

조직 확장기용 생분해성 하이드로젤의 제조 및 특성분석

육군영¹ · 김예태^{1,*} · 임수진 · John Garner^{**} · Yourong Fu^{**} · 박기남^{***} · 박정숙^{*†} · 허강무[†]

충남대학교 고분자공학과, *충남대학교 약학대학, **Akina, Inc., ***퍼듀대학교 약학대학

(2010년 1월 7일 접수, 2010년 2월 2일 수정, 2010년 2월 6일 채택)

Preparation and Characterization of Biodegradable Hydrogels for Tissue Expander Application

Kun Young Yuk¹, Ye-Tae Kim^{1,*}, Su Jin Im, John Garner^{**},
Yourong Fu^{**}, Kinam Park^{***}, Jeong-Sook Park^{*†}, and Kang Moo Huh[†]

Department of Polymer Science and Engineering,

Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

^{*}College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

^{**}Akina, Inc., West Lafayette, IN 47906, U.S.A.

^{***}Department of Biomedical Engineering and Pharmaceutics,

Purdue University, West Lafayette, IN 47907, U.S.A.

(Received January 7, 2010; Revised February 2, 2010; Accepted February 6, 2010)

초록: 본 연구에서는 조직확장 응용을 위한 생체적합성 생분해성 하이드로젤을 제조하고, 그 기본특성을 분석하였다. 친수성 고분자인 poly(ethylene glycol)의 양 말단에 다양한 몰비의 DL-lactide와 glycolide를 개환 중합시켜 PLGA-PEG-PLGA 삼중공중합체를 합성한 뒤 비닐기를 도입하여 하이드로젤 제조 시 swelling/degradation controllers(SDC)로 사용하였다. 합성한 SDC와 PEG diacrylate를 사용하여 라디칼 중합으로 제조한 하이드로젤은 건조된 상태에서도 유연하고 탄성을 보였으며 분해테스트에서는 SDC의 조성과 SDC/PEG의 몰비에 따라 다양한 팽윤지연시간과 분해기간을 갖는 것으로 나타났다. 그 밖에 기계적 물성과 팽윤압력을 측정하였고, 이식시험을 통해 이식용 하이드로젤을 사용목적에 맞게 이식하거나 삽입하였을 때의 생체 조직의 국소적인 병리적 양상을 육안관찰과 현미경적 관찰을 통하여 평가하였다.

Abstract: In this study, we prepared and evaluated a series of biocompatible and biodegradable block copolymer hydrogels with a delayed swelling property for tissue expander application. The hydrogels were synthesized via a radical crosslinking reaction of poly(ethylene glycol) (PEG) diacrylate and poly(D,L-lactide-co-glycolide)-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA-PEG-PLGA) triblock copolymer diacrylate as a swelling/degradation controller (SDC). For the synthesis of various SDCs that can lead to different degradation and swelling properties, various PLGA-PEG-PLGA triblock copolymers with different LA/GA ratios and different PLGA block lengths were synthesized and modified to have terminal acrylate groups. The resultant hydrogels were flexible and elastic even in the dry state. The *in vitro* degradation tests showed that the delayed swelling properties of the hydrogels could be modulated by varying the chemical composition of the biodegradable crosslinker (SDC) and the block ratio of SDC/PEG. The histopathologic observation after implantation of hydrogels in mice was performed and evaluated by macrography and microscopy. Any significant inflammation or necrosis was not observed in the implanted tissues. Due to their biocompatibility, elasticity, sufficient swelling pressure, delayed swelling and controllable degradability, the hydrogels could be useful for tissue expansion and other biomedical applications.

Keywords: biodegradable hydrogel, PEG, PLGA, tissue expander, delayed swelling.

서 론

하이드로젤은 친수성고분자가 공유 또는 비공유결합으로 가교되어 만들어진 3차원 망상 구조물을 말한다. 가교구조로 이루어져 많은 양의

물을 흡수함에도 불구하고 용해되지 않는 특성을 가지고 있다.^{1,2} 1960년대에 처음 Wichterle과 Lim에 의해 가교된 poly(hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) 하이드로젤이 연구된 이래로 하이드로젤의 우수한 생체적합성으로 인해 소프트렌즈나 상처드레싱, 약물전달 시스템, 바이오센서 등 의학학적 분야에 응용되면서 많은 관심을 받아왔다.^{3,4}

하이드로젤은 생체적합성뿐만 아니라 높은 흡수율과 팽윤/수축 특

¹These authors contributed equally to this work.
[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: khuh@cnu.ac.kr, eicosa@cnu.ac.kr

성, 낮은 표면장력을 지니고 있으며 액체와 고체의 중간적인 성질을 띠기 때문에 조직공학분야를 포함에 많은 분야에 응용되고 있다.^{4,5} 특히, 생분해성 하이드로젤은 유연한 물성과 더불어 우수한 생체적합성을 가지고 있고 조직 내에서 목적인 역할을 마치고 생체에 무해한 저분자량 물질로 분해되어 사라지는 장점을 지니므로 피부, 연골, 각막 등의 조직에 응용될 수 있다.

구성성분이나 합성방법에 따라 다양한 성질을 갖는 하이드로젤을 제조할 수 있으며 물리화학적 성질이나 기계적 성질, 생물학적인 성질과 작용기의 성질까지 조절이 가능하다. 생분해성을 갖는 천연고분자나 합성고분자 대부분이 하이드로젤을 제조하는 재료로 사용될 수 있기 때문에 오래 전부터 의약학적인 분야를 포함한 다양한 분야에서 응용되기 위한 많은 연구가 진행되어 왔다. 생분해성 합성고분자와 천연고분자를 사용한 의약학적인 분야의 응용은 이미 여러 논문에서 소개된 바 있다.⁶ 또한, 다양한 물리화학적 가교 방법으로 제조된 생분해성 하이드로젤도 소개되었다.¹

