



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.

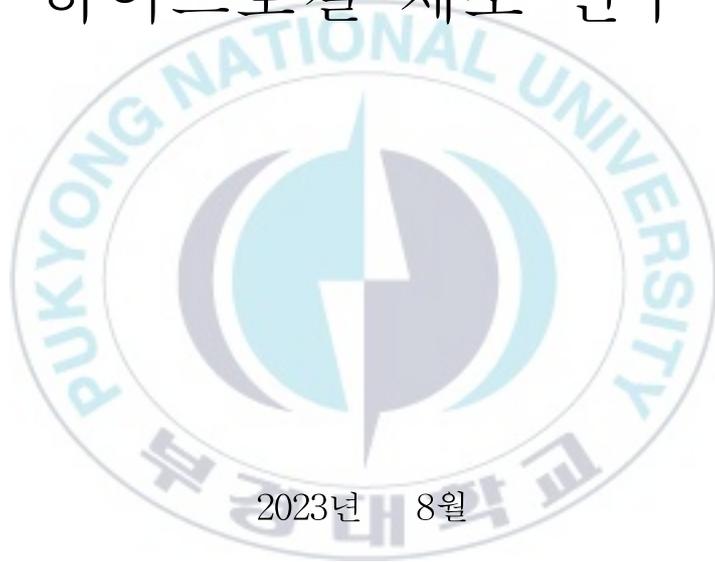
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

공 학 석 사 학 위 논 문

IEDDA 클릭 반응을 이용한 생체직교성
히알루론산계 약물 전달
하이드로겔 제조 연구



2023년 8월

부경대학교 대학원

스마트그린기술융합공학과

주 수 빈

공 학 석 사 학 위 논 문

IEDDA 클릭 반응을 이용한 생체직교성
히알루론산계 약물 전달
하이드로겔 제조 연구

지도교수 임 권 택

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함.

2023년 8월

부경대학교 대학원

스마트그린기술융합공학과

주 수 빈

주수빈의 공학석사 학위논문을 인준함.

2023년 8월 18일



위원장 이학박사 김 용 현 (인)

위원 공학박사 백 강 준 (인)

위원 이학박사 임 권 택 (인)

목 차

목차	i
표 목차	iii
그림 목차	iii
ABSTRACT	iv
제 I 장 서 론	1
제 II 장 이 론	5
2.1 하이드로겔	5
2.2 히알루론산	6
2.2.1 히알루론산의 역사	6
2.2.2 히알루론산의 생산	7
2.2.3 히알루론산의 구조	7
2.2.4 히알루론산의 인체 내 합성과 분해	8
2.2.5 히알루론산의 분자량과 생물학적 기능	9
2.2.6 히알루론산의 개질	10
2.2.7 히알루론산의 응용 분야	11
2.3 IEDDA 클릭 반응	13
제 III 장 실 험	15
3.1 시약	15
3.2 분석	15
3.3 전구체 합성 및 하이드로겔 제조 과정 요약	16
3.4 (4-(Cyano)Benzylamino)-5-Oxopentanoic Acid의 합성	16
3.5 Tetrazine(benzylamino)-5-Oxopentanoic Acid의 합성	17
3.6 PEG-ditetrazine(PEG-DTz) 가교제의 합성	18
3.7 HA-Nb의 합성	19
3.8 하이드로겔의 제조	20

3.9 유변학적 특성 연구.....	20
3.10 팽윤도 연구.....	21
3.11 표면 및 내부 단면 연구.....	21
3.12 약물 로딩 및 방출 연구.....	22
3.13 전구체와 하이드로겔의 시험관 내 세포독성.....	23
제 IV장 결과 및 고찰.....	24
4.1 PEG-DTz의 합성.....	24
4.2 HA-Nb의 합성.....	26
4.3 하이드로겔의 제조 및 특성화.....	28
4.4 하이드로겔의 겔화 시간 및 기계적 특성.....	30
4.5 하이드로겔의 팽윤도 연구.....	31
4.6 하이드로겔의 표면 및 내부 단면 분석.....	32
4.7 약물 로딩 및 방출 연구.....	34
4.8 전구체 및 빈 하이드로겔의 시험관 내 세포 적합성.....	35
제 V 장 결 론.....	38
제 VI 장 참고 문헌.....	39

표 목차

[표 1] PTHG 하이드로겔의 제조 비율과 겔화 시간.....	20
-------------------------------------	----

그림 목차

[그림 1] 히알루론산의 구조.....	8
[그림 2] 히알루론산의 인체 내 합성과 분해.....	9
[그림 3] 히알루론산의 개질.....	11
[그림 4] 히알루론산의 응용 분야.....	13
[그림 5] IEDDA 클릭 반응을 이용한 약물 방출 하이드로겔의 제조 과정.....	16
[그림 6] PEG-DTz의 특성화. (a) ^1H NMR 스펙트럼, (b) FTIR 스펙트럼.....	25
[그림 7] HA-Nb의 특성화. (a) HA-Nb의 ^1H NMR 스펙트럼, (b) HA와 HA-Nb의 FTIR 스펙트럼.....	27
[그림 8] 제조된 하이드로겔. (a) 하이드로겔 사진(왼쪽부터 각각 PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C), (b) 하이드로겔의 주사 가능성을 보여주는 사진, (c) PTHG-B의 FTIR 스펙트럼.....	29
[그림 9] PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C 하이드로겔의 유변학적 특성. (a-c) 겔화 시간의 함수로서 storage modulus(G')와 loss modulus(G''), (d-f) angle frequency sweep 테스트.....	31
[그림 10] PBS(pH 7.4)에서 하이드로겔의 팽윤 특성. (초기 4시간 동안 하이드로겔의 팽윤을 보여주는 삽입도).....	32
[그림 11] 하이드로겔의 표면(좌) 및 단면(우)의 주사 전자 현미경(SEM) 이미지. (a) PTHG-A, (b) PTHG-B, (c) PTHG-C.....	33
[그림 12] 20% 예탄올을 함유한 PBS 내 하이드로겔 PTHG-B의 시험관 내 Curcumin 방출 거동.....	35
[그림 13] HEK-293 세포의 시험관 내 세포적합성. (a) HA-Nb, (b) PEG-DTz, (c) 하이드로겔(PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C).....	37

Bioorthogonal Hyaluronic Acid-Based Hydrogels Developed by IEDDA Click Reaction for Drug Delivery Application

Soo-Bin Joo

Department of Smart Green Technology Engineering,
The Graduate School, Pukyong National University

Abstract

In this work, we developed injectable hydrogels derived from hyaluronic acid (HA) modified with norbornene (Nb) and a cross-linker composed of polyethylene glycol (PEG) with tetrazine (Tz) functional groups. The hydrogels exhibited high biocompatibility and rapid absorption. The porosity of the hydrogels was created through the release of nitrogen gas as a by-product during the cross-linking reaction known as inverse electron demand Diels-Alder (IEDDA). By adjusting the molar ratio of HA-Nb and PEG-DTz (Nb:Tz = 10:2.5, 10:5, 10:10), we could control the porosity, gelation time, mechanical strength, and swelling properties of the hydrogels. The gelation process was quick, taking less than 100 seconds, which suggests the potential for their use as injectable drug delivery systems. The hydrogels exhibited rapid swelling and high swelling ratios due to the presence of PEG chains and a highly porous structure. They effectively encapsulated curcumin, with an encapsulation efficiency of approximately 99%, and released the curcumin in a controlled manner. The cytotoxicity evaluation conducted on HEK-293 cells demonstrated no harmful effects of the PEG-DTz cross-linker, HA-Nb, and resulting hydrogels. Overall, these absorbent hydrogels, fabricated from HA-Nb and the IEDDA clickable cross-linker, hold great promise as biocompatible drug carriers for injectable drug delivery applications.

제 I 장 서 론

과거 몇십 년간 고분자 화합물, 리포솜, 나노입자, 마이셀, 하이드로겔과 같은 여러 가지 약물 전달 시스템이 생체 이용률이 낮은 치료제의 전달 또는 제어된 방출을 위해 이용되었다[1]. 하이드로겔은 친수성 고분자 사슬의 가교 및 3차원 네트워크 구성으로 대량의 물 또는 생체액을 흡수하고, 내부 네트워크에 치료용 분자를 캡슐화할 수 있어 약물 전달 분야에서 큰 주목을 받고 있다. 이러한 이점과 관계없이, 전통적인 하이드로겔은 약성 부위로의 이식을 위해 수술 절차가 필요하였다. 이 문제를 해결하기 위해 어떤 형태로든 성형될 수 있는 주사 가능한 하이드로겔이 약물 전달에 있어 큰 관심을 모으고 있다. 이러한 주사 가능한 하이드로겔은 천연 세포 외 기질의 극도로 수화된 3D 미세 환경을 모방할 뿐만 아니라, 치료용 분자를 질병 부위에 전달할 수 있다. 주사 가능한 하이드로겔은 sol-gel 상전이[2], in-situ 중합[3] 및 물리적 또는 화학적 가교 전략[4]을 사용하여 합성 또는 천연 중합체에 의해 설계될 수 있다.

생체 모방의 관점에서 볼 때, 이상적인 주사용 하이드로겔은 빠른 흡수력을 가져야 한다. 즉, 다량의 물을 흡수할 수 있고, 산소, 영양소, 성장 인자, 치료용 화합물 등의 충분한 공급을 촉진하기 위해서는 연결된 기공을 갖추고 있어야 하며, 천연 조직 환경을 모방해야 한다[5]. 이전에 보고된 자료는 다공성이 높은 하이드로겔이 비다공성 하이드로겔에 비해 몇 가지 이점을 가지고 있음을 보여주었다[6]. 천연 고분자 기반의 다공성 하이드로겔은 다양한 첨가제 및 접근법을 사용하여 개발될 수 있다. 예를 들어, 젤라틴 유래의 다공성 스캐폴드는 에멀전 템플릿 방법에 의해 개발되었다[7]. 이러한 목적을 위해, 젤라틴 방울은 먼저 유화에 의해 설계되고, 이후 미소 구체를 생성하여 genipin 가교제에 의해 안정화되었으며, 나중에 젤

라틴 기반의 다공성 하이드로겔의 개발을 위한 템플릿으로 사용되었다. 하이드로겔은 매크로 다공성과 연동 네트워크를 가지고 있으며, 마이크로스피어의 직경을 변경함으로써 기공 크기를 프로그래밍할 수 있음이 입증되었다. 그러나, genipin 가교제는 생성된 다공성 물질의 생체 적합성을 포함할 수 있다. Porogen 침출은 하이드로겔에 다공성을 새기는 또 다른 방법으로, 몰드에 주조기 전에 무기염(염화나트륨, 설탕 결정 등)을 고분자 용액과 혼합하는 것을 의미한다[8]. 이어서, 하이드로겔을 동결건조하고, 염입자를 행구어 하이드로겔에 다공성을 생성한다. 그럼에도 불구하고, 기공 크기의 큰 차이, 상호 연결성의 부족 및 불균일한 기공 형상은 이 기술의 사용을 제한하였다. 동결건조는 또한 다공성 하이드로겔의 형성에도 널리 이용되어 왔다[9]. 그러나 다공성 하이드로겔의 기공 크기의 제어가 불충분하고, 생성된 다공성 하이드로겔의 구조적 안정성이 낮기 때문에, 동결건조 기술은 실용성이 떨어진다.

최근 카르보다이미드 화학을 통해 히알루론산(HA)과 시스타민으로부터 in-situ 기포 생성 절차로 제조된 다공성 하이드로겔이 개발되었다[10]. 구체적으로, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide(EDC)와 N-hydroxy-succinimide(NHS)는 커플링 반응 동안 부산물로서 이산화탄소 가스를 방출하여 하이드로겔 네트워크에 기공을 생성한다. 이 접근법은 간단하지만 EDC 및 NHS 커플링제는 원치 않는 세포독성을 유발할 수 있으며, 주사 가능한 약물 전달 시스템에 안전한 것으로 간주되지 않는다. 주목할 점은 위에서 언급한 대부분의 접근법이 세포독성 시약을 사용하거나 주사 가능한 하이드로겔에 적합하지 않은 파괴적인 기술을 사용하며, 이를 환부에 주사할 가능성을 배제한다는 것이다. 따라서 보다 우수한 생체 적합성을 갖는 다공성 및 주사 가능한 하이드로겔은 생물 의학적 응용에 매우 필요하다.

다양한 고분자 재료를 사용하여 다공성 및 주사 가능한 하이드로겔을 제조할 수 있다. 히알루론산(HA)은 반복 이당류인 β -1,4-D-glucuronic acid와 β -1,3-N-acetyl-D-glucosamine의 교대 단위로 구성된 천연 선형 다당류이다. HA는 탁월한 세포 적합성과 생분해성으로 인해 약물 전달에서 유망한 재료 중 하나로 손꼽히고 있다[11-14]. 많은 이점이 있음에도 불구하고, HA는 약한 기계적 특성과 빠른 분해 특성을 지닌다[15]. HA의 기계적 강도 및 분해 특성은 glutaraldehyde, genipin 및 EDC와 같은 공유결합 가교제에 의해 이전에 개선되었다. 이러한 가교제는 안정한 하이드로겔을 생성하지만, 높은 세포독성이 보고되었다[16].

