

히알루론산의 온도감응성 그래프트 공중합체

최소영 · 이종휘[†]

중앙대학교 공과대학 화학신소재공학부

(2010년 11월 9일 접수, 2010년 12월 10일 수정, 2010년 12월 18일 채택)

Thermoresponsive Graft Copolymers of Hyaluronic Acid

Soyoung Choi and Jonghwi Lee[†]

Department of Chemical Engineering and Materials Science, Chung-Ang University

221 Heukseok-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-756, Korea

(Received November 9, 2010; Revised December 10, 2010; Accepted December 18, 2010)

초록: 자극감응성 고분자는 다양한 응용에 중요한 역할을 하는 재료로 널리 연구되어오고 있다. 온도감응성을 가지는 히알루론산 공중합체를 카르복실기 고분자와 생체친화성 히알루론산의 아미드 결합을 통하여 연결시켜 합성하였다. 온도 감응성 특징은 두 공중합체 모두에 구현되었으며, 탁도 측정과 rheological 결과는 일치하였다. 두 공중합체 중 elastin-like peptide (ELP)를 그래프트 사슬에 둔 공중합체의 경우가 *N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm) 경우에 비해 보다 완만한 LCST 변화과정을 보여주었다. PNIPAAm과 ELP의 그래프트 부분 함량이 증가함에 따라 점도가 증가하였고, 비슷한 그래프트 함량에서는 PNIPAAm 공중합체의 점도 증가가 컸다. 이러한 결과를 통해 생체친화성의 히알루론산에 그래프트 사슬을 붙임으로써 온도감응성을 부여할 수 있고, 그 특성을 설계할 수 있음을 알 수 있었다.

Abstract: Stimuli-responsive polymers have been investigated as the materials playing the critical roles in various applications. Thermoresponsive graft copolymers, poly(*N*-isopropylacrylamide)-*g*-hyaluronic acid (PNIPAAm-*g*-HA) and elastin-like peptide-*g*-hyaluronic acid (ELP-*g*-HA), were synthesized by coupling carboxylic polymers (PNIPAAm-COOH or ELP) to biocompatible HA through amide linkages. Thermoresponsive behavior was observed in both the copolymers, and the results of turbidity measurement were consistent with the results of rheological examination. Among the two copolymers, the ELP graft copolymer shows less cooperative LCST transition than the PNIPAAm case. As the content of graft chains of PNIPAAm and ELP increases, viscosity increases, and the increase was larger in PNIPAAm case at a graft content. These results shows us that the introduction of grafts provides thermosensitivity to biocompatible HA, whose characteristics can be engineered.

Keywords: hyaluonic acid, hydrogel, *N*-isopropylacrylamide, thermoresponse, stimuli responsive.

서 론

히알루론산은 동물의 조직 세포 내에 들어있는 산성 다당류의 하나로 수산화기가 많아 친수성 물질로 다량의 물을 머금어 젤을 형성하는 성질을 갖는다.¹⁻³ 동물 등의 피부에서 보습효과를 가지며 위와 같은 특성으로 화장품의 원료로 사용되기도 한다. 또한 주사제 및 다양한 약물제제에 널리 사용되고 있다.^{4,5} 이와 같이 생체친화적인 고분자인 히알루론산은 물을 머금어 하이드로젤을 형성하는 성질을 가지지만 물 속에서는 비교적 안정한 상태를 유지하는 반면 고체 상태에서는 상온에서 불안정한 상태를 보인다.

온도감응성을 가지는 물질인 poly(*N*-isopropylacrylamide (PNIPAAm)는 *N*-이소프로필 아크릴아미드(NIPAAm)를 중합시켜 만든다. 이 물질의 수용액 상태는 약 33 °C에서 lower critical

solution temperature (LCST)를 가진다.⁶⁻⁸ 이때 물을 흡수해 부풀어 오른 PNIPAAm이 온도가 LCST 이상이 되면 물을 방출하고 수축하는(상분리) 성질을 가지는데 이는 약물전달을 조절할 수 있는 가능성을 지닌 물질이라 볼 수 있다.⁵

