



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문  
싸이올-노보넨 광중합 반응 기반 피이지  
하이드로겔의 물성 및 약물방출 연구

정현비

제주대학교 대학원

화학과

2024년 02월



싸이올-노보넨 광중합 반응 기반 피이지  
하이드로겔의 물성 및 약물방출 연구

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

정 현 비

제주대학교 대학원

화 학 과

지도교수 배세원

정현비의 이학 석사 학위논문을 인준함

2023년 12월

심사위원장	박경순	인
위 원	배세원	인
위 원	권태진	인

Physical properties and drug release  
of thiol-norbornene  
photopolymerization-based PEG  
Hydrogel

A Thesis submitted to the graduate school of Jeju  
National University in partial fulfillment of the  
requirements for the degree of Master of Science under  
the supervision of Professor Se Won Bae

The thesis for the degree of Master of Science by  
Hyeonbi Jung has been approved by the dissertation  
committee.

2023. 12.

Chair \_\_\_\_\_

Member \_\_\_\_\_

Member \_\_\_\_\_

## 목차

List of Tables	iii
List of Figures	v
요약	viii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	8
2.1 시약	8
2.2 하이드로겔 전구체 제조	9
2.2.1 싸이올-엔 피이지 하이드로겔 전구체 제조	10
2.2.2 약물 담지 하이드로겔 전구체 제조	12
2.3 하이드로겔 합성	13
2.4 하이드로겔 강성 측정	15
2.5 하이드로겔 상대적 mesh size 비교	16
2.6 하이드로겔 팽윤율 측정	17
2.7 하이드로겔 내 담지된 물질 방출 거동 측정	18
2.8 통계적 검증	21
III. 결과 및 고찰	22
3.1 하이드로겔의 강성 측정	22
3.1.1 PEG-8NB, PEG-4NB의 분자량, HS-PEG-SH, 4-Arm PEG-SH의 분자량 및 당량의 변화에 따른 강성 측정	22
3.1.2 PEG의 가닥의 수에 따른 강성 측정	29
3.1.3 pH 변화에 따른 강성 측정	31
3.2 하이드로겔의 상대적 mesh size 비교	33
3.3 하이드로겔의 팽윤율 변화	34
3.3.1 PEG-8NB, PEG-4NB의 분자량, HS-PEG-SH, 4-Arm PEG-SH의 분자량 및 당량의 변화에 따른 팽윤율 변화	34
3.3.2 PEG의 가닥의 수에 따른 팽윤율 변화	41
3.3.3 pH 환경에 따른 팽윤율 변화	43
3.4 하이드로겔 내 담지된 물질 방출 거동	46
3.4.1 하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 담지된 물질의 방출 거동	46

3.4.2 pH 환경에 따른 담지된 물질의 방출 거동.....	49
IV. 요약 및 결론.....	55
V. 참고문헌.....	57
Abstract.....	62

## List of Tables

Table 1. Preparation of monomers, TCEP and LAP.....	9
Table 2. Preparation of thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel precursor. Total volume of precursor is 10 $\mu$ L (n = 0, 1, 2, 3, 4. Step in which the equivalent weight increases. e.q. 1.5 eq is 0 step and 2.0 eq is 1 step).....	11
Table 3. Preparation of drug encapsulated PEG hydrogel.....	12
Table 4. Specifications of UV lamp.....	13
Table 5. UV exposure time depending on hydrogel precursor.....	14
Table 6. Storage modulus(G') of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	23
Table 7. Storage modulus(G') of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	24
Table 8. Storage modulus(G') of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	25
Table 9. Storage modulus(G') of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	32
Table 10. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	35
Table 11. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	36
Table 12. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	37
Table 13. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	45

Table 14. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4.....	47
Table 15. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4.....	47
Table 16. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2·	52
Table 17. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2·	52
Table 18. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	53
Table 19. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	53



## List of Figures

Figure 1. Applications of synthetic hydrogels.....	3
Figure 2. Smart hydrogel.....	3
Figure 3. Chain-growth and step-growth polymerization.....	6
Figure 4. Chemical mechanism A) LAP, B) Thiol-norbornene reaction.....	6
Figure 5. Isoelectric point of lysozyme at different pH.....	7
Figure 6. Electrical change of fluorescein at different pH.....	7
Figure 7. Photopolymerization of thiol-norbornene PEG Hydrogel.....	13
Figure 8. Rotational rheometer and PP system.....	15
Figure 9. Micro-CT.....	16
Figure 10. Calibration curves of fluorescein at A) pH 5.0, B) 7.4, C) 8.2	19
Figure 11. Calibration curves of lysozyme at A) pH 5.0, B) 7.4, C) 8.2...	20
Figure 12. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	26
Figure 13. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	27
Figure 14. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	28
Figure 15. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB, and PEG-4NB at pH 7.4..	29
Figure 16. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized 20 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	30
Figure 17. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and A) HS-10 kDa PEG-SH, and B) 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	31

Figure 18. Micro-CT image of PEG Hydrogel polymerized with 1.5 eq of HS-10 kDa PEG-SH and A) 10 kDa PEG-8NB, B) 20 kDa PEG-8NB, and C) 3.0 eq of HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB. ....	33
Figure 19. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	38
Figure 20. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4.....	39
Figure 21. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	40
Figure 22. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB, and PEG-4NB at pH 7.4.....	41
Figure 23. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 20 kDa PEG-NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4.....	42
Figure 24. Principle of change in swelling ratio of thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel according to pH condition....	43
Figure 25. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and A) HS-10 kDa PEG-SH, and B) 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2.....	44
Figure 26. Cumulative release of fluorescein from PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4.....	48
Figure 27. Cumulative release of lysozyme from PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4.....	48

Figure 28. Principle of change in release of A) fluorescein and B) lysozyme from thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel according to pH condition..... 51

Figure 29. Cumulative release of A) fluorescein from 10PEG8NB and C) 20PEG8NB, B) lysozyme from 10PEG8NB and D) 20PEG8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2..... 54

# 싸이올-노보넨 광중합 반응 기반 피이지 하이드로겔의 물성 및 약물방출 연구

정 현 비

제주대학교 대학원 화학과

## 요약

PEG 하이드로겔은 다양한 생체의학 응용 분야에서 주목을 받고 있는 다용도 생체 재료이다. 이는 poly(ethylene glycol) (PEG)을 다른 중합체나 분자와 가교시켜 형성할 수 있다. 이러한 PEG 하이드로겔 중에서 thiol-ene 광중합 PEG 하이드로겔은 세포 담지, 약물 전달 및 재생 의학과 같은 다양한 생물 의학 응용 분야에 대해 광범위하게 연구되었다. 하지만 이런 하이드로겔의 다양한 요인에 의한 변화에 관한 정보는 충분하지 않다. 본 연구에서는 다양한 네트워크 밀도의 thiol-norbornene 광중합 PEG 하이드로겔을 합성하여 하이드로겔의 가교 밀도에 따른 물성 및 약물 방출 동역학을 조사하였다. 또한 약물 전달 거동을 연구하기 위하여 pH에 따라 서로 다른 전하를 갖는 라이소자임과 플루오레세인을 PEG 하이드로겔에 담지하여 pH 조건에 따른 변화도 관찰하였다. 이 실험을 통해 thiol-ene 광중합 PEG 하이드로겔의 가교 밀도와 약물 방출 간의 관계에 대한 최신 연구를 제공하였고, 더 나아가 약물에 따른 단량체의 디자인을 설계할 수 있어 적절한 약물 전달 시스템에 대한 응용의 발전에 기여할 수 있을 것이라 생각된다.

## I. 서 론

하이드로겔은 다량의 물이나 생체 내 유체를 흡수할 수 있는 3차원 고분자 네트워크로 생체 적합성과 유동성이 뛰어나며, 동시에 물리적 또는 화학적 가교, 압힘 등에 따라 다양한 물리적 성질을 나타낸다. [1]. 하이드로겔은 자연 상태의 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 구조적 유사성을 가져 생체 의용 분야에서 3차원의 세포 배양 매트릭스 또는 조직 공학용 지지체 등으로 활용되고 있다. 또한 그 질량의 90% 이상의 물을 보유하며 팽윤될 수 있는 친수성 및 다공성의 특징을 갖기 때문에 펩타이드나 영양분, 그리고 약물 등의 수송을 위한 담체로도 활용되고 있다[9]. 이러한 특성으로 인하여 하이드로겔은 약물 전달 시스템, 상처 드레싱 및 조직 공학 응용 분야와 같은 의료 제품에 사용되고 있다. 하이드로겔 중에서 합성 PEG 하이드로겔은 천연 하이드로겔과는 달리 기능성 단량체(monomer) 및 거대 단량체(macromer) 등의 설계에 따라 기능이나 구조적 특성을 제어할 수 있다. 기능성 단량체 및 거대단량체의 개발이 지속적으로 증가하여 스펙트럼이 매우 광범위하게 확장되면서 하이드로겔 응용의 다양성은 계속 확대되고 있다[2](Figure 1).

하이드로겔은 이온 특성을 나타낼 수도 있다. 이온성 하이드로겔에서는 폴리머 사슬의 펜던트 이온화 그룹으로 인하여 양전하 또는 음전하가 생성된다. 이로 인하여 주변 환경의 pH 및 이온 강도에 따라 하이드로겔이 부풀어 오르거나 붕괴될 수 있다. 무엇보다도 수소결합은 거대분자 사슬 사이의 화학적 결합을 담당하는 상호작용 중 하나이다[3]. 이처럼 단량체 혹은 거대단량체의 작용기를 조절하면서 이온 특성을 변형함으로써 다양한 특성을 갖는 약물 전달 시스템을 개발할 수 있다.

하이드로겔은 스마트 약물 전달 시스템 개발에 광범위하게 사용되어 왔다. 기존 약물 제제의 단점을 극복하기 위하여 미리 정의된 기간 동안, 미리 결정된 속도로 약물을 전달하도록 의도된 제어 가능한 약물 전달 시스템이 사용되었다. 당뇨병 및 심장 박동 장애와 같은 많은 임상 장애를 치료하려면 변동하는 대사 요구 사항이나 신체 내 특정 생체 분자의 존재 여부에 따라 통제된 조건에서 약물을 전달해야 한다. 생리적 요구에 정확하게 맞는 방식으로 적절한 시간(시간적 조절) 및/또는 적절한 부위(부위별 표적화)에 약물을 투여할 수 있는 것이 더 바람직한 조건이며,

이는 약물의 전신 투여에 대한 부작용을 줄일 수 있다. 이를 위해서는 질병으로 인한 신호를 활성물질이 감지하고, 신호의 크기를 판단한 후 적정량의 약물을 방출하도록 작용하는 시스템이 필요하다. 합성 PEG 하이드로겔은 환경 자극에 반응하여 겔 구조를 변경하면서 약물 방출을 제어할 수 있다. 이러한 감각적 특성을 포함하는 환경적으로 민감한 하이드로겔의 유형을 ‘지능형’ 또는 ‘스마트’ 하이드로겔이라고도 한다[3, 4](Figure 2).

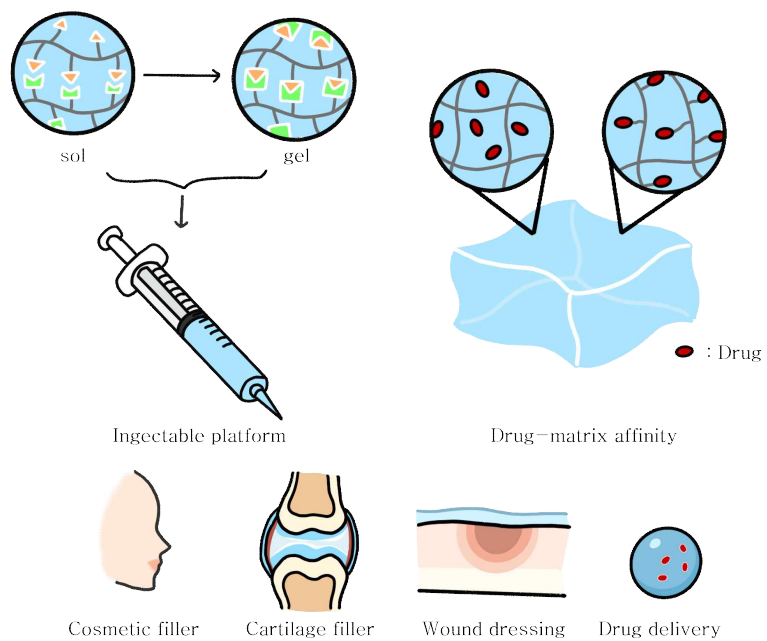


Figure 1. Applications of synthetic hydrogels

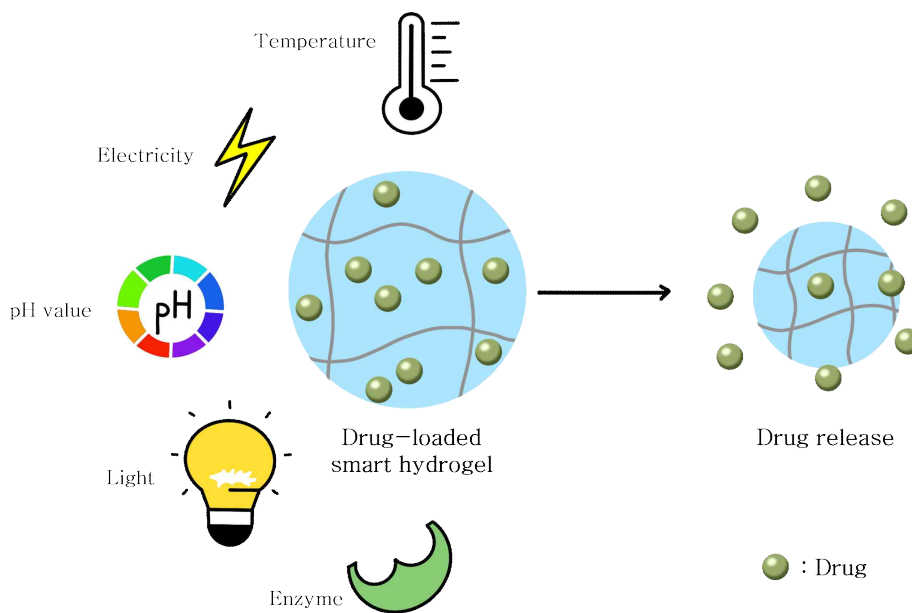


Figure 2. Smart hydrogel

기계적 강도가 높은 하이드로겔은 가용성 중합체 사슬을 불용성 네트워크로 공유 가교 결합하여 형성될 수 있으며, 이는 물질의 안정성을 요구하는 응용 분야에 매우 적합할 수 있다. 일반적으로 공유결합 하이드로겔은 라디칼 매개 중합이나 생체 직교 클릭 반응(bio-orthogonal click reactions)을 통하여 형성될 수 있다 [12-14]. 라디칼 매개 중합은 광자, 열, 산화환원 전위 또는 효소 활성화와 같은 적절한 개시 에너지원에 의해 분해된 개시제에서 생성된 라디칼에 의해 개시된다. 이러한 종류의 라디칼은 거대단량체의 다중 비닐(vinyl) 부분에 걸쳐 전파될 수 있지만, 결과적으로 형성된 사슬 성장(chain-growth) 고분자 네트워크는 보통 이질적(heterogeneous)이다. 또는 구리 촉매 아자이드-알카인 고리 첨가(copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition)[15], 딜스-알더 반응(Diels-Alder reaction)[16] 등과 같은 상호 반응성 거대단량체 종류의 가교를 통하여 공유결합 하이드로겔을 형성할 수도 있다. 이러한 단계 성장(step-growth) 중합 네트워크는 이질적인 가교결합을 갖지 않지만 상호 반응성 성분이 함께 혼합된 직후 가교결합 반응이 시작된다. 따라서 가교 반응은 시공간적으로 제어될 수 없다(Figure 3).