최근, 클릭 화학은 공유 가교 하이드로겔을 설계하기 위한 유망한 접근법으로 간주되고 있다[17,18]. 특히, 노르보넨(Nb) 작용기와 테트라진(Tz) 작용기 사이의 Inverse electron demand Diels-Alder(IEDDA) 클릭 반응은 하이드로겔 합성을 위한 생체 적합성이 높은 접근법으로 간주되어 왔다 [19]. IEDDA 반응은 높은 화학적 선택성과 초고속 반응 속도를 가지며 [20], 온화한 조건에서 촉매가 없는 환경에서 수행될 수 있다. 흥미롭게도, 이 반응의 유일한 부산물은 독성이 없는 질소 가스로, 주사 가능한 약물 전달 응용에 적합하다[21-23]. 또한, 방출된 질소 가스는 하이드로겔에 기공을 생성할 수 있고[20], 이 다공성 구조는 결과적으로 하이드로겔의 약물 캡슐화 및 방출 성능을 조절할 수 있다[24]. 또한, Tz 또는 가교제의 양에 따라 하이드로겔의 겔화 시간을 몇 초에서 몇 분으로 조정할 수 있으므로 이러한 물질을 주사 가능하게 할 수 있다.

본 연구에서는 Nb으로 기능화된 HA(HA-Nb)와 PEG 양단에 Tz 작용기를 갖는 수용성 가교제(polyethylene glycol-ditetrazine, PEG-DTz)를 사용하여 생체 적합성이 높고 흡수가 빠른 주사용 하이드로겔을 개발하였다. PEG-Tz 가교제는 간단한 카르보디이미드 반응을 통해 합성되었다.

PEG-DTz와 HA-Nb는 수용성이 높은 전구체이고, IEDDA 클릭 반응은 생체 직교성이 높아 생체 적합성이 우수한 하이드로겔을 제조할 수 있었다. 가교제의 몰비(Nb:Tz = 10:2.5, 10:5, 10:10)를 변경하여 세 가지의 하이드로겔을 개발하였다. 하이드로겔은 빠르게 형성되었으며(sol-gel time < 100초) 주사 가능한 약물 전달 시스템으로 사용될 가능성을 제공한다. IEDDA 반응 중에 방출된 질소 가스는 높은 다공성 구조를 형성하였고, 이러한 구조는 하이드로겔로부터의 약물 방출을 조절할 수 있다. 제조된 하이드로겔의 실험 데이터는 PEG 사슬의 존재와 하이드로겔의 높은 다공성 구조로 인해 급속한 팽윤을 보여준다. Curcumin(강황에서 유래한 소수성 생체 활성제)은 하이드로겔의 약물 로딩 및 방출 거동을 평가하기 위한 치료용 분자로 사용되었다. 하이드로겔은 많은 양의 Curcumin(약 99%)을 캡슐화할 수 있었으며, 일시적인 패턴으로 방출하였다. PEG-DTz 가교제, HA-Nb 및 제조된 하이드로겔은 HEK-293 세포에서 세포독성을 나타내지 않아 이들 하이드로겔의 우수한 생체 적합성을 보여주었다. 우수한 생체 적합성을 지닌 이러한 빠른 흡수성 및 주사 가능성을 나타내는 하이드로겔은 주사 가능한 약물 전달 응용을 위한 유망한 약물 운반체가 될 수 있다.

제 II 장 이 론

2.1 하이드로겔

하이드로겔(hydrogel)은 주로 물로 구성된 혼합물이다. 친수성 구조로 인해 3차원 네트워크에 다량의 물을 흡수 및 보유할 수 있으며, 수분 함량이 높아 천연 조직과 유사한 높은 유연성을 가진다. 물을 흡수하는 하이드로겔의 능력은 폴리머 백본에 부착된 친수성 작용기에서 발생하는 반면, 용해에 대한 저항성은 네트워크 사슬 사이의 가교에서 발생한다. 최근 하이드로겔은 고분자 사슬과 그 사슬 사이의 공간을 채우는 물의 3차원 네트워크로 구성된 2성분 또는 다성분 시스템으로 정의되었다. 평형 상태에서 이러한 물질은 사용된 폴리머의 특성과 네트워크 접합부의 밀도에 따라 다양한 양의 물을 포함할 수 있다. 일반적으로 팽윤된 상태에서 하이드로겔의 물의 질량 비율은 폴리머의 질량 비율보다 훨씬 높다[25].

이상적인 하이드로겔 재료의 기능적 특징은 식염수에서 가장 높은 흡수 용량을 가지며, 적용 요건에 따라 입자 크기 및 다공성을 조절하여 원하는 흡수율을 얻을 수 있어야 한다. 무색, 무취, 무독성으로 분해 후 독성 중의 형성 없이 높은 생분해성을 가져야 하며 팽윤 환경 및 보관 시 최고의 내구성과 안정성을 제공해야 한다[26]. 특히, 약물 전달에 사용되는 하이드로겔은 다공성이어야 하며, 이는 pH 또는 온도에 반응해야 한다. 하이드로겔 합성 시 다양한 합성 소재 또는 천연 소재들이 사용되고 있고, 지난 수십 년간 약물 전달을 위한 생체 재료로서 주목받고 있으며 이와 관련된 많은 연구가 이루어지고 있다.

2.2 히알루론산

히알루론산(hyaluronic acid, HA)은 천연 고분자로, 다양한 범위에서 응용되는 물질이다. 하이드로겔 제조를 위한 천연 고분자 중 하나인 HA는 히알루로난(Hyaluronan)이라고도 하며, 자연계에 널리 퍼져 있으면서 인간과 동물, 박테리아 등에 존재한다. 친수성 분자인 HA는 세포 주위에 분포하며 세포막을 형성하고, 결합 조직의 세포 외 기질(extracellular matrix, ECM)에 존재한다.

2.2.1 히알루론산의 역사

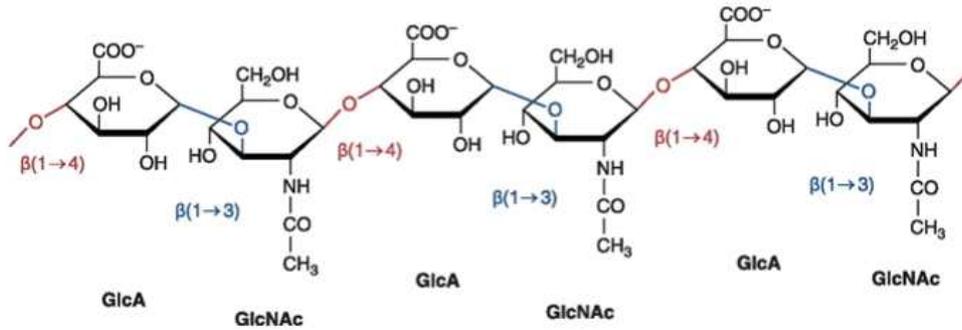
HA에 대한 최초의 연구는 1880년 프랑스 과학자 Portes가 유리체의 점액이 각막과 연골의 다른 점액과 다르다는 것을 관찰하고, 이를 hyalomucine이라고 명명한 것에서 시작되었다[27]. 이후, 1934년에 Meyer와 Palmer가 소 유리체액에서 아미노당과 우론산을 포함하는 새로운 다당류를 분리하고, 이를 hyaloid(유리체)와 uronic acid에서 유래하여 hyaluronic acid라고 명명하였다[28]. 1940년대부터 HA의 물리화학적 특성이 널리 연구되었으며[29], 1954년 화학적 구조가 밝혀졌다[30]. 1979년 최초의 제약 등급 HA가 생산되었으며, 닭 벼슬과 인간 뱃줄에서 HA를 추출하고 정제하는 방법이 개발되었다[31]. 1980년대 초부터 이식용 인공수정체, 관절 치료, 피부 질환, 상처 치유 분야 등에 널리 연구되었고[32], 1980년대 후반부터는 약물 전달 시스템의 응용에도 사용되었다[33]. 1990년대와 2000년대에는 HA 대사에 관여하는 효소 특성화 및 박테리아 발효 기술이 개발되었다[27]. 오늘날 HA는 다양한 의료, 제약, 영양 및 미용 응용 분야에서 핵심 분자로 손꼽힌다.

2.2.2 히알루론산의 생산

산업에 적용된 최초의 생산 공정에서 HA는 소 유리체 및 닭 벼슬과 같은 동물 공급원에서 추출되었다[34,35,36]. 추출 프로토콜이 몇 년에 걸쳐 개선됨에도 불구하고, 이러한 방법은 HA의 수율이 낮다는 기술적 한계가 있었다[27,34]. 또한 동물에서 유래되기 때문에 바이러스와 같은 오염 위험이 있으며, 정제 비용이 높다는 단점이 있다[34,35,36]. 이를 보완하기 위해, 최근 상업용 HA는 주로 생명 공학적인 방법 즉, 미생물 발효 방법으로 생산된다. 높은 분자량의 HA는 최적의 박테리아 배양 조건인 37°C, pH 7에서 얻어진다[37,38]. 미생물에서 유래한 HA는 서로 다른 종 사이에서 그 구조가 잘 보존되어 있어 인체와 생체 적합성을 나타낸다[27,35]. 이러한 방법으로 HA를 추출하는 것은 상대적으로 공정이 간단하며 높은 수율을 얻을 수 있다.

2.2.3 히알루론산의 구조

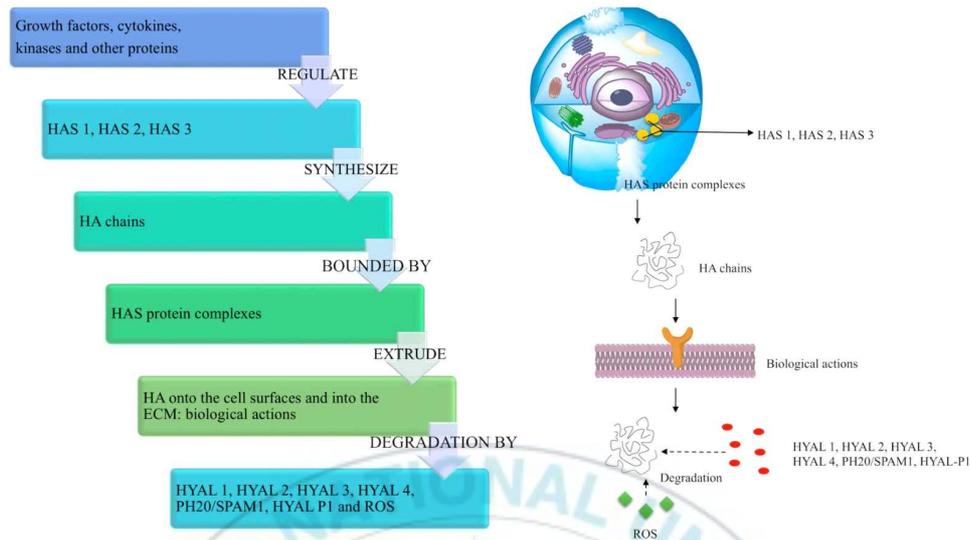
HA는 β -1,4-D-glucuronic acid와 β -1,3-N-acetyl-d-glucosamine의 반복 이당류 단위로 구성된 선형 다당류이다. 생리적 pH에서 각 카복실기 (-COOH)는 음이온 전하를 가지며, 이는 이동성 양이온과 균형을 이룰 수 있다. 따라서 수용액에서 HA는 염을 형성하며[39,40], 이는 친수성이 높아 물 분자에 둘러싸여 있다.



[그림 1] 히알루론산의 구조 [48]

2.2.4 히알루론산의 인체 내 합성과 분해

인체에서 HA는 HAS1, HAS2, HAS3로 불리는 3개의 합성 효소에 의해 자유 선형 폴리머로 합성된다. HA 성장 사슬은 원형질막과 HAS 단백질 복합체를 통해 세포 표면이나 ECM으로 압출된다[42,43]. 인체의 HA 분해는 두 가지의 다른 메커니즘에 의해 수행된다. 하나는 효소 (hyaluronidases, HYAL)에 의한 분해이고, 다른 하나는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 인한 산화적 손상에 의한 분해이다. HYAL과 ROS는 인체에 존재하는 15g HA의 약 30%를 국소적으로 분해한다.