Elastin-like peptide (ELP)는 동물계에 널리 존재하는 elastin의 전구체인 tropoelastin에 흔히 존재하는 다섯 개 아미노산 배열인 GVGVP를 반복단위로 합성된 폴리펩티드이다(G: 글리신, V: 발린, P: 프롤린).⁹ 본 고분자는 π 로 보고된 상 전이를 가지고 있는데, 이는 랜덤 사슬 고분자들인 합성고분자에서 관찰되는 LCST 거동과 유사하나, 본 폴리펩티드의 경우 베타나선형 사슬 구조에서 유래한 단백질 2차구조의 변형과 연관되어 있다는 점이 상이하다. 특히 PNIPAAm의 변이온도와 유사하게 체온 근처에서 변이가 있어 매우 흥미로운 고분자이다. ELP는 아미노산의 변형을 통해 다양한 자극 감응성 및 에너지 변환이 가능하여, 인공근육 등의 목적으로 연구되어 왔다. GVGVP의 기본 구조에 glutamic acid(E)를 도입함으로써 다양한 물질과 화학

[†]To whom correspondence should be addressed.
E-mail: jong@cau.ac.kr

반응도 가능하다.

본 연구에서는 생체친화성 친수성 고분자인 히알루론산에 자극감응성을 가지는 물질을 도입하여 새로운 의료용 고분자 물질을 탐구하고자 한다.^{5,10} 생체고분자인 히알루론산과 ELP 혹은 PNIPAAm의 반응을 이용하여 두 공중합체 물질을 합성하였다. 이제까지 PNIPAAm과 히알루론산의 공중합체는 시도된 바 있으나, ELP와의 공중합체는 보고된 바 없으며, 이 두 공중합체의 체계적인 비교도 보고된 바 없다.¹¹ 이와 같은 실험은 온도감응성을 가지는 생체친화적인 고분자의 제조를 통해 보다 온도에 안정적이며 효율적인 약물전달을 가능하게 할 수 있다.^{12,13} 또한 하이드로젤의 특징을 가짐으로써 조직공학에도 매우 적합한 물질의 제조가 가능하다. 아울러 PNIPAAm과 같이 온도감응성을 가지는 물질 중 하나인 펜타펩티드 구조의 ELP를 이용한 공중합체를 PNIPAAm을 이용한 히알루론산 공중합체와 구조적, 물리적, 화학적 특성을 비교하고, 이를 통해 향후 보다 나은 온도감응성 히알루론산을 개발할 수 있을 것이다.

실 험

시약. 다음 시약들은 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하였다. 히알루론산 sodium salt(HA) ($M_w \sim 1.6 \times 10^6$), *N*-isopropylacrylamide(NIPAAm) (97%), adipic dihydrazide(ADH), *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), 1-hydroxybenzotriazole hydrate(HOBT), 4,4'-azobis(4-cyanovaleic acid)(ACA) 등은 정제과정 없이 사용되었다. *N*-isopropylacrylamide는 *N*-헥산 용액에서 재결정 방법을 통한 정제과정을 거쳐 사용하였다. 즉, 100 mL의 *N*-헥산에 NIPAAm 12 g을 50 °C, 300 rpm으로 2시간 동안 녹여 이 용액을 실리콘 오일에서 온도를 천천히 떨어뜨려 주면서 하루 동안 천천히 결정화시킨 후 PTFE 맵 브레인(0.5 μm, 90 mm)을 이용하여 결정을 얻어냈다. Elastin-like peptide(ELP) [(GVGVP GVGVP GEGVP GVGVP)4(GVGVP)]는 바이오엘라스틱사(U.S.A.)에서 구입하였다. 물(Clomasolv, HPLC)과 *N*-헥산(anhydrous, 95%)는 Sigma-Aldrich(USA)에서 구매하였다. 메틸 알콜(99.9%)은 덕산(Korea)에서 구입하였다.

