



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원 저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#)





1,4-Butanediol Diglycidyl Ether와
Divinyl Sulfone으로 가교된
히알루론산 필러의 물리화학적 및
유변학적 특성 분석

연세대학교 대학원

의료기기산업학과

최 환 열

1,4-Butanediol Diglycidyl Ether와
Divinyl Sulfone으로 가교된
히알루론산 필러의 물리화학적 및
유변학적 특성 분석

지도교수 구 성 옥 · 권 병 주

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2024년 12월

연세대학교 대학원

의료기기산업학과

최 환 열

최환열의 석사 학위논문으로 인준함

심사위원

심사위원

심사위원

구성욱 ~~김현경~~

진병주 ~~김명숙~~

장관석 ~~김은석~~

연세대학교 대학원

2024년 12월

감사의 글

석사 과정과 학위논문을 마무리하며 이렇게 감사의 글을 쓰니 감회가 새롭습니다.

설렘과 꿈을 안고 학교 정문을 들어섰던 게 엊그제 같은데, 벌써 2 년이라는 시간이 흘렀습니다. 그동안의 시간들은 저에게 감사함을 항상 느끼게 해 주었습니다. 석사학위 논문을 완성할 수 있도록 많은 분들의 도움과 지원이 있었습니다. 이 글을 통해 깊은 감사의 마음을 전하고자 합니다.

우선, 석사 과정 동안 큰 가르침을 주신 지도 교수님께 진심으로 감사드립니다.

구성욱 교수님, 권병주 교수님께서 보여주신 학문에 대한 열린 마음과 열정을 보며 학문을 대하는 자세를 배울 수 있었습니다. 마지막까지 교수님께서 아낌없이 격려해 주시고 지도해 주셔서 학위논문을 잘 마무리할 수 있었습니다. 이곳에서 배운 교수님들의 가르침에 부끄럽지 않도록 저 또한 끊임없이 배움을 놓지 않고, 세상에 조금이라도 도움이 될 수 있도록 노력하겠습니다. 학업과 학위 과정도 의미가 있었지만, 이렇게 좋은 동기 (장현이 형님)를 만날 수 있었던 것 또한 저에게는 감사한 일입니다.

사랑하는 제 가족들에게 감사를 전합니다. 직장과 학업을 병행하기가 쉽지 않아 육체적, 정신적으로 힘들 때 많은 위로가 되어 준, 제 인생의 비타민이며 사랑스럽고 고마운 후원자이자 동반자인 아내 강민정, 우리 집의 행복 제조기 딸 최윤서에게 이 기쁨을 함께 나누며 감사를 전합니다. 항상 배움의 자세를 놓지 않고 격려해주신 존경하는 아버지, 어머니, 그리고 항상 응원과 지원해 주시는 사랑하는 장인어른, 장모님의 무한한 사랑에 깊이 감사드립니다.

연구 과정 동안 함께 고민하고 힘을 보태 준 정다함 책임연구원님, 김소현 주임연구원님, 모든 분들께 진심으로 감사드리며, 앞으로도 더욱 열심히 노력하겠습니다.

대학원 석사 과정의 큰 마침표를 찍었지만, 대학원 생활은 새로운 도약을 위한 준비의 쉼표로 남겨두고 싶습니다. 앞으로도 계속해서 최선을 다하며, 사회에 긍정적인 영향을 미칠 수 있는 사람이 되기 위해 지속적으로 성장하고 발전해 나가겠습니다. 감사합니다.

2024년 12월

최환열 올림



차례

그림 차례	iii
표 차례	v
국문 요약	vi
제 1 장 서론	1
1.1. 연구 배경	1
1.2. 연구 목적	14
제 2 장 재료 및 방법	15
2.1. 재료	15
2.2. 가교 히알루론산 하이드로겔 제조	15
2.3. 히알루론산 하이드로겔의 물리화학적 특성	17
2.3.1. FTIR-ATR 분석	17
2.3.2. 유변학 특성 분석	17
2.3.3. 팽윤도	18
2.3.4. 응집력	18
2.3.5. 주입력	18
2.4. 히알루론산 하이드로겔의 생체외 평가	19
2.4.1. 세포독성 평가	19
2.4.2. 효소 분해 시험	20
제 3 장 결과	21
3.1. 가교된 히알루론산 하이드로겔의 제조	21
3.2. 히알루론산 하이드로겔의 물리화학적 특성	22
3.2.1. FTIR-ATR 분석	22
3.2.2. 유변학 특성 분석	23
3.2.3. 팽윤도	25
3.2.4. 응집력	26
3.2.5. 주입력	27
3.3. 히알루론산 하이드로겔의 생체외 평가	28
3.3.1. 세포독성 평가	28
3.3.2. 효소 분해 시험	30



