

## 히아루론산을 이용한 조직공학용 Scaffold의 제조와 약물 방출 거동에 관한 연구

남혜성\* · 김지홍\*\* · 안정호\* · 정동준\* · \*\*\*\*†

\*성균관대학교 고분자공학과 고분자기술연구소, \*\*성균관대학교 화학공학과, \*\*\*서울대학교 지능형 생체계면 연구센터  
(2001년 5월 2일 접수)

### Synthesis of Hyaluronic Acid Scaffold for Tissue Engineering and Evaluation of Its Drug Release Behaviors

Hye Sung Nam\*, Ji Heng Kim\*\*, Jeong Ho An\*, and Dong June Chung\* · \*\*\*\*†

\*Department of Polymer Science and Engineering and Polymer Technology Institute, Sungkyunkwan University

\*\*Department of Chemical Engineering, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

\*\*\*Intellectual Biointerface Engineering Center, Seoul National University, Seoul 110-749, Korea

†e-mail : djchung@yurim.skku.ac.kr

(Received May 2, 2001)

**요약:** 본 연구에서는 고분자 지지체를 만든 후 약물을 흡수시켜 방출 특성을 검토하는 기존의 방법에서 나타나는 초기 과다 방출이라는 단점을 보완하고 장기간에 걸친 약물방출이 가능한 고분자 지지체를 구축하기 위해 광반응 관능기를 갖는 히아루론산과 sodium alginate 유도체로 세포의 성장을 촉진하는 약물을 함유한 미립자를 만들고 이를 성형가공한 고분자 지지체를 제작하여 약물 방출 특성을 검토하였다. 이러한 방법으로 만들어진 지지체는 초기 방출이 억제되고 오랜 기간 동안 지속적으로 약물을 서서히 방출하였으며, 뿐만 아니라 천연고분자가 갖는 생체내 분해 특성으로 인하여 일정한 기간 동안 형태를 유지하며 지지체로 기능을 한 이후 분해되어 재생된 조직이 손상조직과 대체 가능하므로, 세포의 성장과 분화를 유도하는 손상조직 대체용 고분자 지지체 본연의 목적을 달성할 수 있을 것으로 기대된다.

**ABSTRACT:** In this study, we tried to design and synthesize using natural polymers (hyaluronic acid and sodium alginate) and also to make some kinds of scaffolds as sponge type for reducing the burst effect of loaded drug from them. Photo-dimerizable group was incorporated to hyaluronic acid and degradable hydrogel was prepared by the UV radiation of the polymer. The pore size and its distribution of scaffold were controlled by changing microsphere production conditions such as solution concentration and spraying pressure. It was found that drug release behavior from synthesized scaffolds was affected by hybridization of two naturally originated polymers (cinnamoylated tetrabutylammonium hyaluronate: CHT and cinnamoylated sodium alginate: CSA) and the obtained scaffolds were degraded in fairly long time (about 2 months) under in vitro environment. Therefore, we expect that obtained scaffolds can be applicable for the tissue regeneration scaffolds in the fields of orthopaedic surgery.

**Keywords:** hyaluronic acid, sodium alginate, microsphere, polymeric scaffold, spray drying, bone tissue regeneration.

## 서 론

히아루론산(hyaluronic acid; HA)은 세포간질에 광범위하게 분포되어 있는 glycosaminoglycan (GAG)의 일종으로서 단순한 충전 충전제가 아니라 생리적 환경에서 세포간질 분자의 3차원 네트워크 구성요소로 작용하여<sup>1</sup> 각종 결합 단백질, proteoglycan과 성장인자들과 상호작용을 하고,<sup>2</sup> 삼투압과 flow resistance, 혈장과 단백질의 선택적인 투과에 미치는 수분 균형을 능동적으로 조절하며,<sup>3</sup> 용해점도가 높아 shear stress로부터 연골을 보호하는 윤활제로 작용하기도 한다.<sup>4</sup> 또한 분자 수준에서는 free radical scavenger로서 작용하고,<sup>5</sup> CD44 cell receptor에 대한 인식분자로 세포의 접착, 성장, 분화, 이동에 영향을 미치며,<sup>6</sup> 특정한 세포형태를 활성화,<sup>7</sup> 염증발생, 혈전형성, healing process에 관여하는<sup>8</sup> 등의 여러 가지 기능을 수행하고 있다. 이런 탁월한 능력에도 불구하고 HA는 수용성, 빠른 체내 분해성 및 조직 내에서의 짧은 체류기간 때문에 응용이 제한되어져 왔다. 따라서 HA를 체내 환경에서 보다 안정한 형태로 유지하기 위해, 공유결합에 근간을 둔 방법을 이용하여 HA를 esterification,<sup>9,10</sup> sulfonation,<sup>11</sup> amidation<sup>12</sup> 반응에 의해 다당류의 관능기 부분을 개질하면, HA에 존재하는 -COOH기가 상실됨에 따라 -OH기와 분자 내 수소결합이 끊어져 딱딱하고 소수성인 재료로 개질된다. 나아가서 가교제로 개질된 HA는 불용성 겔을 형성하므로 생리적 환경 내에서 우수한 안정성을 발휘하게 된다.

신체의 중요한 여러 기능을 담당하는 뼈가 손상되면 재구성에 많은 시간이 걸리며, 물리적인 방법과 약물치료가<sup>6,13-15</sup> 병행되어도 장기간의 치료가 필요하나, 재구성을 촉진시키는 방법에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다. 최근에 이르러 일련의 연구로 연골조직의 재생이 성공된<sup>16-19</sup> 이후, 골조직에도 적용할 목적으로 세포가 접착, 분화하는 것을 도와주는 cytokine들과 성장인자들을 약물전달시스템 구축방법으로 도입한 보다 기능적인 지지체들에 관한 연구들이 시도되고 있다.