PNIPAAm-COOH의 합성(과정1). 5 g의 *N*-이소프로필 아크릴 아미드(NIPAAm)와 60 mg의 4,4'-azobis(4-cyanovaleic acid)를 25 mL 메틸알콜에 녹여 20 wt% 단량체 용액을 만든다. 위 용액을 질소 분위기에서 68 °C 3시간 동안 방치한 뒤에 60 °C의 물에 넣어 PNIPAAm-COOH를 침전시킨다. 침전물을 2번 정도 뜨거운 물로 씻어준 뒤 20 °C의 물에 다시 녹인 후 -50 °C에서 동결건조시킨다. 위 과정의 반응식은 Figure 1과 같다.

ELP의 경우에는 물질 자체에 반응기인 카르복실기가 존재하여 별도의 합성과정은 필요하지 않다.

HA의 기능기 도입(과정2). 0.5 g의 히알루론산을 100 mL 물에 녹여 5 mg/mL 용액을 만든다. 10 g의 ADH를 위 용액에 넣는다. 0.8 g EDC와 0.7 g HOBT를 5 mL DMSO와 5 mL 물에 녹인다. 위 용액을 히알루론산과 ADH를 넣은 용액에 넣고, 1 N HCl 용액을 이용하여 pH를 5.0에 맞춰준다. 24시간 동안 상온에서 교반시킨 뒤 MWCO 10000 삼투막(CelluSep®H1 high grade regenerated, cellulose

tubular membranes Membrane Filtration Products, Seguin, U.S.A.)을 이용하여 3일 동안 투석과정을 거친다(2000 mL의 물을 기준으로 24시간에 한번씩 물을 교체). 투석과정 후 염화나트륨을 넣어 5% (w/v) 용액을 만들어 주고 500 mL의 에틸 알코올에서 침전을 시킨다. 이 침전물을 물에 다시 녹인 후 MWCO 10000 삼투막을 이용하여 다시 3일 동안 투석과정을 거친 후 액체 질소로 얼려 동결건조(FD-1000, EYELA, Japan)시킨다. 위 과정의 반응식은 Figure 2와 같다.

HA 그래프트 공중합체 합성(과정3). 0.1 g HA를 20 mL 물에 녹여 5 mg/mL 용액을 만든다. PNIPAAm-COOH(혹은 ELP)와 EDC의 무게비를 각각 5/1, 10/1, 20/4으로 녹여 48시간 동안 4 °C에서 보관한다. 위 용액을 각각 5 mg/mL HA 용액에 넣은 후 24시간 상온에서 교반한다. MWCO 25000 삼투막을 이용하여 5일간 투석과정을 진행한 뒤 동결건조 한다. 위 과정의 반응식은 Figure 3과 같다.

분석. FTIR(Fourier transform infrared spectroscopy: Magna 750, Nicolet, U.S.A.)을 이용하여 합성을 확인하였으며 NMR 600 MHz(nuclear magnetic resonance: VNS, Varian, U.S.A.)를 이용하여 합성을 확인하였다.

광학현미경(BX51TRF, Olympus, Tokyo Japan)을 이용하여 온도에 따른 탁도(turbidity)를 측정하였다. 온도 측정 가능 범위는 ±

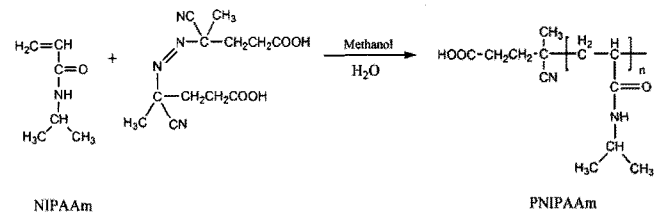


Figure 1. Synthesis scheme of PNIPAAm-COOH.

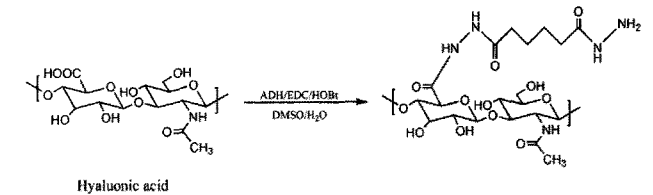


Figure 2. Synthesis scheme of HA-NH₂.