제 4 장 고찰	32
제 5 장 결론	37
참고문헌	38
영문 요약	41

그림 차례

Figure 1. 국내 경쟁사 시장 점유율 (시장조사기관 GBI 리서치, NICE 디엔비기술분석보고서)	3
Figure 2. 해외 경쟁사 시장점유율 (시장조사기관 GBI 리서치, UBS 파마슈티컬 핸드북(Pharmaceutical Handbook 2019))	4
Figure 3. Dermal Fillers Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034	5
Figure 4. Chemical structures of a) hyaluronic acid and b) BDDE, c) DVS	12
Figure 5. Scheme for preparation of hyaluronic acid-based hydrogel crosslinked by BDDE or DVS	16
Figure 6. Photograph of hydrogels, a) HA-BDDE 1, b) HA-BDDE 2, c) HA-BDDE 3,	21
Figure 7. FT-IR spectra of Hyaluronic acid, HA-BDDE 3 and HA-DVS 3	23
Figure 8. Swelling ratio of HA hydrogels. The error bars represent SD (n = 3) *p < 0.05, ** p < 0.01 (t-test)	25
Figure 9. Cohesiveness of HA hydrogels. The error bars represent SD (n = 3) *p < 0.05, ** p < 0.01 (t-test)	26
Figure 10. Injection force of HA hydrogels. The error bars represent SD (n = 3)	27
Figure 11. Cell viability for extract of HA hydrogels against Fibroblast cell (L929). NC is negative control. PC is positive control as extract of latex. The error bars represent SD (n = 3)	28



- Figure 12. Cytotoxicity assay in L929 cells performed using test on extract, a) regent control, b) negative control (NC), c) 29
positive control (PC), d) HA-BDDE 1, e)
HA-BDDE 2, f) HA-BDDE 3
- Figure 13. Enzymatic degradation of HA hydrogels with 50 U/mL (a, d), 75 U/mL (b, d) and 100 U/mL (c, f) hyaluronidase, 31
respectively. The error bars represent SD
(n = 3)



표 차례

표 1. 의료기기의 품목 분류	6
표 2. 23년도 제조 및 수입별 다수 허가 품목 (단위 : 건수)	7
표 3. 23년도 인체이식형 의료기기 다수 품목 (상위 10 개, 단위: 건수)	7
표 4. 23년 일회용 의료기기 다수 품목 현황 (상위 15 개, 단위 : 건수)	8
표 5. Summary of FDA-approved dermal fillers on the market	9
표 6. 체내에 존재하는 히알루론산 분포	12
표 7. 가교 히알루론산의 조성과 시료명	17
표 8. 제조된 HA 하이드로겔의 유변학적 특성	24



국 문 요 약

1,4-Butanediol Diglycidyl Ether 와 Divinyl sulfone 으로 가교된 히알루론산 필러의 물리화학적 및 유변학적 특성 분석

히알루론산 기반 더말 필러는 전 세계의 필러 시장을 지배하고 있다. 히알루론산 기반 필러는 히알루론산을 화학적 가교제를 통해 하이드로겔로 제조된다. 가장 대표적으로 사용되는 가교제는 BDDE와 DVS이며, 현재 대부분의 히알루론산 필러는 BDDE로 제조되고 있지만, DVS와 BDDE의 가교제로의 우월성은 엄격하게 비교되지 않았다. 우리는 가교제의 우월성을 평가하기 위해 BDDE 또는 DVS를 이용하여 동일한 가교제 농도로 히알루론산 하이드로겔을 제조했다. 제조된 하이드로겔은 필러화 하였으며, 제조된 하이드로겔들의 화학적 구조는 FTIR-ATR을 통해 분석하였고, 물리적 특성은 레오미터와 주입력 측정장치를 활용하여 유변학적 특성, 응집력 및 주입력을 분석하였다. 섬유아세포에서 각 필러들의 용출물들의 세포독성을 평가하고, 세포 외 효소분해 측정시험을 통해 히알루론산 분해효소에 대한 민감도를 평가하였다. 최종적으로, 유변학적 특성, 팽윤도, 주입력, 분해효소에 대한 민감도를 고찰하여, DVS와 BDDE의 가교제로서 우월성을 평가하였다. DVS가 BDDE보다 분자량이 적어 중량대비 같은 농도로 처리하였을 때 히알루론산과 가교되는 정도가 많아 높은 저장탄성계수를 나타냈다. 그러나, DVS는 첨가되는 양에 따라 유변학적 특성을 포함한 팽윤도, 응집력, 주입력 등이 지수적으로 증가하여 반응의 제어가 어려웠고, BDDE는 배수적으로 증가하여 보다 핸들링이 쉽고 예측이 가능하였다. 생체외 평가를 통해, BDDE와 DVS로 제조된 하이드로겔들은 세포독성이 나타나지 않았으며, 분해효소는 모두 유사하였다. 최종적으로 핸들링이 쉽고, 효율적인 가교가 나타나 물성제어가 용이한 BDDE가 DVS보다 우월하다고 판단되었다. 본 연구 결과를 통해, 추후 신규 가교제 혹은 가교 공정을 개발하는데 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