천연고분자는 생분해성과 생체적합성, 우수한 수용성 등의 성질을 가지고 있기 때문에 이상적인 하이드로젤의 재료로 평가받고 있다. 하지만 기계적 강도가 매우 낮아 높은 하중을 견뎌야 하는 조직에 충분한 기계적 강도를 제공하지 못하고 가공과 개질이 어렵다는 단점이 있다. 이와 반대로 생분해성 합성고분자는 정밀하게 조절된 구조와 기능을 보유하도록 제조할 수 있으며 기계적 물성이 우수하여 봉합술 시 사용되는 봉합사 등 특수한 응용분야에 사용되고 있다.⁷ 최근에는 새로운 합성고분자의 연구발견으로 더욱 다양한 특성이 부여되면서 광범위한 분야에서 생분해성 고분자가 사용되고 있다. 대표적인 생분해성 고분자로는 poly(α -esters),⁶ polyglycolide,⁸ polylactides,⁹ poly(lactide-co-glycolide),¹⁰ polydioxanone,¹¹ poly-caprolactone,¹² poly(trimethylene carbonate),¹³ polyurethanes,¹⁴ poly(ester amide),¹⁵ poly(ortho esters),¹⁶ polyanhydrides,¹⁷ poly(anhydride-co-imide),¹⁸ poly(propylene fumarate),¹⁹ poly(alkyl cyanoacrylates),²⁰ polyphosphazenes,²¹ polyphosphoester와²² 그 유도체들이 있다. 그러나, 많은 생분해성 고분자들은 소수성을 띠기 때문에 수성환경에서 하이드로젤의 특성을 발현하는데 있어 제약을 주게 된다. 이러한 고분자들은 poly(ethylene glycol) (PEG)과 같은 친수성고분자 또는 다른 수용성 고분자와 블록/그래프트 공중합체, 고분자 블렌드(semi-interpenetrating) 고분자 형태로 제조하거나 다른 화학적, 물리적 결합구조로 결합시킴으로써 활용할 수 있다.

생체재료분야에서 poly(ϵ -caprolactone) (PCL), polylactides (PLAs), poly(glycolic acid) (PGA), poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) 등과 같은 생분해성 폴리에테르들은 약물전달시스템이나 조직공학의 지지체로의 활용을 목적으로 광범위하게 연구되고 있다.²³⁻²⁵ 최근에는 이들 폴리에스테르의 생분해성과 친수성고분자인 PEG의 생체적합성을 모두 갖춘 polyester-PEG의 블록공중합체가 유망한 생체재료로 주목받고 있다.²⁶⁻²⁸ 블록공중합체는 양친매성 때문에 독특한 특성을 지니며 블록의 비와 구성에 따라 생분해성과 팽윤비, 탄성, 기계적 물성 및 투과성과 같은 다양한 물리화학적 특성들을 나타내기 때문에 원하는 특성에 따라 고분자를 제조할 수 있다.²⁹⁻³¹ 예로 블록 공중합체를 사용하여 건조된 상태에서 유연하고 탄력적인 물성을 갖는 생분해성 하이드로젤이 연구된 바 있다.¹²

조직공학은 하이드로젤의 다양한 응용분야 중 가장 유망한 분야로 하

이드로젤의 대표적 특징인 물을 흡수하고 팽윤하는 특성을 효과적으로 사용할 수 있다. 그중 조직확장술은 피부아래에 조직확장기를 위치시키고 일시적으로 자가 팽창시켜 조직면적을 늘리고 늘어난 피부로 흉터 부위를 덮어주는 치료과정이다.^{32,33} 1957년 측두부 피하에 공기를 채울 수 있는 고무 풍선을 넣고 인위적으로 피부의 확장을 유도하여 소이증 치료를 한 연구 이후에 조직확장기의 종류는 다양하게 발전되었다.³⁴ 최근에는 vinyl pyrrolidone과 methyl methacrylate(MMA)로 구성된 하이드로젤을 사용한 자가팽창 조직확장기가 Wiese에 의해 고안되었다. 이 자가팽창 조직확장기는 이식 후 체액을 흡수하여 정해진 크기와 부피로 천천히 팽윤한다. 이전의 조직확장기에 비해 안정한 팽윤부피로 남아있는 반면 건조된 상태에서 딱딱하고 깨지기 쉽기 때문에 주입 시 모양과 크기를 변화시키기 어려운 단점이 있다.^{35,36} 그러므로, 응용분야에 따라서 개질이 가능하고 다루기 쉬운 유연하고 탄성을 지닌 조직확장기의 개발이 필요하게 되었다.

본 연구에서는 조직확장기 응용분야에 적용하기 위한 새로운 생분해성 하이드로젤을 제조하였다. 하이드로젤은 친수성 고분자인 PEG와 생분해성 고분자인 PLGA-PEG-PLGA를 기본 블록으로 사용하였고 vinyl 그룹을 도입한 후 라디칼 중합에 의해 제조하였다. PLGA-PEG-PLGA 삼중공중합체는 DL-lactide와 glycolide의 반응 물비를 변화시켜 다양한 분자량을 합성하였으며 말단을 아크릴레이트 그룹으로 치환시켜 하이드로젤 제조 시 swelling/degradation controllers(SDC)로 사용하였다. 생분해성 고분자로 이루어진 SDC는 가수분해에 의해 분해가 일어나고 SDC의 종류에 따라 분해가 일어나는 시간을 조절할 수 있다. 제조한 하이드로젤은 생분해성, 팽윤특성, 기계적 물성, 삼투압 등의 여러 특성을 평가하고 이식시험을 통해 국제표준화기구 기준에 따라 이식용 하이드로젤을 사용목적에 맞게 이식하거나 삼입하였을 때, 생체 조직의 국소적인 병리적 양상을 육안관찰과 현미경적 관찰을 통하여 전반적으로 평가하였다.

실 험

시약 및 재료. Poly(ethylene diacrylate) (PEG-DA, $M_n=700$), PEG diol($M_n=1500$), stannous 2-ethylhexanoate(stannous octoate), acryloyl chloride(Ac), triethylamine(TEA), toluene, benzene, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. 라디칼 개시제로서 2,2'-azobisisobutyronitrile(AIBN)은 Junsei Chemicals(Japan)에서 구입하였으며 methanol에서 1회 재결정하여 사용하였다. DL-Lactide(LA)와 glycolide(GA)는 Polysciences에서 구입하였으며 ethyl acetate에서 1회 재결정하여 사용하였다. Methylene chloride, *n*-hexane, methanol, diethyl ether, ethanol은 Samchun Chemicals(Korea)에서 구입하였고, sodium phentobarbital(Entobar[®])은 한림제약(한국)에서 구입하였으며, 다른 시약들은 별도의 정제과정 없이 사용하였다.

PLGA-PEG-PLGA 삼중블록 공중합체의 합성. PEG diol(5 g, $M_n=1500$)을 2-neck 둥근 플라스크에 넣고 80 °C의 진공오븐에서 12시간 건조하여 수분을 완전히 제거하였다. 플라스크 안에 질소분위기를 형성한 뒤, 110 °C에서 계산된 양의 stannous octoate을 toluene에 5배 희석시켜 넣은 후 30분 교반시켰다. 플라스크의 온도를 실온으로 냉각시키고 LA(1.65 g)와 GA(1.65 g)를 넣은 뒤 감압 후 질소

를 들여보내는 과정을 3회 반복하고 마지막은 진공 상태로 만들어 주었다. 진공상태의 two-neck flask를 140 °C에서 교반하며 5시간 동안 반응시킨 후 합성된 고분자를 실온으로 냉각시킨 다음 methylene chloride 30 mL로 용해시키고 과량의 차가운 diethyl ether에 침전시켰다. 침전된 고분자를 여과 및 분류하여 실온의 진공오븐에서 24시간 건조하여 합성물을 얻었다. PEG에 대한 LA와 GA의 반응비율을 다르게 첨가하여 다양한 블록길이의 PLGA-PEG-PLGA를 합성하였다.