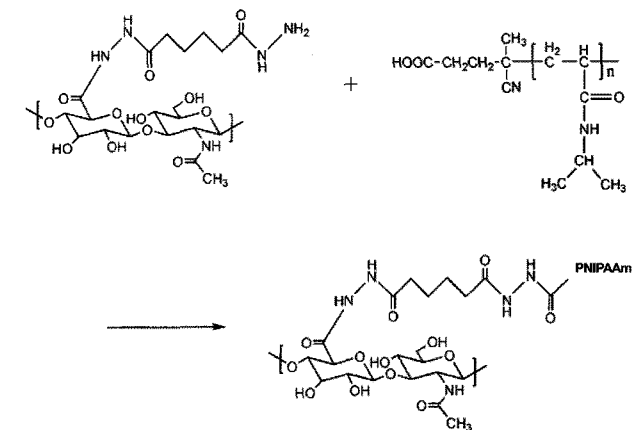


Figure 3. Synthesis scheme of PNIPAAm-*g*-HA.

0.1 °C이며 PNIPAAm-*g*-HA와 ELP-*g*-HA를 물에 녹여 2 wt%의 용액을 만들어 슬라이드글라스 위에 0.1 mL를 떨어뜨리고, 증발을 막기 위해 커버글라스로 덮은 뒤에 측정하였다. 또한 온도는 각 온도에서 1분 동안 방치 후에 광학현미경으로 측정하였다. 이 과정은 총 3번을 반복하여 측정하였다.

Rheometer(CVOD 1000NF Rheometer, Malvern Instrument, UK)를 이용하여 온도 변화에 따른 점도(viscosity)를 측정하였으며 온도 범위는 25에서 40 °C까지 측정하였으며 shear stress는 5 Pa로 고정하여 측정하였다. 또한 온도 변화 속도는 2 °C/min으로 진행하였다. 위 과정은 총 5번을 진행하였으며 각 값들의 평균값을 결과값으로 하였다.

결과 및 토론

HA 그래프트 공중합체의 합성 및 분석. 최종 반응 물질은 FTIR과 NMR을 통해 치환율과 반응을 확인하고 히알루론산과의 반응물질과 반응비에 따른 물리적, 화학적 특성을 확인하였다.¹⁴

과정1의 수득률은 92.5%, 과정2의 수득률은 89.8%, 과정3의 수득률은 HA와 PNIPAAm-COOH의 반응비에 따라 1:0.5에서는 95.5%, 1:1에서는 96.2%, 1:2에서는 95.1% 이었다. 또한 HA와 ELP의 반응비에 따라 1:0.5에서는 95.5%, 1:1에서는 94.4%, 1:2에서는 93.0% 이었다. 성공적으로 각 작용기의 conjugation과 그래프트화 반응이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

PNIPAAm(ELP)-*g*-HA은 HA:PNIPAAm(혹은 ELP)가 1:0.5, 1:1, 1:2의 무게비로 반응이 되었으며 NMR을 통해 치환된 정도를 확인하였다. PNIPAAm과 HA의 반응에서는 1:0.5 비율에서 49.1 wt%, 1:1반응에서 62.8 wt%, 1:2반응에서 78.1 wt%의 치환율을 확인하였다. 또한 HA와 ELP의 반응에서의 치환 정도는 1:0.5 비율에서 20.3 wt%, 1:1 비율에서 37.6 wt%, 1:2 비율의 반응에서는 58.8 wt%의 치환율을 확인하였다.

각 반응을 확인하기 위해 FTIR 피크와 NMR 피크를 확인해 보았다. Figure 5는 FTIR 결과를, Figure 6은 NMR 결과를 보여준다. 이를 통해 성공적인 합성을 확인할 수 있었다.

우선 Figure 4(a)의 1410 cm⁻¹로 NIPAAm의 CH₂의 이중결합이 끊어지는 것을 확인하였고, Figure 4(b)의 1621 cm⁻¹로 NIPAAm의 C=C 이중결합이 끊어지는 것을 확인하였고, Figure 4(c)의 3200~3600 cm⁻¹ 사이의 넓은 피크를 통해 PNIPAAm의 카르복실기를 확인하였다.