시공간적으로 제어가 가능하면서 동시에 무작위 사슬 중합과 관련된 문제를 회피하기 위해 개발된 반응이 싸이올(thiol)과 노보넨(norbornene) 사이의 직교 반응을 기반으로 하는 광 및 라디칼 매개 단계 성장 중합 반응이다[11]. 싸이올-노보넨(또는 싸이올-엔, thiol-ene) 광클릭 반응(photoclick reaction)은 라디칼 매개 중합과 생체-직교 클릭 반응의 장점을 결합한 독특한 중합 메커니즘 중 하나이다. 싸이올-노보넨 하이드로겔은 다양한 겔화가 가능하며 생체의학 응용 분야에서 세포 및 생체 적합성이 뛰어나다. 이 반응은 화학량론적 비율로 발생하며, 일반적으로 비교적 라디칼 농도가 낮은 생리학적 관련 조건에서 수행되므로 반응 혼합물에 존재하는 생물학적 성분에 원치 않는 손상을 일으킬 수 있는 화학적 독성을 최소화한다[10].

싸이올-노보넨 광중합 반응의 메커니즘은 다음과 같다[10](Figure 4). 싸이올-노보넨 반응에는 Irgacure-2959 또는 Lithium phenyl-2,4,6-trimethyl benzoylphosphinate(LAP)와 같은 절단형 광 개시제 및 광 개시제를 절단하여 라



디칼을 발생시키기 위한 장파장의 UV 조사[11]가 필요하며 이는 몇 초 내에 달성될 수 있다[7]. UV로 인한 광 개시제의 절단으로 발생한 라디칼은 설프하이드릴(sulfhydryl) 즉, 싸이올 그룹에서 양성자를 추출하여 싸이일(thiyl) 라디칼을 형성한다. 이는 노보넨 부분에 있는 바이닐(vinyl) 즉, 에테닐(ethenyl) 부분과 반응하며, 또 다른 싸이일 라디칼을 생성할 수 있는 탄소 중심 라디칼을 생성한다. 싸이올-노보넨 결합과 싸이일 라디칼 생성은 제한된 잔기(싸이올 또는 노보넨)가 고갈될 때까지 화학량론적 비율로 진행되며, 아크릴레이트 기반 하이드로겔의 가교결합과는 달리 노보넨 그룹 사이에 단독중합이 없어 무작위 사슬 성장 중합에 비해 네트워크 이질성이 최소한이다[17].

그러나 이런 하이드로겔의 다양한 요인에 의한 변화에 관한 정보는 충분하지 않다. 이 연구에서는 싸이올-노보넨 광중합 피이지 하이드로겔의 가교 밀도가 약물 방출에 미치는 영향에 중점을 두었다. 가교 밀도는 팽창 거동 및 약물 방출 동역학에 영향을 미칠 수 있다. 또한, pH 조건에 따른 변화도 관찰하였다. 약물 전달 거동을 연구하기 위하여 pH에 따라 서로 다른 전하를 갖는 라이소자임(lysozyme)과 플루오레세인(fluorescein)을 피이지 하이드로겔에 담지하였다(Figure 5, Figure 6). 네트워크 밀도가 다른 두 가지의 하이드로겔에서, pH 환경에 따른 담지된 두 가지 물질의 방출 거동에 대한 데이터를 수집하였다. 본 연구에서는 피이지 하이드로겔 연구의 현재 상태에 대한 개요를 제공하고 가교 밀도와 약물 방출 간의 관계에 대한 최신 연구 결과를 논의할 것이다. 마지막으로, 피이지 하이드로겔 연구의 미래 방향과 제어된 약물 전달에 이러한 물질의 잠재적 응용에 대한 논의로 결론을 내릴 것이다.

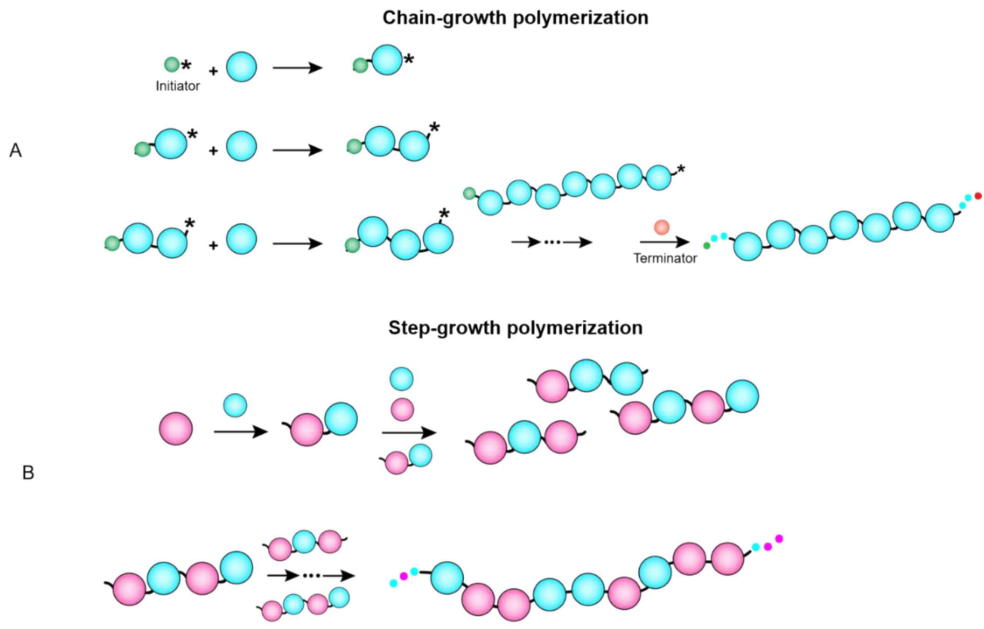


Figure 3. Chain-growth and step-growth polymerization[20]

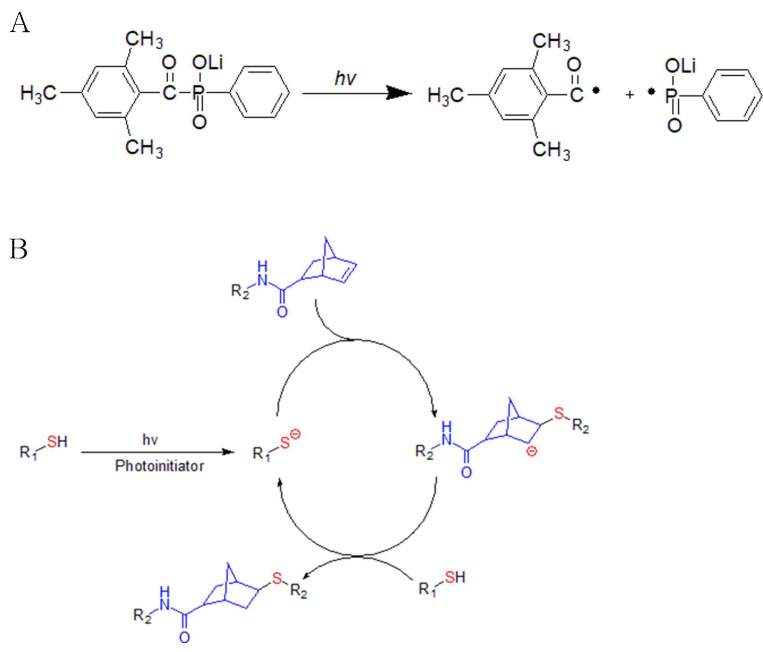


Figure 4. Chemical mechanism A) LAP, B) Thiol-norbornene reaction

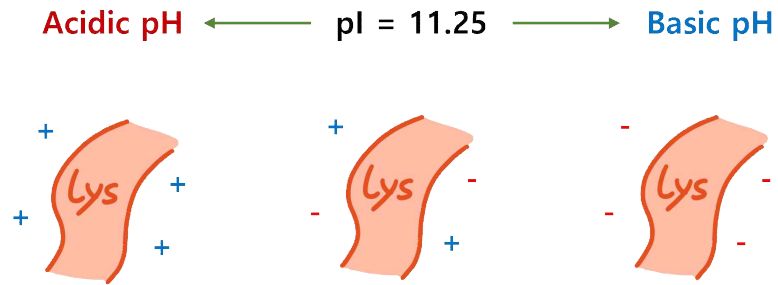


Figure 5. Isoelectric point of lysozyme at different pH [21]

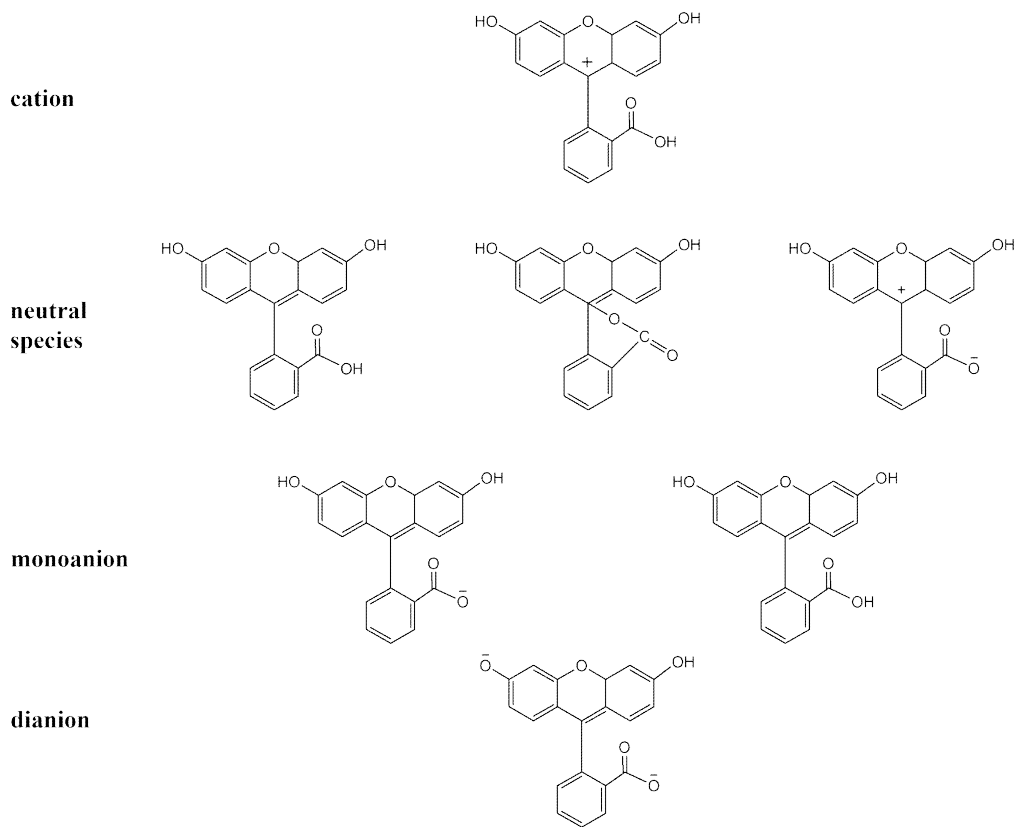


Figure 6. Electrical change of fluorescein at different pH [18, 19, 26]

## II. 재료 및 방법

### 2.1 시약

싸이올-엔 광중합 피이지 하이드로겔 합성을 위한 단량체로는 노보넨 그룹이 다중 기능화된 poly(ethylene glycol)(Multi-Arm PEG-NB)과 양쪽 말단이 싸이올로 기능화된 PEG(HS-PEG-SH) 및 4개의 말단이 싸이올로 기능화된 PEG(4-Arm PEG-SH)가 사용되었다. 단량체인 8-Arm PEG-Norbornene (PEG8NB, 10, 20 kDa)와 4-Arm PEG-Norbornene (PEG-4NB, 10, 20 kDa), HS-PEG-SH (3.4, 10 kDa), 4-Arm PEG-SH(5, 10 kDa)은 Creative PEGWorks USA에서 구매하였다. 싸이올이 기능화된 PEG의 disulfide 결합의 환원을 위한 환원제로 Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride (TCEP, TCI, Japan)가 사용되었다. 하이드로겔 광중합의 광개시제로는 Lithium Phenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphinate (LAP, TCI, Japan)가 사용되었다. 담지를 위한 약물은 플루오레세인(Fluorescein, Sigma-Aldrich)과 라이소자임(Lysozyme, Roche, Germany)을 사용하였다. 라이소자임의 정량을 위한 Bradford assay의 시약으로 Coomassie Brilliant blue G 250(Sigma-Aldrich, Canada)을 사용하였다.

## 2.2 하이드로겔 전구체 제조

하이드로겔 전구체를 제조하기 위해 영하 70 °C에 보관된 Multi-Arm PEG-NB과 HS-PEG-SH 및 4-Arm PEG-SH를 **Table 1**과 같은 농도로 1.5 mL 마이크로 튜브(microcentrifuge tube, E-P tube)에 볼텍서(Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Bohemia) 및 원심분리기(Frontier™ 5000 시리즈 미니, Ohaus, Germany)를 이용하여 용해하였고, 이는 4°C에서 2일 동안 보관하여 사용할 수 있다. disulfide bond의 환원제인 TCEP과 광개시제인 LAP은 마찬가지로 **Table 1**과 동일하게 용해하였고, 매번 신선한 상태로 사용하였으며 특히 LAP은 빛에 노출되지 않도록 하였다.

**Table 1. Preparation of monomers, TCEP and LAP**

Materials	Molecular weights (g/mol)	Concentrations (M)
Monomer		
8-Arm PEG-Norbornene	10,000	$1.0 \times 10^{-1}$
	20,000	$5.0 \times 10^{-2}$
4-Arm PEG-Norbornene	10,000	$1.0 \times 10^{-1}$
	20,000	$5.0 \times 10^{-2}$
HS-PEG-SH	3,400	$1.0 \times 10^{-1}$
	10,000	$1.0 \times 10^{-1}$
4-Arm PEG-SH	5,000	$1.0 \times 10^{-1}$
	10,000	$1.0 \times 10^{-1}$
Tris(2-carboxyethyl)phosphine Hydrochloride	286.64	$7.0 \times 10^{-2}$
Lithium Phenyl(2,4,6- trimethylbenzoyl)phosphinate	294.21	$2.0 \times 10^{-2}$

### 2.2.1 싸이올-엔 피이지 하이드로겔 전구체 제조

하이드로겔의 다양한 네트워크 밀도를 구성하기 위하여 **Table 2**와 같이 싸이올이 기능화된 PEG의 당량을 조절하였으며 이에 따라 LAP 및 증류수를 조절하였다. TCEP은 과량으로 일정하게 취하였고, 각 용액을 0.5 mL 마이크로 튜브에 마이크로 피펫(Eppendorf, Germany)으로 주입하여 볼텍서 및 원심분리기를 사용하여 혼합하였다. 용액을 주입하는 순서는 증류수, Multi-Arm PEG-NB, HS-PEG-SH(또는 4-Arm PEG-SH), TCEP, LAP이다. LAP을 넣기 전후 모두 볼텍서로 1분, 원심분리기로 20초 동안 혼합하였다(**Table 2**).

**Table 2** Preparation of thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel precursor. Total volume of precursor is 10  $\mu\text{L}$

(n = 0, 1, 2, 3, 4. Step in which the equivalent weight increases. e.g. 1.5 eq is 0 step and 2.0 eq is 1 step)

A	Volume ( $\mu\text{L}$ )	B	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Distilled water	5.5-0.5n	Distilled water	6.25-0.25n
10 kDa PEG-8NB	1	10 kDa PEG-8NB	1
HS-3.4, 10 kDa PEG-SH	1.5+0.5n	4-Arm 5, 10 kDa PEG-SH	0.75+0.25n
TCEP	1	TCEP	1
LAP	1	LAP	1
C	Volume ( $\mu\text{L}$ )	D	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Distilled water	4.5-0.5n	Distilled water	5.25-0.25n
20 kDa PEG-8NB	2	20 kDa PEG-8NB	2
HS-3.4, 10 kDa PEG-SH	1.5+0.5n	4-Arm 5, 10 kDa PEG-SH	0.75+0.25n
TCEP	1	TCEP	1
LAP	1	LAP	1
E	Volume ( $\mu\text{L}$ )	F	Volume ( $\mu\text{L}$ )
Distilled water	5.75-0.25n	Distilled water	4.75-0.25n
10 kDa PEG-4NB	1	20 kDa PEG-4NB	2
HS-3.4, 10 kDa PEG-SH	1.25+0.25n	HS-3.4, 10 kDa PEG-SH	1.25+0.25n
TCEP	1	TCEP	1
LAP	1	LAP	1

## 2.2.2 약물 담지 하이드로겔 전구체 제조

약물을 담지한 하이드로겔 전구체를 제조하기 전, 약물을 담지하기에 안정적이고 팽윤율의 차이가 크다고 판단된 조성을 기준으로 하여 전구체를 제조하였다. 하이드로겔의 조성은 PEG-8NB 10 kDa과 HS-PEG-SH 10 kDa 1.5 당량을 합성한 하이드로겔(10PEG8NB)과 PEG-8NB 20 kDa과 HS-PEG-SH 10 kDa 1.5 당량을 합성한 하이드로겔(20PEG8NB)로 결정하였다. 전구체는 Table 2의 증류수를 제외한 항목은 동일하게 주입하고, 0.5 mM fluorescein 및 5 mM lysozyme을 Table 3과 같은 조건으로 혼합하였다. 용액을 주입하는 순서는 증류수, 8-Arm PEG-NB, HS-PEG-SH, TCEP, 약물, LAP이다(Table 3).