본 연구는 손상된 골조직을 재생시키기 위해 생분해성과 기계적 물성을 동시에 갖는 천연 고분자 지지체를 합성할 목적으로, 세포간질 성분인 HA와 해조

류에서 추출한 천연고분자인 sodium alginate (SA)를 원료로 하여 model drug을 함유시킨 고분자 미립구를 제조한 다음, 광가교 과정을 거친 후 이를 압축성형한 디스크를 제작하였다. 이들 디스크로부터의 시간 변화에 따른 약물 방출 특성과 생분해 특성을 실험실적으로 관찰하여 골조직 재생용 기능성 지지체로서의 응용 가능성을 검토하였다.

## 실 험

**시약 및 재료.** 히아루론산(HA)은 (주)태평양(Pacific Co., Seoul, Korea)으로부터 제공받았다. 제공받은 HA는 분획 분자량이 12000인 투석막을 사용하여 18 MΩ 탈이온수로 3일간 투석하여, 저분자량의 펩티드를 제거한 후, -70 °C에서 동결건조 하였다. Gel permeation chromatography (GPC) (Dynamax Co.; model SD-200, detector; UV-1, column: Viscotek DM 400)로 측정된 HA의 분자량은 170000이었다. Sodium alginate (SA)는 약리화학(주) (Yacuri Chemicals Co. Ltd., Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. Cinnamoyl chloride는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, USA)와 동경화학(Tokyo, Japan)에서 구입한 것을 정제 없이 사용하였다. *N,N*-dimethylformamide (DMF)는 (주)대정(Daejung Chemicals and Metals Co., Seoul, Korea)에서 구입하였다. Pyridine는 시약급으로 TEDIA (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Tetrabutyl ammonium hydroxide (12.5% solution in methanol)는 Merck (New Jersey, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)인 indomethacine (1-*p*-chloro-benzoyl-5-methoxy-2-methylindole-3-acetic acid)은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, USA)에서 구입하였다.

**Cinnamylation of amphiphilic tetrabutylammonium hyaluronate.**<sup>20</sup> 동결 건조시킨 HA 1g을 100 mL의 증류수에 녹인 다음, 음이온 수지물 15 cm 높이로 채운 column에 HA 용액을 통과시켜 sodium이 제거된 용액으로 만들고, 이를 10 °C에서 교반 중인 tetrabutylammonium hydroxide의 12.5% 용액 30 mL에 적하하였다. Tetrabutylammonium

hydroxide에 떨어뜨린 HA는 즉시 회수하여 동결 건조하였다. Fourier transformed infrared spectrometer (FT-IR)(Mattson 5000 FT-IR, Mattson Instruments Inc., WI, USA)과 proton nuclear magnetic resonance spectrometer ( $^1\text{H-NMR}$ )(Varian Unity Inova, 500 MHz, Germany) 측정으로 HA에 존재하던  $-\text{COOH}$ 가 염으로 치환되었음을 확인한 다음, 합성된 tetrabutylammonium hyaluronate 1g을 DMF (100 mL)와 pyridine (20 mL)의 혼합용액에 녹인 뒤, 질소분위기 하에서 cinnamoyl chloride 5 mL를 20 mL의 DMF에 희석시켜 적하하였고, 8시간 이상 빛을 차단한 채  $4^\circ\text{C}$ 에서 반응시켰다. 반응이 끝난 뒤 최종 산물은 메틸알코올에 침전시키고 여과한 뒤 하룻밤 동안 진공건조기에서 건조시켰다 (Figure 1(a)). 건조시켜 얻은 백색 분말을 물에 녹여 분획 분자량이 8000인 투석튜브를 이용하여 18 M $\Omega$ 의 탈이온수로 3일간 투석하여 미반응물을 제거한 다음, 동결 건조하여 최종적으로 백색 분말 (cinnamoylated tetrabutylammonium hyaluronate; CHT)을 얻었다. 개질된 HA 유도체들은 FT-IR, ultraviolet spectrometer (UNICAM UV/Vis spectrometer UV 2, USA)와  $^1\text{H-NMR}$  측정으로 cinnamoyl기의 도입을 확인하였다. Cinnamoyl기로 개질된 정도는 기지 농도의 cinnamoyl chloride 용액으로 UV 흡수도에 대한 농도별 검정곡선을 이용하여 구하였다.

**Cinnamoylation of SA.** 0.1 M의 NaOH 수용액 50 mL에 1g의 SA를 녹인 후, SA 용액을 감압농축기를 사용하여 더 이상의 수분이 증발하지 않을 때까지 농축한 다음, 이 용액에 100 mL의 DMF와 30 mL의 pyridine을 첨가하였다.  $40^\circ\text{C}$ 에서 녹인 cinnamoyl chloride 20 mL를 동량의 DMF로 희석시킨 다음, 소량씩 적하하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 빛을 차단한 채 8시간 동안 반응을 진행시켰다. 반응 후 반응용액을 감압하에서 농축하고 피랑의 아세톤으로 cinnamoylated SA (CSA)를 침전시켜 회수하였다. 여과 후 메틸알코올로 세척하고 진공건조기에서 하룻밤 동안 건조시켜 백색의 분말을 얻었다 (Figure 1(b)).

