고분자 매트릭스에서의 약물방출 경향을 조사함으로써 경피투과용 약물전달시스템으로의 응용성을 조사하였다. 그 결과, UPHA의 가교시간의 증가에 따라 약물방출 속도가 늦어지고 약물방출 속도가 일정해지는 경향을 나타내었다. 경피투과용 패취의 두께가 두꺼워질수록 약물방출 지속시간이 길어지고 경피투과 향상제인 프로필렌 글리콜의 함량 증가에 따라 방출 속도가 향상되는 경향을 나타내었다.

감사의 글 : 본 연구는 한국과학재단에서 지원한 목적기초연구사업 (R01-1999-00072)에 의하여 수행되었습니다.

References

1. Y. Poirier, C. Nawrath, and C. Somerville, *Biotechnology*, **13**, 142 (1995).
2. A. Steinbuchel and H. E. Valentin, *FEMS. Microbiol. Lett.*, **128**, 219 (1995).
3. E. A. Dawes and P. J. Senior, *Adv. Microb. Physiol.*, **10**, 135 (1973).
4. G. W. Haywood, A. J. Anderson, L. Chu, and E. A. Dawes, *Biochem. Soc. Trans.*, **16**, 1046, (1988).
5. T. Suzuki, W. L. Zahler, and E. W. Emerich, *Arch. Biochem. Biophys.*, **254**, 272 (1987).
6. A. J. Anderson and E. A. Dawes, *Micobiol. Rev.*, **54**, 450 (1990).
7. L. L. Wallen and W. K. Rohwedder, *Environ. Sci. Technol.*, **8**, 576 (1974).
8. R. H. Findlay and D. C. White, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 71 (1983).
9. G. Odham, A. Runlid, G. Westerdahl, and P. Marden, *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 905 (1986).
10. H. S. Lee, J. S. Lee, J. S. Yoon, H. J. Choi, and S. J. Choi, *Polymer (Korea)*, **18**, 358 (1994).
11. C. W. Pouton and S. Akhtar, *Adv. Drug Del. Rev.*, **18**, 133 (1996).
12. D. Y. Kim, Y. B. Kim, and Y. H. Rhee, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **12**, 518 (2000).
13. D. Y. Kim, Y. B. Kim, and Y. H. Rhee, *Macromolecules*, **31**, 4760 (1998).
14. C. Alving, R. W. Baker, D. Chapman, A. T. Florence, R. Langer, K. Larsson, and L. P. Luigi, *Controlled Release of Drugs: Polymers and Aggregate Systems*, VCH Publishers, New York, 1988.