**Table 3. Preparation of drug encapsulated PEG hydrogel**

	Distilled water	Fluorescein, Lysozyme
10PEG8NB	4.25 $\mu$ L	2 $\mu$ L
20PEG8NB	3.25 $\mu$ L	



### 2.3 하이드로겔 합성

하이드로겔 전구체를 마이크로 피펫으로 200  $\mu\text{L}$  피펫 팁을 사용하여 80  $\mu\text{L}$ 인 채로 10  $\mu\text{L}$ 씩 취하였다. 전구체가 들어있는 피펫 팁을 스티로폼 판에 고정하여 UV lamp(SUPRATEC HTC Ultraviolet lamps, Osram, Germany)를 설치한 오븐에 넣고, UV에 노출하여 광중합을 진행하였다(Figure 7). Table 5와 같이 단량체의 당량이나 분자량에 따라 노출 시간을 확장하였다. UV lamp의 사양은 Table 4와 같다.

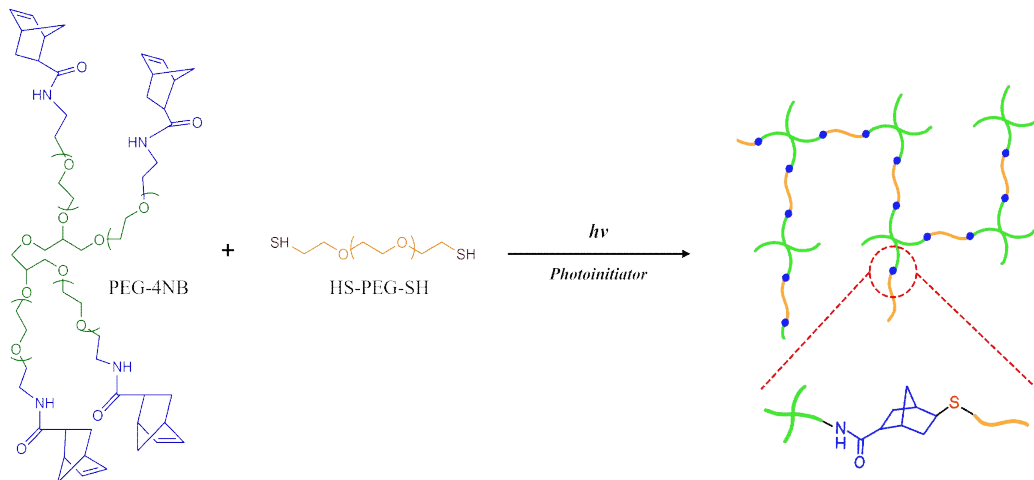


Figure 7. Photopolymerization of thiol-norbornene PEG Hydrogel

Table 4. Specifications of UV lamp

Property	Wattage (W)	Voltage Rating (V)	Peak Wavelength (nm)
Value	460	230	315

Table 5. UV exposure time depending on hydrogel precursor

Norbornene	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Exposure time (s)
PEG-8NB	10	HS-PEG-SH	3.4	1.5, 2.0,	10+2n
			10	2.5, 3.0,	12+2n
		5	3.5		
	20	4-Arm PEG-SH	5	0.75, 1.0,	12+2n
			10	1.25, 1.5,	14+2n
		10	1.75		
PEG-4NB	10	HS-PEG-SH	3.4	1.5, 2.0,	12+2n
			10	2.5, 3.0,	14+2n
		5	3.5		
	20	4-Arm PEG-SH	5	0.75, 1.0,	14+2n
			10	1.25, 1.5,	16+2n
		10	1.75		

## 2.4 하이드로겔 강성 측정

하이드로겔의 네트워크에 따른 경화 거동을 파악하기 위하여 강성(stiffness)을 측정하였다. 하이드로겔의 강성은 pH가 다른 phosphate 완충 용액에 24시간 동안 팽윤시킨 하이드로겔을 회전형 레오미터(Rotational rheometer, 모듈식 소형 레오미터, Anton Paar, Austria)를 사용하여 겔, 고점도 폴리머 등의 시료에 적합한 PP(Plate & Plate) 시스템에서 저장 탄성계수(Storage modulus,  $G'$ )를 측정하였다. PP 시스템에서의 측정 원리는 완전히 고정된 하단 플레이트에서 시료를 한 방향으로 회전시키면서 시료의 유변 특성을 평가하는 것이다. 저장 탄성계수는 고체의 특성, 즉 하이드로겔이 가지고 있는 전체 에너지 중에 힘이 가해졌을 때 남아 있는 에너지이며 이를 통해 강성을 수치화할 수 있다. 실험은 약 22 °C에서 Shear strain 1%의 일정한 값으로 Angular Frequency를 0.1~100 rad/s로 증가시키면서 진행하였다(Figure 8).

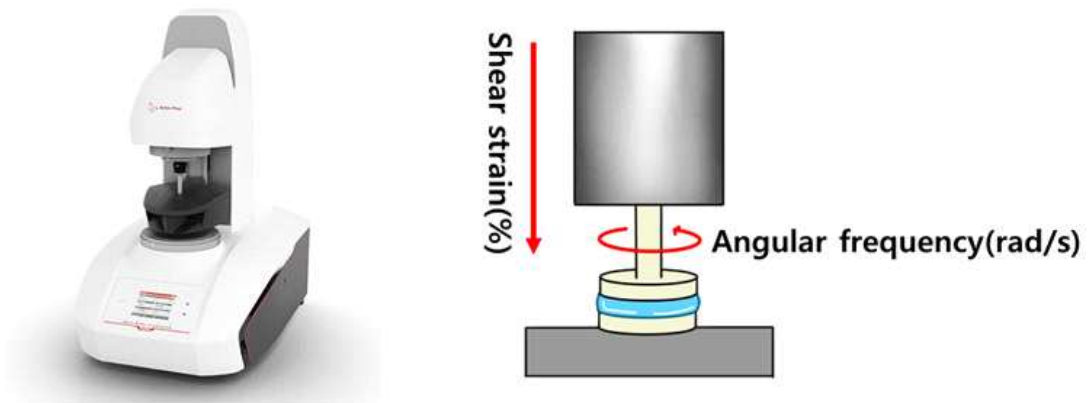


Figure 8. Rotational rheometer and PP system

## 2.5 하이드로겔 상대적 mesh size 비교

하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 mesh size를 비교하기 위하여 엑스선 컴퓨터 단층촬영장치(Micro-CT, Bruker, Belgium)를 이용하여 촬영하였다(Figure 9). 네트워크 밀도 비교를 위한 하이드로겔은 HS-10 kDa PEG-SH 1.5 eq와 10 kDa PEG-8NB를 합성한 하이드로겔과 20 kDa PEG-8NB과 합성한 하이드로겔, HS-10 kDa PEG-SH 3.0 eq와 20 kDa PEG-8NB과 합성한 하이드로겔로 결정하였고, 이들을 동결건조하여 촬영하였다.



Figure 9. Micro-CT

## 2.6 하이드로겔 팽윤율 측정

PEG 하이드로겔의 네트워크 및 pH가 팽윤율(swelling ratio, SR)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험을 진행하였다. 합성된 하이드로겔을 pH가 각각 5.0, 7.4, 8.2인 0.1 M phosphate 완충용액 200  $\mu$ L에서 24시간 동안 팽윤하였다. 이렇게 팽윤된 하이드로겔의 겉면에 남은 물기를 제거한 뒤, 팽윤된 무게( $W_{\text{swelling}}$ ,  $W_s$ )를 분석용 전자저울(Explorer™ Analytical, Ohaus, USA)로 측정하였다.  $W_s$ 를 측정된 하이드로겔은 동결건조기(Freeze Dryer, EYELA, Japan)를 이용하여 건조시킨 후, 동결건조된 하이드로겔의 무게( $W_{\text{dried}}$ ,  $W_d$ )를 측정하여 아래의 식을 통해 팽윤율을 구하였다[22].

$$\text{Swelling ratio(\%)} = \frac{W_s - W_d}{W_d} \times 100$$

$W_s$  = 24시간 동안 팽윤된 하이드로겔의 무게

$W_d$  = 동결건조된 하이드로겔의 무게

## 2.7 하이드로겔 내 담지된 물질 방출 거동 측정

하이드로겔의 네트워크 및 pH 환경이 담지된 약물의 방출 거동에 미치는 영향을 조사하였다. 약물이 담지된 하이드로겔을 pH 5.0, 7.4, 8.2의 phosphate 완충용액에 상온에서 배양한 후, 정해진 시간마다 배양한 완충용액을 모두 옮기고 100  $\mu$ L씩 마이크로플레이트 리더(Spectramax M2 microplate reader, Molecular Devices, USA)를 이용하여 측정하였다. 하이드로겔은 다시 신선한 완충용액에 배양하여 누적되는 흡광도를 측정하였다. 플루오레세인은 형광 피크(peak)는 여기 피크(excitation peak)가 490 nm, 방출 피크(emission peak)가 520 nm이다. 라이소자임은 Commassie Brilliant blue G 250이라는 염색약의 흡광도 차이를 이용한 단백질 정량법인 Bradford assay[23]를 통하여 정량하였다. 흡광 파장대는 595 nm이다. 플루오레세인과 라이소자임은 pH에 따라 형광의 세기가 변화하기 때문에 pH 5.0, 7.4, 8.2에서 먼저 측정하여 검정곡선을 얻었다(Figure 10, Figure 11). 이를 통해 방출한 물질의 흡광도를 몰농도( $\mu$ M)로 환산하였고, 몰농도로 몰수( $M_n$ , nmol)를 구하여 담지된 전체 몰수( $M_t$ , nmol)로 누적 방출 정도(Cumulative release, %)를 계산하였다.

$$\text{Cumulative Release(\%)} = \frac{\sum_{n=0}^{48} M_n}{M_t} \times 100$$

$M_n$  = 정해진 시간 동안 방출한 물질의 몰수 ( $n = 0, 1, 2, 3, 24, 48$ )

$M_t$  = 담지된 전체 몰수 (Fluorescein: 5 nmol, lysozyme: 1.5 nmol)

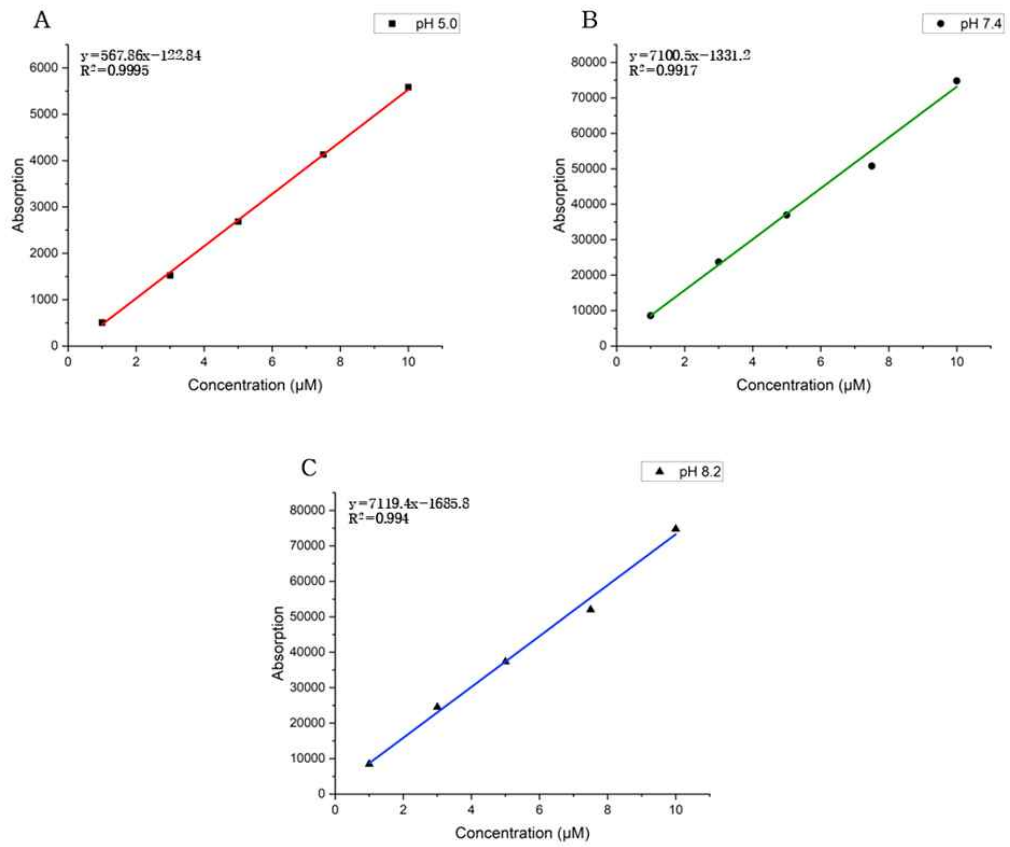


Figure 10. Calibration curves of fluorescein at A)pH 5.0, B)7.4 , C)8.2

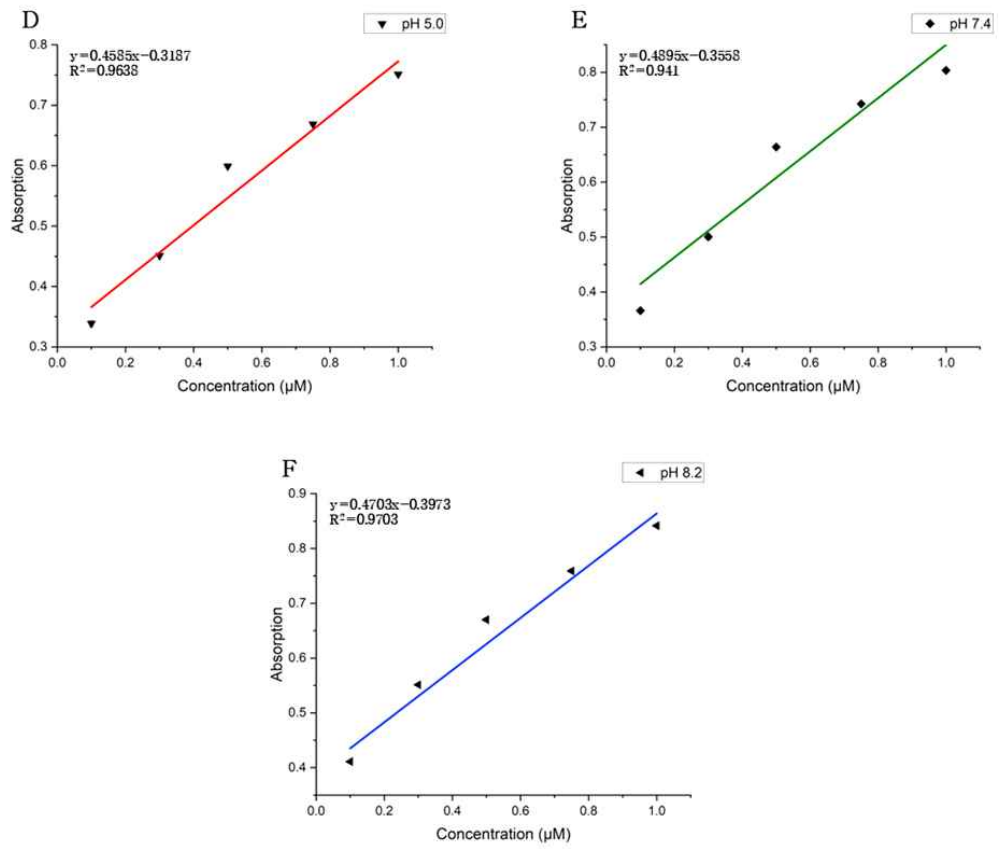


Figure 11. Calibration curves of lysozyme at D)pH 5.0, E)7.4, F)8.2



## 2.8 통계적 검증

본 연구의 모든 실험은 동일 조건하에서 3회 반복 실시하여 실험결과를 평균  $\pm$  표준편차로 나타내었으며, student's *t*-test를 통해 유의성에 따라 \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ 로 유의를 표시하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 3.1 하이드로겔의 강성 측정

##### 3.1.1 PEG-8NB, PEG-4NB의 분자량, HS-PEG-SH, 4-Arm PEG-SH의 분자량 및 당량의 변화에 따른 강성 측정

하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 겔화(gelation)를 확인하기 위하여 22 °C에서 Shear strain 1%의 일정한 값으로 Angular Frequency를 0.1~100 rad/s로 증가시키며 회전형 레오미터를 이용해 저장 탄성계수( $G'$ )를 측정하였으며, 측정 데이터는 **Table 6**, **Table 7**, **Table 8**에 나타내었다.