[그림 2] 히알루론산의 인체 내 합성과 분해 [41]

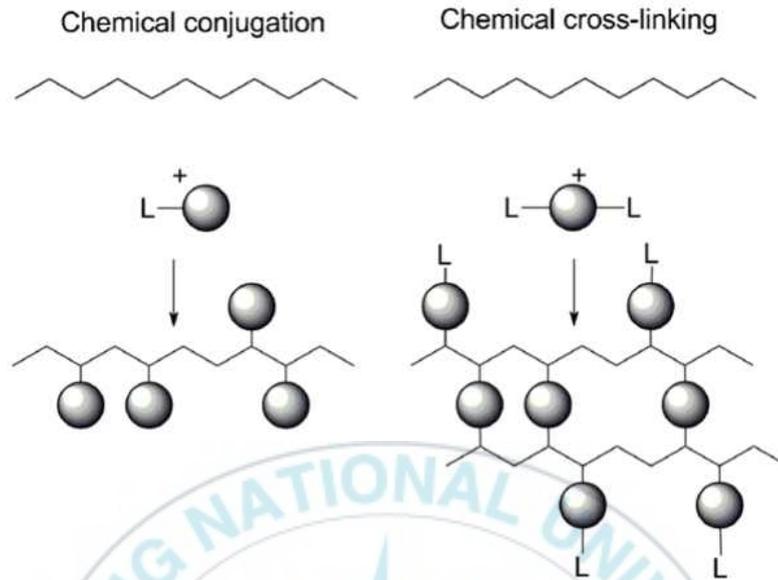
2.2.5 히알루론산의 분자량과 생물학적 기능

HA 합성과 분해 사이의 균형은 HA의 양뿐만 아니라 분자량을 결정하기 때문에 인체에서 중추적인 조절 기능을 한다. 분자량과 합성 및 분해 환경은 HA의 생물학적 작용을 정의하는 핵심 요소이다[44,45,46]. 실제로 고분자량 HA(high molecular weight HA, HMW HA)와 저분자량 HA(low molecular weight HA, LMW HA)는 상반되는 효과까지 나타낼 수 있다 [45,47]. 세포 외 HMW HA($\geq 10^6$ Da)는 항 혈관신생으로 내피세포 성장을 억제할 수 있다[45,47,48]. 또한 점탄성으로 인해 활막 관절액에서 윤활제 역할을 하여 관절 연골을 보호한다[49]. HMW HA는 또한 염증, 조직 손상 및 복구, 상처 치료 및 면역 억제에서 중요하고 유익한 역할을 한다. 천식, 폐 섬유증 및 고혈압, 류마티스 관절염과 같은 일부 환경 및 병리학적 조건에서 HMW HA는 LMW HA($2 \times 10^4 - 10^6$ Da)로 분해되어 염증

및 혈관 신생 활성을 갖는 것으로 나타났다[45,46]. LMW HA는 또한 종양 진행을 유도하여 세포에 영향을 미치고[45,50], ECM 리모델링을 유발할 수 있다.

2.2.6 히알루론산의 개질

HA 구조의 화학적 개질(modification)을 통해 가능 적용 범위를 확장하여 특정 요구를 충족할 수 있고, 더 나은 성능의 제품을 얻을 수 있다. HA의 화학적 개질은 주로 두 가지 기능적 위치 즉, 하이드록실기와 카복실기를 포함한다. 이러한 개질은 아미노 기능을 복구할 수 있는 전략인 N-아세틸기의 탈아세틸화 후에 수행될 수 있다[51]. 구체적으로, HA의 하이드록실기와 카복실기는 아마이드, 에스터 또는 에테르 결합을 형성하는 시약에 의해 쉽게 개질될 수 있다[52]. 원칙적으로 HA의 작용기는 동일 화학 반응을 기반으로 하지만 서로 다른 생성물을 형성하는 두 가지 기술인 접합과 가교에 의해 변형될 수 있다. 접합은 단일 공유결합으로 단일 기능성 분자를 하나의 HA 사슬에 연결하는 반면, 가교는 두 개 이상의 공유결합으로 다기능 화합물을 사용하여 서로 다른 HA 사슬을 함께 연결한다.



[그림 3] 히알루론산의 개질 [51]

2.2.7 히알루론산의 응용 분야

HA는 고유한 생물학적 및 물리화학적 특성과 생체 적합성으로 인해 다양한 의료, 제약, 화장품 등의 분야에서 흥미로운 생체 재료로 주목받고 있다.

약물 전달 시스템에서의 약물 전달을 개선하기 위해 HA 및 이의 합성 유도체가 개발되었다. 약물이 방출될 때 즉, 약물과 HA를 연결하는 공유결합이 유기체에서 분해될 때, 특정 부위에서 이상적인 치료 작용이 달성된다. 국소적 또는 전신적 사용을 위해 다양한 활성 성분이 HA에 활용될 수 있다[41].

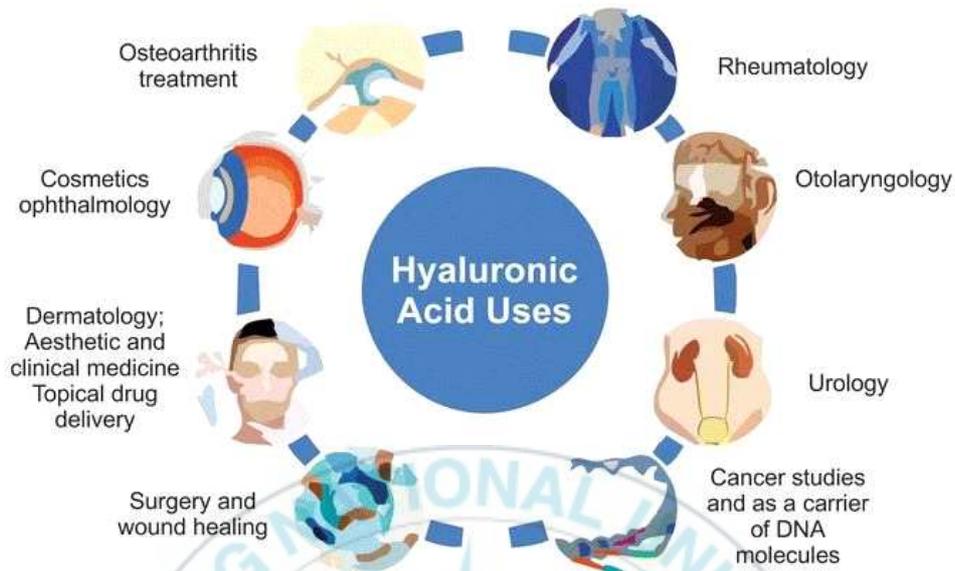
상처 치료 분야에서 또한 HA는 주목받는 재료이다. 내인성 HA는 콜라겐 생성의 자극, 섬유아세포의 증식, 상처 부위에 대한 접착의 촉진 등의 작용

덕분에 상처 치유 및 재생피화 과정을 유지한다. 이러한 이유로, HA는 찰과상, 외상 후 절개와 같은 피부 자극과 상처를 치료하는 데 사용된다 [53].

HA는 인간 눈의 자연적인 구성 요소이기 때문에, HA 기반의 안과 제품은 완전히 생체 적합성이 있으며 이물질 반응을 유발하지 않는다[51]. HA 용액은 섬세한 눈 조직을 보호하고 윤활하며, 손실된 유리액을 대체할 수 있다[54]. 또한 HA는 안구 표면에 수분을 공급하고 시력의 질을 높이는 안약의 활성 성분으로 안구 건조증과 같은 질병을 치료하는 주성분이며, 콘택트렌즈 착용의 편안함을 높이는 데 유용하다[55,56,57].

활막 관절액의 ECM의 주요 윤활제 중 하나인 HA는 그 점탄성으로 인해 기계적 충격을 흡수하고 골단 사이의 마찰을 방지한다[49]. 활액이 감소하거나 염증이 생기고 HA 수치가 감소하면, 류마티스 관절염 및 골관절염 등의 질환이 발생한다. 따라서 관절 내 HA 주입은 국소 효과를 최대화하고 통증을 감소시킬 뿐만 아니라 전신적인 부작용을 최소화한다[58].

마지막으로 HA는 화장품 제형(젤, 에멀전, 세럼 등)에 널리 사용되는 보습 활성 성분을 나타낸다. 또한, HA를 함유한 자외선 차단제는 HA의 자유라디칼 소거 특성으로 인해 젊은 피부를 유지하고 자외선 조사의 유해한 영향으로부터 피부를 보호하는 데 기여할 수 있다[59,60].



[그림 4] 히알루론산의 응용 분야 [35]

2.3 IEDDA 클릭 반응

독성 촉매나 용매를 포함하지 않는 Inverse electron demand Diels-Alder(IEDDA) 클릭 반응의 수성 호환성은 바이오 및 나노 물질 응용 분야에서 최적의 반응이다. 가장 중요한 것은 모듈화된 특성으로 인해 IEDDA 반응은 빌딩 블록의 쉬운 가교 결합을 허용하여 분자 구조의 구성 및 수정을 위한 대안적인 방법을 가능하게 한다. IEDDA 반응의 또 다른 주요 이점은 빠른 반응에 도달하기 위해 어떤 접합 파트너도 과도하게 사용할 필요가 없어 정제가 촉진된다. 이러한 유리한 특성을 기반으로 IEDDA 반응은 생물학 및 의학 분야의 응용을 위한 생체 재료 및 나노 재료를 위해 사용되었다. 특히, 이러한 IEDDA 반응은 생체 직교 반응을 통한 고분자 하이드로겔 형성에 광범위하게 사용된다.

높은 수분 함량, 우수한 물질 수송 특성 및 조직과 같은 탄력성으로 인해 이온 가교된 하이드로겔은 조직 공학뿐만 아니라 세포 및 생리활성 분자를 캡슐화하는 데 광범위하게 사용되었다. 그러나 지금까지 이러한 폴리머는 낮은 가교 효율과 결과 물질의 낮은 무결성으로 인해 크게 제한되었다 [23]. 이러한 한계를 극복하기 위해, IEDDA 결합은 다른 생체 직교 반응과 함께 생체 적합성 하이드로겔 합성을 위한 대체 방법으로 제안되었다 [61]. 한 예에서 테트라진/노르보넨-알지네이트 유도체를 사용함으로써 하이드로겔을 1시간 만에 제조할 수 있었으며, 다른 테트라진/노르보넨-알지네이트 비율에 따라 조절 가능한 기계적 특성과 스웰링 특성을 보고했다 [62]. 이온 가교된 하이드로겔과 비교하여, IEDDA 클릭 반응으로 제조된 하이드로겔은 더 높은 세포 생존율 및 세포 대사 활성을 보였다. 또한 생체 내 주입 후 염증 반응이 최소화되고 안정성이 높은 것으로 관찰되었다.

제 III장 실험

3.1 시약

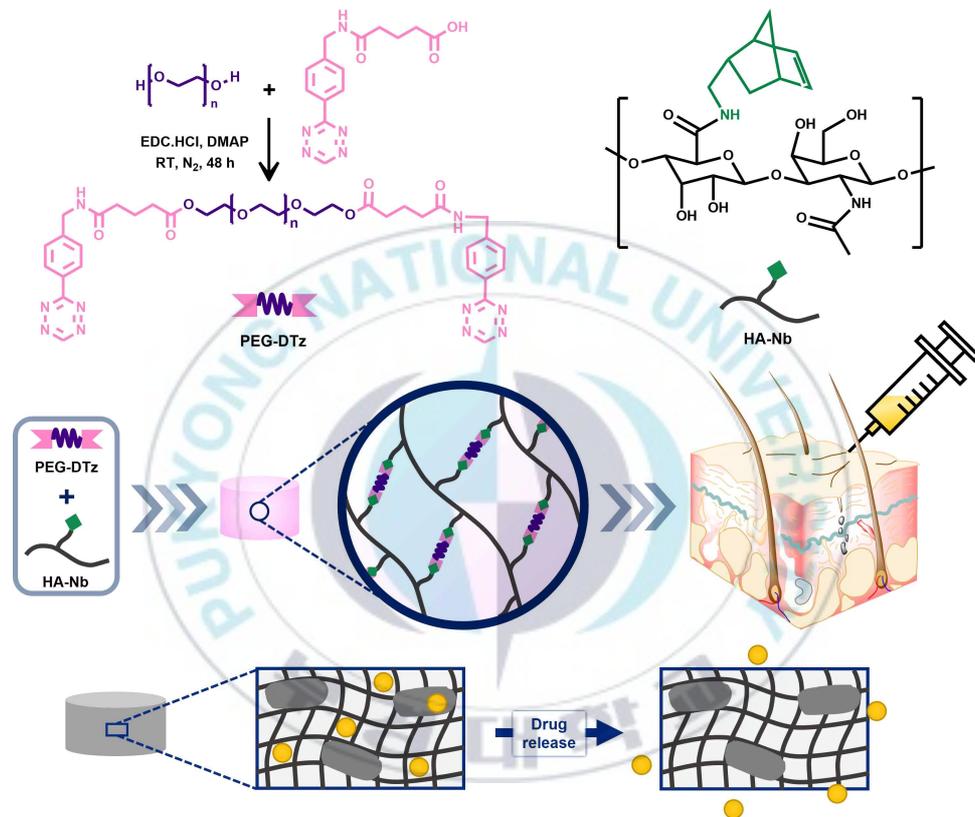
PEG-DTz 가교제 합성을 위해 사용된 Polyethylene glycol (OH-PEG-OH, Mn = 1000), 4-(dimethylamino)pyridine (DMAP, 99%), sodium chloride (NaCl, 99%), NHS (98%), triethylamine (TEA, 99%)는 Sigma Aldrich (Waltham, M, USA)에서 구입하였다. EDC.HCl(99%) 및 5-Norbornene-2-methylamine(Nb-NH₂, 98%)은 Tokyo Chemical Industry(TCI, Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Acetone, dichloromethane(DCM), diethyl ether 및 ethyl acetate는 Duksan Pure Chemicals (Siheung, Korea)로부터 구입하였다. Sodium hyaluronate(HA, Mn = 800 kDa)은 Bioland Korea(Chungbuk, Korea)에서 구입하였다. 4-(Aminomethyl)benzotrile hydrochloride(98%)는 Matrix Scientific에서 구입하였으며, Curcumin (95%)은 Alfa Aesar (Haverhill, MA, USA)에서 구입하였다.