최종 반응 물질인 PNIPAAm-*g*-HA와 ELP-*g*-HA의 1651 cm⁻¹의 FTIR 피크는 하이드로카본 구조의 CH₂에서 나타나며 PNIPAAm과 ELP만이 가지고 있는 부분이다. 따라서 HA의 피크에는 나타나지 않음을 Figure 5에서 확인하였다.

PNIPAAm(혹은 ELP)과 PNIPAAm(혹은 ELP)-*g*-HA의 합성을 Figure 6에 보이는 NMR 피크를 통해서도 확인할 수 있다. PNIPAAm의 CH₃는 1.1 ppm (a), CH₂와 CH는 1.5 ppm (b), NH는 3.8 ppm (c)에서 확인가능하고 ELP의 CH₃는 1.0 ppm (e), CH는 2.1 ppm (f)에서 확인된다.

공중합체 수용액 점도의 온도감응성. Rheological 측정은 25에서 37 °C까지 점도를 측정하였다.¹⁵ 이는 체내 온도를 염두에 둔 약물전

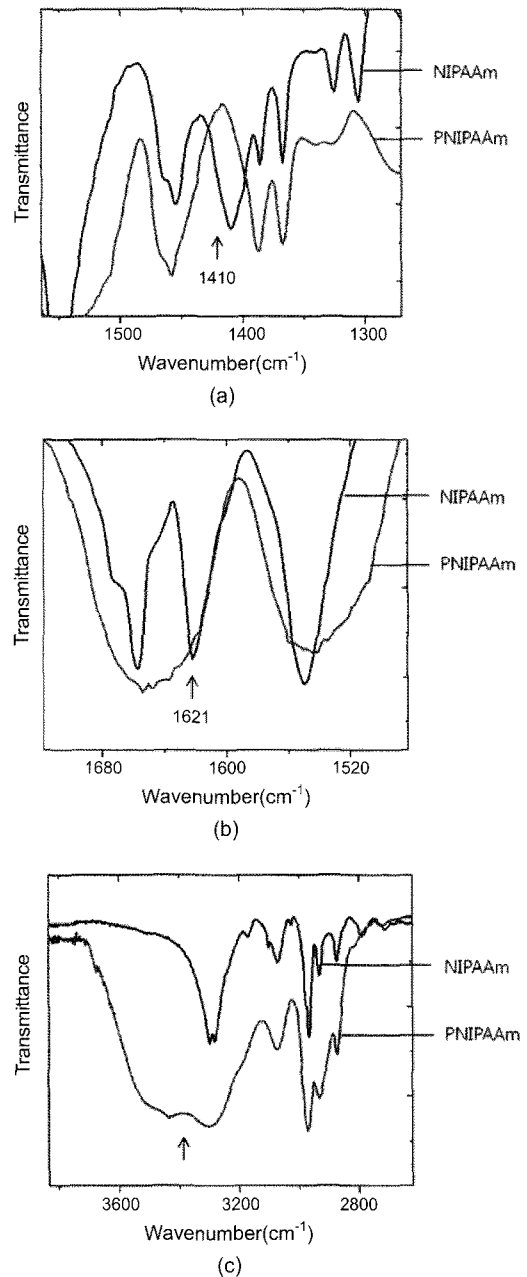


Figure 4. FTIR spectra of NIPAAm and PNIPAAm.

달 분야에 적용할 때 그 거동을 파악하기 위한 것이며, 37도 이상의 고온에서는 물질의 층 분리 현상으로 정확한 측정이 어려웠다. 이 실험은 각각의 고분자를 물에 녹여 4 wt% 용액을 만든 후 5 Pa의 일정한 전단력을 가해주었을 때 생기는 점도를 rheometer로 측정하였다. PNIPAAm(혹은 ELP)-*g*-HA 최종 합성물의 온도에 따른 점도의 변화는 Figure 7과 같다. 각 고분자에서 주사슬과 그래프트 사슬의 비에 따라 점도의 차이를 볼 수 있는데, PNIPAAm이나 ELP의 상대적인 반응비가 클수록 점도가 커지는 것을 확인할 수 있다. 즉 그래프트 부분이 늘어날수록 점도는 증가하였다. 치환율에 따른 비교 또한 PNIPAAm과 ELP가 HA에 치환된 정도가 비슷하더라도 상이한 결과를 보여주는데, PNIPAAm-*g*-HA이 ELP-*g*-HA에 비해