PLGA-PEG-PLGA Diacrylate(PLGA-PEG-PLGA-DA)의 합성. PLGA-PEG-PLGA 삼중공중합체 5 g을 질소 기류하에서 two-neck 둥근바닥 플라스크에 넣고 benzene 30 mL로 녹였다. 미리 계산된 양의 triethylamine (0.69 g, 6.87mmol)과 acryloyl chloride (0.62 g, 6.87 mmol)를 용액에 넣고 80 °C에서 3시간 반응시킨 후 여과지로 triethylamine hydrochloride를 여과하였다. 여과된 반응 용액은 차가운 *n*-hexane에 침전시키고 침전용액을 감압 여과하여 걸러진 반응물을 실온에서 24시간 진공 건조시켜 합성물을 얻었다.

PLGA-PEG-PLGA/PEG 블록 공중합체 하이드로젤의 제조 PLGA-PEG-PLGA diacrylate와 PEG diacrylate의 일정량을 5 mL의 DMSO에 녹였다. 고분자 총 농도를 10 wt%로 맞추고 AIBN(17.5 mg, 0.11 mmol)을 첨가한 후 고분자 용액을 microcentrifuge tube에 나누어 담고 60 °C의 오븐 안에서 12시간 동안의 라디칼 중합에 의해 삼차원 망상구조를 가진 하이드로젤을 제조하였다. 제조된 하이드로젤을 에탄올에 담가 미반응물을 제거한 후 진공오븐에서 24시간 동안 건조하였다.

특성분석. 합성된 PLGA-PEG-PLGA와 PLGA-PEG-PLGA-DA의 화학적 조성은 ¹H NMR(JNM-AL400 spectrometer, Jeol Ltd, Akishima, Japan)과 FTIR(Nicolet, UAS)로 확인하였다. 고분자의 분자량 및 분자량 분포는 GPC(Agilent 1100 series, USA)를 통하여 분석하였다. GPC는 RI 탐지기, quaternary 펌프와 두 개의 컬럼(PLgel 5 μm MIXED-D & E columns)을 장착하였으며, PEG를 기준 시료로 하여 1 mL/min의 유속으로 측정하였다. 이동상 용매는 THF를 이용하였으며 컬럼과 탐지기의 온도는 모두 35±0.1 °C를 유지하였다.

기계적 물성 측정. 제조된 PLGA-PEG-PLGA/PEG 하이드로젤의 기계적 물성을 알아보기 위해 texture analyzer(TA.XT plus, Texture Technologies Corp.)를 이용하여 탄성과 응력 완화를 측정하였다.³⁷ 디스크모양의 하이드로젤 시료를 digital calipers를 사용하여 횡단면 넓이와 높이를 계산한 후 실험을 시행하였다. 1/2 inch(12.7 mm) radius dacron tip은 0.5 mm/sec의 속도로 시료에 압력을 가하였고 하이드로젤이 20%의 변형률이 일어나도록 하여 60초 동안 유지한 후 팁을 제거하였다. 탄성률은 탄성체가 탄성한계 내에서 가지는 응력과 변형의 비로 정의되므로 대략 0~2%의 작은 변형이 일어났을 때 응력과 변형의 비의 변화를 측정하여 탄력성을 알아보았다. 응력완화는 순간적으로 가한 변형을 일정하게 유지할 때 물체 내부의 응력이 시간경과에 따라 감소하는 현상이고 하이드로젤의 응력완화는 다음의 식으로 정의하였다.

Stress relaxation =

$$\frac{\text{maximum stress at 20\% strain}}{\text{stress at 20\% strain after holding for 60 sec}} \times 100$$

팽윤압력 측정. 하이드로젤의 팽윤 압력은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 환경은 가능한 생리적 환경과 비슷하게 유지된 상태로 고분자 에스테르의 분해과정을 빠르게 진척시킬 수 있는 곳에서 하이드로젤을 팽윤시켰다. 디스크 모양의 하이드로젤 시료를 22 mL의 scintillation vial에 넣은 후 그 vial을 열자력 교반기에 올려놓고 표면의 온도는 37 °C로 유지하였다. Texture analyzer tip을 하이드로젤 시료 위에 살짝 놓고(접촉 힘=2 grams) 10 mL의 0.154 M HCl을 첨가하였다. 24시간 후 tip에 힘(Newtons)을 가하고 이 힘은 10초에 한번씩 측정하였다. 모든 시료가 손상(crack)이 일어나 측정되는 값이 줄어들 때까지 계속하여 힘을 측정하였고, 가해진 힘이 최대에 도달되었을 때 팽윤된 하이드로젤의 접촉 단면으로 나누어 압력을 구하였다. 모든 측정은 세 번씩 이루어졌고, 평균값으로 최대 팽윤 압력을 최종적으로 결정하였다.

In vitro 분해 시험. 하이드로젤의 분해거동을 알아보기 위해 다음의 방법을 사용하였다. 건조된 하이드로젤을 직경 5 mm와 3 mm의 디스크 모양으로 자른 후 무게를 측정하였다. 건조된 하이드로젤을 37 °C의 증류수에 담고 시간에 따른 무게변화를 측정하였고 측정하기 전 여과지를 사용하여 하이드로젤 표면에 과량으로 묻어있는 물을 제거하였다. 팽윤비(*S*)는 다음의 식으로 계산하였다.

$$S = W_s / W_d$$

여기서, W_s 와 W_d 는 각각 팽윤되었을 때와 건조되었을 때의 무게이다. 팽윤비의 변화와 하이드로젤의 무게 손실은 일정 시간마다 측정하였다. 모든 측정은 3번씩 측정하여 무게의 평균값과 오차를 계산하였다(average ± SD).

이식시험. 수컷 마우스(balb/c, 20±2 g, 6주령) 18마리를 중앙실험동물(주) (한국)로부터 구입하였다. 실험전까지 1주일 이상 동물실에서 안정시킨 후 실험하였으며, 충남대학교의 실험동물의 관리와 사용에 관한 지침을 준수하여 취급하였다. 이식물은 제조된 하이드로젤 A(PLGA-PEG-PLGA:PEG=1:2)와 B(PLGA-PEG-PLGA:PEG=1:1)을 두께 1 mm, 지름 6 mm의 얇은 원기둥 모양으로 절단하여 준비하였다.

