

단순유체법으로 제조한 히알루론산 미립구의 생분해도에 미치는 가교제 농도 효과

정다연, 이도영, 문상엽, 오다연, 정유정, 이득용*

대림대학교 의공융합과

Effect of crosslinker concentration on biodegradation of hyaluronic acid microspheres prepared by a simple fluidic device

Dayeon Jeong, Doyoung Lee, Sangyeop Moon, Dayon Oh, Yujeong Jeong, Deuk Yong Lee*

Department of Biomedical Engineering, Daelim University, Korea

*duke1208@gamil.com

Abstract

Hyaluronic acid (HA) microspheres (MSs) crosslinked with polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDE) are prepared using a simple fluidic device (SFD) to evaluate the effect of crosslinker concentration on the biodegradability of HA MSs for drug delivery systems. A continuous phase was synthesized by dissolving PEGDE in 2-methyl-1-propanol (0~6%). HA solution of 1 wt% concentration was used as a discontinuous phase. The microstructure and biodegradation rate of MS were examined as a function of PEGDE concentration. In addition, rheology (viscosity, surface tension, electrical conductivity), Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), cytotoxicity (ISO 10993-5), and L-929 cell proliferation were investigated. Experimentally, lower degradation rates were observed for HA MS with higher PEGDE content.

1. 연구 배경

생분해성 고분자를 이용한 약물전달용 미립구 (microsphere, MS)는 약물을 담지하는 내부 코어(core)와 코어를 둘러싸고 있는 벽재물질(shell)로 구성되어 있다. 사용목적에 따라 에멀전법을 이용 MS의 크기와 미세조직을 조절하여 표적 치료가 가능하다. 에멀전은 분산상 (discontinuous phase)과 연속상(continuous phase)이 모두 액체이며, 친유성, 친수성과 같이 섞이지 않는 두 물질이 한 액체의 입자가 다른 액체에 분산되어 있는 oil-in-water(O/W) 또는 water-in-oil(W/O)과 같은 콜로이드(colloid)이다.

선행연구에서 노즐낙하법, 자석교반기, 초고속교반기와 용매증발법으로 MS 직경이 1~250 μ m 범위 내에서 실험방법에 따라 크기 조절이 가능하였다 [1-5]. 하지만, 생산수율 낮은 문제점으로 이를 해결하고자 그림 1처럼 단순유체법 (SFD)을 이용하여 MS를 제조하였다. 약물전달체(drug delivery carrier)는 생안전성을 가지며 약물전달 기능이 종료된 MS는 체내에 축적되지 않고 생분해되어야 한다. 본 연구에서는 히알루론산(hyaluronic acid, HA)을 이용하여 MS를 제조한다. HA는 체내에 존재하는 천연고분자이며 관절의 활액, 진피 및 표피, 유리체 등에 존재한다. HA의 생체적합성 및 친수성으로 조직 공학 및 약물 전달 시스템(drug delivery system, DDS)에 사용되는 우수한 생체 재료이다 [5].

분해효소에 의한 HA의 체내 생분해 시간을 효과적으로 증가시키기 위하여 화학적 가교반응이 요구된다. HA 가교제인 1,4-butanediol diglycidyl ether (BDDE), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC), divinyl sulfone (DVS), polyethylene glycol diglycidyl ether (PEGDE) 중 독성이 없어 안전성이 우수한 친환경 가교제인 PEGDE를 사용하여 HA MS를 제조하였다. HA 분자들은 PEGDE의 에폭사이드(epoxide) 작용기의 ring opening에 의해 C-O-C 에테르 결합을 통한 3차원 HA 구조로 인해 분해속도가 감소된다 [6]. 본 연구에서는 PEGDE 가교제 양을 0.2~6vol%로 변화시키면서 SFD법으로 MS를 제조하고 미세구조 및 분해도를 조사하였다.

2. 연구 방법

0.05M NaOH를 사용하여 1wt% discontinuous

HA(Mw=1058 kDa, Bloomage Biotechnology Co., Jinan, China) 용액을 제작하였다. 균일한 MS 직경을 제조하기 위하여 점도값은 50cP를 최대값으로 30~50cP로 조절하여 사용하였고, NaOH를 이용하여 pH는 11~12가 되도록 하였다. 가교제 PEGDE(Mn=500, Sigma-Aldrich, USA)는 용매인 2-methyl-1-propanol(99.0%, 삼전화학)을 사용하여 가교제 농도를 0.2~1.8vol% (0.4% 간격), 3vol%, 6vol%를 각각 제조하였다. PEGDE 용액의 flow rate은 1.0mL/min이었다. HA용액의 flow rate은 0.2~1.9mL/min 범위에서 0.2mL/min 간격으로 조절하며 PEGDE 가교액 농도에 따른 HA MS의 직경 변화를 조사하였다. MS 분주 후 40도에서 24시간 교반하여 가교하였다. 가교된 MS는 에탄올에 3회 30분씩 침지시켜 에탄올의 OH기로 HA MS 내부의 미반응 잔류 가교제를 제거하였다.