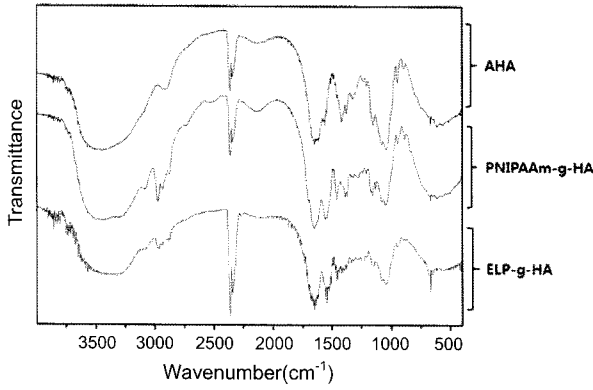


Figure 5. FTIR spectra of HA, PNIPAAm-*g*-HA and ELP-*g*-HA.

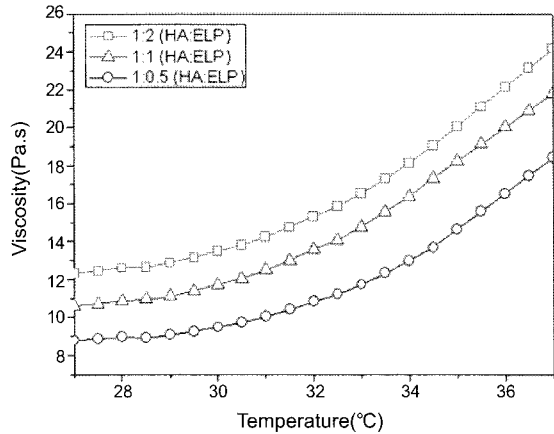
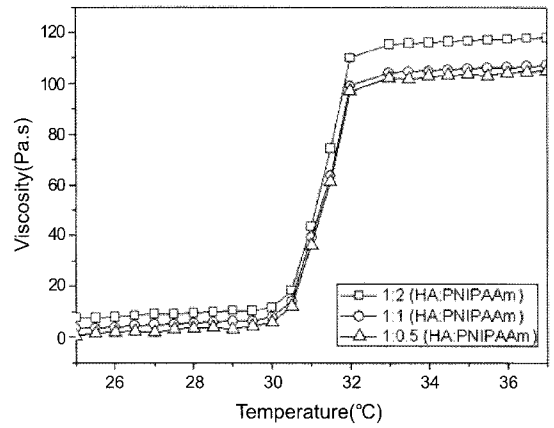


Figure 7. Viscosity of PNIPAAm (or ELP)-*g*-HA as a function of temperature (4 wt% aq. solution).