분무건조법에 의한 CHT와 CSA의 미립자화. 개질된 HA (CHT)와 SA (CSA)를 혼합비율을 10:0,

10:1, 9:1, 8:2로 하여 각각 1, 2, 5, 6 wt%의 수용액을 만들고 20분간 초음파로 처리하였다. CHT와 CSA에 적용된 분무건조기 (Buchi Mini Spraydryer B-190, Swiss)의 운전조건을 다음과 같이 유지하여 개질된 HA 미립자들을 얻었다. 압축공기의 flow rate는 650과 800 NL/min의 두 가지로 설정하였고, 용액의 inlet temperature는  $185^\circ\text{C}$ , outlet temperature는  $110^\circ\text{C}$ , aspirator control 및 pump control은 각기 13과 4의 값으로 고정하였다. 얻어진 미립자의 형태는 주사형 전자현미경 (SEM) (Hitachi S-2200, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

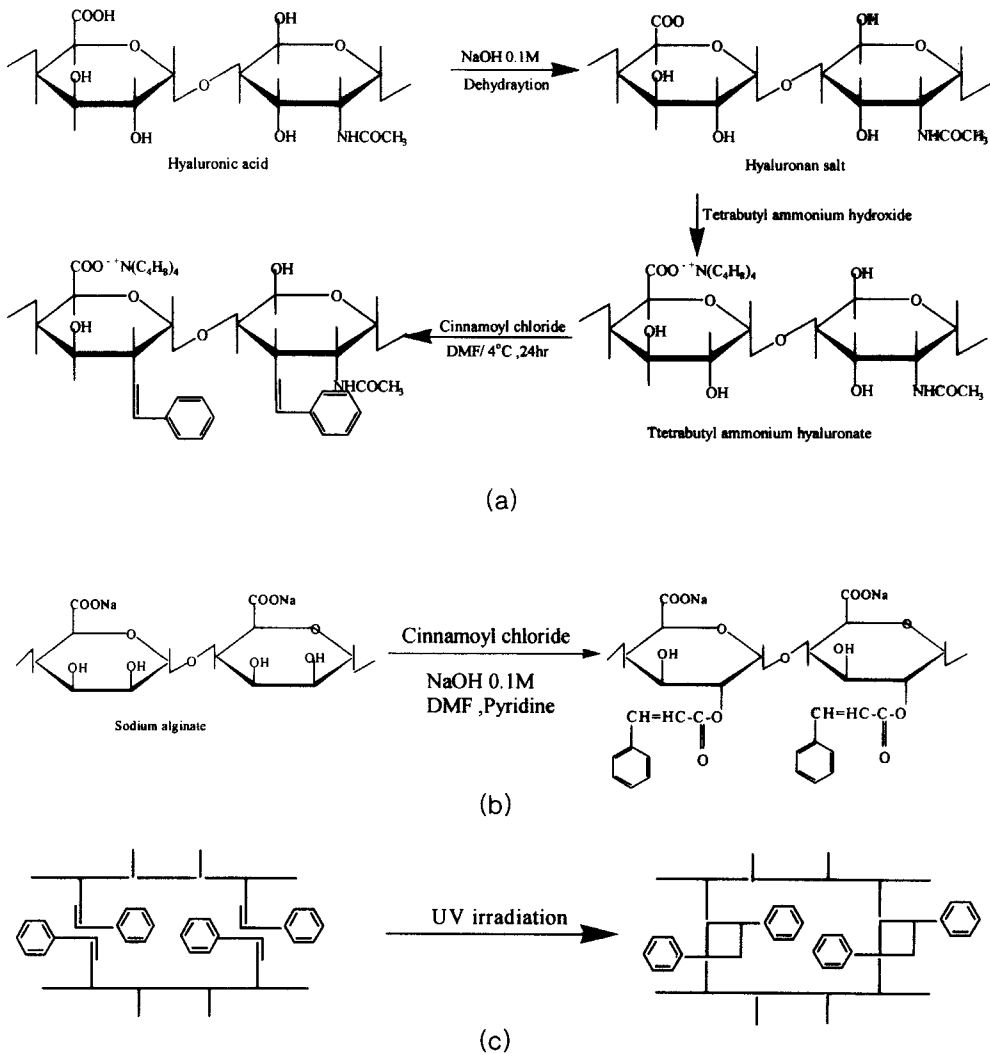
**압축성형으로 CHT/CSA 미립자로부터 디스크의 제작.** 제조한 미립자들을 단독 또는 블렌딩하여 유압 프레스 (Cravor Co., USA)로 상온에서 15 metric ton의 압력을 가하여 두께가 0.5, 0.7, 1 mm인 디스크 형태로 제작하였다. 디스크 앞뒷면에 각각 10, 20, 30분간 자체 제작한 400 W UV lamp를 광원으로 하여 UV-D33S filter (Toshiba Co., Tokyo, Japan)로 350 nm 이상의 장파장이 제외된 UV 광을 조사하여, 분자간 가교반응을 유발시킨 다음 (Figure 1(c)), 2일간 pH 7.0 PBS 용액에 침적시켜 잔존 미가교 분을 제거하고 동결 건조한 후 스폰지 구조를 갖는 고분자 지지체를 얻었다. 다공성을 확인하기 위하여 디스크를 파단시켜 단면구조와 표면구조를 SEM으로 관찰하였다.

**약물 함입.** Model drug으로서 NSAID의 일종으로 현재 관절염 치료에 사용되고 있는 indomethacine을 선택하였다. Indomethacine은 다음의 세 가지 방법으로 loading 하고 각각의 방출 특성을 비교 검토하였다.