실험동물을 무작위로 2군으로 구분하고, 각각 이식물 A와 이식물 B를 이식하였으며, 이식기간에 따라 1, 3, 9주차 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 면도기로 각 마우스의 등 부위의 털을 깎고 완전한 무균 조건에서 이식물과 대조군 등의 피하부분에 이식하였다. 척추를 기준으로 등의 오른쪽 부위에 이식물을 삽입하고, 왼쪽 부위에는 대조군인 PBS를 주입하였다. 이식물을 삽입할 때에는 오른쪽 등의 중앙부를 세로로 절개하고 터널을 만들어 이식물을 절개부의 양쪽으로 이식하였다. 이식부위는 절개선으로부터 거리가 10 mm 이상 되게 하고, 이식부위 하나당 한 개의 이식시료를 이식하였다. 대조이식물은 이식물과 같은 부위의 PBS를 사용하였다.³⁸ PBS는 척추를 기준으로 이식물이 이식된 부위와 대칭되는 왼쪽 부위에 PBS 30~50 μL를 주입했다. 이식물은 이식 전에 UV를 15분간 조사하고 PBS는 고압증기 멸균 처리하여 멸균상태를 유지하였으며, 절개 시 감염을 막기 위해 무균상태에서 시행하고 이식부위의 외상을 최소화 하도록 하였다. 시술 후에 봉합사를 사용하여 절개 부위를 봉합하고 절개부위를 소독하였다. 분해/흡수될 수 있으므로 이식부위를 비침투성 피부 marker를

이용하여 표시하였다.³⁹

1, 3, 9주에 이식물 A와 이식물 B를 각각 이식한 마우스를 각각 3 마리씩 안락사시켰다. 이식된 부분의 피하조직이 포함되게 피부를 벗긴 다음, 피서 여파지에 붙이고, 2% formaldehyde가 담긴 용기에 조직 샘플을 넣어 shaking시키며 고정한 다음, 9주째 모든 조직 샘플을 분석하였다.

이식 후 마우스에 대한 이식물의 영향을 알아보기 위해 몸무게와 체온을 측정하고, 이식부위의 사진을 찍었다. 관찰된 조직반응의 정도 및 특성을 육안적으로 대조부위와 비교하여 기록하였다. 고정한 샘플을 마이크로톰을 이용하여 3~6 μm 두께의 절편을 만들었으며 hematoxylin and eosin(H&E) staining으로 염색 후, 현미경으로 피하조직상태를 관찰하였다.⁴⁰

국제표준화기구 기준(ISO 10993-6)에 제시된, 조직학적 평가 시 평가하고 기록해야 하는 생물학적 반응의 변수는 섬유 캡슐화 및 염증의 정도, 형태학적 변화에 의한 조직의 변화, 이식시료와 조직접촉면에서의 염증세포의 수 및 분포 형태; 다형핵백혈구, 림프구, 플라즈마 세포, 호산구, 대식세포, 다중핵 세포와 같은 염증세포의 숫자나 분포도, 세포핵의 잔해 또는 모세혈관 벽의 파괴로 인한 괴사의 발생, 원자재의 파편, 지방침투, 육아종과 같은 기타 변수, 다공성 이식시료 시험 시 구멍의 안쪽으로 성장한 조직의 상태와 양 등과 같다.³⁹

본 실험에서는 국제표준화기구 기준(ISO 10993-6)에 제시된 변수들 중, 피하이식 후 평가 가능한 몇 가지 변수를 평가하였다. 이식물 접촉 부위의 캡슐화 정도와 염증의 정도는 4단계(minimal, slight, moderate, marked)로 평가하였고 대식세포의 뭉침(conglomerate)

의 유무도 관찰하였다.⁴¹

결과 및 토론

특성분석. PLGA-PEG-PLGA 삼중블록 공중합체는 거대 개시제로서의 PEG와 촉매인 소량의 stannous octoate 존재 하에 LA와 GA의 개환중합에 의하여 합성하였다. 합성된 공중합체는 말단의 하이드록시 그룹을 아크릴레이트 그룹으로 치환시켰으며 합성 과정은 Figure 1에 나타내었다. PLGA-PEG-PLGA를 합성할 때 PLGA와 PEG 사이의 몰비를 다양하게 하여 삼중블록 공중합체의 블록크기를 조절하였다. 또한, PLGA의 조성은 LA와 GA의 몰비를 변화시켜 조절하였고 합성된 두 종류의 삼중블록 공중합체에서의 LA/GA비는 1/1과 4/1로 얻어졌으며, 수득률은 각각 77%, 88%이었다. ¹H NMR로 분석한 결과 수평균분자량은 각각 2170, 1990이었으며, 그 값은 GPC 측정 분자량 값($M_n=2140$ and 1940)과 거의 유사함을 확인하였다. 그리고, 두 개의 합성된 고분자의 분자량 분포는 GPC 분석을 통해 좁은 분산도(PDI<1.1)를 가짐을 확인하였다.

¹H NMR 스펙트럼에서 PLGA-PEG-PLGA 삼중블록 공중합체의 특성피크(Figure 2(a))는 $\delta=1.55$ ppm(CH₃ of LA) (a), $\delta=3.65$ ppm(CH₂ of PEG) (b), $\delta=4.20$ ppm(CH₂ of PEG) (c), $\delta=4.80$ ppm(CH₂ of GA) (d)와 $\delta=5.20$ ppm(CH of LA) (e)에서 확인되었다. ¹H NMR 분석을 통한 PLGA의 분자량 계산은 PEG의 CH₂에 대한 LA의 CH 피크(또는 GA의 CH₂피크)의 proton면적 비를 비교하여 계산하였다. Figure 2(b)에 나타난 피크를 보면 $\delta=5.8, 6.2,$

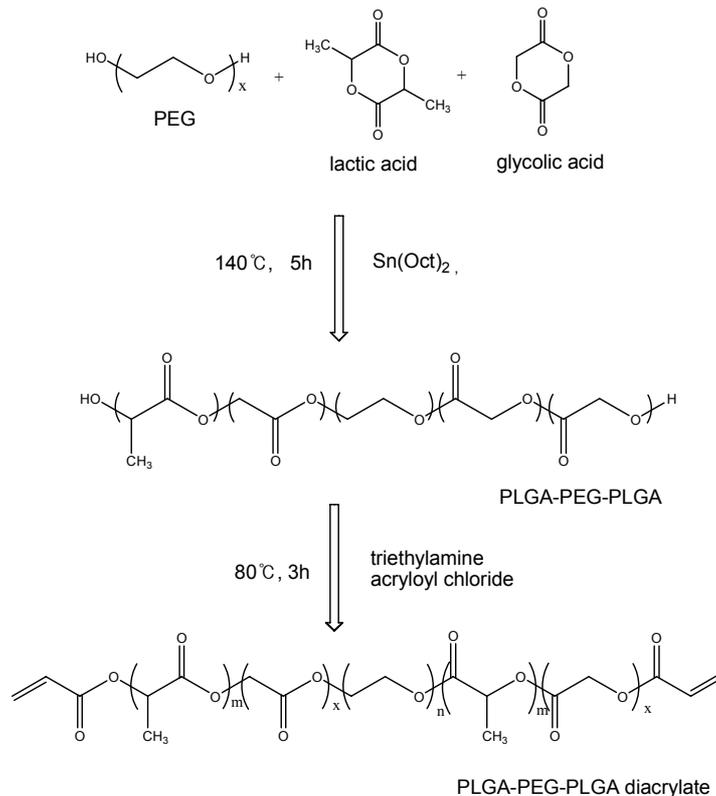


Figure 1. Synthetic methods of PLGA-PEG-PLGA diacrylate.