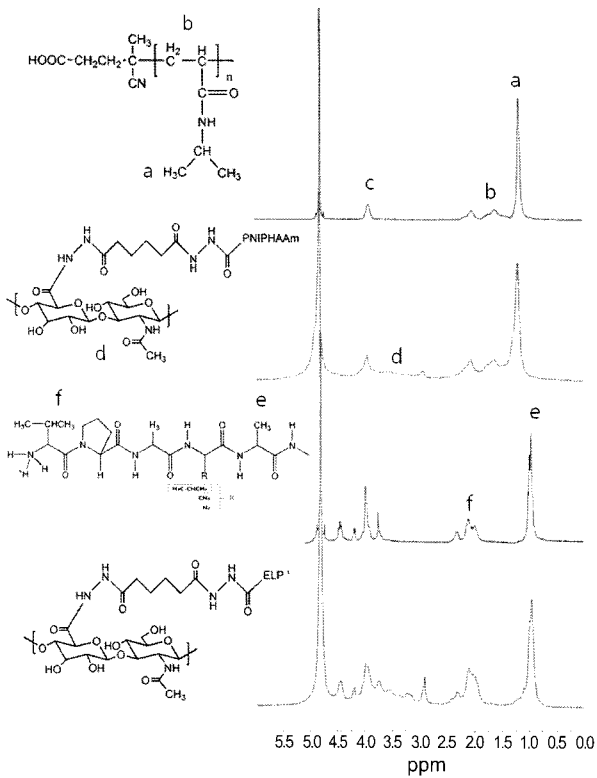


Figure 6. ¹H NMR spectra of PNIPAAm (or ELP) and PNIPAAm (or ELP)-*g*-HA.

높은 점도를 가짐을 알 수 있다.

또한 PNIPAAm-*g*-HA이 LCST를 갖는 것을 확인할 수 있으며 이는 약 30 °C에서 나타난다.¹⁶ ELP-*g*-HA는 매우 완만한 전이가 상당히 넓은 온도 영역에서 존재하여, LCST로 볼 수 있는 명확한 전이온도를 파악하기 어려웠다. ELP의 경우도 PNIPAAm-*g*-HA와 같이 반응비가 클수록 점도가 커지는 것을 볼 수 있다. 또한 전체적으로 PNIPAAm-*g*-HA에 비해 매우 낮은 점도를 갖는다는 것을 확인할 수 있다.

공중합체 수용액 탁도의 온도감응성. 온도에 따른 탁도를 측정하여 고분자들의 온도감응성을 파악할 수도 있다. 이 측정은 2 wt%의 용액 상태에서 측정하였으며 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

Figure 8은 온도 변화에 따라 투명한 용액이 불투명한 용액으로 바

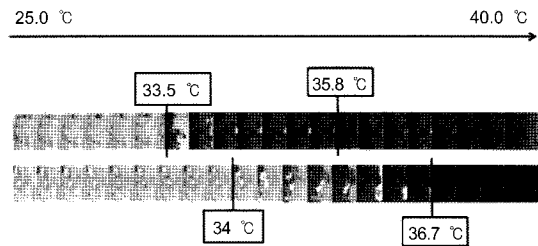


Figure 8. Turbidity change of PNIPAAm-*g*-HA (a) and ELP-*g*-HA (b) 2 wt% aq. solution as a function of temperature.

뀌는 과정을 온도에 따라 보여주고 있다. Rheological 측정과는 미세한 차이를 보이는데 PNIPAAm-*g*-HA의 LCST가 약 30 °C이며 33.5 °C에서는 이미 일정한 점도를 가지지만 탁도변화에서는 33.5 °C가 되어야 용액의 투명도가 변화하는 것을 볼 수 있다. 이는 온도 상승 속도의 차이가 샘플의 크기 및 주위 환경에 의해 차이가 나서 생긴 결과로 사료된다.

또한 점도 측정에서는 LCST를 명확하게 확인하기 힘들었던 ELP-*g*-HA에서도 변화점은 존재하는데 PNIPAAm-*g*-HA보다 약간 높은 온도인 34 °C에서 나타나는 것을 확인할 수 있다. 또한 모든 용액이 완전히 불투명해지는 순간은 ELP-*g*-HA는 35.8 °C, PNIPAAm-*g*-HA는 36.7 °C이었다.

선형 HA의 주사슬에 그래프트 사슬이 많이 붙을수록 점도가 상승하

였으며, 그래프트 사슬의 온도감응성 상변화 특성을 그래프트 공중합체에서도 그대로 나타내었다. 이로써 주사슬에 비해 상대적으로 소수성의 그래프트 사슬이 수용액 상에서 점도, 상변이 등에 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 점도는 같은 농도에서 PNIPAAm-*g*-HA가 ELP-*g*-HA보다 큰 점도를 가지며 이는 분자량의 차이일 수도 있으나, 랜덤 사슬과 베타나선형의 사슬 구조 차이일 수도 있을 것으로 사료된다. PNIPAAm-*g*-HA의 경우 온도에 따른 급격한 점도 변화와 탁도 변화를 보여주는데, 반대로 ELP-*g*-HA에서는 다소 완만한 변화를 보여준다. 완만한 변화는 cooperativity가 떨어지는 상전이로, 그래프트 사슬의 이차구조의 차이에 기인하는 것으로 판단된다. 즉, PNIPAAm의 랜덤 사슬 구조와 ELP의 정형화된 나선형 구조가 상전이의 cooperativity 차이를 가져오는 것으로 판단되며, 이는 기존의 T_i 전이와 LCST 전이의 설명과 일치한다.¹⁷