- 1) CHT 용액에 약물을 첨가한 혼합 용액을 만들고 이를 분무 건조하는 방법.
- 2) 분무 건조된 HA 미립자 분산액에 약물을 첨가하여 함입시키고 건조된 미립자를 압축 성형하는 법.
- 3) HA 미립자만으로 압축 성형하여 디스크를 만들고, 이를 메틸알코올에 용해시킨 indomethacine 용액에 담가 약물을 함입시키는 방법.

## 결과 및 고찰

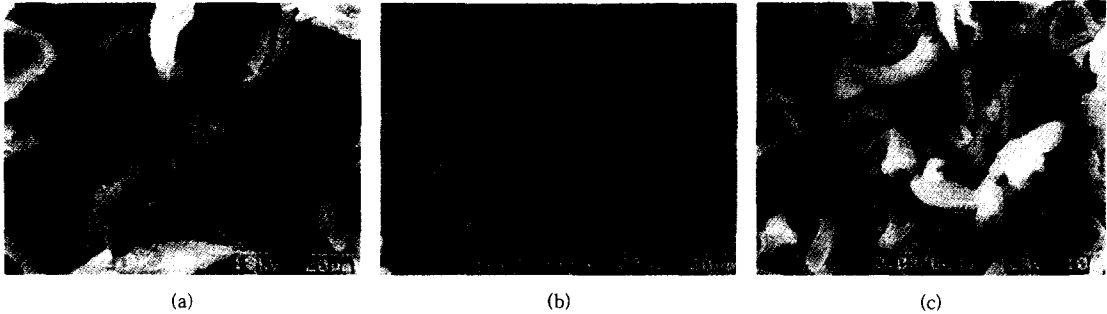
개질된 HA 및 SA를 이용한 미립자의 제조. 분무



**Figure 1.** Synthesis (a) chemical scheme for modification of amphiphilic hyaluronate, (b) chemical scheme for modification of sodium hyaluronate, and (c) scheme of photodimerization of modified HA and SA.

건조법을 이용하면, 최적의 분무조건에서는 입경의 차이가 크지 않는 구형의 입자로 제조 가능하였다 (Figure 2). 개질 전 물에만 녹던 HA는 tetrabutyl-ammonium기의 도입으로 DMF에도 용해성을 가지게 되었고 동량의 cinnamoyl chloride를 첨가했을 때 HA에 비해 더 많은 cinnamoyl기로 개질될 수 있었다. 반응시간에 따라 다양한 도입량을 갖는 개질된 CHT를 얻을 수 있었는데 (Table 1), 이중 개질도 9.8 mol%인 CHT10과 4.22 mol%인 CSA03을

취해 기설정된 비율로 혼합한 다음, 각기 1, 2, 5 wt% 수용액을 만들어 분무 건조하여 얻어진 입자의 morphology를 SEM으로 관찰한 결과를 Figure 3에 나타내었다. CHT에 SA를 첨가하여 제조한 미립자의 경우, CHT (Figure 3(a))나 CSA (Figure 3(b)) 단독으로 형성된 미립자에 비해 입경의 차이는 두드러지지 않으나, 균일한 입경을 갖는 미립자가 얻어짐을 알 수 있었다 (Figure 3(c), (d), (e), (f)). 한편 CSA와 CHT를 혼합하여 분무 건조한 고분자 미립



**Figure 2.** SEM images of CHT particle before and after spray drying: (a) before spray drying, (b) after spray drying, and (c) after drug releasing for 30 hrs.

**Table 1. Modified Products Properties**

a. Degree of modification (HA)

	rxn time (hr)	yield (%)	degree of modification (mol%)
CHT01	6	91.1	0.717
CHT02	12	93.3	0.856
CHT03	15	92.8	1.018
CHT04	17	94.1	1.087
CHT05	19	95.4	1.458
CHT06	24	93.1	4.220
CHT08	28	92.9	4.544
CHT09	36	91.6	8.310
CHT10	72	92.5	9.832