3.2 분석

핵자기공명 스펙트럼(NMR)은 JEOL NMR spectrometer(JNM ECZ-400, JEOL, Akishima-shi, Japan)를 사용하여 분석하였다. 푸리에 변환 적외선 (FTIR) 스펙트럼은 Cary640-FTIR(Agilent)을 사용하여 측정하였다. 하이 드로겔의 표면 및 내부 단면 구조는 저진공 주사 전자 현미경(SEM, JEOL, Gatan, JSM-6490LV, Pleasanton, CA, USA)을 사용하여 관찰되었다. UV-Vis 스펙트럼은 UV-Vis 분광광도계(Optizen POP)로 분석하였

다. 하이드로겔의 유변학적 특성은 편평한 강판에 설치된 TA Discovery HR-2 hybrid rheometer를 사용하여 측정하였다.

3.3 전구체 합성 및 하이드로겔 제조 과정 요약



[그림 5] IEDDA 클릭 반응을 이용한 약물 방출 하이드로겔의 제조 과정

3.4 (4-(Ciano)Benzylamino)-5-Oxopentanoic Acid의 합성

(4-(cyano)benzylamino)-5-oxopentanoic acid은 이전에 발표된 논문의 합성 방법을 약간 변경한 후에 얻어졌다[63]. 간략히 말하면, 4-(aminomethyl)benzotrile hydrochloride(2g, 11.86mmol)를 2구 둥근

바닥 플라스크(RBF)에서 100mL의 초고순도 acetonitrile과 혼합하였다. 질소로 30분 동안 퍼징한 후, TEA(5mL, 35.58mmol)를 RBF 내 혼합물에 추가하였다. 30분 동안 더 교반한 후, acetonitrile에 미리 용해된 glutaric anhydride(1.48g, 13.04mmol)을 혼합물에 첨가하였다. 이어서 반응물을 85°C에서 24시간 동안 환류시켰다. 회전 증발 농축기(Rotary evaporator)로 용매를 증발시킨 후, 고체 결정을 100mL의 DI water에 현탁시켰다. 이어서, 1N HCl을 혼합물에 첨가하여 pH 3으로 산성화한 다음, 100mL의 ethyl acetate로 3회 추출하였다. 유기층을 100mL의 DI water 및 100mL의 brine으로 각각 한 번 더 세척하였다. 혼합물을 anhydrous MgSO₄로 처리하여 잔류하는 물을 제거하고 여과하였다. 마지막으로, 회전 증발 농축기로 ethyl acetate를 증발시켜 백색 고체를 얻었다(수율 : 91%). (4-(cyano)benzylamino)-5-oxopentanoic acid의 구조는 ¹H NMR에 의해 확인되었다. (¹H NMR, 400MHz, DMSO-d₆, δ): 12.05(s, 1H), 8.44(t, J = 5.9Hz, 1H), 7.78(d, J = 8.5Hz, 2H), 7.42(d, J = 8.6Hz, 2H), 4.33(d, J = 6.0Hz, 2H), 2.26-2.15(m, 4H), 1.79-1.69(m, 2H).

3.5 Tetrazine(benzylamino)-5-Oxopentanoic Acid의 합성

Tetrazine(benzylamino)-5-Oxopentanoic Acid(Tetrazine-COOH)는 이전에 공개된 논문의 프로토콜에 약간의 변경을 통해 합성되었다[63]. 간단히 말하면, (4-cyanobenzylamino)-5-oxopentanoic acid(1g, 4.08mmol) 및 formamidinium acetate salt(2.12g, 20.39mmol)을 RBF에서 혼합하였다. zinc triflate(0.074g, 0.20mmol)를 혼합물에 첨가한 후, anhydrous hydrazine(3.26mL, 102mmol)을 혼합물에 조심스럽게 천천히 첨가하였다. 격렬한 가스 방출 후, 생성된 점성이 있는 혼합물을 실온에서 밤새 교반하

였다. 이어서, 5mL의 DI water에 용해된 sodium nitrite(2.82g, 40.80mmol)을 반응 용액에 첨가하였다. 이후 혼합물 플라스크를 얼음 bath(0°C)로 옮기고 1N HCl을 용액에 천천히 첨가하였다. 격렬한 가스 방출이 관찰되며 150mL의 1N HCl이 소모된 후, pH가 3에 근접해지면 용액이 밝은 분홍색으로 바뀌면서 가스 발생이 중단되었다. 혼합물을 100mL DCM으로 3회 추출하고, 유기층을 100mL의 brine으로 3회 더 세척하였다. anhydrous MgSO₄로 혼합물을 건조시키고 여과한 후, 회전 증발 농축기를 사용하여 DCM을 증발시켰다. 마지막으로, 생성물을 차가운 isopropyl alcohol 중 재결정에 의해 정제하여 밝은 분홍색 고체의 Tetrazine-COOH를 수득하였다(수율 : 53%). Tetrazine-COOH의 구조는 ¹H NMR에 의해 확인되었다. (¹H NMR, 400MHz, DMSO-d₆, δ): 12.06(s, 1H), 10.58(s, 1H), 8.52-8.40(m, 3H), 7.53(d, J = 8.6Hz, 2H), 4.40(d, J = 5.9Hz, 2H), 2.28-2.17(m, 4H), 1.77(p, J = 7.3Hz, 2H).

3.6 PEG-ditetrazine(PEG-DTz) 가교제의 합성

Tetrazine-COOH(198.86mg, 0.66mmol)를 RBF에서 2mL의 DMSO 및 10mL의 DCM을 포함하는 용매와 혼합한 다음, 생성된 혼합물을 0°C에서 교반하면서 탈기시켰다. 이후 10mL의 DCM에 용해된 DMAP(91.62mg, 0.75mmol)을 불활성 환경을 유지하면서 첨가하였다. 이어서 10mL의 DCM에 용해된 EDC.HCl을 혼합물에 천천히 첨가한 후, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하여 카르복실산 작용기를 활성화시켰다. 이후 2mL DCM에 용해된 PEG(300mg, 0.3mmol)를 혼합물에 첨가한 후, 혼합물을 불활성 질소 분위기 하에서 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 혼합물을 70mL의 DCM으로 희석한 후, 이를 125mL의 DI water로 3회 세척하고,

100mL의 brine으로 1회 세척하였다. 분리한 DCM 층을 anhydrous MgSO₄로 건조시켜 잔류하는 물을 제거한 다음, 필터 페이퍼로 여과 후 회전 증발 농축기를 사용하여 감압 하에 DCM을 증발시켰다. 마지막으로, 생성물에 40mL의 diethyl ether를 첨가하여 침전시켰다. 생성된 결정을 여과하고 감압 하에 1일 동안 건조시켜 분홍색 고체의 PEG-DTz 가교제를 얻었다. (수율 : 67.13%), (¹H NMR, 400MHz, DMSO-d₆, δ): 10.58(s, 2H), 8.52–8.40(m, 6H), 7.53(d, 4H), 4.40(d, 4H), 4.13(t, 4H), 3.68(t, 4H), 3.51(s, 91H), 2.34(t, 4H), 2.23(t, 4H), 1.80(t, 4H).

3.7 HA-Nb의 합성

HA-Nb는 이전에 발표된 논문의 프로토콜에 따라 합성되었다[21]. 간략하게 설명하면, HA(2000mg, 0.0025mmol)를 균질한 용액이 얻어질 때까지 200mL의 DI water와 혼합하였다. 이어서, EDC.HCl(475.40mg, 2.48mmol) 및 NHS(427.84mg, 3.72mmol)를 혼합물에 첨가한 후 1시간 동안 교반하였다. 이 용액에 5mL의 DMSO에 용해된 Nb-NH₂(458mg, 3.72mmol)를 첨가한 후, 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반하였다. 이어서, NaCl(1.5g)을 5mL의 DI water와 혼합한 후 혼합물에 첨가하였다. 이를 10분 동안 교반한 후, 용액을 과량의 acetone으로 침전시켰다. 여과 후, 스피지형 고체 생성물을 감압 건조시켰다. 이어서, 고체를 200mL의 DI water에 재수화시키고, dialysis bag(MWCO=14kDa)으로 옮겨, DI water 중에서 2일간 투석하였다. 마지막으로, 생성물을 냉각한 후 동결 건조하여 18.55%의 치환도(¹H NMR로 측정)를 갖는 건조된 HA-Nb를 얻었다. HA-Nb의 구조는 FTIR 분석에 의해 더욱 특징화되었다.

3.8 하이드로겔의 제조

IEDDA click 반응을 기반으로 한 가교 하이드로겔은 PEG-DTz 가교제와 HA-Nb의 단일 단계 혼합에 의해 개발되었다. 3가지 타입의 가교 조성 [표 1]을 설정하여 다양한 물리 화학적 특성을 가진 하이드로겔을 얻었다. 간략하게 설명하자면, 2% HA-Nb 용액(HA-Nb를 DI water에 용해시켜 제조) 200 μ L와 다양한 농도의 PEG-DTz 용액(PEG-DTz 가교제를 DI water에 용해시켜 제조) 35 μ L을 혼합하였다. (PEG-DTz 가교제는 10mg/mL, 20mg/mL 및 40mg/mL의 세 가지 조성으로 DI water에 용해되었다.) Eppendorf tube 내에서 두 용액을 15초 동안 vortex를 이용하여 부드럽게 혼합하였다. 이러한 용액 혼합물을 즉시 주사기(25G needle)로 옮겨 주사 가능성을 테스트하였다.

[표 1] PTHG 하이드로겔의 제조 비율과 겔화 시간

Sample	Nb : Tz Ratio (Moles)	Gelation Time(s)
PTHG-A	10 : 2.5	99
PTHG-B	10 : 5	81
PTHG-C	10 : 10	68

* 겔화 시간(Gelation time)은 레오미터를 사용하여 G'과 G''의 교차점으로부터 계산되었다.

3.9 유변학적 특성 연구

하이드로겔의 점탄성 거동은 rheometer에 의해 평가되었다. 특히, sol-gel 전환 시간 즉, 겔화 시간은 하이드로겔의 Storage modulus(저장

탄성률, G') 및 Loss modulus(손실 탄성률, G'')을 step-time의 함수로 측정함으로써 평가되었다. 겔화 시간은 G' 와 G'' 가 교차점으로부터 알 수 있다. 마찬가지로, angle frequency sweep 테스트를 수행하여 하이드로겔의 기계적 강도를 평가하였다.

3.10 팽윤도 연구

팽윤도를 측정하기 위해, 제조된 하이드로겔을 동결건조하고 3mL의 PBS (pH = 7.4)에 담그기 전에 중량을 먼저 측정하였다. 하이드로겔을 PBS에 담그고 잠시 후, 하이드로겔을 팽윤 매질로부터 제거하였다. 팽윤한 하이드로겔의 중량 측정을 위해, 하이드로겔 표면에 존재하는 여분의 물을 티슈 페이퍼로 조심스럽게 제거한 후 그 중량을 측정하였다. 하이드로겔의 팽윤도는 다음의 [식 1]을 사용하여 계산되었다.

$$[\text{식 1}] \quad \text{Swelling Ratio (\%)} = \frac{M_s - M_d}{M} \times 100$$

M_s 는 팽윤된 하이드로겔의 중량, M_d 는 건조된 하이드로겔의 중량이다.

3.11 표면 및 내부 단면 연구

제조된 하이드로겔의 미세구조를 확인하기 위해, 하이드로겔을 액화 질소에서 5분 동안 동결시키고, -80°C 에서 1일 동안 보관한 후, 3일 동안 동결건조하였다. 동결건조된 하이드로겔을 다시 액체 질소에 담근 후, 수직으로 절단하였다. 하이드로겔의 표면과 내부 단면은 SEM을 사용하여 관찰하였다.

3.12 약물 로딩 및 방출 연구

약물이 로딩된 하이드로겔을 제조하기 위해, 로딩할 약물로서 Curcumin을 선택하였다. 1mg/mL Curcumin 용액을 고체 HA-Nb와 혼합하여 균일해질 때까지 교반하였다. 그런 다음 Eppendorf tube에 Curcumin이 로딩된 2% HA-Nb 용액 200 μ L와 각 농도의 PEG-DTz 용액 35 μ L을 넣고 vortex를 사용하여 혼합 용액을 15초 동안 부드럽게 혼합하였다. 이후 혼합물을 어두운 곳에서 실온에서 12시간 동안 항온 처리하였다. 이어서, Curcumin이 로딩된 하이드로겔을 3mL의 방출 매질(20% ethyl alcohol, 80% DI water)로 세척하여 로딩되지 않거나 표면에 부착된 Curcumin을 제거하였다. UV-Vis 분광 광도계(파장 : 430nm)를 사용하여 용액의 흡광도를 기록하고, Curcumin의 standard curve를 통해 약물 로딩 효율(DLE%)을 측정하였다. Curcumin 로딩 효율은 다음의 [식 2]를 사용하여 측정되었다.