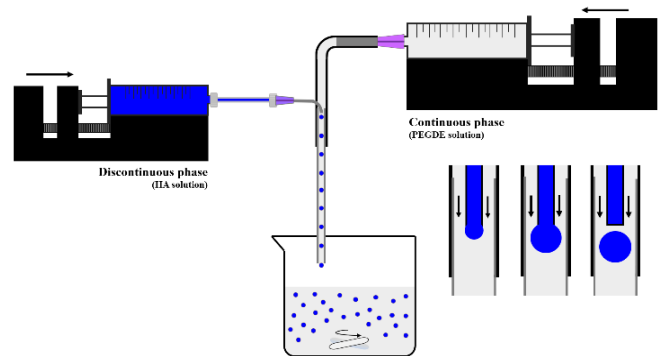


그림 1. Simple fluidic device 모식도

HA MS의 화학적 특성은 적외선분광기 (FT-IR, Spectrum Two, PerkinElmer, UK)를 이용하여 분석하였다. 연속상의 유속 0.2~1.9mL/min 중 1.1mL/min으로 지정하여 150 μ m의 직경을 가진 MS로 PBS 용액으로 분해도 실험을 진행하였고, 분해도는 포수무게와 건조무게를 이용 계산하였다 [4]. 세포 독성은 ISO 10993-5에 의거 수행하였고 세포증식 실험은 CCK-8을 이용하여 관찰하였다.

3. 연구 결과

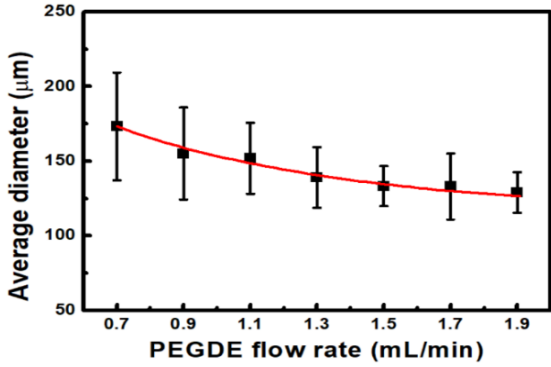


그림 2. Continuous phase 유속에 따른 MS 직경변화

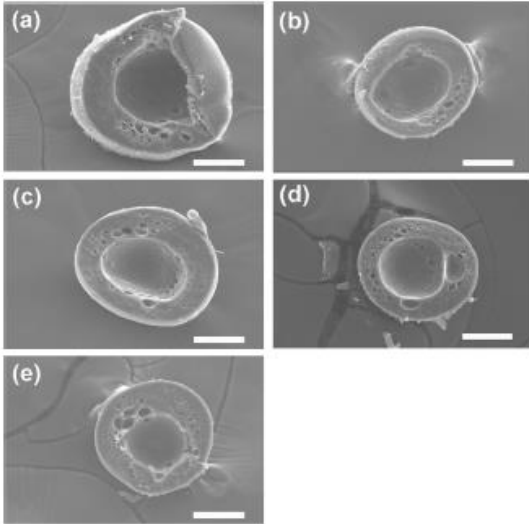


그림 3. PEGDE 농도에 따른 HA MS 기공 변화: (a) 0.2, (b) 0.6, (c) 1.0, (d) 1.4 and (e), 1.8 vol%.

HA용액 점도가 50cP 이하에서 MS가 원활하게 생성되었으며, 링캡(ringcap) 내부에 MS 생성이 우선되어야 분산상에서 MS 생산 수율이 안정적이고 효과적이었다. Discontinuous phase인 HA 용액의 유속이 1.0mL/min, 가교제 농도의 유속이 0.7~1.9mL/min일때 유속에 따른 MS 직경 변화는 유속이 증가함에 따라 그림 2에서 보는 것처럼 MS 직경은 173μm에서 129μm로 감소하였다. PEGDE 농도가 0.2~1.8vol% MS 크기는 148 ± 20.6μm로 표준편차 내에 존재하였다. PEGDE의 유속을 1.1mL/min으로 고정하고 0.2~1.8vol%~3vol%, 6vol% PEGDE 농도별 MS 미세 구조를 관찰결과, 그림 3에서 보는 것처럼 PEGDE 농도가 증가할수록 내부기공 (inner void) 크기는 감소하였고 벽(wall) 두께는 증가하였다.