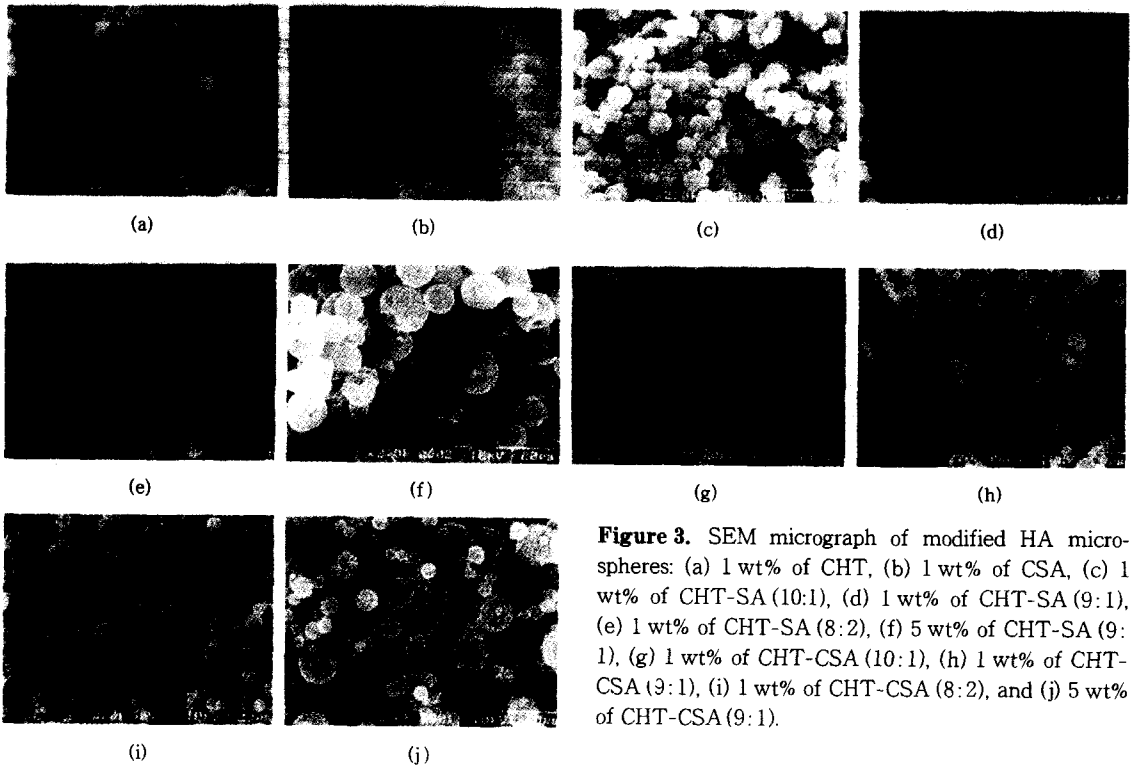
b. Degree of modification (SA)

	rxn time (hr)	yield (%)	degree of modification (mol%)
CSA01	4	91.3	1.541
CSA02	6	88.1	3.408
CSA03	8	85.5	4.223
CSA04	12	92.4	0.792
CSA05	18	91.6	0.854

자는 CHT만으로 분무처리한 미립자 (Figure 3(a))에 비해 크기가 작아졌고 동시에 균일한 형태를 지님을 알 수 있었다 (Figure 3(g), (h), (i), (j)). 결과로부터 분무조건법에 의해 일정한 입경을 갖는 고분자 미립자의 형성을 확인 가능하였으며, 아울러 압축공기 유입속도가 빠를수록 더 작은 입경을 갖는 미립자가 얻어짐을 알 수 있었다 (Table 2). 이는 압축공기의 유입속도가 빠르면 분무조건기의 분사구에서 고분자용액과 압축공기간의 혼합에 의한 미세

분산 (atomization)이 더 잘 일어나기 때문이다. 한편, 분무조건기 공정변수를 고정시키고 압축 공기 주입속도, 시료용액의 농도를 변화시키면 (Figure 3 (e), (f) and (i), (j)) 다양한 크기의 미립자를 얻을 수 있었고 주어진 조건에서 얻어진 모든 미립자는 10  $\mu\text{m}$ 를 넘지 않는 입경을 가지고 있었다 (Table 2). CHT에 CSA와 SA를 첨가하여 제조한 미립자는 균일한 크기와 형태를 갖게 되는데, 이는 긴 CHT 분자 사슬 사이로 짧은 사슬의 SA 혹은 CSA가 끼어 들어가 더 조밀한 형태의 구조를 형성할 수 있기 때문으로 사료된다. 분사 nozzle의 온도, 농도와 압축공기 유입속도에 의해서도 미립자들이 갖는 크기 및 형태에 변화가 나타났으나, 본 연구에서는 최적 조건을 선정하여 수행하였다.

제조된 미립자의 광가교. Cinnamoyl chloride와 HA 및 SA와의 반응에 따른 개질도의 차이를 반응시간에 따른 수율과 개질도의 변화로 표시한 결과를 Table 1에 나타내었다. HA와 tetrabutylammonium기로 치환된 HA는 같은 시간 동안 같은 양의 cinnamoyl chloride로 개질시키더라도 개질도의 차이가 4.2%에서 8.3%로 두배 가량 높았다. 이는 tetrabutylammonium기로의 치환이 HA의 DMF에 대한 용해도를 향상시키므로, 수분이 존재하지 않는 조건에서 반응이 진행되어 cinnamoyl chloride기가 미치환된 HA에 비해 tetrabutylammonium기로 치환된 HA에 더 많이 첨가되는 조건이 제공되기 때문이다. 한편, HA만으로는 얻어진 고분자 지지체는 본연의 특성상 충분한 기계적인 물성을 나타내기 어려우며, 광반응기를 도입하여 HA를 광가교 시키더라도



**Figure 3.** SEM micrograph of modified HA microspheres: (a) 1 wt% of CHT, (b) 1 wt% of CSA, (c) 1 wt% of CHT-SA (10:1), (d) 1 wt% of CHT-SA (9:1), (e) 1 wt% of CHT-SA (8:2), (f) 5 wt% of CHT-SA (9:1), (g) 1 wt% of CHT-CSA (10:1), (h) 1 wt% of CHT-CSA (9:1), (i) 1 wt% of CHT-CSA (8:2), and (j) 5 wt% of CHT-CSA (9:1).

도 체내에서 hyaluronidase에 의해 분해될 수 있기 때문에, 얻어지는 광이량화 고분자가 충분한 기계적인 물성을 갖도록 하기 위해 HA와 구조적으로 유사하며 지금까지 세포배양용 기재로 사용되어져왔던<sup>21-25</sup> SA로 고분자를 보강하였다. SA도 동일한 조건하에서 cinnamoyl chloride로 개질하였으나, SA의 경우 HA와는 다소 다른 반응양상을 나타내었다. 즉, cinnamoyl chloride와의 반응은 8시간이 지나면 개질되는 정도가 감소하는 결과를 표출하였으며, 광가교에 적용 가능한 개질도는 HA 경우 8%이상이나, SA는 4% 이상이면 광가교가 가능하였다. 이는 두 물질의 분자량 차이에 기인한 분자쇄간 운동의 용이성 때문으로 사료된다.