[식 2]

$$LE \% = \frac{\text{quantity of curcumin in feed} - \text{quantity of curcumin in supernatant}}{\text{quantity of curcumin in feed}} \times 100$$

Curcumin이 로딩된 하이드로겔의 시험관 내 약물 방출 평가는 각 하이드로겔을 35mL의 방출 매질이 포함된 바이알에 담금으로써 수행되었다. 샘플을 50rpm의 속도와 37 $^{\circ}$ C의 온도로 설정된 진탕배양기(shaking incubator)에 넣었다. 특정 시간 간격으로 방출 매질에서 2mL의 용액을 채취하고 UV-Vis 분광 광도계로 흡광도를 측정하여 방출된 커큐민의 양을 분석하였다. 430nm의 파장에서 흡광도 측정 후, 채취한 샘플을 각각의 바이알에 다시 넣어 샘플의 부피가 일정하도록 유지하였다.

3.13 전구체와 하이드로겔의 시험관 내 세포독성

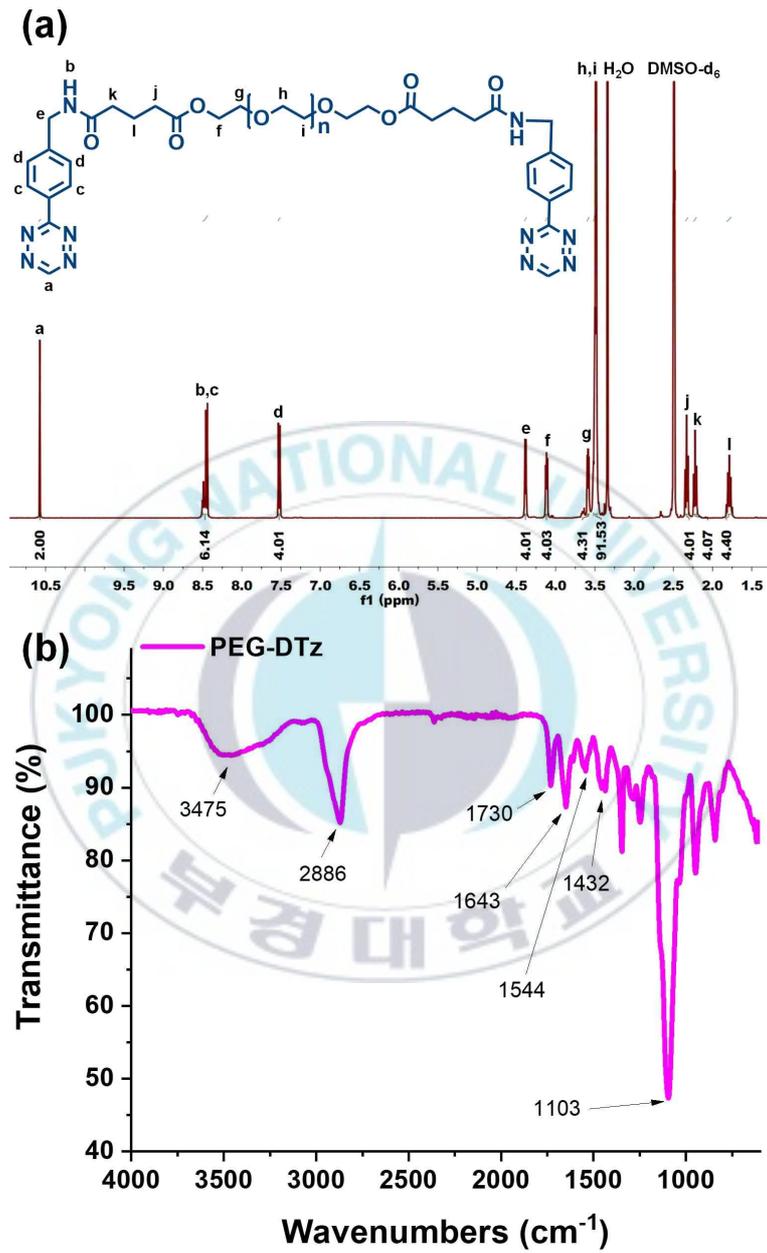
HA-Nb, PEG-DTz 가교제 및 하이드로겔의 세포 적합성을 인간 배아 신장 세포(HEK-293)에서 평가하였다. 간단하게 설명하자면, Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM) 및 10% fetal bovine serum(FBS), 1% Antibiotic-Antimycotic solution(Gibco™)을 사용하여 10,000cells/well 파종 밀도로 37°C, 5% CO₂에서 24시간 세포를 48-well plate에 파종하였다. 이후 세포 배지를 제거하고 다양한 농도의 HA-Nb (0, 100, 500, 1000, 1500, 2000µg/mL), PEG-DTz 가교제 (0, 10, 20, 30, 40 및 50µg/mL)를 포함하는 새로운 배지로 교체하였다. 24시간 동안의 인큐베이션 후, 세포를 100µL의 PBS로 2회 세척하고, 10µL의 WST 분석 용액(EZ-cytox, Seoul, Korea)으로 처리하였다. 생성된 보라색 용액(formazan)의 흡광도를 microplate reader(파장 450nm)를 사용하여 계산하였다. 마찬가지로, 하이드로겔 추출물을 사용하여 빈 하이드로겔의 세포 적합성을 평가하였다.

제 IV장 결과 및 고찰

4.1 PEG-DTz의 합성

IEDDA 클릭 반응을 위한 PEG-DTz 가교제는 Tetrazine-COOH의 카르복실산기와 OH-PEG-OH의 하이드록시기가 카르보디이미드 커플링 반응을 통해 반응하여 에스테르 결합이 형성되었다. PEG-DTz의 화학 구조는 [그림 6]에 나타낸 바와 같이 ^1H NMR에 의해 분석되었다.

4.13ppm의 ^1H NMR 피크는 에스테르 결합 옆에 양성자가 있음을 나타내며, 반응이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있다. 반면에, PEG 반복 ethylene 양성자는 3.51ppm의 피크에 의해 확인할 수 있다. PEG-DTz의 구조는 FTIR에 의해 추가적으로 분석되었고, 3475cm^{-1} 에서 방향족 고리의 C-H stretching 및 2886cm^{-1} 에서 PEG의 C-H stretching이 입증되었다. 카르보닐기의 C=O stretching이 1730cm^{-1} 에서 관찰되었다. 한편, 테트라진 분자의 C=N, C-N 및 C=C stretching vibration은 각각 1643cm^{-1} , 1544cm^{-1} 및 1432cm^{-1} 로 기록되었다. 1103cm^{-1} 에서의 stretching은 PEG의 C-O기에 할당되었으며, PEG-DTz의 합성이 성공적으로 이루어졌음을 확인할 수 있다.

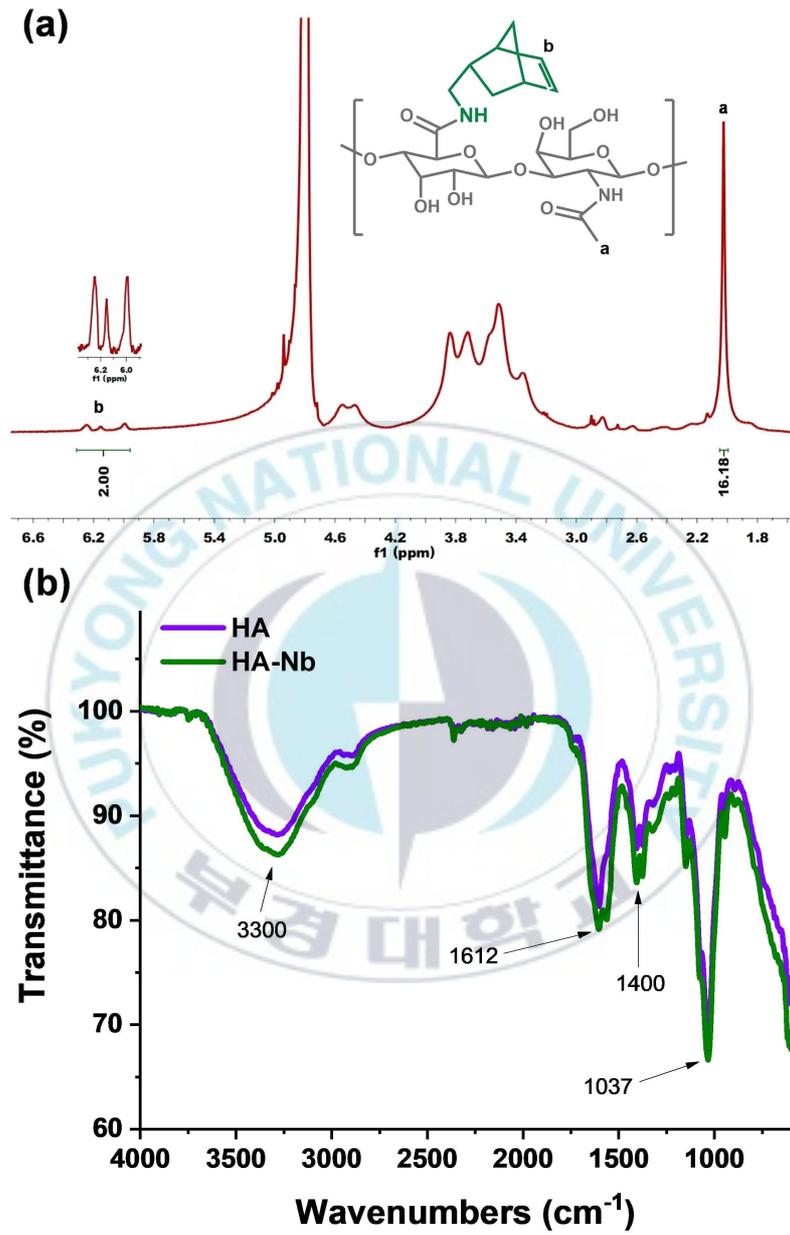


[그림 6] PEG-DTz의 특성화. (a) ^1H NMR 스펙트럼,
(b) FTIR 스펙트럼

4.2 HA-Nb의 합성

HA-Nb의 Nb 작용기와 PEG-DTz의 Tz 작용기와의 IEDDA 클릭 반응을 통해 하이드로겔을 제조하였다. 구체적으로, HA는 Nb-NH₂와의 카르보디이미드 커플링 반응에 의해 functionalization 반응을 일으켜 HA-Nb를 생성한다. 합성된 HA-Nb를 ¹H NMR로 분석한 결과, [그림 7a]에 나타난 바와 같이 6.0-6.20ppm에서 Nb 부분의 알켄 양성자의 특징적인 화학적 이동이 나타났다.

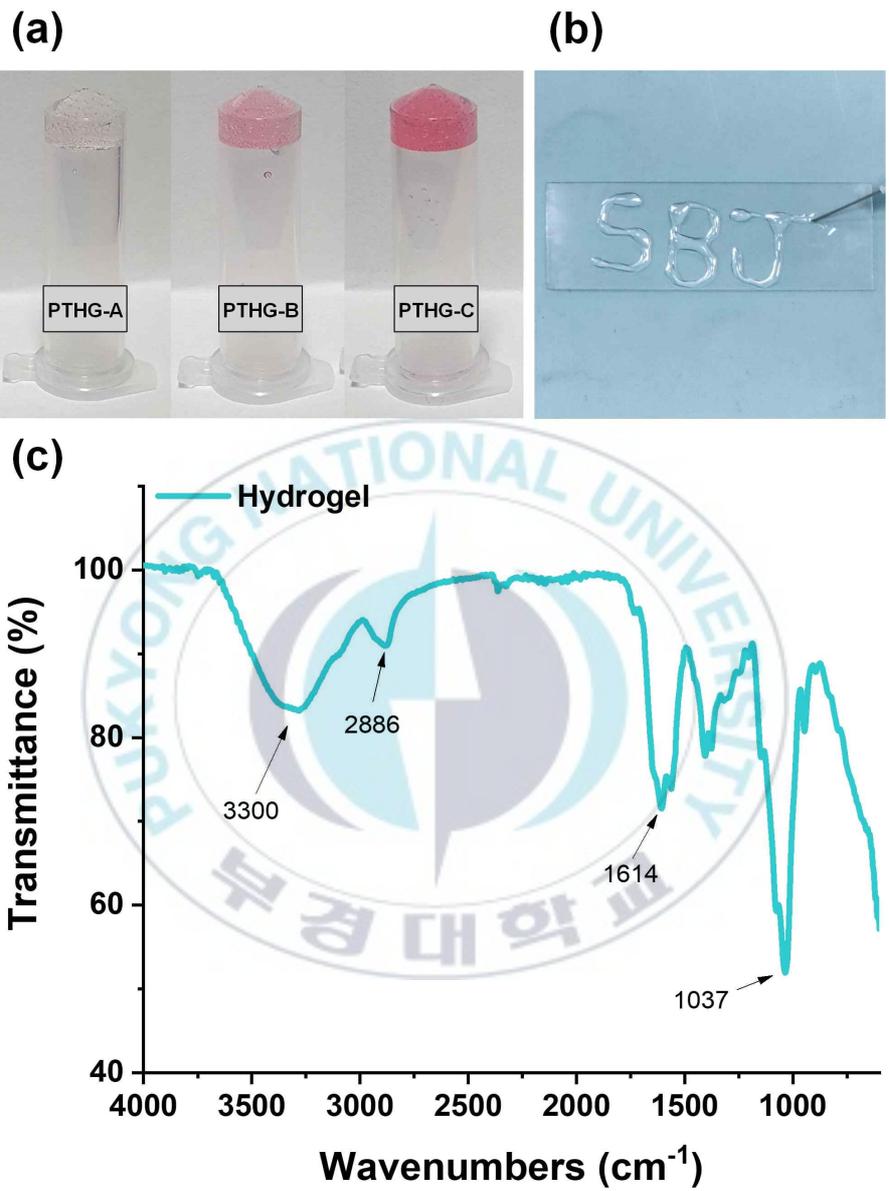
Nb의 치환도(DS)는 Nb 양성자의 적분을 HA의 methyl 양성자의 적분과 함께 함으로써 계산되어 18.55%인 것으로 나타났다. 성공적인 HA-Nb 합성은 FTIR에 의해 추가로 확인되었으며, 이러한 결과는 [그림 7b]에 나타내었다. 3300cm⁻¹에서 OH stretching, 1612cm⁻¹에서 비대칭 고리의 C=O stretching, 1400cm⁻¹에서 대칭 고리의 C=O stretching 및 1037cm⁻¹에서 C-O stretching이 관찰되어 Nb기에 의한 HA의 기능화가 성공적으로 이루어진 것으로 확인되었다.