먼저, PEG-8NB의 당량은 1 eq로 모두 일정하게 고정된 상태에서 PEG-8NB의 분자량과 HS-PEG-SH의 분자량 및 당량에 변화를 주었으며 pH 7.4에서 팽윤시킨 하이드로겔의 저장 탄성계수의 범위는 870.578 ~ 15485.3 kPa로 측정되었다(**Table 6**, **Figure 12**). 분자량이 상대적으로 낮은 것과 높은 것을 비교하였을 때 분자량이 높아질수록 강성이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 반대로 분자량이 낮을수록 강성이 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 HS-PEG-SH의 당량이 증가할수록 강성이 증가하였다.

PEG-8NB과 마찬가지로 PEG-4NB의 당량을 고정된 상태에서 분자량 및 HS-PEG-SH의 당량에 변화를 주었으며, 하이드로겔의 저장 탄성계수의 범위는 265.790 ~ 3903.87 kPa로 측정되었다(**Table 7**, **Figure 13**). PEG-8NB과 동일하게 분자량이 높아지고 HS-PEG-SH의 당량이 증가할수록 강성도 증가하였다.

PEG-8NB의 당량을 고정된 상태에서 분자량 및 4-Arm PEG-SH의 분자량에 변화를 주었으며, 하이드로겔의 저장 탄성계수의 범위는 5275.24 ~ 32744.2 kPa로 측정되었다(**Table 8**, **Figure 14**). 앞선 실험의 결과와 마찬가지로 4-Arm PEG-SH의 분자량 및 당량이 증가할수록 강성도 함께 증가하는 것으로 나타났다.

이는 단량체의 분자량 및 당량이 증가할수록 사슬(chain)이 엉키므로 하이드로겔의 네트워크 밀도가 조밀해지기 때문이다[24].

**Table 6. Storage modulus(G') of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 (mean±SD)**

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Storage modulus (kPa)
PEG-8NB	10	HS-PEG-SH	10	1.5	870.578±78.471
				2.0	2071.01±222.18
				2.5	3209.87±523.90
				3.0	4712.79±343.53
				3.5	4469.87±648.90
	20	HS-PEG-SH	10	1.5	1057.96±184.73
				2.0	3849.79±122.94
				2.5	5033.47±304.48
				3.0	7238.05±160.43
				3.5	10129.8±571.32
PEG-8NB	10	HS-PEG-SH	10	1.5	1757.14±131.06
				2.0	3875.08±378.64
				2.5	5504.28±503.66
				3.0	6822.55±184.46
				3.5	6062.00±662.47
	20	HS-PEG-SH	10	1.5	2083.21±176.23
				2.0	4589.41±173.17
				2.5	8094.69±128.65
				3.0	10370.1±1204.5
				3.5	15485.3±1569.7

Table 7. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 (mean $\pm$ SD)

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Storage modulus (kPa)
PEG-4NB	10	HS-PEG-SH		1.25	265.790 $\pm$ 5.5140
				3.4	331.895 $\pm$ 7.7692
				1.75	278.160 $\pm$ 10.036
	20	HS-PEG-SH		1.25	226.770 $\pm$ 35.009
				10	860.351 $\pm$ 78.596
				1.75	2104.87 $\pm$ 31.183
PEG-4NB	10	HS-PEG-SH		1.25	1158.35 $\pm$ 26.988
				3.4	1229.74 $\pm$ 33.764
				1.75	2064.48 $\pm$ 146.77
	20	HS-PEG-SH		1.25	1021.39 $\pm$ 75.390
				10	2910.66 $\pm$ 47.188
				1.75	3903.87 $\pm$ 330.95

**Table 8. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4 (mean $\pm$ SD)**

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Storage modulus (kPa)
PEG-8NB	10	4-Arm PEG-SH	5	0.75	5275.24 $\pm$ 151.16
				1.00	8515.22 $\pm$ 1506.7
				1.25	13134.3 $\pm$ 158.56
				1.50	16213.3 $\pm$ 303.14
				1.75	15481.2 $\pm$ 591.28
				0.75	4315.46 $\pm$ 288.52
				1.00	8639.97 $\pm$ 1105.6
	20	4-Arm PEG-SH	10	1.25	13091.2 $\pm$ 1638.2
				1.50	18069.3 $\pm$ 504.82
				1.75	19525.8 $\pm$ 912.52
				0.75	12327.5 $\pm$ 23.594
				1.00	19461.3 $\pm$ 917.58
				1.25	21289.8 $\pm$ 360.27
				1.50	23434.7 $\pm$ 1789.7
20	4-Arm PEG-SH	10	1.75	24208.3 $\pm$ 2451.3	
			0.75	10831.9 $\pm$ 698.03	
			1.00	17124.2 $\pm$ 910.52	
			1.25	22123.5 $\pm$ 1272.7	
			1.50	24829.9 $\pm$ 519.47	
			1.75	32744.2 $\pm$ 1036.7	

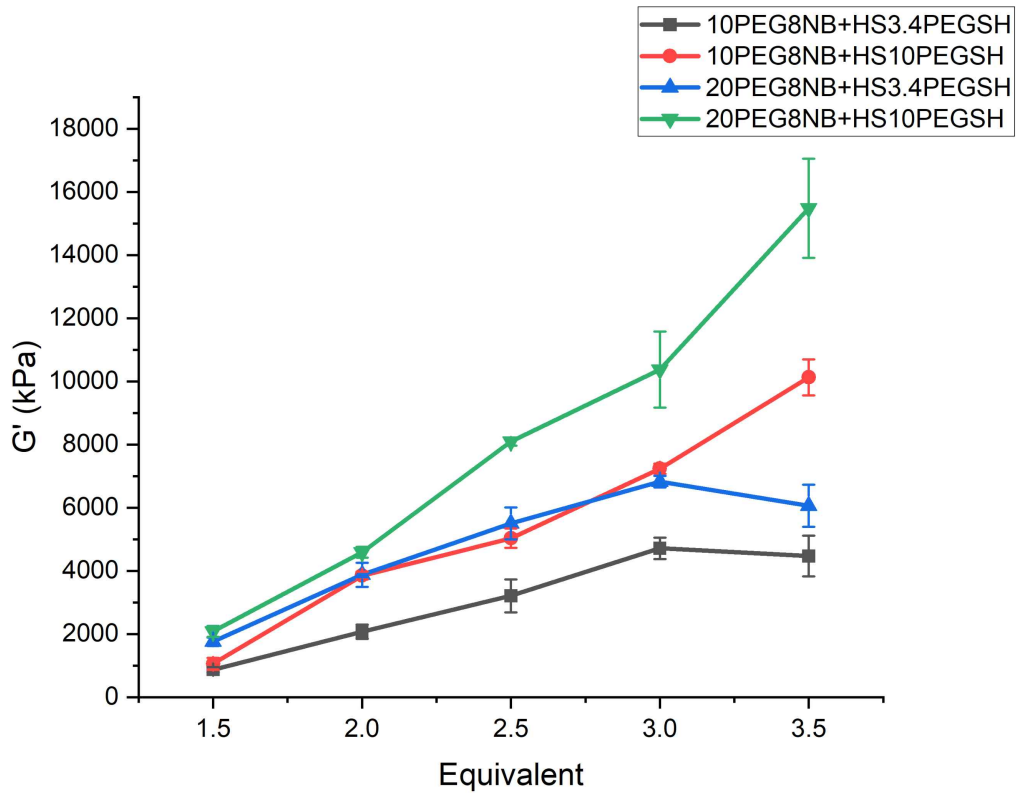


Figure 12. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $n=3$ )

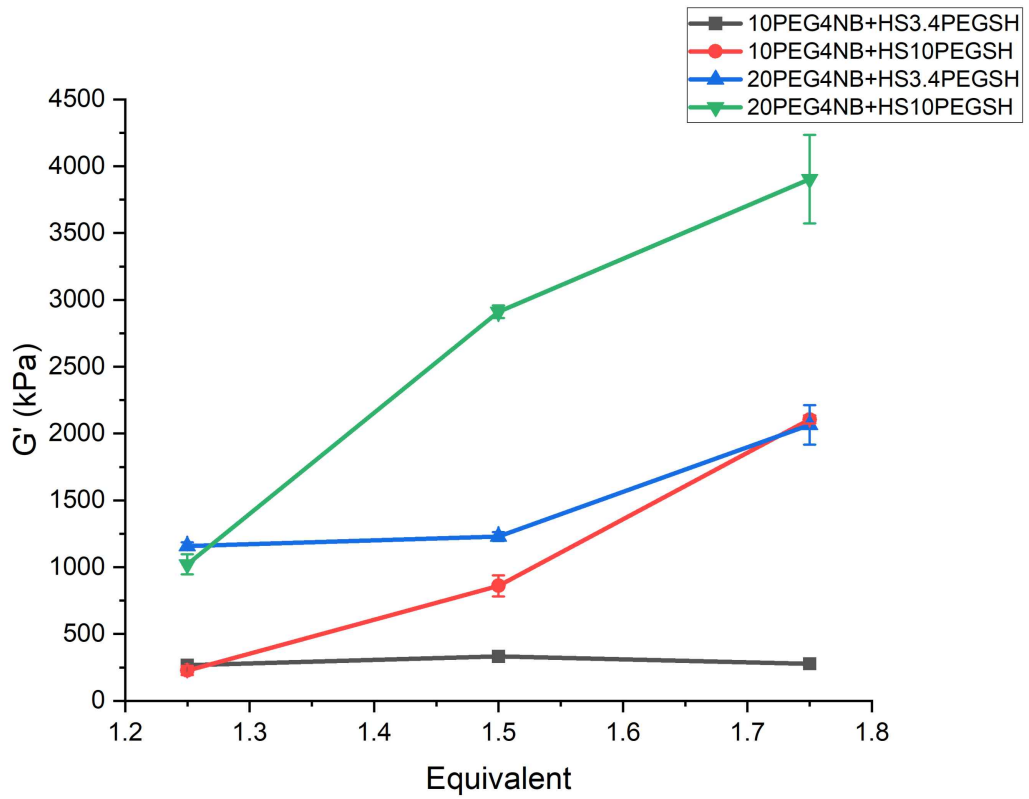


Figure 13. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $n=3$ )

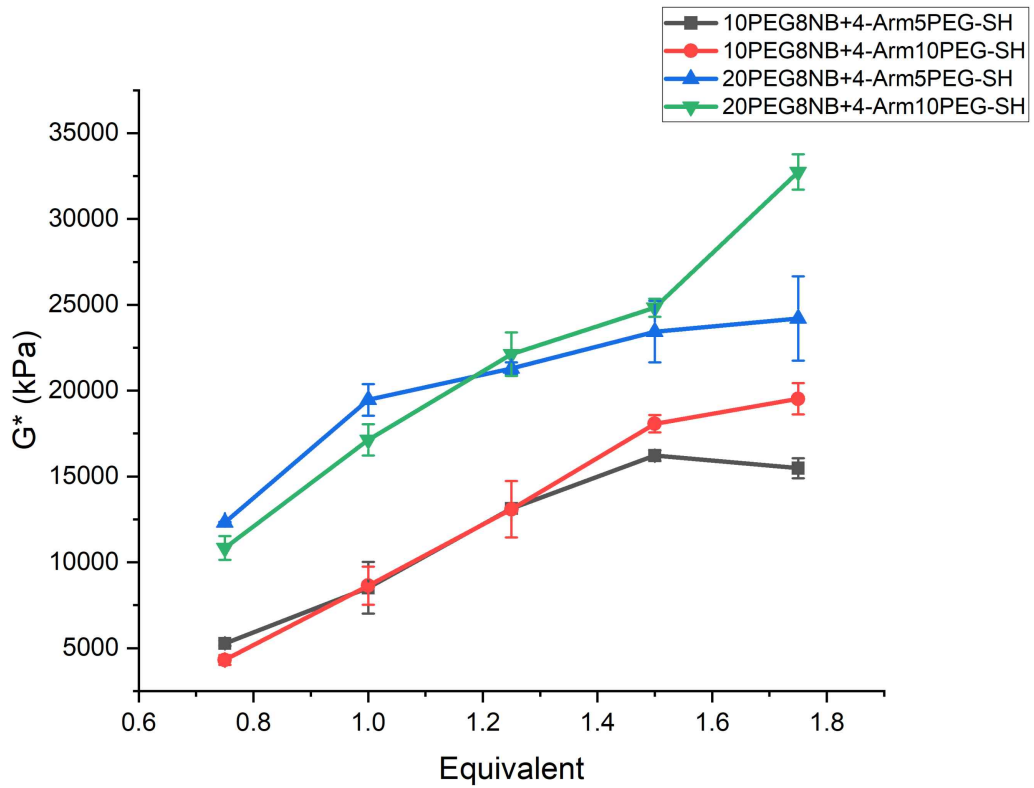


Figure 14. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )



### 3.1.2 PEG의 가닥의 수에 따른 강성 측정

PEG에 존재하는 상호반응성 그룹의 수에 따라 변화하는 겔 네트워크의 밀도를 Table 6, Table 7, Table 8을 참고하여 비교하였다(Figure 15, Figure 16).

PEG-8NB보다 가닥 수가 적은 PEG-4NB으로 합성한 하이드로겔의 강성이 약 5배 정도 낮은 것으로 측정되었다(Figure 15). 또한 PEG-8NB과 HS-PEG-SH 및 4-Arm PEG-SH로 합성한 하이드로겔의 강성을 비교했을 때, 가닥 수가 더 많은 4-Arm PEG-SH의 강성이 약 2.5~5배 정도 높은 것으로 확인되었다(Figure 17). 이는 상호반응성 그룹의 수가 증가할수록 가교결합이 증가하고, 이로 인하여 겔의 네트워크 밀도가 증가하기 때문이라고 판단된다.