결 론

히알루론산 생체고분자에 자극감응성을 가지는 사슬을 conjugation 시켜 그래프트 공중합체를 합성하였다. 반응 물질의 반응비를 변화시켜 주사슬과 그래프트 사슬의 무게비를 변화시킬 수 있었다. PNIPAAm-*g*-HA는 치환율이 커질수록, 온도가 올라갈수록 점도가 높아지는 것을 확인하였으며 치환율에 상관없이 30 °C 부근에서 명확한 LCST를 보인다. 또한 33.5 °C에서 탁도 변화를 확인할 수 있다. ELP-*g*-HA는 점도 측정에서는 PNIPAAm과 같은 LCST는 파악하기 어려웠으나, 치환 정도와 온도의 증가가 점도와 비례함을 확인하였으며, 탁도 변화 측정에서는 PNIPAAm-*g*-HA와 비슷한 34 °C에서 LCST를 확인할 수 있었다. 이러한 자극감응성 히알루론산은 약물방출과 조직공학 등 다양한 연구분야에 활용할 수 있는 가능성을 보여준다.

감사의 글: 이 논문은 2010년도 중앙대학교 연구 장학 기금 지원에 의한 것임.

참 고 문 헌

1. J. L. Drury, *Biomaterials*, **24**, 4337 (2003).
2. H. Tan, C. M. Ramirez, N. Miljkovic, H. Li, J. P. Rubin, and K. G. Marra, *Biomaterials*, **30**, 6844 (2009).
3. K. Moriyama, T. Ooya, and N. Yui, *J. Control. Release*, **59**, 77 (1999).
4. D. I. Ha, S. B. Lee, M. S. Chong, Y. M. Lee, S. Y. Kim, and Y. H. Park, *Macromol. Res.*, **14**, 87 (2006).
5. I. L. Hong and Y. J. Kim, *Polymer(Korea)*, **32**, 561 (2008).
6. J. H. Cho, S. H. Kim, K. D. Park, M. C. Jung, W. I. Yang, S. W. Han, J. Y. Noh, and J. W. Lee, *Biomaterials*, **25**, 5743 (2004).
7. S. Ifuku and J. F. Kadla, *Biomacromolecules*, **9**, 3308 (2008).
8. M. K. Yoo, Y. K. Sung, Y. M. Lee, and C. S. Cho, *Polymer*, **41**, 5713 (2000).
9. D. Urry, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 11007 (1997).
10. X. Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M. C. Roberts, and G. D. Prestwich, *Biomacromolecules*, **3**, 1304 (2002).
11. S. Ohya, Y. Nakayama, and T. Matsuda, *Biomacromolecules*, **2**, 856 (2001).
12. K. Y. Yuk, Y. M. Choi, J. S. Pack, S. Y. Kim, G. N. Pack, and K. M. Huh, *Polymer(Korea)*, **33**, 469 (2009).
13. H. G. Ho, S. H. Pack, C. H. Pack, and J. H. Lee, *Polymer(Korea)*, **33**, 353 (2009).
14. Z. Zhao, Z. Li, Q. Xia, H. Xi, and Y. Lin, *Eur. Polym. J.*, **44**, 1217 (2008).
15. D. Mortisen, M. Peroglio, M. Alini, and D. Eglin, *Biomacromolecules*, **11**, 1261 (2010).
16. J. P. Chen and T. H. Cheng, *Polymer*, **50**, 107 (2009).
17. J. Lee, C. Macosko, and D. Urry, *Macromolecules*, **34**, 4114 (2001).