미립자 및 고분자 지지체로부터의 약물 방출 특성. 약물용액과 함께 분무 건조시킨 시료는 약물의 손실 없이 용액내의 약물을 미립자에 분산시킬 수 있었다. 분무 건조하지 않은 CHT를 이용한 디스크 형태의 고분자 지지체가 가장 많은 약물 함입량을 보였고, 분무 건조로 얻어진 CHT 미립자에서는, CSA의

함량이 증가할수록 약물 함입량이 증가하였다 (Table 3). 이는 미립자를 압축성형하여 제작한 디스크를 약물 함입을 위하여 메틸알코올/물 공용매에 용해시킨 indomethacine용액에 담글 때, CSA부분이 메틸알코올에서 팽윤되어 용이하게 약물을 흡수할 수 있을 뿐 아니라, CHT에 비해서 소수성 분자인 CSA가 시료에 포함되면 소수성인 indomethacine의 함입을 촉진시킬 수 있기 때문이다. 분무 건조하지 않은 CHT는 분무 건조하여 얻은 미립자보다 공극간격(void volume)이 커서 더 많은 약물이 함입되기는 하지만, 약물의 초기 방출량이 많아지기 때문에 조직 재생용의 지지체에 요구되는 성장인자의 서방성이라는 측면에서는 적당하지 않음을 알 수 있었다 (Figure 5). Figure 4는 indomethacine을 도입한 CHT10 미립자로부터 시간에 따른 약물의 방출거동을 보여주고 있으며, 2시간에서 6시간 사이에 약물 방출이 급격히 이루어지고 있음을 알 수 있다. 한편 CHT/CSA의 복합형 미립자는 용액의 pH가 팽윤 거동에 영향을 미치는데, CHT 디스크는 pH의 변화에 무관

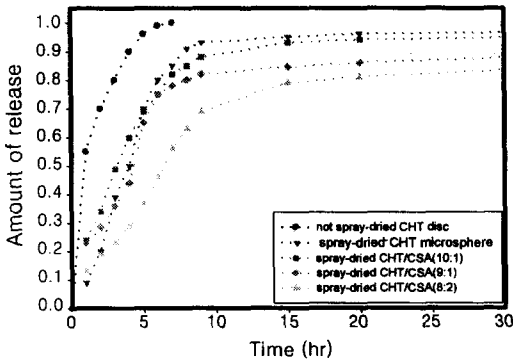
**Table 2. Microsphere Size and Its Distribution according to Spray Drying Conditions**

feed conc. (wt%)	compressed air flow (NL/min)	mean particle size ( $\mu\text{m}$ )				
		CHT10/SA			CHT10/CSA	
		10:1	9:1	8:2	9:1	8:2
1	650	3.12±8.602	3.21±7.542	3.54±3.208	1.92±2.926	1.76±2.072
	800	2.50±4.026	2.75±3.190	3.12±2.716	1.54±1.405	1.67±1.567
2	650	4.21±4.751	4.69±5.121	4.93±1.953	2.51±1.272	2.51±1.618
	800	3.35±2.986	3.69±2.260	3.82±1.762	2.13±0.976	1.85±0.488
5	650	4.64±9.818	6.49±4.999	7.95±4.787	2.92±1.451	3.12±1.440
	800	3.69±3.801	4.46±2.215	5.91±1.395	2.83±0.933	2.41±0.343

**Table 3. Amount Difference of Loaded Drug according to Microsphere Composition**

composition	CHT powder <sup>a</sup>	CHT microsphere	CHT/SA			CHT/CSA		
			10:1	9:1	8:2	10:1	9:1	8:2
amount of entrapped drug (mg)/ matrix polymer (mg)	0.22±0.016	0.21±0.059	0.18±0.034	0.14±0.045	0.13±0.028	0.24±0.039	0.27±0.023	0.29±0.013

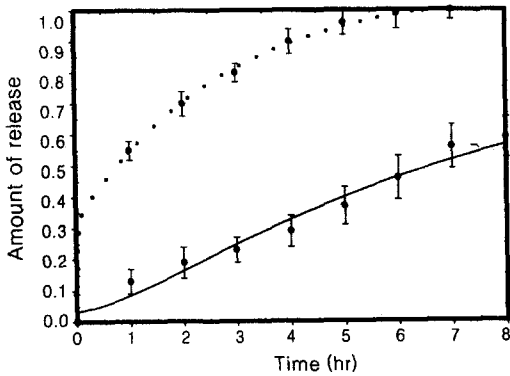
<sup>a</sup> (not spray-dried).



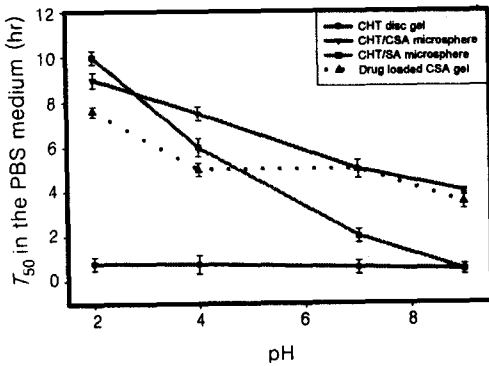
**Figure 4.** Drug release behaviors from various spray-dried microspheres.