[그림 7] HA-Nb의 특성화. (a) HA-Nb의 ^1H NMR 스펙트럼,
(b) HA와 HA-Nb의 FTIR 스펙트럼

4.3 하이드로겔의 제조 및 특성화

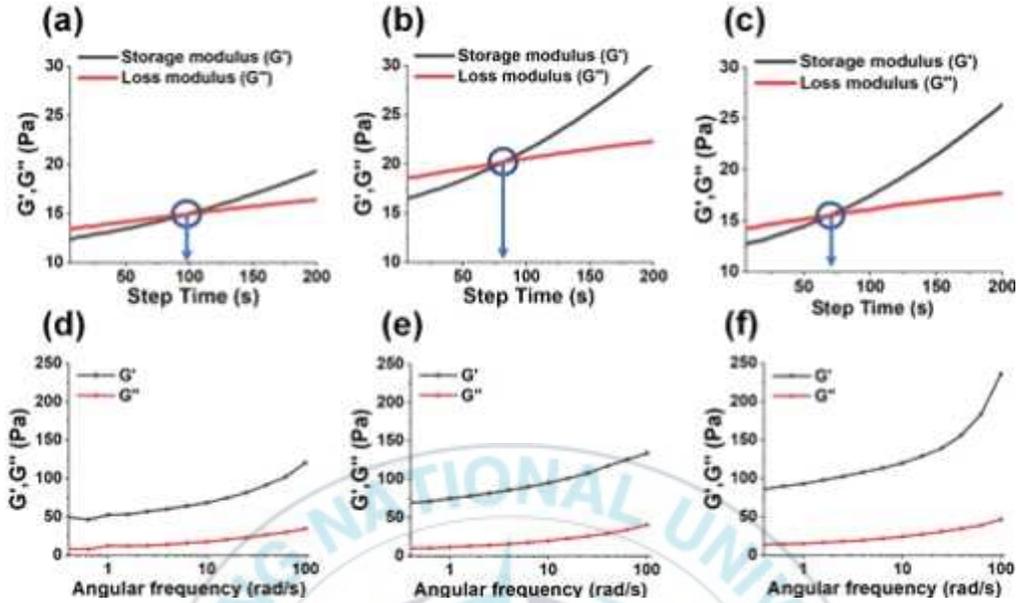
Nb:Tz 몰비를 변경(각각 10:2.5, 10:5, 10:10)하여 PTHG-A, PTHG-B 및 PTHG-C로 설정된 세 가지 유형의 하이드로겔이 개발되었다. 가교 반응의 끝에 촬영한 습윤 상태의 하이드로겔 사진인 [그림 8a]에서 볼 수 있듯이, 고분자 sol을 gel로 변환하고 안정된 하이드로겔을 생성하였음을 확인할 수 있다. IEDDA 클릭 반응은 자발적으로 발생하며, IEDDA 클릭 반응 초기에 생성된 질소 가스에 의해 생성된 기공 또한 관찰되었다. IEDDA 반응은 숙련된 선택적 생물 접합에 일반적으로 사용된다[64]. IEDDA 반응에 사용되는 시약 중에서 Tz와 Nb는 촉매가 없는 환경에서 강력하고 신속하게 반응하여 소량의 질소를 생성하지만, 세포독성 부산물은 생성하지 않는다. 이 반응은 반응 속도가 빠르고 정량적 수율이 높은 것으로 알려져 있으며, 물과 체액에서도 일어난다. IEDDA 반응은 HA를 가교시켰으며, 방출된 질소 가스는 겔 네트워크에 미세 기포와 다공성을 생성하였다. [그림 8b]에서 알 수 있듯이, 빠른 IEDDA 반응으로 제조된 HA 기반의 하이드로겔은 주사 가능하다. 하이드로겔은 HA 및 PEG-DTz의 모든 특징적인 피크를 나타내는 FTIR에 의해 특성화되었고, 이는 [그림 8c]에 나타내었다. 이를 통해 IEDDA 클릭 반응에 의한 하이드로겔의 형성이 확인되었다.



[그림 8] 제조된 하이드로겔. (a) 하이드로겔 사진(왼쪽부터 각각 PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C), (b) 하이드로겔의 주사 가능성을 보여주는 사진, (c) PTHG-B의 FTIR 스펙트럼

4.4 하이드로겔의 겔화 시간 및 기계적 특성

겔화 시간과 하이드로겔의 점탄성 거동을 rheometer를 사용하여 평가하였다. 하이드로겔의 G' 과 G'' 는 step-time, angle frequency sweep 테스트의 함수로서 분석되었다. step-time 결과에서는 G' 와 G'' 의 교차점에서 알 수 있듯이 세 종류의 하이드로겔 모두 sol에서 gel로 빠르게 변형됨이 확인되었다. 구체적으로, [그림 9a-c]에 나타내었듯이 PTHG-A, PTHG-B 및 PTHG-C는 겔로 변하기까지 약 99초, 81초 및 68초가 걸렸다. 즉, 하이드로겔의 가교제의 함량이 증가할수록 겔화 시간이 감소한다는 것을 나타낸다. angle frequency sweep 테스트는 [그림 9d-f]에서 볼 수 있듯이 PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C의 G' 값이 각각 약 120Pa, 134Pa 및 236Pa임을 보여주었다. 이러한 결과는 가교제의 함량이 하이드로겔의 가교 밀도를 증가시킬 수 있고, 따라서 하이드로겔의 기계적 강도가 증가하는 것으로 확인된 이전에 보고된 데이터와 일치한다[65].

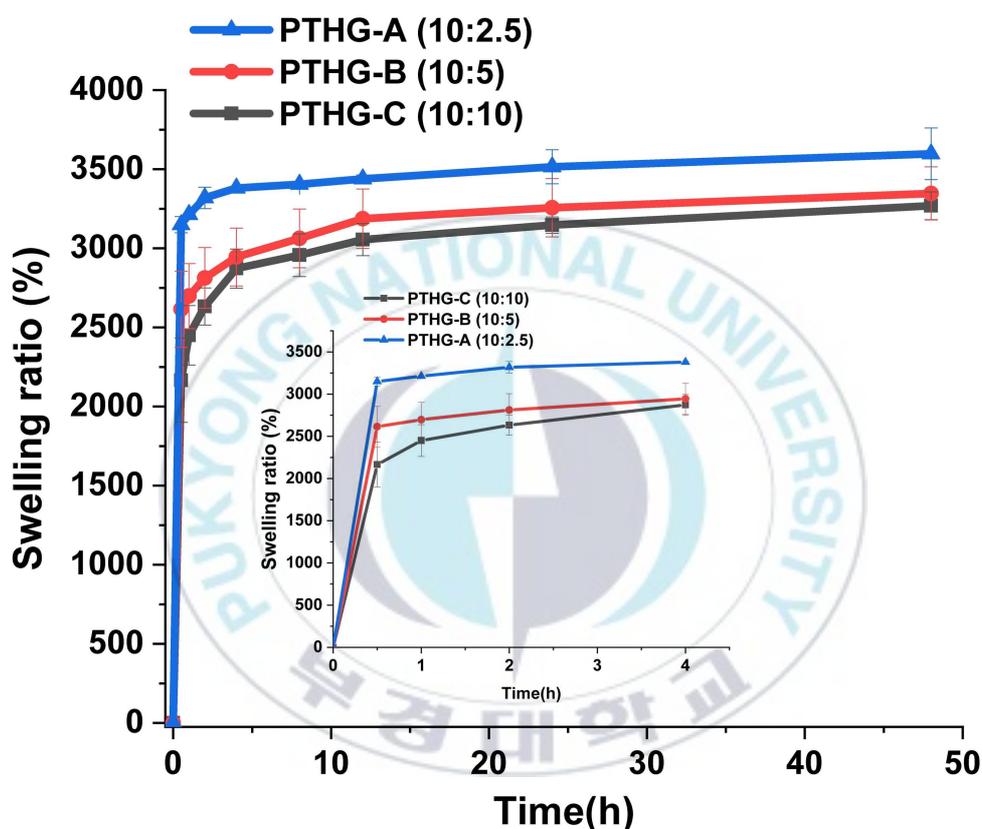


[그림 9] PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C 하이드로겔의 유변학적 특성.
 (a-c) 겔화 시간의 함수로서 storage modulus(G')와 loss modulus(G''),
 (d-f) angle frequency sweep 테스트

4.5 하이드로겔의 팽윤도 연구

준비된 하이드로겔을 동결건조하여 팽윤 특성을 연구하였다. 하이드로겔을 3mL의 PBS(pH = 7.4)에 담근 후, 미리 정해진 시간에 팽윤된 하이드로겔의 중량을 측정하여 팽윤도를 계산하였다. [그림 10]에서 볼 수 있듯이, 혼합된 모든 하이드로겔은 PBS에 담근 후 불과 30분 이내에 빠르게 팽창하였다. 이 급속한 팽윤은 하이드로겔의 가교에 친수성 PEG 사슬이 존재하기 때문일 수 있다. 또한 고도로 다공성인 구조는 하이드로겔의 신속하고 순간적인 팽윤에도 관여할 수 있다. 급속 팽윤 단계 후, 팽윤도가 일관되게 연속적으로 증가하였으며 48시간 후에 팽윤 평형에 도달하였다.

48시간 후의 PTHG-A, PTHG-B 및 PTHG-C 하이드로겔의 최대 팽윤도는 각각 약 3596%, 3346% 및 3268%이며, 가교 비율이 높을수록 하이드로겔의 팽윤이 감소함을 확인할 수 있다. 하이드로겔의 팽윤에 대한 이러한 경향은 이전에 보고된 데이터와 일치하였다[66].

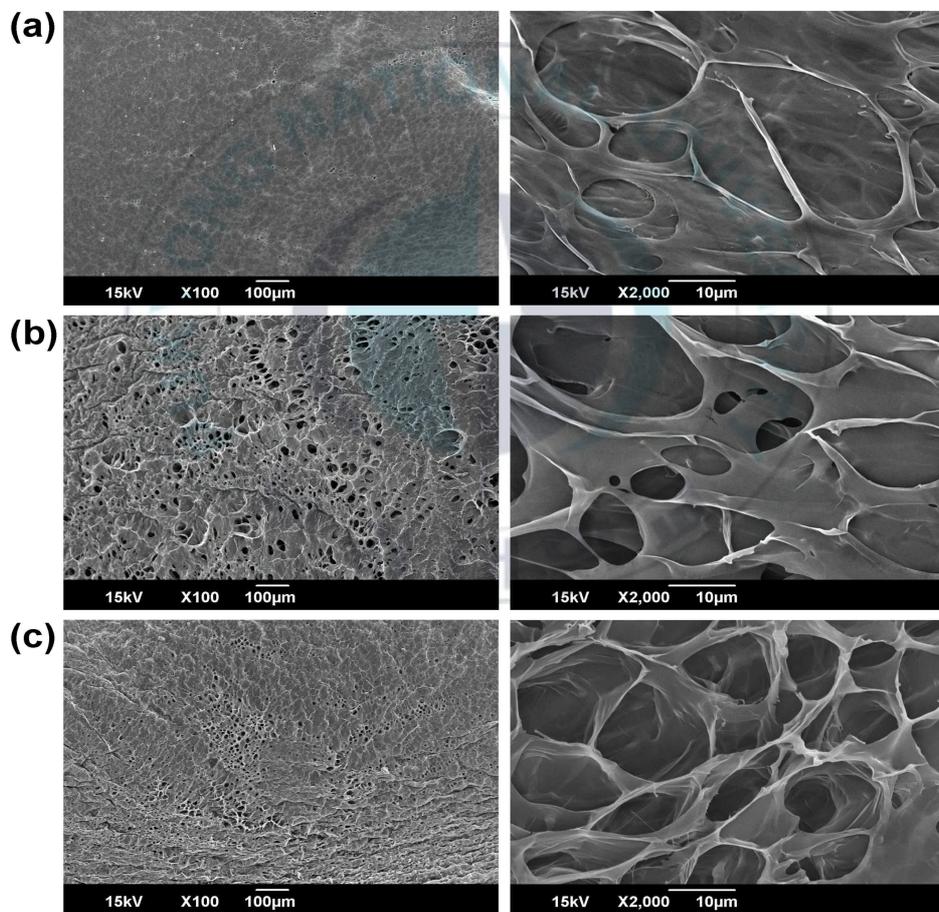


[그림 10] PBS(pH 7.4)에서 하이드로겔의 팽윤 특성. (초기 4시간 동안 하이드로겔의 팽윤을 보여주는 삽입도)