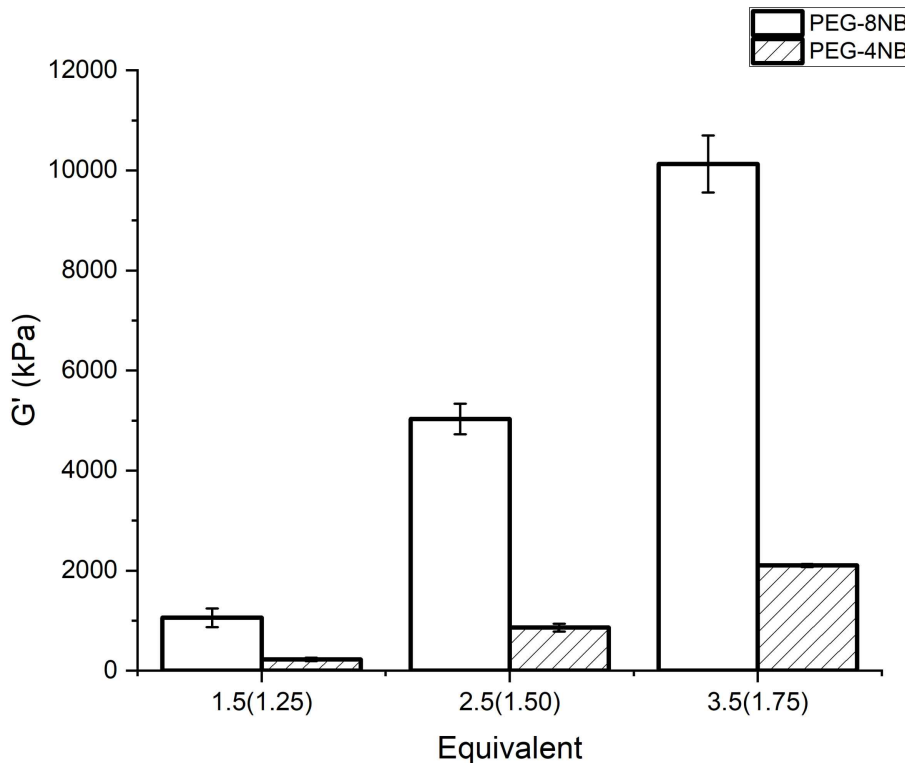


Figure 15. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB, and PEG-4NB at pH 7.4 ( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

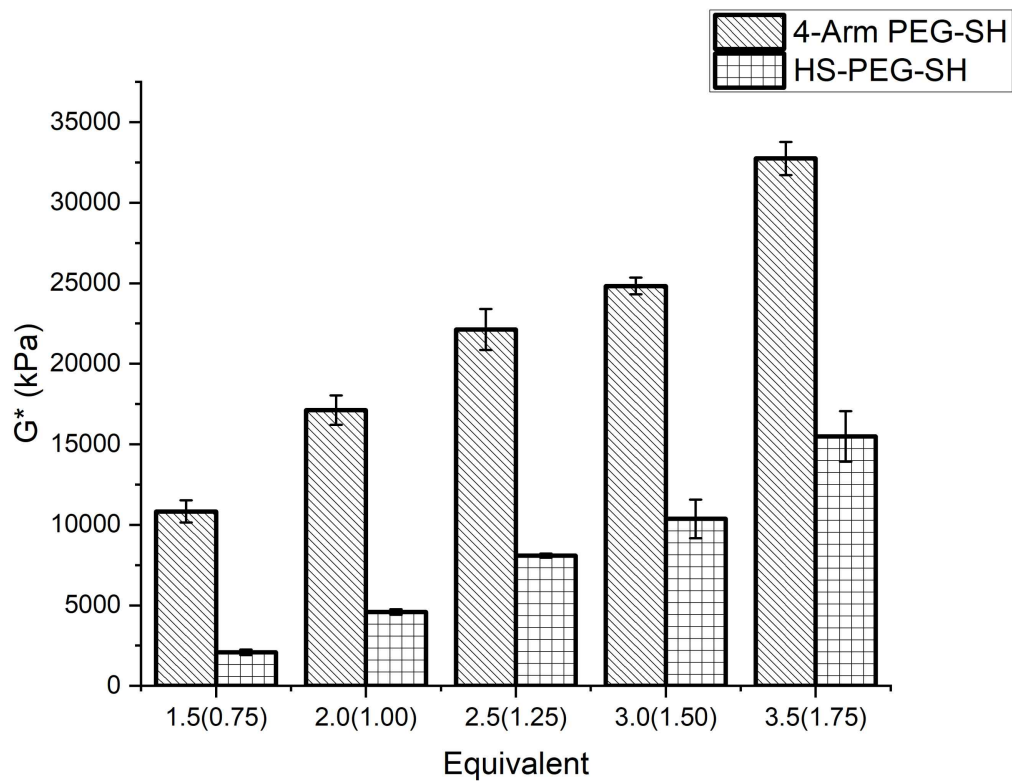


Figure 16. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized 20 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4

( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

### 3.1.3 pH 변화에 따른 강성 측정

pH에 따른 하이드로겔의 겔화를 확인하기 위하여 앞선 실험과 동일한 조건으로 저장 탄성계수( $G'$ )를 측정하였으며, 측정 데이터는 Table 9에, 그래프는 Figure 17에 나타내었다. 하이드로겔의 강성은 pH가 변화함에 따라 유의미한 변화가 보이지 않았다.

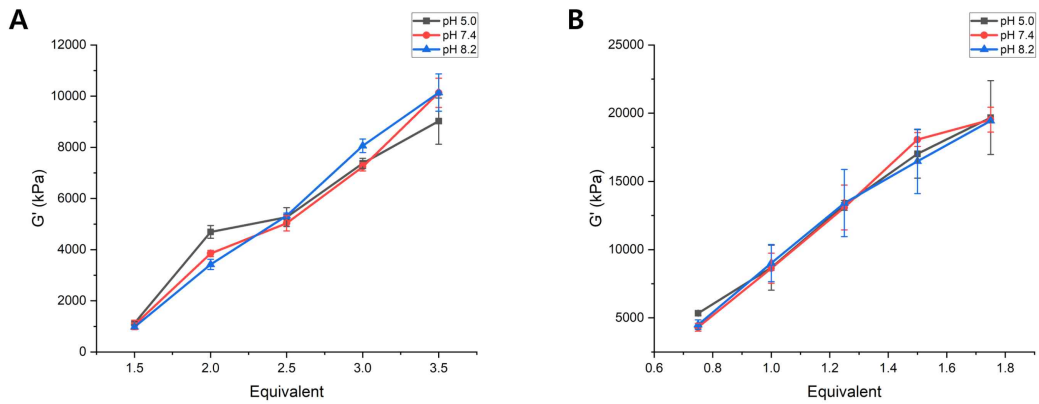


Figure 17. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and A) HS-10 kDa PEG-SH, and B) 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2 (*p*-value \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n=3)

Table 9. Storage modulus( $G'$ ) of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean $\pm$ SD)

Thiol	Equivalent (eq)	Storage modulus (kPa)		
		pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
HS-PEG-SH	1.50	1125.01 $\pm$ 60.015	1057.96 $\pm$ 184.73	973.624 $\pm$ 61.366
	2.00	4694.27 $\pm$ 246.63	3849.79 $\pm$ 122.94	3424.20 $\pm$ 199.28
	2.50	5271.01 $\pm$ 367.98	5033.47 $\pm$ 304.48	5325.33 $\pm$ 105.93
	3.00	7370.68 $\pm$ 202.15	7238.05 $\pm$ 160.43	8058.93 $\pm$ 266.06
	3.50	9024.06 $\pm$ 902.41	10129.8 $\pm$ 571.32	10140.5 $\pm$ 730.46
4-Arm PEG-SH	0.75	5338.91 $\pm$ 151.30	4315.46 $\pm$ 288.52	4497.56 $\pm$ 351.37
	1.00	8679.27 $\pm$ 1644.0	8639.97 $\pm$ 1105.6	9020.62 $\pm$ 1362.6
	1.25	13239.8 $\pm$ 357.90	13091.2 $\pm$ 1638.2	13413.5 $\pm$ 2466.4
	1.50	17022.3 $\pm$ 1779.4	18069.3 $\pm$ 504.82	16475.0 $\pm$ 2361.2
	1.75	19676.8 $\pm$ 2703.8	19525.8 $\pm$ 912.52	19450.3 $\pm$ 367.44

### 3.2 하이드로겔의 상대적 mesh size 비교

하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 mesh size를 비교하기 위하여 엑스선 컴퓨터 단층촬영장치(Micro-CT)를 이용하여 촬영하였다(Figure 18). 1.5 eq의 HS-10 kDa PEG-SH와 10 kDa PEG-8NB를 합성한 하이드로겔과 20 kDa PEG-8NB를 합성한 하이드로겔 및 HS-10 kDa PEG-SH 3.0 eq와 20 kDa PEG-8NB를 합성한 하이드로겔을 비교하기로 결정하였고, 이들을 동결건조하여 촬영하였다.

동결건조한 하이드로겔을 촬영한 결과, PEG-8NB의 분자량이 2배 더 높은 하이드로겔의 메쉬 크기는 유의미하게 커지지 않는 것으로 확인되었다. 반면에 HS-PEG-SH의 당량이 2배 많은 하이드로겔의 메쉬 크기는 훨씬 작아지는 것을 확인하였다. 이 결과를 통하여 단량체의 분자량은 하이드로겔의 메쉬 크기에 큰 영향을 주지 않고 단량체의 당량이 증가하면 메쉬 크기가 커진다는 것을 알 수 있었다.

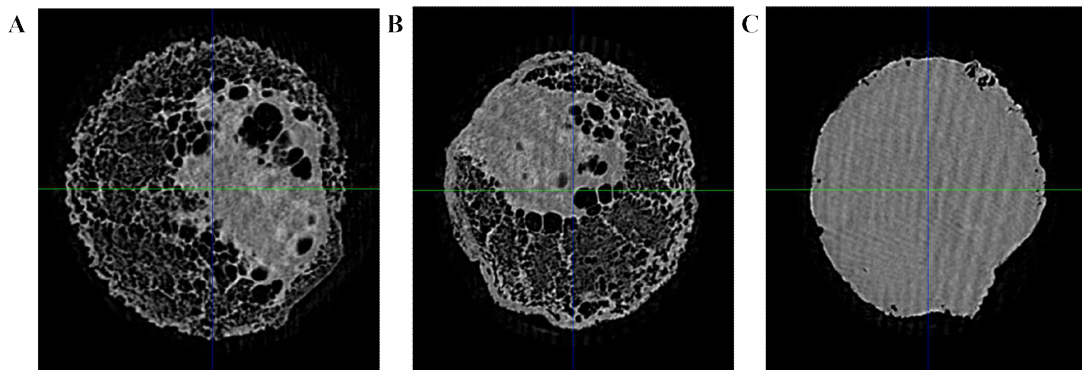


Figure 18. Micro-CT image of PEG Hydrogel polymerized with 1.5 eq of HS-10 kDa PEG-SH and A) 10 kDa PEG-8NB, B) 20 kDa PEG-8NB, and C) 3.0 eq of HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB.

### 3.3 하이드로겔의 팽윤율 변화

PEG 하이드로겔의 네트워크 및 pH 환경이 하이드로겔의 팽윤율(swelling ratio, SR)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 **Table 5**와 같이 합성된 하이드로겔을 pH 5.0, 7.4, 8.2의 phosphate 완충용액에서 24시간 동안 팽윤 및 동결건조하여 팽윤율을 확인하였다.

#### 3.3.1 PEG-8NB, PEG-4NB의 분자량, HS-PEG-SH, 4-Arm PEG-SH의 분자량 및 당량의 변화에 따른 팽윤율 변화

먼저, PEG-8NB의 당량은 1 eq로 모두 일정하게 고정된 상태에서 PEG-8NB의 분자량과 HS-PEG-SH의 분자량 및 당량에 변화를 주었으며 pH 7.4에서 하이드로겔의 팽윤율의 범위는 606.813 ~ 2631.18%로 측정되었다(**Table 10, Figure 19**). 분자량이 상대적으로 낮은 것과 높은 것을 비교하였을 때 분자량이 높아질수록 팽윤율이 증가하는 것을 볼 수 있었으며, 반대로 분자량이 낮을수록 팽윤율은 감소하는 것으로 확인되었다. 또한 HS-PEG-SH의 당량이 증가할수록 팽윤율은 감소하였다.

PEG-8NB과 마찬가지로 PEG-4NB의 당량을 고정된 상태에서 분자량 및 HS-PEG-SH의 당량에 변화를 주었으며, 하이드로겔의 팽윤율의 범위는 2088.46 ~ 3527.37%로 측정되었다(**Table 11, Figure 20**). PEG-8NB과 동일하게 분자량이 높아지고 HS-PEG-SH의 당량이 낮아질수록 팽윤율은 증가하였다.

PEG-8NB의 당량을 고정된 상태에서 분자량 및 4-Arm PEG-SH의 분자량에 변화를 주었으며, 하이드로겔의 팽윤율의 범위는 628.095 ~ 1342.40%로 측정되었다(**Table 12, Figure 21**). 앞선 실험의 결과와 마찬가지로 4-Arm PEG-SH의 분자량이 증가하거나 당량이 감소할수록 팽윤율도 증가하는 것으로 나타났다. 이는 단량체의 분자량이 증가하면 팽윤하기 전에는 메쉬의 크기가 크지 않지만 팽윤하면서 단량체의 길이가 길어지게 되므로 메쉬의 크기가 증가하는 것이기 때문이라고 판단하였다. 또한 앞선 Micro-CT 촬영을 통해 알 수 있었듯이 당량이 감소할

수록 하이드로겔의 메쉬 크기가 커지기 때문이다.

**Table 10. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 (mean±SD)**

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Swelling ratio (%)	
PEG-8NB	10	HS-PEG-SH	3.4	1.5	1016.48±53.317	
				2.0	924.132±19.223	
				2.5	868.465±32.799	
				3.0	790.278±42.150	
				3.5	606.813±87.627	
	20	HS-PEG-SH	10	1.5	1176.22±71.461	
				2.0	1135.54±48.453	
				2.5	1068.00±96.167	
				3.0	1021.23±96.567	
				3.5	864.286±74.751	
PEG-8NB	20	HS-PEG-SH	3.4	1.5	1860.00±73.169	
				2.0	1641.30±97.315	
				2.5	1394.74±3.7216	
				3.0	1319.33±79.472	
				3.5	1305.84±50.522	
				10	1.5	2631.18±22.888
					2.0	2177.27±64.442
2.5	1734.62±48.954					
				3.0	1585.98±40.780	
				3.5	1433.66±53.358	

Table 11. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 (mean±SD)

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Swelling ratio (%)
PEG-4NB	10	HS-PEG-SH	3.4	1.25	2457.78±267.11
				1.50	2269.09±78.814
				1.75	2088.46±195.36
			10	1.25	3553.97±193.04
				1.50	2770.83±252.59
				1.75	2322.22±23.570
	20	HS-PEG-SH	3.4	1.25	2747.22±121.78
				1.50	2322.22±86.424
				1.75	2268.75±26.517
			10	1.25	3527.37±95.273
				1.50	3095.08±192.66
				1.75	2157.97±41.323



Table 12. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4 (mean±SD)

NB	Molecular weight (kDa)	Thiol	Molecular weight (kDa)	Equivalent (eq)	Swelling ratio (%)
PEG-8NB	10	4-Arm PEG-SH	5	0.75	986.667±65.997
				1.00	871.111±54.886
				1.25	748.485±5.2486
				1.50	677.137±28.091
				1.75	628.095±32.899
				0.75	1302.42±37.284
				1.00	1266.67±106.93
	20	4-Arm PEG-SH	10	1.25	1066.88±64.716
				1.50	887.619±57.915
				1.75	839.583±38.302
				0.75	1287.00±70.111
				1.00	1038.57±64.159
				1.25	917.917±36.579
				1.50	907.895±22.536
20	4-Arm PEG-SH	10	1.75	852.505±34.200	
			0.75	1342.40±22.786	
			1.00	1085.49±78.950	
			1.25	1019.49±80.855	
			1.50	921.061±98.713	
				1.75	910.447±29.102