6.4 ppm에서 작은 세 개의 피크로 아크릴레이트의 비닐기($\text{CH}_2=\text{CH}$)를 확인하였으며 이로 PLGA-PEG-PLGA 삼중블록 공중합체 말단의 하이드록시 그룹이 아크릴레이트 그룹으로 치환되었음을 확인하였다. 한 개의 PEG 단위당 acryl 그룹의 수는 acryl 그룹의 $\text{C}=\text{C}$ 와 PEG의 CH_2 해당하는 피크의 proton 면적비를 비교하여 계산하였으며 1.7 이상임을 확인할 수 있었다.

하이드로젤은 PEG-DA와 PLGA-PEG-PLGA-DA의 당량비를 조절하여 제조하였고 그 결과를 Table 1에 요약하였다. PEG, PLGA-PEG-PLGA, PLGA-PEG-PLGA-DA, PLGA-PEG-PLGA/PEG 하이드로젤을 FTIR로 측정된 결과 PEG 스펙트럼과 비교했을 때 1734 cm^{-1} 주변에서 PLGA의 에스테르 결합($\text{C}=\text{O}$) 때문에 새로운 파장이 나타난 것을 알 수 있었다. PLGA-PEG-PLGA-DA의 스펙트럼에서는 1548 와 806 cm^{-1} 에서 양말단에 치환된 아크릴레이트 그룹의 비닐기($\text{C}=\text{C}$)에 의한 흡수피크가 나타났고 하이드로젤에서는 반응에 의해 사라짐을 확인하였다.

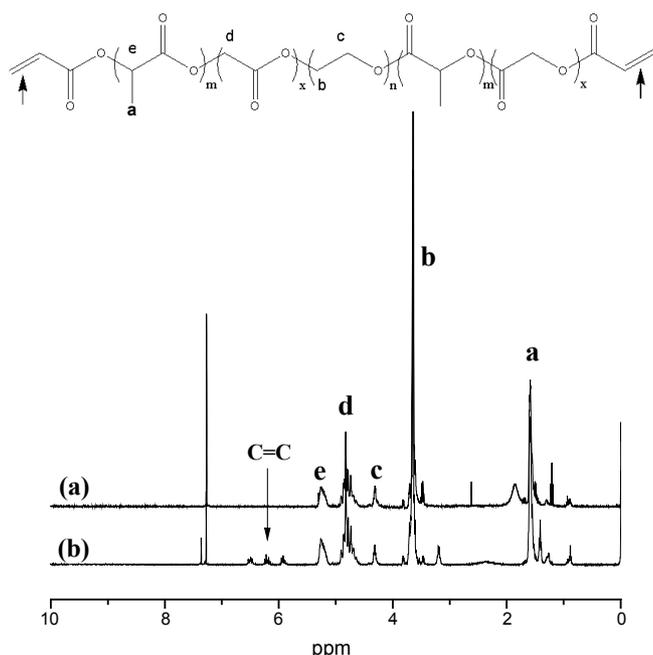


Figure 2. ^1H NMR spectra of PLGA-PEG-PLGA triblock copolymer (a); PLGA-PEG-PLGA diacrylate (b).

기계적 물성. 하이드로젤의 기계적 물성을 알아보기 위해 탄성률과 응력완화를 측정하여 각각 Table 2에 나타내었다. 시료 1은 높은 탄성률을 가졌고 다소 단단하여 자르는데 어려움이 있었지만 그 외의 다른 시료들은 모두 낮은 탄성률을 가졌고 비슷한 기계적 물성으로 건조된 상태에서도 유연하고 고무 같은 성질을 보였다. 응력완화는 고분자에 변형을 일정하게 유지하였을 때 물체내부의 응력이 시간경과에 따라 감소하는 현상이다. 즉, 처음에 요구된 힘보다 변형을 유지하는데 힘이 덜 요구되는 현상을 뜻한다. 점탄성 물질에서 응력완화는 물질의 영구적 변형에 따른 고분자 사슬의 재배열 때문에 일어난다. 제조된 시료들은 모두 90% 이상의 응력 완화를 나타내었는데 이것은 고분자 사슬의 가교구조에 기인하여 응력 하에서의 변형이 쉽게 일어나지 않음을 알 수 있었다.

팽윤압력. 하이드로젤의 팽윤압력은 생리적 환경과 비슷한 상태에서 분해를 가속화시켜 측정되었고, 그 결과는 Table 2에 나타내었다. PLGA의 분해가 낮은 pH에 의해 가속화되고⁴² PEG의 용해성과 팽윤 성질은 염의 첨가에 의해 주로 영향을 받기 때문에,⁴³ 하이드로젤의 분해를 가속화하기 위해 0.154 M HCl(isotonic to human body, $\text{pH}=1.53$)을 사용하였다. 이전의 연구에서 하이드로젤이 조직 팽창기에 사용되었을 때의 이상적인 팽윤압력은 100 mmHg 이었다.⁴⁴ 이것으로 보아 제조된 모든 하이드로젤은 조직을 팽창시키기 위해 충분한 팽윤압력을 가지고 있다는 것을 알 수 있다.