4.6 하이드로겔의 표면 및 내부 단면 분석

하이드로겔의 표면과 내부 구조를 SEM으로 관찰하였다. [그림 11]에서

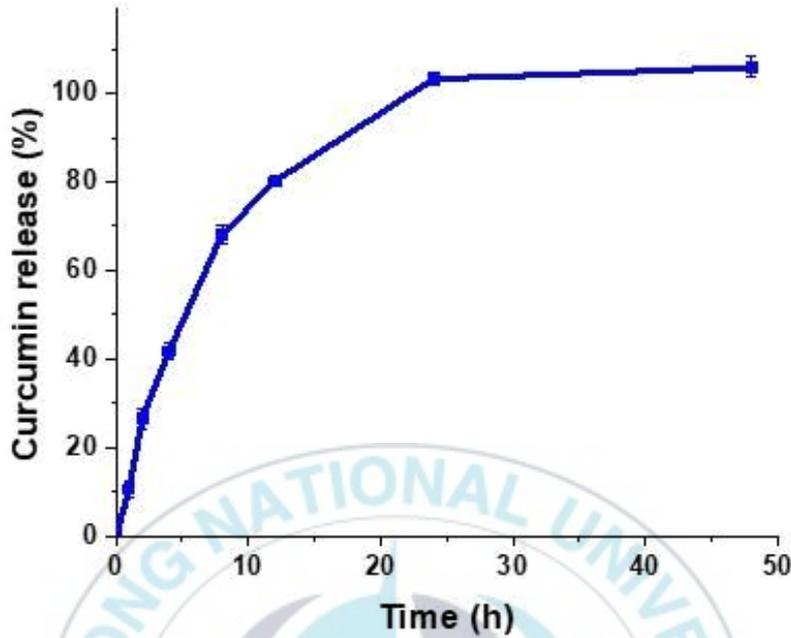
볼 수 있듯이, 모든 하이드로겔은 표면과 내부 단면 모두에 기공이 존재하는 높은 다공성의 형태를 보였다. 이러한 표면 기공은 IEDDA 반응 중에 방출되는 질소 가스로 인한 것이고, 내부 기공은 질소 가스 방출 및 가교 네트워크로 인한 것으로 볼 수 있다. 가교제 함량이 낮은 PTHG-A는 더 느슨한 구조와 큰 크기의 기공을 보이는 반면, 가교제 함량이 더 높은 PTHG-C는 더 치밀한 구조와 더 작은 크기의 미세 기공을 나타내었다. 이러한 차이 역시 가교 밀도의 차이에 의한 것으로 추측할 수 있다.



[그림 11] 하이드로겔의 표면(좌) 및 단면(우)의 주사 전자 현미경(SEM) 이미지. (a) PTHG-A, (b) PTHG-B, (c) PTHG-C

4.7 약물 로딩 및 방출 연구

약물 로딩 효율과 약물 방출 거동을 평가하기 위한 하이드로겔로서, 중간 정도의 팽윤도와 기계적 특성을 가진 PTHG-B(Nb:Tz = 10:5) 하이드로겔이 선택되었다. PEG-DTz 가교제로 제조된 HA 기반 하이드로겔은 빠른 팽윤과 높은 다공성 구조를 나타내었기 때문에, 신속한 약물 방출을 나타낼 것으로 기대하였다. 약물 로딩과 방출 연구는 1mg/mL Curcumin 약물을 사용하여 수행되었다. 흥미롭게도, 하이드로겔의 약물 로딩 효율은 약 99%로 현저하게 높았다. 이것은 아마도 하이드로겔의 높은 다공성 구조에 의해 하이드로겔의 기공 내에 Curcumin이 쉽게 캡슐화될 수 있었기 때문이라고 추측된다. Curcumin은 생체 이용 효율이 매우 낮으며 소수성이 높은 약물이기 때문에, 약물 방출 실험은 20% 에탄올을 포함한 DI water에서 수행되었다. PTHG-B 하이드로겔은 [그림 12]에 나타내었듯이, 1시간 후에 약 10.6%의 Curcumin을 방출하였고, 2시간 후에는 26.6%의 Curcumin을 방출하였다. 이러한 신속한 약물 방출은 하이드로겔의 급속한 팽윤 및 높은 다공성 형태에 기인할 수 있다. 급속 방출 단계 후에 연속 약물 방출 단계가 계속되었고, PTHG-B 하이드로겔은 48시간 후에 캡슐화된 대부분의 약물(약 100%)을 방출하였다. 복잡한 시스템을 필요로 하지 않는 이러한 유형의 약물 방출은 생체 직교성 및 주사 가능한 약물 전달 시스템에 유익할 수 있다. 이 결과는 Fab1 단백질의 in situ 캡슐화를 위한 하이드로겔 전구체로서 이전에 보고된 HA-Tz 및 PEG-Nb에 기초한 IEDDA 가교 하이드로겔과 유사하며, 이는 몇 주 동안에 걸쳐 하이드로겔 매트릭스로부터 FAB1이 완전히 방출되었음을 입증하였다[67].

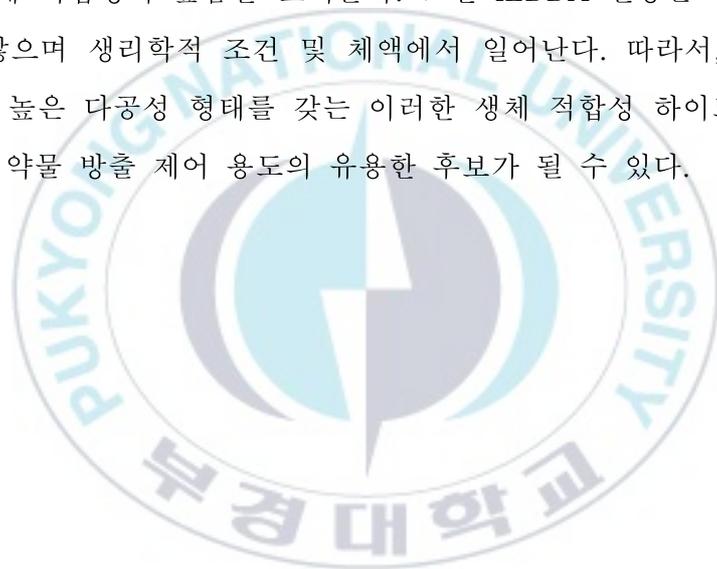


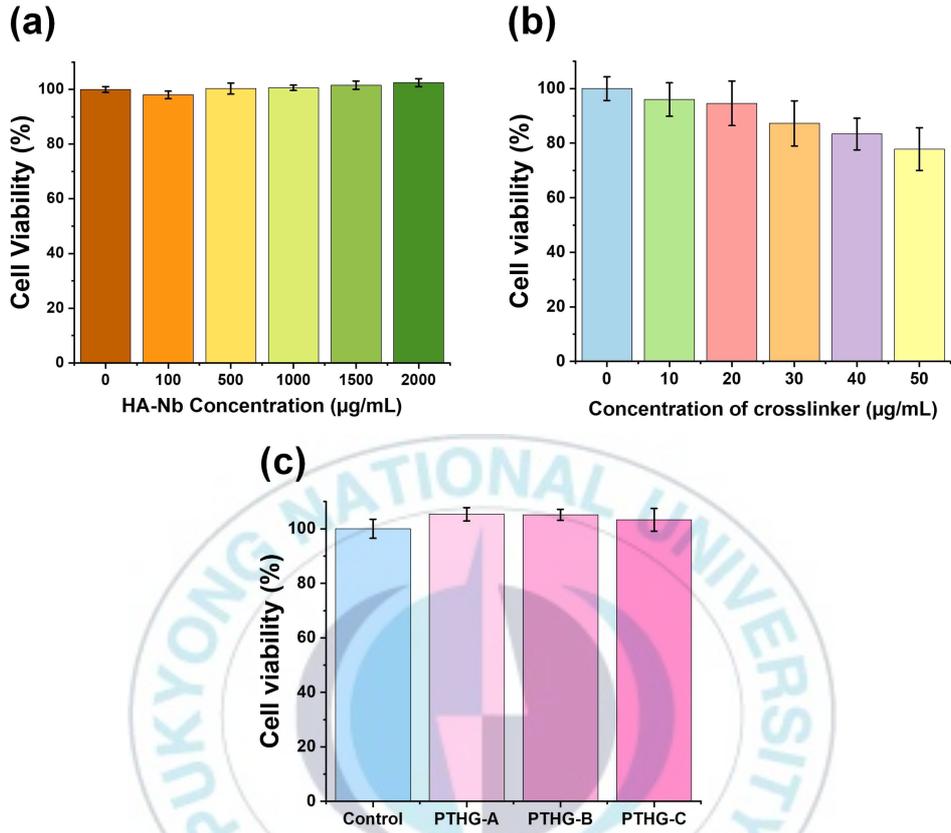
[그림 12] 20% 에탄올을 함유한 PBS 내 하이드로겔 PTHG-B의 시험관 내 Curcumin 방출 거동

4.8 전구체 및 빈 하이드로겔의 시험관 내 세포 적합성

가교제, HA-Nb 전구체 및 제조된 하이드로겔은 생물의학 응용을 위해 세포독성이 없어야 한다. 따라서 PEG-DTz, HA-Nb 및 빈 하이드로겔의 세포독성을 평가하여 이들의 세포 적합성을 조사하였다. HEK-293 세포를 정상 세포 모델로 선택하고, WST 분석을 사용하여 세포독성을 평가하였다. 세포독성 평가를 위해 HEK-293 세포를 다양한 농도의 PEG-DTz, HA-Nb 및 빈 하이드로겔(PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C)과 함께 24시간 동안 배양하였다. [그림 13]에 나타난 세포독성 평가의 결과와 같이, HA-Nb는 생체 적합성이 높았고, HEK-293 세포에서는 2000 μ g/mL의 농

도까지 세포독성을 나타내지 않았다. PEG-DTz 가교제는 최대 50 μ g/mL의 농도에서도 세포 상용성을 나타내었다(세포 생존율 > 80%). 또한, 빈 하이드로겔의 세포독성 평가 결과에서는 PTHG-A, PTHG-B 및 PTHG-C 하이드로겔로 HEK-293 세포를 처리한 후에도 세포독성은 관찰되지 않고, 따라서 빈 하이드로겔도 생체적합성이 높은 것을 확인하였다. 이러한 결과는 IEDDA 클릭 가교 반응에 의해 제조된 다공성 하이드로겔이 반응하는 동안 비독성 질소를 제외하고 다른 부산물을 생성하지 않기 때문에 생체 적합성이 높음을 보여준다. 또한 IEDDA 반응은 촉매를 필요로 하지 않으며 생리학적 조건 및 체액에서 일어난다. 따라서, 급속한 팽윤 거동과 높은 다공성 형태를 갖는 이러한 생체 적합성 하이드로겔은 주사 가능한 약물 방출 제어 용도의 유용한 후보가 될 수 있다.





[그림 13] HEK-293 세포의 시험관 내 세포적합성. (a) HA-Nb, (b) PEG-DTz, (c) 하이드로겔(PTHG-A, PTHG-B, PTHG-C)

제 V 장 결 론

주사 가능한 특성과 빠른 흡수성을 갖춘 히알루론산 기반의 IEDDA 클릭 가교 하이드로겔을 개발하였다. 하이드로겔의 다공성, 겔화 시간 및 기계적 강도는 Norbornene과 Tetrazine의 몰수를 변경함으로써 즉, 가교제의 비율을 달리 설정함으로써 연구되었다. PEG-DTz 가교제의 높은 친수성과 제조된 하이드로겔의 다공성 미세구조 덕분에, 하이드로겔은 신속히 팽창하였다. 하이드로겔(PTHG-B, Nb:Tz = 10:5)은 Curcumin의 우수한 로딩 효율(약 99%)을 나타내었으며, 하이드로겔로부터의 약물이 초기 단계에서 급속하게 방출됨을 관찰하였고, 그 후 지속적인 약물 방출이 확인되었다. 생성된 하이드로겔은 시험된 세포주(HEK-293)와 높은 생체 적합성을 보였고, 따라서 IEDDA 가교 하이드로겔은 높은 생체 직교성을 지님을 확인하였다. 이러한 빠른 팽윤성 및 높은 다공성을 지닌 하이드로겔은 주사 가능한 약물 전달 시스템으로서 유망한 후보가 될 수 있다.