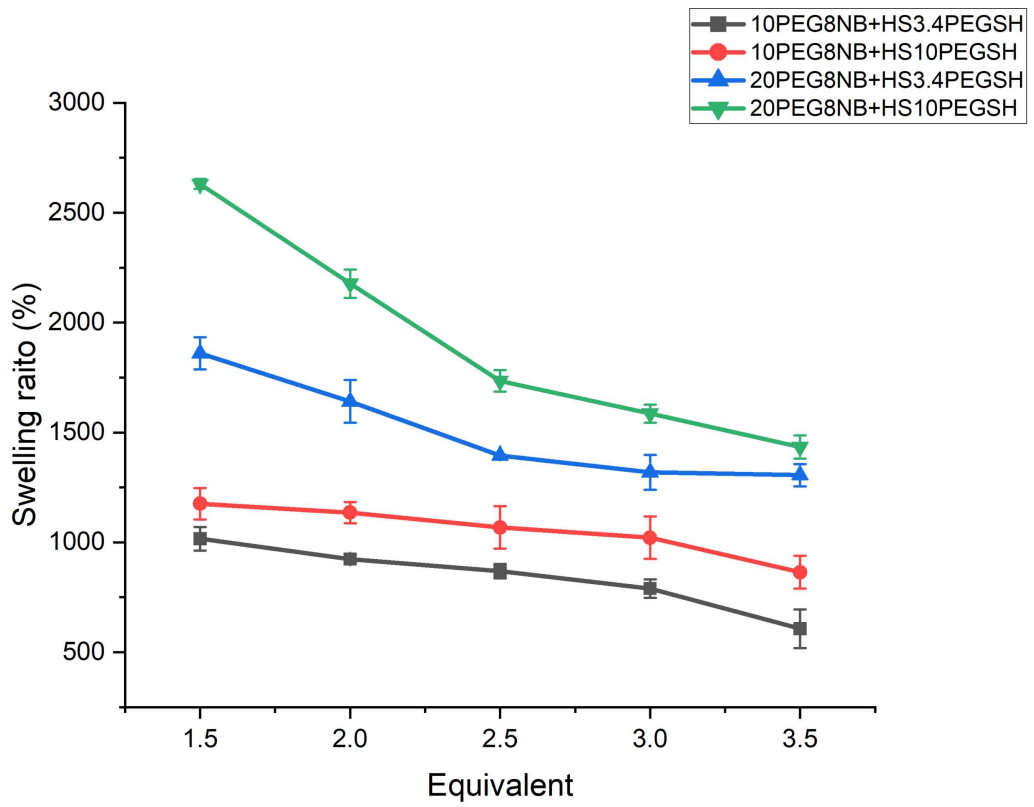


Figure 19. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

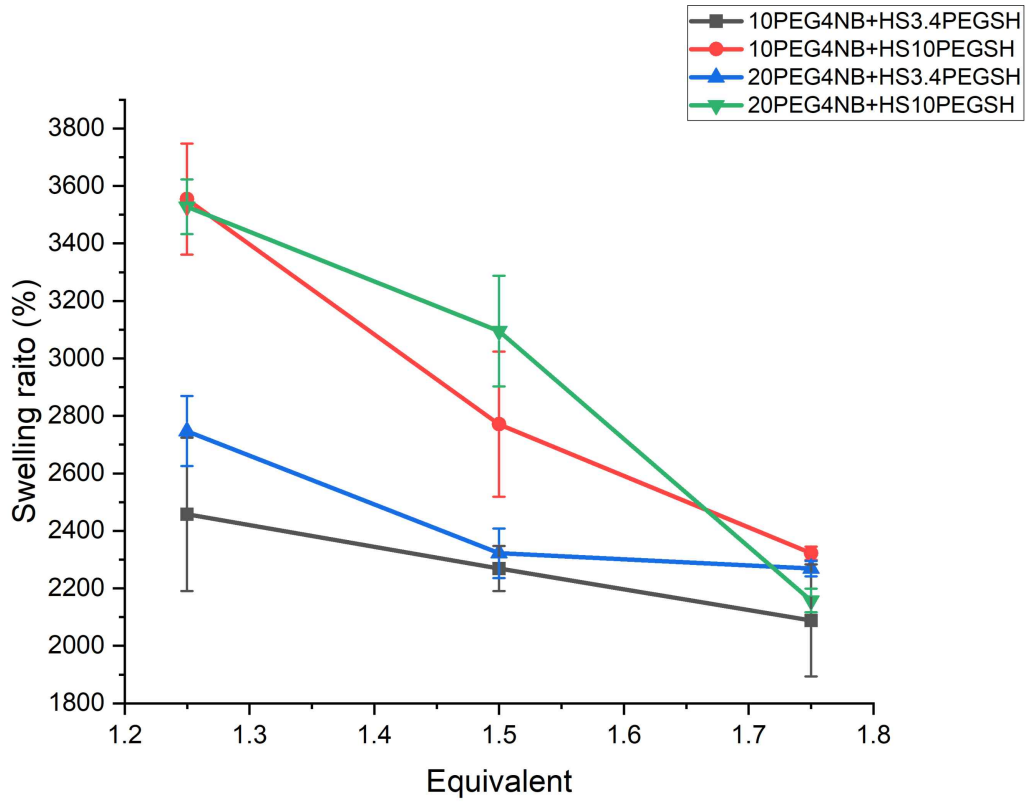


Figure 20. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-4NB and HS-PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

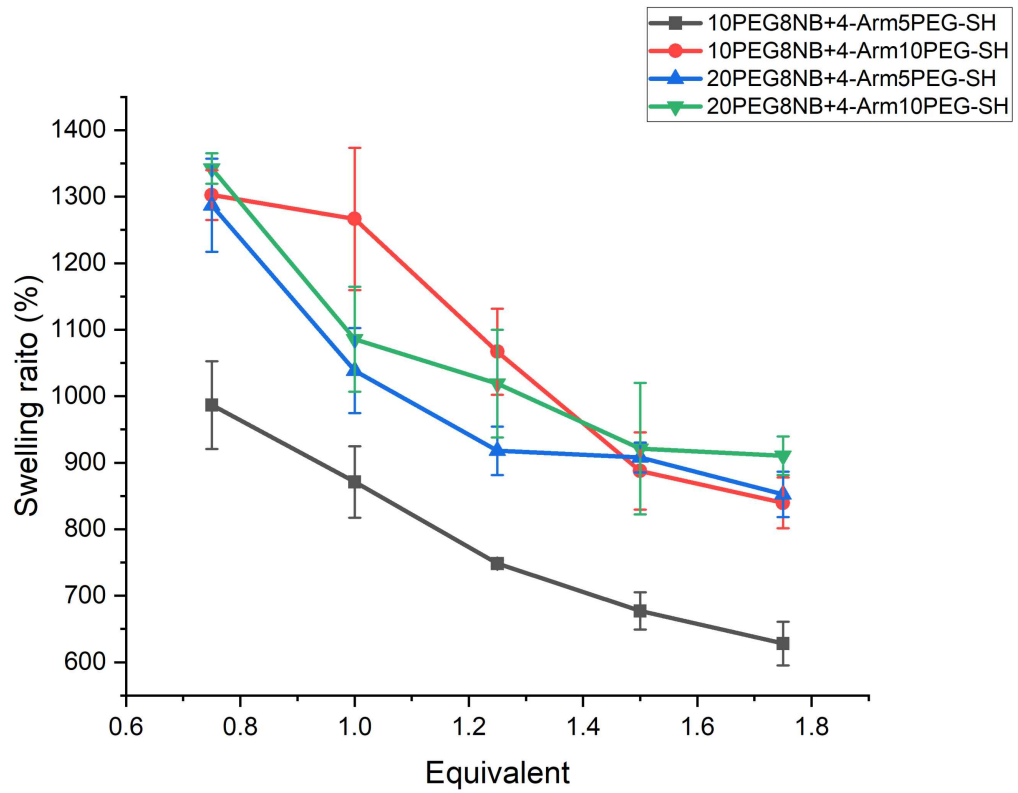


Figure 21. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized PEG-8NB and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4 ( $p$ -value \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ,  $n=3$ )

### 3.3.2 PEG의 가닥의 수에 따른 팽윤율 변화

PEG에 존재하는 기능성 그룹의 수에 따라 변화하는 겔 네트워크의 밀도를 Table 10, Table 11, Table 12를 참고하여 비교하였다(Figure 22, Figure 23). PEG-8NB보다 가닥 수가 적은 PEG-4NB으로 합성한 하이드로겔의 팽윤율이 약 3배 정도 높은 것으로 측정되었다(Figure 22). 또한 PEG-8NB과 HS-PEG-SH 및 4-Arm PEG-SH로 합성한 하이드로겔의 팽윤율을 비교했을 때, 가닥 수가 더 많은 4-Arm PEG-SH의 팽윤율이 약 1.5~2배 정도 낮은 것으로 확인되었다(Figure 23). 이는 기능성 그룹의 수가 증가할수록 가교결합이 증가하고, 이로 인하여 겔의 메쉬 크기가 감소하기 때문이라고 판단된다.

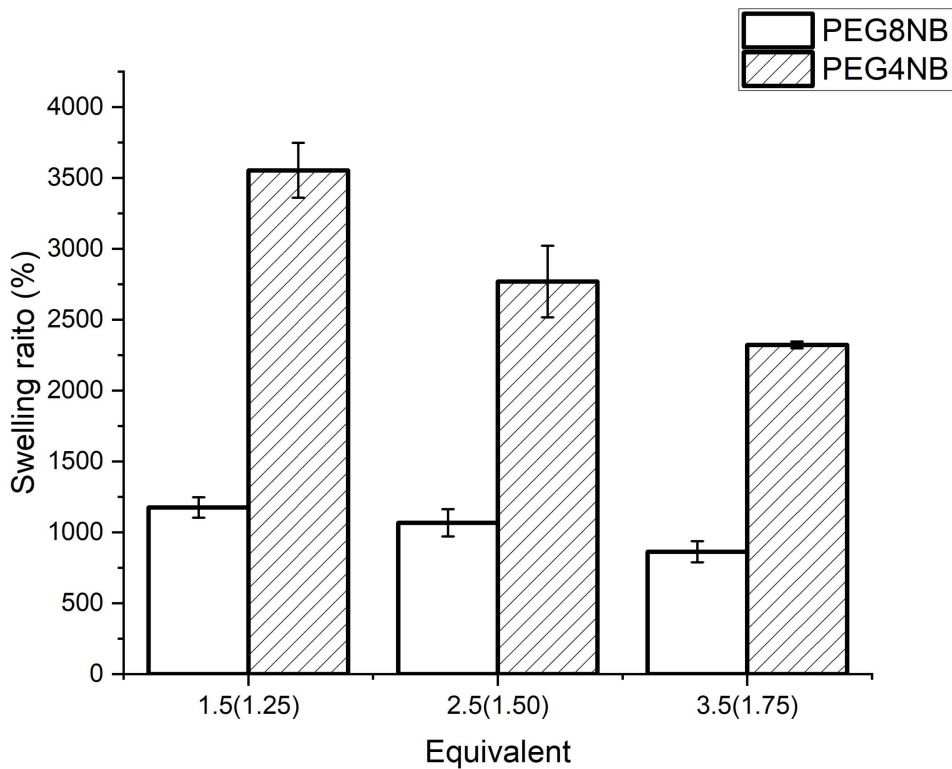


Figure 22. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB, and PEG-4NB at pH 7.4  
(*p*-value \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n=3)

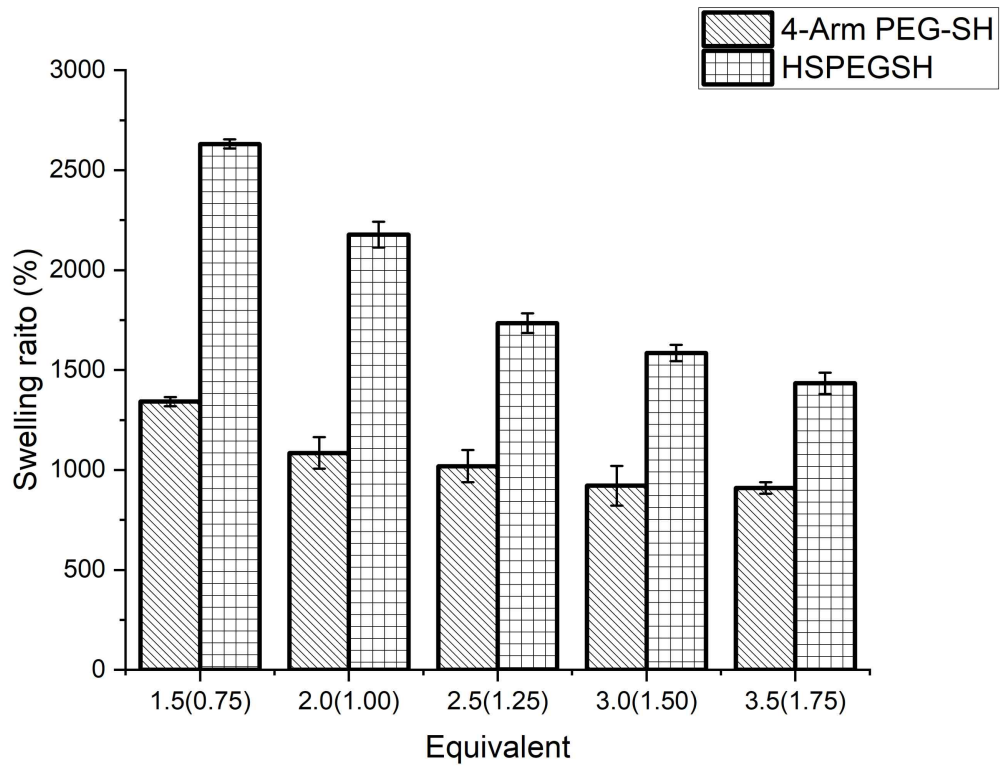


Figure 23. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 20 kDa PEG-NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 7.4 (*p*-value \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n=3)

### 3.3.3 pH 환경에 따른 팽윤율 변화

pH에 따른 하이드로겔의 팽윤율의 변화를 확인하기 위하여 앞선 실험과 동일한 조건으로 팽윤율을 측정하였으며, 측정 데이터는 Table 13에, 그래프는 Figure 25에 나타내었다. 하이드로겔의 팽윤율은 pH 5.0에서 제일 높은 팽윤율을 보였고, pH 7.4와 8.2에서는 비슷한 팽윤율을 보였다. 이는 하이드로겔 네트워크 중에 존재하는  $-NH$  그룹의 pKa 값이 29.5[25]이므로 pH가 감소하게 되면 이온화된  $-NH_2^+$ 의 수가 증가하면서 이들 사이의 반발력도 증가하기 때문에, pH 5.0에서 더 높은 팽윤율을 보이는 것으로 판단된다.

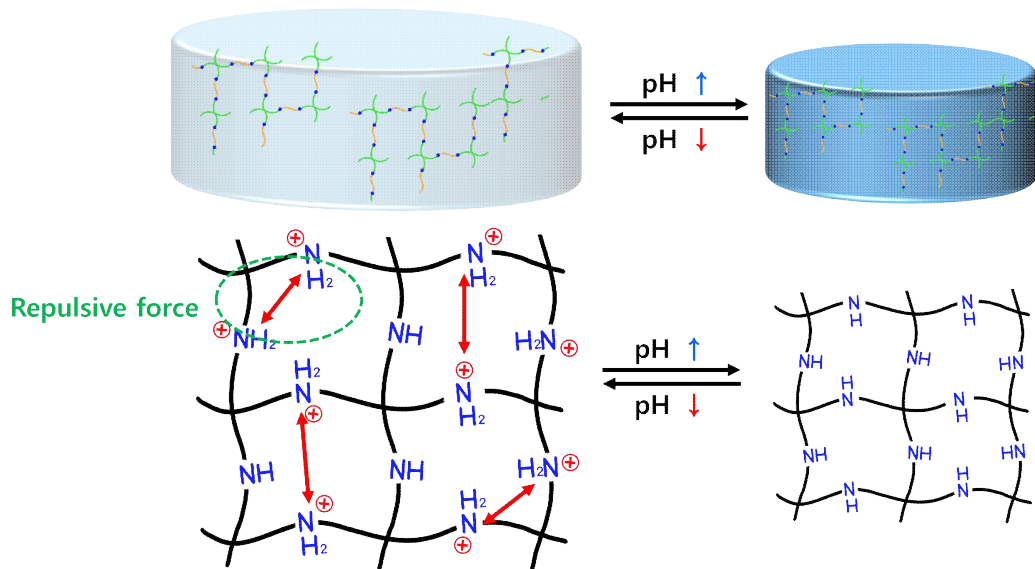


Figure 24. Principle of change in swelling ratio of thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel according to pH condition

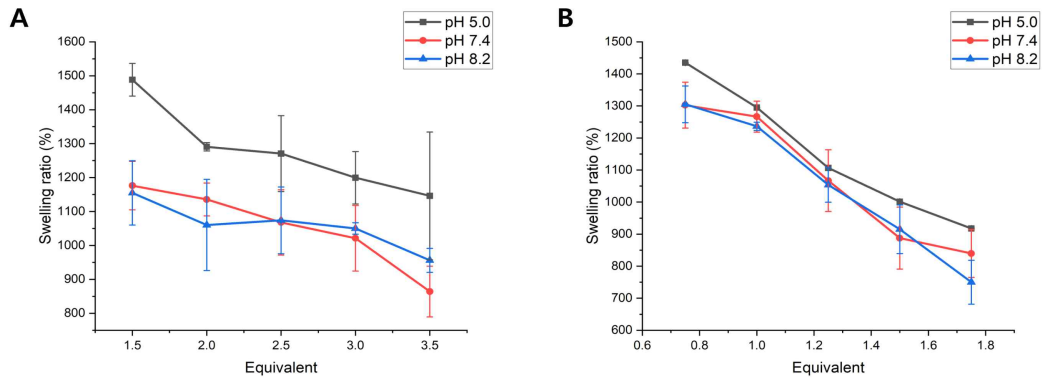


Figure 25. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and A) HS-10 kDa PEG-SH, and B) 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2 (*p*-value \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n=3)



**Table 13. Swelling ratio of PEG Hydrogel photopolymerized 10 kDa PEG-8NB and HS-10 kDa PEG-SH, and 4-Arm PEG-SH at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean±SD)**

Thiol	Equivalent (eq)	Swelling ratio (%)		
		pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
HS-PEG-SH	1.50	1488.41±48.089	1176.23±71.461	1154.86±94.643
	2.00	1290.77±12.089	1135.54±48.453	1060.24±134.50
	2.50	1270.64±111.75	1068.00±96.167	1073.94±98.215
	3.00	1199.52±77.135	1021.23±96.567	1050.09±16.747
	3.50	1146.11±188.38	864.286±74.751	956.076±35.255
4-Arm PEG-SH	0.75	1435.00±77.782	1302.42±37.284	1305.15±57.426
	1.00	1295.00±63.640	1266.67±106.93	1236.36±12.856
	1.25	1106.41±44.245	1066.88±64.716	1053.53±53.940
	1.50	1001.47±56.724	887.619±57.915	915.079±75.905
	1.75	917.506±86.681	839.583±38.302	750.077±68.529

### 3.4 하이드로겔 내 담지된 물질 방출 거동

하이드로겔의 네트워크 및 pH 환경이 담지된 약물의 방출 거동에 미치는 영향을 조사하였다. 약물이 담지된 하이드로겔 10PEG8NB과 20PEG8NB을 pH 5.0, 7.4, 8.2의 phosphate 완충용액에 상온에서 배양한 후, 1, 2, 3, 24, 48 h 간격으로 배양한 완충용액을 모두 옮기고 100  $\mu$ L씩 마이크로플레이트 리더를 이용하여 측정하였다. 시간 경과에 따른 누적 방출량은 **Figure 26, Figure 27**에 나타내었으며 데이터는 **Table 14, Table 15**에 나타내었다.