In vitro 분해시험. 7개의 하이드로젤 시료를 사용하여 *in vitro* 분해 테스트를 진행하였다. 분해테스트를 하는 동안 팽윤도를 측정함으로써 시료의 가수분해 거동을 분석하였고 결과는 Figure 3에 나타내었다. 하이드로젤은 처음 팽윤시 건조된 무게의 6~17배의 팽윤도를 보였고 친수성 고분자인 PEG의 함량이 높을수록 비교적 높은 초기 팽윤비를 나타내었다. 실험은 매일 새로운 증류수로 교체되었고 수일이 지난 후 하이드로젤은 생분해성 사슬의 가수분해에 기인하여 팽윤비가 다시 증가하는 2차 팽윤을 보였다. Figure 4(a)에 하이드로젤의 분해과정을 그림으로 나타내었고, 건조상태와 분해과정의 하이드로젤을 시간에 따른 형태 변화 사진을 Figure 4(b)에서 보여주고 있다. 그림에서와 같이 하이드로젤 내에서 생분해성 PLGA블록의 분해가 진행됨에 따라 하이드로젤의 가교도는 감소하여 결과적으로 팽윤부피의 증가를 유도하였다. 7개의 하이드로젤은 2차 팽윤이 일어나기 전 다양한 지연시간을 보였고 이는 하이드로젤들의 분해속도가 삼중블록 공중합체의 화학적 조성과 하이드로젤의 PLGA-PEG-PLGA/PEG 블록조성비에 의존한다는 것을 알 수 있었다. 팽윤 전 지연시간은 조직확장기의 삽

Table 1. Synthetic Results of Hydrogels Based on PLGA-PEG-PLGA and PEG

Hydrogel samples	PEG-DA (g/mol)	SDC ^a (g/mol)	LA:GA ^b	SDC: PEG ^c (by weight)	Swelling ratio		Degradation time (day) ^f
					S_I^d	S_M^e	
#1	-	333-1500-333	1 : 1	1 : 0	6	60	6
#2	700	333-1500-333	1 : 1	2 : 1	10	138	5
#3	700	333-1500-333	1 : 1	1 : 1	10	130	14
#4	700	333-1500-333	1 : 1	1 : 2	17	248	9
#5	700	246-1500-246	4 : 1	2 : 1	10	81	13
#6	700	246-1500-246	4 : 1	1 : 1	10	65	24
#7	700	246-1500-246	4 : 1	1 : 2	12	88	35

^aSDC=Swelling/degradation controller, PLGA-PEG-PLGA-DA. ^bThe molar ratio of LA and GA in PLGA-PEG-PLGA. ^cThe feed block composition of SDC and PEG-DA. ^d S_I =The initial swelling rate before degradation. ^e S_M =The maximum swelling ratio during degradation. ^fThe time required to reach S_M .

입에 의해 손상된 피부가 접합이 되기 위한 충분한 시간을 제공할 것이다. 또한, 조절 가능한 분해 속도는 이것을 신체의 다양한 부분에 적용 가능하게 할 것이다.

PLGA-PEG-PLGA(LA/GA=1) 삼중블록 공중합체가 SDC로 사용되었을 때, 하이드로젤은 5~14일의 팽윤 전 지연시간을 보인 반면 PLGA-PEG-PLGA(LA/GA=4) 삼중블록 공중합체가 사용된 하이

Table 2. Elastic Modulus, Stress Relaxation, and Swelling Pressure of Biodegradable Elastic Hydrogels

Sample	Elasticity modulus (kPa)	Stress relaxation at 60 sec (%)	Swelling pressure (mmHg)
#1	5.20±0.1	94.7±0.18	699±208
#2	2.32±0.10	91.5±0.38	471±139
#3	2.00±0.47	94.1±0.32	450±87
#4	2.62±0.33	95.0±0.39	398±41
#5	2.02±0.32	95.9±0.30	402±24
#6	2.95±0.40	95.4±0.14	425±0
#7	2.25±0.85	93.4±2.81	490±52

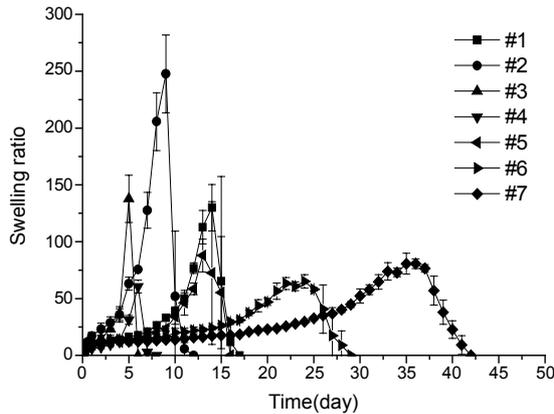


Figure 3. *In vitro* degradation test of PLGA-PEG-PLGA/PEG hydrogels at 37 °C.

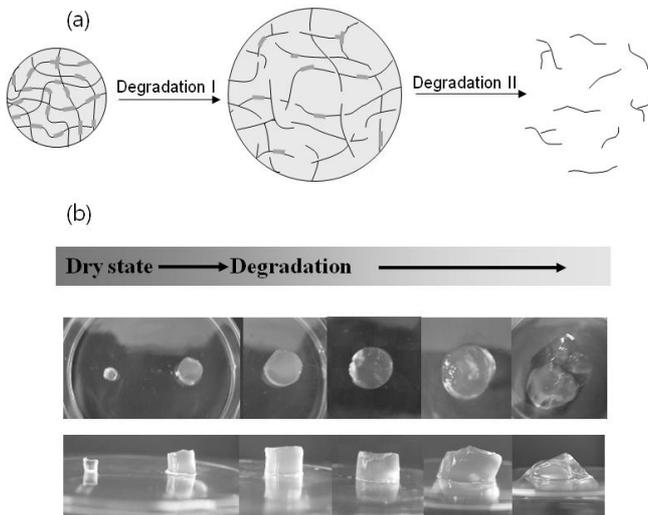


Figure 4. Schematic degradation process (a); photographs of hydrogels in dry state and during degradation process (b).

드로젤의 경우, 13~35일의 팽윤 전 지연시간을 보였다. 일반적으로 PEG-DA블록이 높은 비율로 함유되어 있는 하이드로젤은 PEG 블록의 짧은 블록 길이에 의한 높은 가교밀도로 인해 낮은 분해속도를 보였다. 모든 하이드로젤 샘플은 분해가 계속 진행되면 최종적으로 하이드로젤의 망상 구조 붕괴로 용해되어 사라지게 된다.

이식시험.