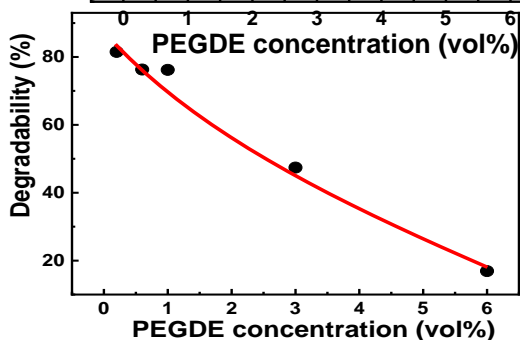


그림 4. PEGDE 농도에 따른 분해도 경향

5주차 분해도 실험결과, 0.2~6vol% 가교제 농도별 분해도는 81%에서 17%로 급격하게 감소하였다. PEGDE 가교제 농도가 증가할수록 분해 속도가 감소하는 결과를 도출하였다.

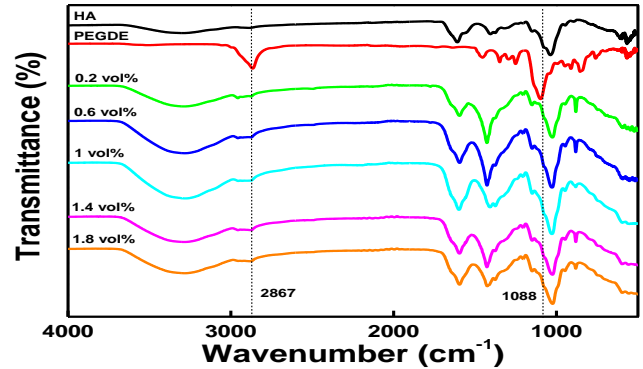


그림 5. HA, PEGDE 및 PEGDE 농도에 따른 HA MS FT-IR

FT-IR 실험결과, 그림 5에서처럼 HA는 1601cm⁻¹ 와 1405cm⁻¹ 피크를 보이는 COO-기, 2872cm⁻¹의 -NH기, 1033 cm⁻¹에 위치한 C-O-C기가 관찰되었다. Pristine PEGDE의 FT-IR 피크는 2867, 1456, 1348, 1088cm⁻¹이었다. 본 연구에서 제조한 PEGDE로 가교된 HA MS에서 2867과 1088cm⁻¹ PEGDE 피크가 관찰되어 HA가 PEGDE로 인해 HA-PEGDE-HA 화학적가교(crosslink)가 된 것이 관찰되었다. 그러나 1456cm⁻¹과 1348cm⁻¹의 PEGDE 피크는 HA 피크의 겹침(overlap)으로 인해 관찰되지 않았다. PEGDE 가교제로 인하여 HA MS가 화학적 가교가 이루어진 것이 실험적으로 관찰되었다 [4]. 세포독성 실험결과, HA MS는 0.2~1.8vol% PEGDE 농도별로 세포생존율은 각각 151%, 123%, 98%, 157%, 133%로 생체적합성이 우수하였다. HA MS는 DDS에 사용하기에 적합하였다.

4.참고 문헌

- [1] C. Chun, Y. Kim, S. Son, D.Y. Lee, J. Kim, M. Kwon, Y. Kim, and S. Kim. "Viscoelasticity of hyaluronic acid dermal fillers prepared by crosslinked HA microspheres." *Polymer(Korea)*. Vol. 40, No. 4, pp. 600-606, 2016
- [2] H. Lee, D.Y. Lee, Y. Song, and B. Kim. "Poly(ε-caprolactone) microcapsule with encapsulated nifedipine prepared by magnetic stirrer." *Journal of Biomedical Engineering Research*. Vol. 40, pp. 7-14, 2019
- [3] H. Lim, J. Shin, D.Y. Lee, B. Kim, and Y. Song. "Drug delivery behavior of PCL and PCL/PEG microcapsules prepared by high-speed agitator and syringe pump." *Polymer Korea*. Vol. 44, No. 4, pp. 487-494, 2020
- [4] S. Yuk, D. Jeong, Y. Lee, and D.Y. Lee. "Synthesis of hyaluronic acid microsphere crosslinked with polyethylene glycol diglycidyl ether orepared by a simple fluidic device." *Journal of Biomedical Engineering Research*. Vol. 42, pp 251-258, 2021
- [5] C.H. Jeong, D.H. Kim, J.H. Yune, H.C. Kwon, D. Shin, H. Sohn, K.H. Lee, B. Choi, E.S. Kim, J.H. Kang, E.K. Kim, and S.G. Han. "In vitro toxicity assessment of crosslinking agents used in hyaluronic acid dermal filler." *Toxicology in Vitro*. Vol. 70, pp. 105034, 2021