한 약물 방출거동을 보이나 CHT/CSA 블렌드 디스크의 경우 pH가 증가할수록 팽윤이 잘되어 약물방출이 빨리 일어났다. CHT/CSA 블렌드가 나타내는 pH 감응성은 SA가 가지는 pH 민감성에서<sup>26,27</sup> 유래한 것으로 사료된다. 가공한 미립자에 세 가지 방법, 1) CHT solution과 약물용액을 혼합하여 분무 건조하는 방법, 2) 분무 건조로 얻은 미립자와 약물을 함께 섞은 후 압축 성형하는 법, 3) 압축 성형법으로 HA의 디스크를 만든 뒤 메틸알코올에 용해시킨 indomethacine용액에 담가 약물을 흡수시키는 방법

으로 약물을 도입하였는데, 약물용액과 함께 분무 건조하면 약물의 손실 없이 높은 약물농도를 갖는 미립자를 얻을 수 있었고, SA와 CSA가 소량 함유된 미립자를 만든 뒤 약물을 흡수시키는 경우는 CSA가 메틸알코올에 팽윤되는 성질을 가지고 있어 같은 무게의 시료 내에 더 많은 약물을 함유할 수 있었다. 가장 방출 특성이 좋았던 시료는 약물용액과 CHT 용액을 혼합하여 분무 건조시킨 후, 평가교시킨 시료였다. 이는 개질된 HA 분자사슬의 cinnamoyl기가 광에 의해 tetra cycle을 형성하면서 광이량화 (photodimerization)<sup>28</sup> 반응이 일어나 가교물을 형성하기 때문에 미립자의 밀도가 증가하여 미립구에서의 약물방출이 지연될 수 있기 때문이다. 처음 도입한 약물의 50%가 방출될 때까지의 시간과 pH의 상관관계에 관해 Figure 6에서 나타내었다. SA와 CSA를 함유한 재료는 pH에 따라서 미립자 디스크의 팽윤 거동이 달라지는데 pH가 낮아질수록 팽윤이 더 적게 일어나 약물방출이 지연되었으며 pH 9.0에서 미립자의 SA와 CSA부분의 용해성이 증가하여 빠른 속도로 약물방출이 일어났다. 팽윤 거동과 약물 방출 거동은 비례하기 때문에 50% 방출까지의 시간이 가장 긴 것을 각각의 pH에서 약물방출이 가장 지연되는 것이라고 설명할 수 있다.



**Figure 5.** Sustained drug release effect by spray-dried microspheres formation for 8 hrs (-----: spray-dried microspheres formation for 8 hrs, —: spray-dried CHT particle).

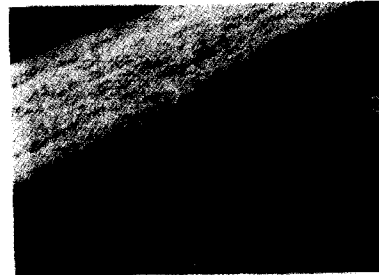


**Figure 6.** Half life time of drug release from various scaffolds ( $T_{50}$ : time for releasing 50% of loaded drug).

미립자를 이용한 고분자 지지체의 제조. 분무 건조로 얻어진 CHT 미립자를 압축 성형하여 디스크 형태로 제조할 때, 디스크의 두께를 0.5 mm 이하로 만들면 미가교 부분 없이 전체가 가교된 디스크를 얻을 수 있었고 (Figure 7(a)), 이를 물속에 장시간 침적시켜 잔존 가능한 미가교분을 제거하고 건조시켜 얻은 지지체는 스폰지 구조를 나타내었고, pore size는 10~30  $\mu\text{m}$ 임을 알 수 있었다 (Figure 7(d)). 한편 1.0 mm 이상의 두께로 만들면 표면에서만 가교 반응이 일어나, 2일 정도 물 속에 침적시켜 미가교분을 제거하면 가운데가 비어있고 폭이 25  $\mu\text{m}$  정도인 sack 구조의 고분자 지지체가 얻어짐을 확인할 수 있었다 (Figure 7(b), 7(c)). 손상된 골조직을 대체



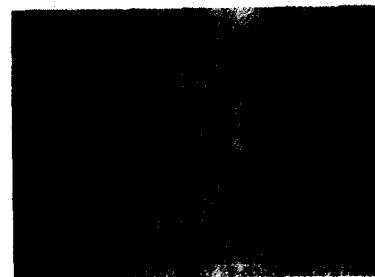
(a)



(b)



(c)



(d)

**Figure 7.** SEM micrographs of synthesized scaffold. (a) surface morphology of scaffold with CHT/CSA microsphere, (b) cross-sectional area morphology of disc-formed microsphere scaffold before soaking, (c) cross-sectional area morphology of disc-formed microsphere scaffold after soaking with water, and (d) surface morphology of disc-formed scaffold with CHT/CSA (2:8) microspheres after soaking with water.



하기 위해 조직공학의 방법으로 골아세포를 배양하려 면 다공성 지지체가 필요한데,<sup>29,30</sup> CHA와 CHT 미립자로서 다양한 pore size를 가지는 지지체를 만들 수 있음을 확인하였다.