육안적 평가: 7주령 마우스에 이식한 후 몸무게는 시간이 지남에 따라 증가하였고 감소하는 개체는 없었다. 체온은 직장을 통해 측정하였고 이식 후 발열이라고 생각될 만한 변화는 측정되지 않았다. 대조 부위인 왼쪽 부위와 이식물 A군의 오른쪽 부위는 하루가 지난 후 이식부위의 돌출부위가 사라졌으나, 이식물 B군의 오른쪽 등 부위는 시간이 지남에 따라 더욱 돌출되었다. 이식물 B군 중 3주 동안의 이식 기간을 갖는 2마리의 마우스가 이식 후 10일과 14일이 지나고 돌연

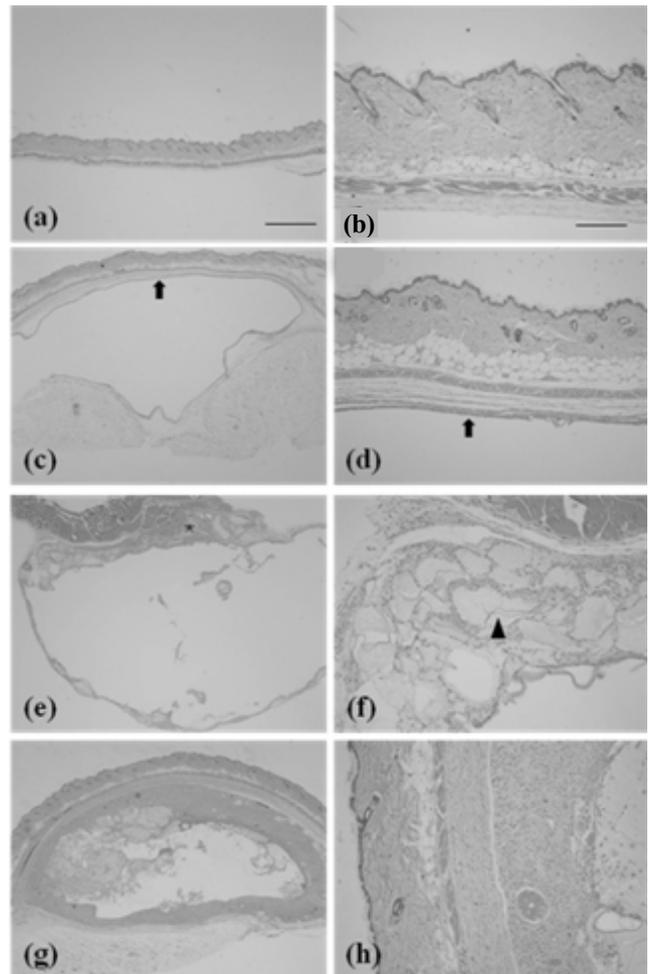


Figure 5. Histological observation of the skin implanted with hydrogel B in mice. Control(a, b), capsule formation(arrows) at one week after implantation(c, d), capsule formation, cellular ingrowth(*), and degradation of implant(arrow head) by macrophages at three weeks after implantation(e, f), and massive phagocytosis of implant at nine weeks after implantation(g, h). H&E, Bar =1 mm(a, c, e, g), =0.2 mm(b, d, f, h). Solid arrow represents degradation of hydrogel.

Table 3. Histological Response in Mice after Implantation of Biodegradable Hydrogels

Time (weeks)	Implant A			B		
	1	3	9	1	3	9
Number examined	3	3	3	3	1	3
Capsule formation	-	-	-			
Minimal				3		
Slight						
Moderate					1	
Marked						3
Inflammation	-	1	-			
Minimal		2 ^a		3		
Slight						
Moderate					1	
Marked						3
Conglomerate of Mφ	-	-	-	-	1	3

^aInflammation on the implantation site.

사하였다. 9주 동안의 이식기간을 갖는 이식물 B군이 3마리 모두 견강한 것으로 보아 이식물에 의한 사망은 아닌 것으로 사료된다.

현미경적 평가. 이식물 A를 이식한 군에서는 이식물 접촉 부위의 캡슐화가 관찰되지 않았지만, 이식물 B를 이식한 군에서는 1주 동안 이식한 마우스는 경미(minimal)한 정도, 3주 동안 이식한 마우스는 중증(moderate) 정도, 9주 동안 이식한 마우스에서는 심각(marked)한 정도의 캡슐화가 관찰되었으며(Figure 5), 이는 육안적 평가와도 일치하는 결과였다. 이식물 B를 이식한 후 조직학적 평가는 Figure 5와 같으며, (a)와 (b)는 생리식염수를 이식한 부위로서 대조군을 나타내고 있으며, 그림 (c)와 (d)는 이식물 B 투여 1주 후, 하이드로젤이 이식된 부분에 염증세포들에 의해 캡슐이 형성되었음을 보여준다. 그림 (e)와 (f)에서 이식물 투여 3주 후, macrophages와 fibroblasts들로 이루어진 캡슐형성과 더불어 하이드로젤이 macrophages에 의해 둘러싸여 분해되고 있음을 관찰할 수 있다. 그림 (g)와 (h)는 이식물 투여 9주 후, macrophages의 현저한 침윤과 더불어 이식된 하이드로젤이 macrophages에 의해 phagocytosis됨을 보여주고 있다. 염증의 경우, 이식 부위의 염증을 제외하면 이식물 A를 이식한 군에서는 염증이 관찰되지 않았고 이식물 B를 이식한 군에서는 1주 동안 이식한 마우스는 경미한 정도, 3주 동안 이식한 마우스는 중증 정도, 9주 동안 이식한 마우스에서는 심각한 정도의 염증이 관찰되었다. 대식세포의 뭉침(conglomerate)의 유무는 3주, 9주 동안 이식물 B를 이식한 군에서 관찰되었다(Table 3).

결 론

Swelling/degradation controller(SDC)로써 PLGA-PEG-PLGA-DA와 PEG-DA를 기본 블록으로 사용하여 라디칼 중합에 의해 다양한 하이드로젤을 제조하였다. 구성성분에 따라 하이드로젤은 다양한 물리화학적 특성을 갖게 제조할 수 있다. 제조된 하이드로젤은 건조된 상태에서도 모양과 크기를 변화시킬 수 있었고 유연함과 탄성을 가짐을 확인하였다. 하이드로젤의 기계적 물성을 알아보기 위해 탄성률과

응력완화를 측정하였고 시료 1은 높은 탄성률을 가져 다소 단단했다. 그 외의 다른 시료들은 모두 낮은 탄성률을 가졌고 비슷한 기계적 물성으로 건조된 상태에서도 자르는 것이 쉬웠다. 또한, 제조된 시료들은 모두 90% 이상의 응력완화를 나타내었고 이것은 응력 하에서 변형이 잘 일어나지 않는다는 것을 뜻한다. 팽윤압력시험에서는 샘플 모두 100 mmHg 이상으로 조직을 팽창시키기 위해 충분한 팽윤압력을 가지고 있다는 것을 알 수 있었다. *In vitro* 분해 시험 결과 PLGA-PEG-PLGA/PEG 하이드로젤의 성분에 따라 2차 팽윤이 일어나기 전 다양한 지연시간을 보였고 완전히 분해되기까지는 1~5주의 시간이 걸렸다. 지연시간은 하이드로젤들의 분해속도가 생분해성 고분자의 종류, 삼중 블록 공중합체의 화학적 조성 및 하이드로젤의 블록조성비에 의존한다는 것을 알 수 있었다.