제 VI 장 참고 문헌

- [1] Shih, H., & Lin, C. C. (2015). Photoclick hydrogels prepared from functionalized cyclodextrin and poly (ethylene glycol) for drug delivery and in situ cell encapsulation. *Biomacromolecules*, 16(7), 1915-1923.
- [2] Yoshida, Y., Takahashi, A., Kuzuya, A., & Ohya, Y. (2014). Instant preparation of a biodegradable injectable polymer formulation exhibiting a temperature-responsive sol-gel transition. *Polymer Journal*, 46(9), 632-635.
- [3] Yan, S., Wang, T., Feng, L., Zhu, J., Zhang, K., Chen, X., ... & Yin, J. (2014). Injectable in situ self-cross-linking hydrogels based on poly (L-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules*, 15(12), 4495-4508.
- [4] Zhu, J., & Marchant, R. E. (2011). Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert review of medical devices*, 8(5), 607-626.
- [5] Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal*, 65, 252-267.
- [6] Rocha-García, D., Guerra-Contreras, A., Rosales-Mendoza, S., & Palestino, G. (2016). Role of porous silicon/hydrogel composites on drug delivery. *Open Material Sciences*, 3(1).
- [7] Yuan, L., Li, X., Ge, L., Jia, X., Lei, J., Mu, C., & Li, D. (2018). Emulsion template method for the fabrication of gelatin-based

scaffold with a controllable pore structure. *ACS applied materials & interfaces*, 11(1), 269–277.

[8] Draghi, L., Resta, S. I. M. O. N. E., Pirozzolo, M. G., & Tanzi, M. C. (2005). Microspheres leaching for scaffold porosity control. *Journal of materials science: materials in medicine*, 16(12), 1093.

[9] Stokols, S., & Tuszynski, M. H. (2004). The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials*, 25(27), 5839–5846.

[10] Wang, L., Dong, S., Liu, Y., Ma, Y., Zhang, J., Yang, Z., ... & Yuan, Y. (2020). Fabrication of injectable, porous hyaluronic acid hydrogel based on an in-situ bubble-forming hydrogel entrapment process. *Polymers*, 12(5), 1138.

[11] Allison, D. D., & Grande-Allen, K. J. (2006). Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue engineering*, 12(8), 2131–2140.

[12] Prestwich, G. D. (2008). Engineering a clinically-useful matrix for cell therapy. *Organogenesis*, 4(1), 42–47.

[13] Kretlow, J. D., Young, S., Klouda, L., Wong, M., & Mikos, A. G. (2009). Injectable biomaterials for regenerating complex craniofacial tissues. *Advanced Materials*, 21(32–33), 3368–3393.

[14] Huang, G., & Huang, H. (2018). Hyaluronic acid-based biopharmaceutical delivery and tumor-targeted drug delivery system. *Journal of Controlled Release*, 278, 122–126.

[15] Lee, H. Y., Hwang, C. H., Kim, H. E., & Jeong, S. H. (2018). Enhancement of bio-stability and mechanical properties of

hyaluronic acid hydrogels by tannic acid treatment. *Carbohydrate polymers*, 186, 290-298.

[16] Fessel, G., Cadby, J., Wunderli, S., van Weeren, R., & Snedeker, J. G. (2014). Dose-and time-dependent effects of genipin crosslinking on cell viability and tissue mechanics - toward clinical application for tendon repair. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 1897-1906.

[17] Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Click chemistry-based injectable hydrogels and bioprinting inks for tissue engineering applications. *Tissue engineering and regenerative medicine*, 15, 531-546.

[18] Xu, Z., & Bratlie, K. M. (2018). Click chemistry and material selection for in situ fabrication of hydrogels in tissue engineering applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(7), 2276-2291.

[19] Anugrah, D. S. B., Ramesh, K., Kim, M., Hyun, K., & Lim, K. T. (2019). Near-infrared light-responsive alginate hydrogels based on diselenide-containing cross-linkage for on demand degradation and drug release. *Carbohydrate polymers*, 223, 115070.

[20] Siboro, S. A., Anugrah, D. S., Ramesh, K., Park, S. H., Kim, H. R., & Lim, K. T. (2021). Tunable porosity of covalently crosslinked alginate-based hydrogels and its significance in drug release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117779.

[21] Jo, Y. J., Gulfam, M., Jo, S. H., Gal, Y. S., Oh, C. W., Park, S. H., & Lim, K. T. (2022). Multi-stimuli responsive hydrogels derived from hyaluronic acid for cancer therapy application. *Carbohydrate*

Polymers, 286, 119303.

[22] Kim, K., Park, J. H., Park, S. H., Lee, H. Y., Kim, J. H., & Kim, M. S. (2016). An Injectable, Click Cross Linked Small Intestinal Submucosa Drug Depot for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Advanced healthcare materials*, 5(24), 3105–3117.

[23] Oliveira, B. L., Guo, Z., & Bernardes, G. J. L. (2017). Inverse electron demand Diels - Alder reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews*, 46(16), 4895–4950.

[24] Vu, T. T., Gulfam, M., Jo, S. H., Park, S. H., & Lim, K. T. (2022). Injectable and biocompatible alginate-derived porous hydrogels cross-linked by IEDDA click chemistry for reduction-responsive drug release application. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118964.

[25] Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of advanced research*, 6(2), 105–121.

[26] Zohuriaan-Mehr, M. J. (2006). Super-absorbents. *Iran Polymer Society, Tehran*, 228, 2–4.

[27] Boeriu, C. G., Springer, J., Kooy, F. K., van den Broek, L. A., & Eggink, G. (2013). Production methods for hyaluronan. *International journal of carbohydrate chemistry*, 2013.

[28] Meyer, K., & Palmer, J. W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *Journal of Biological Chemistry*, 107(3), 629–634.

[29] Varga, L. (1955). Studies on hyaluronic acid prepared from the vitreous body. *Journal of Biological Chemistry*, 217(2), 651–658.

- [30] Weissmann, B., & Meyer, K. (1954). The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical Cord1, 2. *Journal of the american chemical society*, 76(7), 1753-1757.
- [31] Balazs, E. A. (1979). U.S. Patent No. 4,141,973. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- [32] Miller, D., & Stegmann, R. (1980). Use of Na-hyaluronate in anterior segment eye surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 6(1), 13-15.
- [33] Benedetti, L. M., Topp, E. M., & Stella, V. J. (1990). Microspheres of hyaluronic acid esters—Fabrication methods and in vitro hydrocortisone release. *Journal of controlled release*, 13(1), 33-41.
- [34] Knopf-Marques, H., Pravda, M., Wolfova, L., Velebny, V., Schaaf, P., Vrana, N. E., & Lavallo, P. (2016). Hyaluronic acid and its derivatives in coating and delivery systems: applications in tissue engineering, regenerative medicine and immunomodulation. *Advanced healthcare materials*, 5(22), 2841-2855.
- [35] de Oliveira, J. D., Carvalho, L. S., Gomes, A. M. V., Queiroz, L. R., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2016). Genetic basis for hyper production of hyaluronic acid in natural and engineered microorganisms. *Microbial cell factories*, 15(1), 1-19.
- [36] Shiedlin, A., Bigelow, R., Christopher, W., Arbabi, S., Yang, L., Maier, R. V., ... & Miller, R. J. (2004). Evaluation of Hyaluronan from Different Sources: *Streptococcus z ooepidemicus*, Rooster Comb, Bovine Vitreous, and Human Umbilical Cord.

Biomacromolecules, 5(6), 2122-2127.

[37] Rangaswamy, V., & Jain, D. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Biotechnology letters*, 30, 493-496.

[38] Kim, J. H., Yoo, S. J., Oh, D. K., Kweon, Y. G., Park, D. W., Lee, C. H., & Gil, G. H. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 19(6), 440-445.

[39] Laurent, T. (1989). The biology of hyaluronan. Introduction. In *Ciba foundation symposium* (Vol. 143, pp. 1-20).

[40] Balazs, E. A., Laurent, T. C., & Jeanloz, R. W. (1986). Nomenclature of hyaluronic acid. *Biochemical Journal*, 235(3), 903.

[41] Fallacara, A., Baldini, E., Manfredini, S., & Vertuani, S. (2018). Hyaluronic acid in the third millennium. *Polymers*, 10(7), 701.

[42] Weigel, P. H., Hascall, V. C., & Tammi, M. (1997). Hyaluronan synthases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(22), 13997-14000.

[43] Itano, N., & Kimata, K. (2002). Mammalian hyaluronan synthases. *IUBMB life*, 54(4), 195-199.

[44] Heldin, P., Lin, C. Y., Kolliopoulos, C., Chen, Y. H., & Skandalis, S. S. (2019). Regulation of hyaluronan biosynthesis and clinical impact of excessive hyaluronan production. *Matrix Biology*, 78, 100-117.

[45] Cyphert, J. M., Trempus, C. S., & Garantziotis, S. (2015). Size matters: molecular weight specificity of hyaluronan effects in cell

biology. *International journal of cell biology*, 2015.

[46] Toole, B. P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews Cancer*, 4(7), 528–539.

[47] Girish, K. S., & Kemparaju, K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life sciences*, 80(21), 1921–1943.

[48] Jiang, D., Liang, J., & Noble, P. W. (2011). Hyaluronan as an immune regulator in human diseases. *Physiological reviews*, 91(1), 221–264.

[49] Tamer, T. M. (2013). Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdisciplinary toxicology*, 6(3), 111.

[50] Wu, M., Cao, M., He, Y., Liu, Y., Yang, C., Du, Y., ... & Gao, F. (2015). A novel role of low molecular weight hyaluronan in breast cancer metastasis. *The FASEB Journal*, 29(4), 1290–1298.

[51] Schanté, C. E., Zuber, G., Herlin, C., & Vandamme, T. F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate polymers*, 85(3), 469–489.

[52] Ossipov, D. A., Piskounova, S., Varghese, O. P., & Hilborn, J. (2010). Functionalization of hyaluronic acid with chemoselective groups via a disulfide-based protection strategy for in situ formation of mechanically stable hydrogels. *Biomacromolecules*, 11(9), 2247–2254.

[53] Aya, K. L., & Stern, R. (2014). Hyaluronan in wound healing: rediscovering a major player. *Wound repair and regeneration*, 22(5),

579–593.

[54] Neumayer, T., Prinz, A., & Findl, O. (2008). Effect of a new cohesive ophthalmic viscosurgical device on corneal protection and intraocular pressure in small-incision cataract surgery. *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, 34(8), 1362–1366.

[55] Fallacara, A., Vertuani, S., Panozzo, G., Pecorelli, A., Valacchi, G., & Manfredini, S. (2017). Novel artificial tears containing cross-linked hyaluronic acid: an in vitro re-epithelialization study. *Molecules*, 22(12), 2104.

[56] Mlčochová, P., Bystrický, S., Steiner, B., Machová, E., Kooš, M., Velebný, V., & Krčmář, M. (2006). Synthesis and characterization of new biodegradable hyaluronan alkyl derivatives. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 82(1), 74–79.

[57] Carracedo, G., Villa-Collar, C., Martin-Gil, A., Serramito, M., & Santamaría, L. (2018). Comparison between viscous teardrops and saline solution to fill orthokeratology contact lenses before overnight wear. *Eye & contact lens*, 44, S307–S311.

[58] Bowman, S., Awad, M. E., Hamrick, M. W., Hunter, M., & Fulzele, S. (2018). Recent advances in hyaluronic acid based therapy for osteoarthritis. *Clinical and translational medicine*, 7(1), 1–11.

[59] Trommer, H., Wartewig, S., Böttcher, R., Pöppel, A., Hoentsch, J., Ozegowski, J. H., & Neubert, R. H. (2003). The effects of hyaluronan and its fragments on lipid models exposed to UV irradiation. *International journal of pharmaceutics*, 254(2), 223–234.

[60] Hašová, M., Crhák, T., Šafránková, B., Dvořáková, J., Muthný,

T., Velebný, V., & Kubala, L. (2011). Hyaluronan minimizes effects of UV irradiation on human keratinocytes. *Archives of dermatological research*, 303, 277–284.

[61] DeForest, C. A., & Anseth, K. S. (2011). Cytocompatible click-based hydrogels with dynamically tunable properties through orthogonal photoconjugation and photocleavage reactions. *Nature chemistry*, 3(12), 925–931.

[62] Desai, R. M., Koshy, S. T., Hilderbrand, S. A., Mooney, D. J., & Joshi, N. S. (2015). Versatile click alginate hydrogels crosslinked via tetrazine–norbornene chemistry. *Biomaterials*, 50, 30–37.

[63] Gulfam, M., Jo, S. H., Jo, S. W., Vu, T. T., Park, S. H., & Lim, K. T. (2022). Highly porous and injectable hydrogels derived from cartilage acellularized matrix exhibit reduction and NIR light dual-responsive drug release properties for application in antitumor therapy. *NPG Asia Materials*, 14(1), 8.

[64] Nakahara, H., Hagimori, M., Kannaka, K., Mukai, T., & Shibata, O. (2022). Inverse electron-demand diels–alder reactions of tetrazine and norbornene at the air–water interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 211, 112333.

[65] Jeon, O., Bouhadir, K. H., Mansour, J. M., & Alsberg, E. (2009). Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, 30(14), 2724–2734.

[66] Wu, Y., Joseph, S., & Aluru, N. R. (2009). Effect of cross-linking on the diffusion of water, ions, and small molecules in

hydrogels. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113(11), 3512-3520.

[67] Famili, A., & Rajagopal, K. (2017). Bio-orthogonal cross-linking chemistry enables in situ protein encapsulation and provides sustained release from hyaluronic acid based hydrogels. *Molecular pharmaceutics*, 14(6), 1961-1968.