지지체의 가수분해 특성. 모든 재료가 37 °C, pH 7.0의 PBS 용액내에서 완전히 분해될 때까지 시간을 측정하였다. CHT10을 40분간 광에 노출시켜 동일한 구조를 갖게 한 시료는 2개월 동안 형태를 유지하고 있었고 질량감소율은 30±5%에 이르렀다. 즉 CHT 재료는 pH 7.0의 PBS내에서 2개월 동안 서서히 분해되는 거동을 보였으며, CSA와 혼합하면 분해는 더욱 지연되는 결과를 나타내었다. 이로부터 CHT/CSA 재료는 손상된 골조직이 재생될 동안에 충분히 본연의 구조를 유지 가능하고 궁극에는 분해되어 완전히 주위의 골조직으로 대체 가능한<sup>31</sup> 지지체로도 사용할 수 있을 것으로 보이며 분무건조법을 이용하여 손쉽게 세포의 성장을 도울 수 있는 약물 및 성장인자의 도입이 가능한 좋은 재료로 평가할 수 있었다.

## 결 론

HA와 SA를 광반응성기인 cinnamoyl chloride로 각각 화학개질한 CHT와 CSA재료로 성형한 고분자 지지체는 pH 7.0의 PBS내에서 2개월에 걸쳐 본연의 형태를 유지하는 거동을 보였다. 이 고분자 지지체는 손상된 골조직이 재생될 동안에 구조유지가 가능하며 합입 약물(성장인자 등)의 서방성을 지니는 등, 지지체로 역할을 수행하다가 궁극에는 체내에서 효소에 의해 분해되어 새로이 형성된 생체조직으로 완전하게 대체할 수 있는 가능성을 보여준다.

감사의 글: 본 논문은 1999년 학술진흥재단 중점 연구소 육성사업에 의해 지원되었음에 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. M. Yaszemski and A. Mikos, *J. Biomed. Mater. Res.*, **43** (4), 422 (1998).
2. E. Pianigiani and L. Andreassi, *Biomaterials*, **20**, 1689 (1999).
3. V. Peguin and L. Robert, *Int. J. Biolog. Macromolecules*, **22**, 17 (1998).
4. E. Balazs and P. Band, *Cosmetics and Toiletries*, **99**, 65 (1984).
5. R. H. Chen and M. R. Tsaih, *J. Appl. Polym. Sci.*, **66**, 151 (1997).
6. C. Zeng and I. Stamenkovic, *Int. J. Cancer*, **77**, 196 (1998).
7. D. Campoccia and D. Williams, *Biomaterials*, **19**, 2101 (1998).
8. K. Pritchard, A. B. Lansley, G. P. Martin, M. Helliwell, and L. M. Benedetti, *Int. J. Pharmaceutics*, **129**, 137 (1996).
9. K. Tomihata and Y. Ikada, *Biomaterials*, **18**, 189 (1997).
10. K. P. Vercurysse, D. M. Marecak, and G. D. Prestwich, *Bioconjugate Chem.*, **8**, 686 (1997).
11. G. Abatangelo, R. Babucci, and S. Lamponi, *Biomaterials*, **18**, 1411 (1997).
12. Y. Shindo, T. Sugimura, and I. Mita, *Polym. J.*, **22**(1), 63 (1990).
13. C. P. Chung and S. J. Lee, *J. Biomed. Mater. Res.*, **51** (3), 391 (2000).
14. R. Biron and C. Sargeant, *Int. J. Pharmaceutics*, **185**(1), 51 (1999).
15. D. E. Walton and C. J. Mumford, *Trans IChemE*, **77**, Part A, 21 (1999).
16. H. Watanabe, Y. Yamada, and K. Kimata, *J. Biochem.*, **124**, 687 (1998).
17. N. Broom and A. Oloyede, *Biomaterials*, **19**, 1179 (1998).
18. R. Langer and G. Unjaknovakovic, *Experimental Cell Research*, **240**(1), 58 (1998).
19. G. Abatangelo, D. Guidolin, and R. Cortivo, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**(3), 337 (1999).
20. D. Valle Francesco and R. Aurelio, United States Patent 4,851,521 (1989).
21. J. Doyle, T. Roth, R. Smith, Y. Q. Li, and R. Dunn, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**(4), 561 (1996).
22. K. Lee, W. Park, and W. Ha, *J. Appl. Polym. Sci.*, **63**(4), 425 (1997).
23. S. Loty, J. Sautier, C. Loty, H. Boulekbache, T. Kokubo, and N. Forest, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**(2), 213 (1998).
24. Y. Suzuki, Y. Nishimura, and Y. Kakimaru, *J. Biomed.*

- Mater. Res.*, **39**(2), 317 (1998).
25. R. Glicklis, L. Shapiro, R. Agbaria, J. C. Merchuk, and S. Cohen, *Biotech. & Bioeng.*, **67**(3), 344 (2000).
26. S. Murase, K. Kinoshita, K. Horie, and S. Morino, *Macromolecules*, **30**, 8088 (1997).
27. Z. Gugala and S. Gogolewski, *J. Biomed. Mater. Res.*, **49**(2), 183 (2000).
28. P. Brun, G. Abatangelo, M. Radice, V. Zacchi, D. Guidolin, and R. Cortivo, *J. Biomed. Mater. Res.*, **46**(3), 337 (1999).
29. P. R. Hari, T. Chandy, and P. Chandra, *J. Appl. Polym. Sci.*, **59**(11), 1795 (1996).
30. C. Ramesh, N. Raghav, A. Nandal, and H. Singh, *J. Chem. Tech. & Biotech.*, **65**(2), 149 (1996).
31. C. J. Galban and B. R. Locke, *Biotech. & Bioeng.*, **65**(2), 121 (1999).