#### 3.4.1 하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 담지된 물질의 방출 거동

먼저 pH 7.4에서 플루오레세인 함유 10PEG8NB에서는 1 h에서  $31.12 \pm 2.637\%$ , 2 h에서  $48.59 \pm 2.386\%$ , 3 h에서  $54.42 \pm 3.339\%$ , 24 h에서  $57.16 \pm 3.742\%$  방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 더 이상 방출이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다.

플루오레세인 함유 20PEG8NB은 1 h에서  $45.31 \pm 2.530\%$ , 2 h에서  $68.81 \pm 3.569\%$ , 3 h에서  $79.76 \pm 2.747\%$ , 24 h에서  $86.82 \pm 2.103\%$  방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 마찬가지로 방출이 진행되지 않았다.

라이소자임 함유 10PEG8NB에서는 1 h에서  $47.78 \pm 1.766\%$ , 2 h에서  $66.41 \pm 1.693\%$ , 3 h에서  $77.92 \pm 1.691\%$ , 24 h에서  $88.07 \pm 1.561\%$  방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 더 이상 약물의 방출이 관찰되지 않았다.

라이소자임 함유 20PEG8NB에서는 1 h에서  $53.29 \pm 9.442\%$ , 2 h에서  $72.22 \pm 9.298\%$ , 3 h에서  $81.76 \pm 8.029\%$ , 24 h에서  $94.12 \pm 7.276\%$  방출하는 것을 볼 수 있었으며 이 이후부터는 약물이 방출되지 않은 것으로 판단되었다.

따라서 플루오레세인, 라이소자임 모두 10PEG8NB보다 분자량이 더 큰 단량체로 이루어진 20PEG8NB에서 약물의 방출이 상대적으로 빠르게 일어나는 것을 볼 수 있었다.

**Table 14. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)	
	10PEG8NB	20PEG8NB
0	0.000±0.000	0.000±0.000
1	31.12±2.637	45.31±2.530
2	48.59±2.386	68.81±3.569
3	54.42±3.339	79.76±2.747
24	57.16±3.742	86.82±2.103
48	57.16±0.000	86.82±0.000

**Table 15. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)	
	10PEG8NB	20PEG8NB
0	0.000±0.000	0.000±0.000
1	47.78±1.766	53.29±9.442
2	66.41±1.693	72.22±9.298
3	77.92±1.691	81.76±8.029
24	88.07±1.561	94.12±7.276
48	88.07±0.000	94.12±0.000

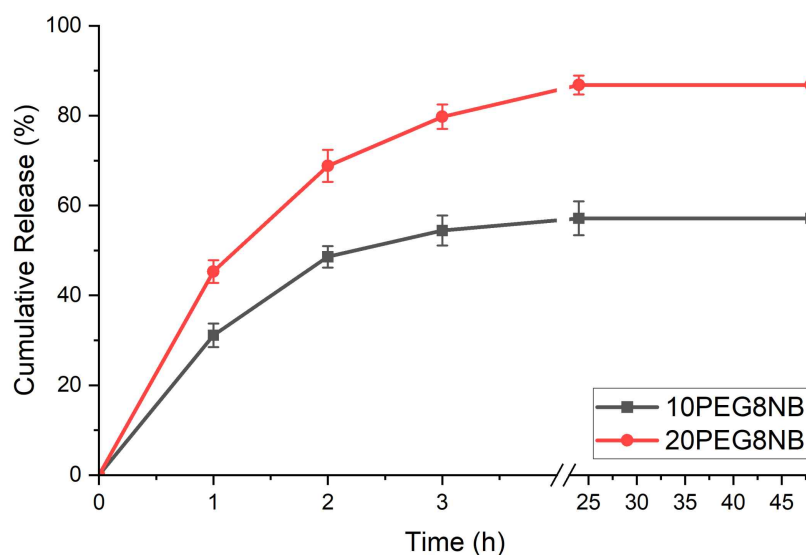


Figure 26. Cumulative release of fluorescein from PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4 ( $p$ -value  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $n=3$ )

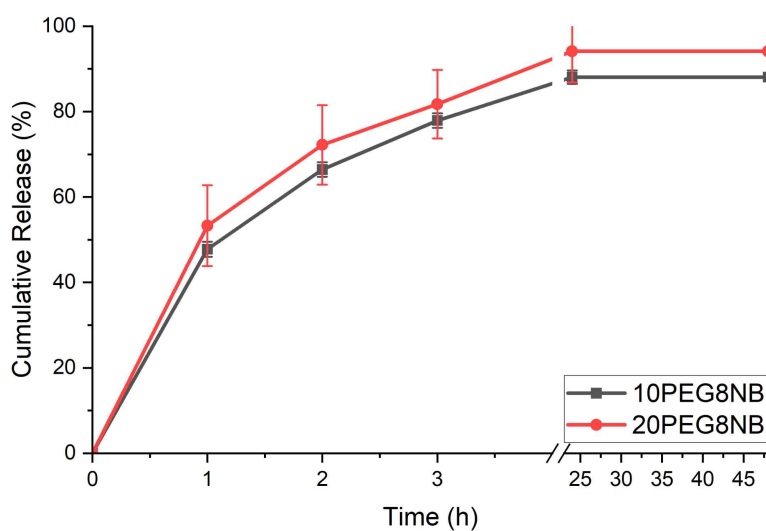


Figure 27. Cumulative release of lysozyme from PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10, 20 kDa PEG-8NB at pH 7.4 ( $p$ -value  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $n=3$ )

### 3.4.2 pH 환경에 따른 담지된 물질의 방출 거동

pH에 따른 약물의 누적 방출량 측정 데이터는 Table 16, Table 17, Table 18, Table 19에, 그래프는 Figure 29에 나타내었다.

플루오레세인 함유 하이드로겔 10PEG8NB의 최대 누적 방출량은 pH 5.0에서  $49.09 \pm 2.213\%$ , pH 7.4에서  $57.16 \pm 3.742\%$ , pH 8.2에서  $58.88 \pm 2.234\%$ 로, pH 5.0에서 제일 낮은 누적 방출량을 보였다. 반면 pH 7.4, 8.2 순으로 높은 누적 방출량을 보였다.

플루오레세인 함유 하이드로겔 20PEG8NB의 최대 누적 방출량은 pH 5.0에서  $60.86 \pm 0.068\%$ , pH 7.4에서  $86.82 \pm 2.103\%$ , pH 8.2에서  $94.59 \pm 2.707\%$ 로, pH 5.0에서 제일 낮은 누적 방출량을 보였다.

플루오레세인은 강산성에서는 양이온을 띠고 pH 2~4에서 중성 종으로 존재하며, pH 4.3~6.4 범위 내에서는 단일 음이온 형태로 존재한다. pH 6.4 이상에서는 이 음이온이 가장 많이 존재한다[18, 19, 26]. pH가 높아질수록 음전하가 강해져 pH 8.2에서 가장 낮은 방출량을 보일 것 같았지만, pH 5.0에서 단일음이온의 플루오레세인과 겔 내의 이온화된  $-NH_2^+$  사이에 인력이 발생하게 되고, pH 7.4와 8.2에서는 이 음이온의 플루오레세인은 겔 내의  $-NH_2^+$  사이에 인력 이외에 남은 음전하들 사이의 반발력으로 인하여 비교적 방출이 용이한 것으로 판단된다(Figure 29).

라이소자임 함유 하이드로겔 10PEG8NB의 최대 누적 방출량은 pH 5.0에서  $91.03 \pm 4.466\%$ , pH 7.4에서  $88.07 \pm 1.561\%$ , pH 8.2에서  $81.59 \pm 1.552\%$ 로, pH 8.2, 7.4, 5.0 순으로 누적 방출량이 증가하였지만 비교적 큰 차이를 보이지는 않았다.

라이소자임 함유 하이드로겔 20PEG8NB의 최대 누적 방출량은 pH 5.0에서  $96.42 \pm 6.471\%$ , pH 7.4에서  $94.12 \pm 7.276\%$ , pH 8.2에서  $82.29 \pm 5.972\%$ 로, pH 8.2, 7.4, 5.0 순으로 누적 방출량이 증가하였지만, 앞선 결과와 마찬가지로 비교적 큰 차이를 보이지는 않았다.

등전점(isoelectric point, pI)이 11.25인 라이소자임은 pH 5.0에서는 total charge가 약 10, pH 7.4, 8.2에서는 약 7.9, 7.0으로 모두 양전하를 띠게 되고

[27], 이와 하이드로겔의 네트워크 중 이온화된  $-NH_2^+$  사이에 반발력이 발생하게 된다. 따라서 실험이 진행된 모든 pH 조건에서 발생하는 반발력으로 인하여 대부분 높은 방출량을 보이는 것으로 판단된다. 분자량이 훨씬 큰 라이소자임의 누적 방출량이 플루오레세인보다 더 높은 것도 이러한 이유에 있다고 판단된다(Figure 29).

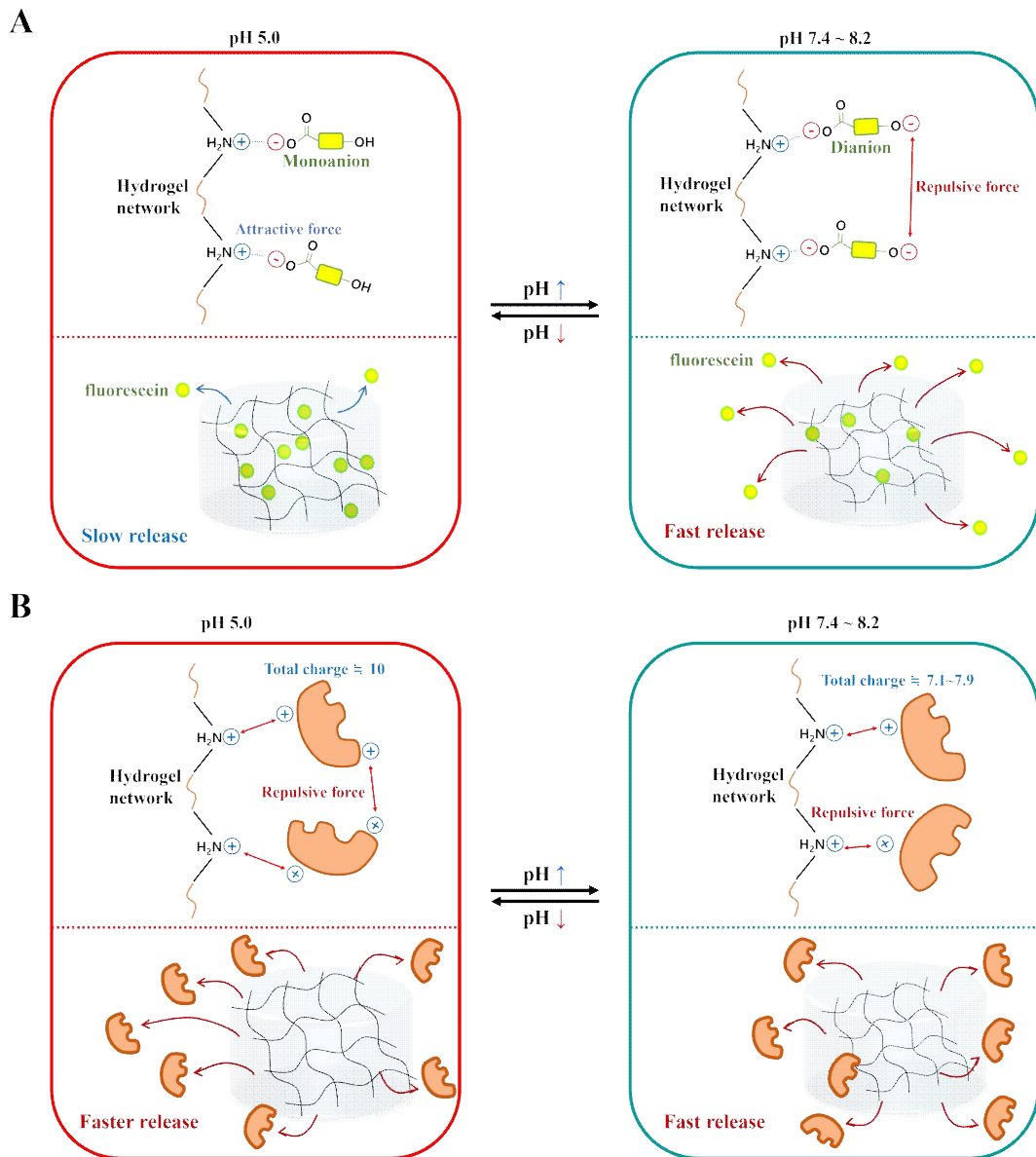


Figure 28. Principle of change in release of A)fluorescein and B)lysozyme from thiol-ene photopolymerized PEG hydrogel according to pH condition

**Table 16. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)		
	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
1	7.515±2.206	31.12±2.637	38.06±3.234
2	24.21±1.816	48.59±2.386	52.11±2.630
3	36.23±2.045	54.42±3.339	56.99±2.559
24	49.09±2.213	57.16±3.742	58.88±2.234

**Table 17. Fluorescein release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)		
	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
1	8.356±1.398	45.31±2.530	47.38±2.428
2	27.35±2.795	68.81±3.569	72.59±3.831
3	42.76±1.977	79.76±2.747	85.20±3.269
24	60.86±0.068	86.82±2.103	94.59±2.707



**Table 18. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 10 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)		
	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
1	42.22±2.408	47.78±1.766	51.10±1.193
2	60.60±3.439	66.41±1.693	64.49±1.155
3	75.01±3.935	77.92±1.691	73.51±1.344
24	91.03±4.466	88.07±1.561	81.59±1.552

**Table 19. Lysozyme release(%) of PEG Hydrogel photopolymerized HS-10 kDa PEG-SH and 20 kDa PEG-8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2 (mean±SD)**

Time (h)	Cumulative Release (%)		
	pH 5.0	pH 7.4	pH 8.2
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
1	40.61±5.441	53.29±9.442	46.21±1.138
2	64.39±6.583	72.22±9.298	64.71±4.298
3	79.52±7.225	81.76±8.029	73.79±5.570
24	96.42±6.471	94.12±7.276	82.29±5.972