또한, 의료기기에 사용되는 하이드로젤의 시험물질로서 분해기간이 다른 이식물 A(PLGA-PEG-PLGA:PEG=1:2)와 이식물 B(PLGA-PEG-PLGA:PEG=1:1)를 선정하여 국제표준화기구 기준에 근거하여 단기 이식평가를 한 결과 육안적 평가와 현미경적 평가에서 이식물 A를 이식한 마우스에서는 캡슐화와 염증이 거의 나타나지 않았다. 이는 이식물 A가 *in vitro* 상에서 2~3주의 짧은 기간에 분해되는 이식용 하이드로젤로, 동물에 이식하였을 때 *in vitro* 보다 움직임이 많고 생체액의 영향으로 더욱 빨리 분해가 이루어진 것으로 사료된다. 이식물 B의 경우는 이식물 A보다 분해성이 떨어지는 하이드로젤로, 이식 후 캡슐화와 염증 및 대식세포의 뭉침이 시간에 따라 활발히 관찰되었다. 이식물 B를 투여한 후 9주 차에는 이식 부위에서 염증 세포들에 의한 염증반응과 분해가 동시에 일어나고 있으며, 탐식세포들에 의한 하이드로젤의 지속적인 탐식 및 제거에 의해 하이드로젤은 완전히 분해될 것으로 사료된다.

이와 같이 분해시간이 조절가능하고 팽윤 전 지연시간을 보이는 특성과 더불어 생체적합성, 탄성, 충분한 팽윤압력을 지니는 하이드로젤은 조직확장기와 다른 의학학적 분야에 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

감사의 글: 이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(2009-0064258)과 2008년도 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 지원(08142의료기372)에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. W. E. Hennink and C. F. van Nostrum, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 13 (2002).
2. J. Kopecek, *Biomaterials*, **28**, 5185 (2007).
3. A. S. Hoffman, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 3 (2002).
4. B. Wang, W. Zhu, Y. Zhang, Z. Yang, and J. Ding, *React. Funct. Polym.*, **66**, 509 (2006).
5. G. Pitarresi, F. Saiano, G. Cavallaro, D. Mandracchia, and F. S. Palumbo, *Int. J. Pharm.*, **335**, 130 (2007).
6. L. S. Nair and C. T. Laurencin, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 762 (2007).
7. S. Y. Kim and H. Y. Kim, *The Korean Journal of Rheology*, **5**, 1 (1993).

8. P. Gunatillake, R. Mayadunne, and R. Adhikari, *Biotechnol. Annu. Rev.*, **12**, 301 (2006).
9. B. Gupta, N. Revagade, and J. S. Hilborn, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 455 (2007).
10. T. K. Kim, J. J. Yoon, D. S. Lee, and T. G. Park, *Biomaterials*, **27**, 152 (2006).
11. P. B. Maurus and C. C. Kaeding, *Oper. Tech. Sports Med.*, **12**, 158 (2004).
12. S. J. Im, Y. M. Choi, E. Subramanyam, K. Park, and K. M. Huh, *Macromol. Res.*, **15**, 7 (2007).
13. R. F. Storey, S. C. Warren, C. J. Allison, and A. D. Puckett, *Polymer*, **38**, 6295 (1997).
14. Z. Ge, X. Zhang, J. Dai, W. Li, and Y. Luo, *Eur. Polym. J.*, **45**, 530 (2009).
15. H. Zhang, Y. He, S. Li, and X. Liu, *Polym. Degrad. Stabil.*, **88**, 309 (2005).
16. J. Heller, J. Barr, S. Y. Ng, K. S. Abdellauoi, and R. Gurny, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**, 1015 (2002).
17. M. A. Attawia, K. E. Uhrich, E. Botchwey, R. Langer, and C. T. Laurencin, *J. Orthop. Res.*, **14**, 10 (1995).
18. C. Vauthier, C. Dubernet, C. Chauvierre, I. Brigger, and P. Couvreur, *J. Control. Release*, **93**, 151 (2003).
19. M. D. Timmer, C. G. Ambrose, and A. G. Mikos, *Biomaterials*, **24**, 571 (2003).
20. C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal, H. Pinto-Alphandary, and P. Couvreur, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 519 (2003).
21. S. Lakshmi, D. S. Katti, and C. T. Laurencin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55**, 467 (2003).
22. S. Penczek, J. Pretula, and K. Kaluzynski, *Biomacromolecules*, **6**, 5 (2005).
23. J. H. Jeong, D. W. Lim, D. K. Han, and T. G. Park, *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **18**, 371 (2000).
24. C. Liu *et al.*, *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects*, **302**, 430 (2007).
25. X. J. Loh, K. B. Colin Sng, and J. Li, *Biomaterials*, **29**, 3185 (2008).
26. S. Zhou, X. Deng, and H. Yang, *Biomaterials*, **24**, 3563 (2003).
27. K. A. Aamer, H. Sardinha, S. R. Bhatia, and G. N. Tew, *Biomaterials*, **25**, 1087 (2004).
28. C. G. Moth, W. S. Drumond, and S. H. Wang, *Thermochim. Acta*, **445**, 61 (2006).
29. S. Chen, R. Pieper, D. C. Webster, and J. Singh, *Int. J. Pharm.*, **288**, 207 (2005).
30. S. Duvvuri, K. G. Janoria, and A. K. Mitra, *J. Control. Release*, **108**, 282 (2005).
31. M. Qiao, D. Chen, X. Ma, and Y. Liu, *Int. J. Pharm.*, **294**, 103 (2005).
32. N. M. O'Brien, *Trauma*, **7**, 7 (2005).
33. K. F. Kobus, *J. Plast. Reconstr. Aesthet. Surg.*, **60**, 414 (2007).
34. C. G. Neumann, *Plast. Reconstr. Surg.*, **19**, 7 (1957).
35. K. G. Wiese, D. E. H. Heinemann, D. Ostermeier, and J. H. Peters, *J. Biomed. Mater. Res.*, **54**, 179 (2001).
36. P. M. Chevray, *Breast Dis.: A Year Book Quarterly*, **16**, 200 (2005).
37. K. K. P. T. A. Khan, and H. S. Ch'ng, *J. Pharm. Pharm. Sci.*, **3**, 9 (2000).
38. ISO10993-12 (2007).
39. ISO10993-6 (2007).
40. A. K. Azab *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **83A**, 414 (2007).
41. E. A. E. V. Tienhoven, D. Korbee, L. Schipper, H. W. Verharen, and W. H. D. Jong, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **78A**, 175 (2006).
42. K. Fu, D. W. Pack, A. M. Klibanov, and R. Langer, *Pharm. Res.*, **17**, 7 (2000).
43. J. M. Harris, *Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum Press, New York, 1992.
44. Z. Min, H. Svensson, and P. Svedman, *Annals of Plastic Surgery*, **21**, 6 (1988).