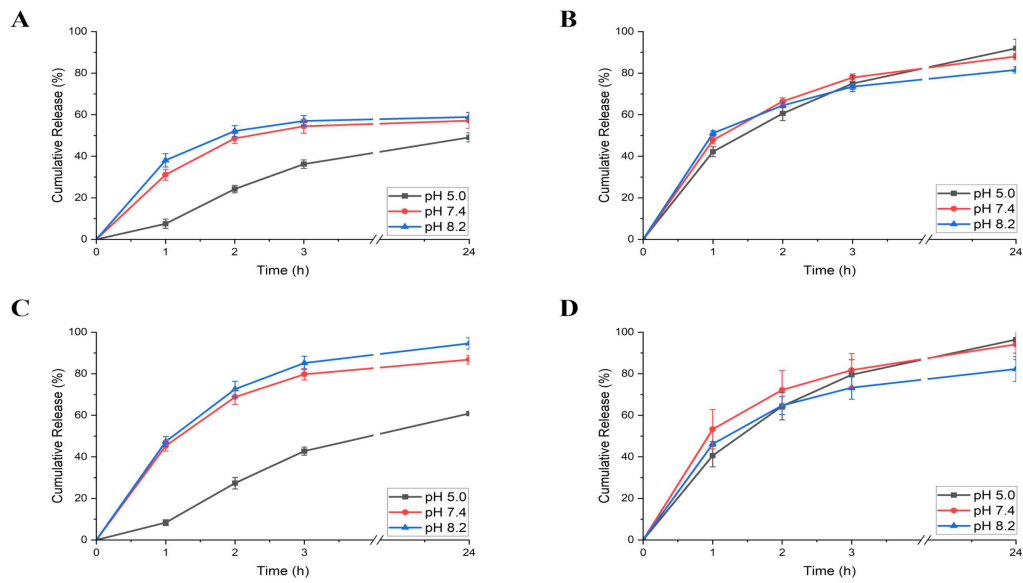


Figure 29. Cumulative release of A) fluorescein from 10PEG8NB and C) 20PEG8NB, B) lysozyme from 10PEG8NB and D) 20PEG8NB at pH 5.0, 7.4, 8.2 (*p*-value \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, n=3)

#### IV. 요약 및 결론

본 연구에서는 다양한 네트워크 밀도의 싸이올-엔(thiol-ene) 광중합 피이지(PEG) 하이드로겔을 합성하여, 이들의 물성을 비교하고 하이드로겔 내 담지된 약물의 방출 거동 비교에 대한 목적을 두고 실험을 진행하였다.

본 실험에서는 싸이올-엔 광중합 피이지 하이드로겔을 합성하기 위해 노보넨이 기능화된 PEG, 싸이올이 기능화된 PEG를 단량체로 하여 광개시제인 LAP과 함께 UV 하에서 thiol-ene 광중합 반응을 진행하였다. 하이드로겔 합성 후 22 °C에서 회전형 레오미터를 통해 저장 탄성계수( $G'$ )를 측정하여 하이드로겔의 네트워크 밀도에 따른 겔화(gelation)를 확인하였다. 실험 결과를 통해 단량체의 분자량이 클수록, 당량이 증가할수록, 가교결합이 가능한 기능 그룹의 수가 많을수록 하이드로겔의 네트워크 밀도가 증가하는 것으로 확인되었다. 반면, 실험이 진행된 pH 5.0, 7.4, 8.2에서는 겔의 네트워크 밀도에 큰 영향이 없는 것으로 확인되었다.

Micro-CT를 통해 단량체의 분자량 및 당량 변화에 따른 하이드로겔의 메쉬 크기를 비교하였다. 단량체의 분자량이 클수록 하이드로겔의 메쉬 크기는 큰 변화가 없었지만, 당량이 많아질수록 메쉬 크기가 증가한 것을 확인하였다.

앞서 합성한 하이드로겔로 팽윤율(swelling ratio)을 측정한 결과, 단량체의 분자량이 증가할수록, 당량이 감소할수록, 가교결합이 가능한 기능 그룹의 수가 적을수록 하이드로겔의 팽윤율이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이를 통해 강성 측정으로 확인한 네트워크 밀도와 팽윤율이 반비례한 관계임을 알 수 있었다. 하지만 단량체의 분자량이 클수록 네트워크 밀도가 증가했지만 팽윤율 또한 증가하였다. 단량체의 분자량이 증가하게 되면 중합체의 사슬(chain)이 엉키게 되면서 네트워크 밀도가 증가하게 되지만, 하이드로겔이 팽윤하게 되면 단량체의 분자량이 큰 만큼 사슬의 길이도 길어지기 때문에 메쉬의 크기도 커지므로 팽윤율도 증가하는 것으로 보여진다.

pH 환경에 따른 하이드로겔의 팽윤율 변화를 관찰하였다. 네트워크 밀도와는 관계없이 pH가 낮을수록 하이드로겔의 팽윤율이 증가하였다. 이는 하이드로겔 네트워크에 존재하는 Multi-Arm PEG-Norbornene의 -NH 그룹의 pKa 값이 29.5이

므로 실험이 진행된 pH 환경에서는 양전하( $-\text{NH}_2^+$ )를 가지고 pH가 낮아질수록 증가한다. 따라서 이들 사이의 반발력을 발생하여 하이드로겔 내의 메쉬 크기를 증가시키므로, pH가 낮을수록 팽윤율이 증가한 것으로 보여진다.

네트워크 밀도 및 pH에 따라 전하가 다른 물질(플루오레세인, 라이소자임)을 담지한 단량체의 분자량이 다른 하이드로겔(10PEG8NB, 20PEG8NB)에서 약물 방출 실험을 진행하였으며, 단량체의 분자량이 더 큰 20PEG8NB에서 상대적으로 약물 방출이 빠르게 일어나는 것을 볼 수 있었다. 이는 단량체의 분자량이 클수록 팽윤시 메쉬의 크기도 증가하므로, 약물이 상대적으로 용이한 방출 거동을 가지는 것으로 보여진다.

pH에 따른 약물 방출 거동은 팽윤율의 변화와 일치하지 않았다. 플루오레세인 함유 하이드로겔에서는 pH 8.2에서 약물 방출이 상대적으로 가장 빠르게 일어났으며, pH가 낮아질수록 누적 방출량이 감소하였다. 반면에 라이소자임 함유 하이드로겔에서는 pH가 높아질수록 누적 방출량이 감소하였으나 방출량의 큰 변화가 관찰되지는 않았다. 먼저 플루오레세인은 pH 5.0에서는 단일음이온, pH 7.4 및 8.2에서는 이음이온 형태이므로 본 실험에서는 모든 pH 환경에서 음전하를 띠게 된다. 하이드로겔의 네트워크에  $-\text{NH}_2^+$  그룹이 존재하기 때문에 이들 사이의 인력으로 인해 약물의 방출 정도도 감소한다. 라이소자임의 pI 값은 11.25이므로 본 실험의 모든 pH 환경에서 양전하를 띠며, 하이드로겔의 네트워크에 존재하는  $-\text{NH}_2^+$  그룹으로 인하여 이들 사이에 반발력이 더 많이 발생하므로, 약물의 방출 정도가 증가한다. 결론적으로 이 실험을 통해 싸이올-엔 광중합 피이지 하이드로겔의 가교 밀도와 약물 방출 간의 관계에 대한 최신 연구를 제공하였고, 더 나아가 약물에 따른 단량체의 디자인을 설계할 수 있어 적절한 약물 전달 시스템에 대한 응용의 발전에 기여할 수 있을 것이라 생각된다.

## V. 참고문헌

- [1] Bell, C. Peppas, N. Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol), *Biomaterials*, 1996, 17
- [2] Lin, C. Metters, A. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2006, 58(12-13), 1379-1408
- [3] Qiu, Y. Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012, 64, 49-60
- [4] Serra, L. Doménech, J. Peppas, N. Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed poly(acrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels, *Biomaterials*, 2006, 27(31), 5440-5451
- [5] Williams, C. Malik, A. Kim, T. et al, Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation, *Biomaterials*, 2005, 26(11), 1211-1218
- [6] Mellott, M. Searcy, K. Pishko, M. Release of protein from highly cross-linked hydrogels of poly(ethylene glycol) diacrylate fabricated by UV polymerization, *Biomaterials*, 2001, 22, 929-941

- [7] Fairbanks, B. Schwartz, M. Bowman, C. et al, Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility, *Biomaterials*, 2009, 30(35), 6702-6707
- [8] Lin, C. Raza, A. Shih, H. PEG hydrogels formed by thiol-ene photo-click chemistry and their effect on the formation and recovery of insulin-secreting cell, *Biomaterials*, 2011, 32(36), 9685-9695
- [9] Ryu, S. Kim, H. Park, Y. et al, Dual mode gelation behavior of silk fibroin microgel embedded poly(ethylene glycol) hydrogels, *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, 4(26), 4574-4584
- [10] Lin, C. Ki, C. Shih, H. Thiol-norbornene photoclick hydrogels for tissue engineering applications, *Journal of Applied Polymer Science*, 2015, 132(8)
- [11] Fairbanks, B. Schwartz, M. Halevi, A. et al, A versatile synthetic extracellular matrix mimic via thiol-norbornene photopolymerization, *Advanced Materials*, 2009, 21(48), 5005-5010
- [12] Kharkar, P. Kiick, K. Kloxin, A. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments, *Chemical Society Reviews*, 2013, 42(17), 7335-7372

- [13] Azagarsamy, M. Anseth, K. Bioorthogonal click chemistry: An indispensable tool to create multifaceted cell culture scaffolds, *ACS Macro Letters*, 2013, 2(1), 5-9
- [14] Gao, L. Zha, G. Wang, Y. et al, An injectable drug-loaded hydrogel using a “clickable” amphiphilic triblock copolymer as a precursor, *Polymer Chemistry*, 2015, 6, 8240-8243
- [15] Polizzotti, B. Fairbanks, B. Anseth, K. Three-dimensional biochemical patterning of click-based composite hydrogels via Thiolene Photopolymerization, *Biomacromolecules*, 2008, 9(4), 1084-1087
- [16] Koehler, K. Alge, D. Anseth, K. et al, A Diels-Alder modulated approach to control and sustain the release of dexamethasone and induce osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Biomaterials*, 2013, 34(16), 4150-4158
- [17] Shih, H. Lin, C. Cross-linking and degradation of step-growth hydrogels formed by thiol-ene photoclick chemistry, *Biomacromolecules*, 2012, 13(7), 2003-2012
- [18] Lee, D. Sung, H. Han, D. et al, *In vitro* Bioassay of Endotoxin Using Fluorescein as a pH Indicator in a Macrophage Cell Culture System, *Yonsei Medical Journal*, 2005, 46(2), 268-274

- [19] Le Guern, F. Mussard, V. Gaucher, A. et al, Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(23), 1-23
- [20] Esmaili, M. Eldeeb, M. Moosavi-Movahedi, A. Current developments in native nanometric discoidal membrane bilayer formed by amphipathic polymers, *Nanomaterials*, 2021, 11(7)
- [21] Proctor, V. Cunningham, F. The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1988, 26(4), 359-395
- [22] Park, H. Guo, X. Temenoff, J. et al, Effect of swelling ratio of injectable hydrogel composites on chondrogenic differentiation of encapsulated rabbit marrow mesenchymal stem cells in vitro, *Biomacromolecules*, 2009, 10(3), 541-546
- [23] Gotham, S. Fryer, P. Paterson W. The Measurement of Insoluble Proteins Using a Modified Bradford Assay, *Analytical Biochemistry*, 1988, 173, 353-358
- [24] Andrey, V. Ryan, S. Ralph, H. Viscosity of Polymer Solutions and Molecular Weight Characterization, *ACS Macro Letter*, 2023, 12(6), 773-779



- [25] Bordwell, F. Harrrelson, J. Lynch, T. Homolytic Bond Dissociation Energies for the Cleavage of  $\alpha$ -N-H Bonds in Carboxamides, Sulfonamides, and Their Derivatives. The Question of Synergism in Nitrogen-Centered Radicals, *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 3337-3341
- [26] Panchompoo, J. Aldous, L. Baker, M. et al. One-step synthesis of fluorescein modified nano-carbon for Pd(ii) detection via fluorescence quenching, *Analyst*, 2012, 137(9), 2054-2062
- [27] Spassov, V. Yan, L. A fast and accurate computational approach to protein ionization, *Protein Science*, 2008, 17, 1955-1970

# Physical properties and drug release of thiol-norbornene photopolymerization-based PEG Hydrogel

**Hyeonbi Jung**

Department of Chemistry  
The Graduate School  
Jeju National University

## Abstract

Poly(ethylene glycol) (PEG) hydrogels have garnered attention as versatile biomaterials in various biomedical applications. These hydrogels can be formed by cross-linking PEG with different polymers or molecules. Among these PEG hydrogels, thiol-ene photopolymerized PEG hydrogels have been extensively researched for diverse biomedical applications such as cell encapsulation, drug delivery, and regenerative medicine. However, information regarding the effects of various factors on these hydrogels is still insufficient. In this study, PEG hydrogels with different network densities were synthesized using thiol-norbornene photo-click chemistry, and the properties and drug release kinetics of the hydrogels were investigated based on their cross-linking density. Additionally, to study drug delivery behavior, lysozyme and fluorescein with different charges were encapsulated in PEG hydrogels, and variations under different pH conditions were observed. Through this experiment, we provide recent research insights into the relationship between the

cross-linking density of thiol-ene photopolymerized PEG hydrogels and drug release. Furthermore, we believe that this research contributes to the advancement of applications in drug delivery systems by allowing the design of monomers based on specific drug requirements.

## 감사의 글

2년 반의 시간이 지나고 어느새 학위논문을 제출하게 되었습니다. 지난 시간 동안 저에게 도움을 주신 분들이 많습니다. 미흡하지만 마무리를 지을 수 있었던 것은 주변에 계신 분들 덕분이기에 감사의 말을 드리고 싶습니다.

먼저 바쁘신 가운데에도 제 학위논문의 심사위원을 맡아주시고 좋은 조언을 해주신 세 분께 감사드립니다. 따뜻한 격려와 조언을 해주신 박경순 교수님과 권태진 교수님께 감사드립니다. 그리고 제 연구를 지도 해주시고 부족한 점을 언제나 세심하고 꼼꼼한 손길로 지적 해주신 배세원 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님의 지도를 통해 연구가 무엇인지, 제게 부족한 점이 무엇인지 어떻게 개선해야 할지에 대해 알 수 있었던 것 같습니다. 교수님의 제자로서 부족함이 없는 연구자가 될 수 있도록 노력하여 성장한 모습 보여드리겠습니다. 앞으로도 잘 부탁드립니다.

그리고 학사 시절부터 항상 따뜻한 격려와 칭찬을 아낌없이 주셨던 임희정 교수님 감사드립니다. 교수님 덕분에 많은 원동력을 얻고 달려올 수 있었던 것 같습니다. 다시 한번 더 감사드립니다.

낮선 연구의 길을 함께 걷고 있는, 제게 많은 힘이 되어줬던 우리 유기화학실험실 친구들 윤슬이와 희주에게 감사드립니다. 그래도 선배인데 항상 받기만 한 것 같아 미안하고 고맙습니다. 하고 싶은 말이 많지만 여기까지 하겠습니다.

항상 놓친 것이 있으면 챙겨주시고 친절하게 알려주신 부준오 선생님, 고하나 선생님, 그리고 현수빈 선생님께 감사드립니다.

즐거운 학과 생활을 함께 보내준 선후배, 그리고 동기 여러분 감사합니다. 좋은 사람들을 만나 너무 행복했던 5년이었습니다.

항상 저를 믿어주시고 응원해주시는 사랑하는 부모님, 할머니께 감사드립니다. 아직 부족한 부분이 많지만, 열심히 성장하여 은혜에 보답할 수 있는 자랑스러운 딸, 손녀가 되도록 하겠습니다.

이외에도 여기에 미처 적지 못한 많은 분께 감사드립니다. 우연으로 만났지만 좋은 인연으로 이어가 여러분께 힘이 될 수 있는 존재가 되고 싶습니다. 감사하고 사랑합니다.