핵심되는 말: 히알루론산기반 필러, 1,4-butanediol diglycidyl ether, divinyl sulfone, 가교제, 하이드로겔, 유변학적 특성



1. 서론

1.1. 연구 배경

히알루론산은 hyaluronic acid, hyaluronate, hyaluronan 등의 이름으로 불리고 있는 천연 유래 고분자로 1934년도에 소의 눈의 유리체에서 처음 얻어졌으며, 히알루론산은 1970년대 후반까지는 세포외 기질의 중 하나의 탄수화물 중합체로만 설명됐다. 이후 히알루론산의 주 역할들이 밝혀 지기 시작했다¹. 1970~1980년대에 최초로 안구 수술에 사용되도록 승인되었다. 이후, 다양한 생물학적 기능이 밝혀져 의료기기나 의약품으로 활용됐다. 여전히 히알루론산은 소재 연구의 인기 있는 주제이며, 다양한 추가 기능이나 의료기기, 의약품으로써의 개발이 연구되고 있다. 그러나, 최근 히알루론산을 주제로 하는 소재 개발 연구는 히알루론산 자체를 사용하는 것보다는 다양한 작용기를 화학적으로 변형하여 새로운 화학구조의 히알루론산을 제조하거나, 다른 유·무기 물질과 혼합하여 사용되는 사례가 많다². 히알루론산은 필러 시장을 견인하는 의료기기 소재로 잘 알려져 있다.

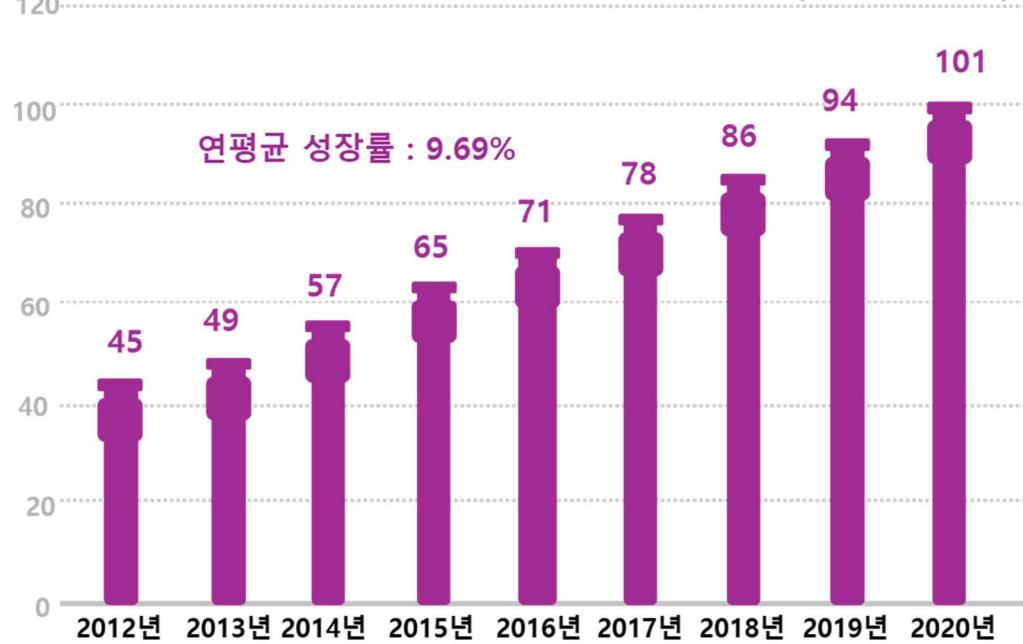
국내 필러 시장은 빠르게 성장하고 있으며, 미용과 성형 분야에서 매우 중요한 위치를 차지하고 있다. 국내 필러 시장은 성형 수술과 비수술적 시술에 대한 높은 수요로 인해 크게 확장되었으며 특히, 히알루론산 필러는 주로 주름 개선, 얼굴 볼륨 복원, 피부 수분 공급 등 미용 목적을 위해 사용하는 주사제형 제제로, 미용 성형 분야에서 매우 중요한 역할을 한다³. 히알루론산은 체내에 자연적으로 존재하는 다당류로 물을 끌어당기는 성질이 뛰어나 피부에 탄력과 수분을 제공하며, 이러한 특성으로 인해 히알루론산 필러는 자연스러운 조직수복 및 주름 개선이 가능하고 부작용이 낮고 체내에서 시간이 지나면 자연적으로 분해되는 안전한 소재로 널리 사용되고 있다. 국내 필러 시장은 성형 수술과 비수술적 시술에 대한 높은 수요로 인해 빠르게 성장하고 있으며, 특히 히알루론산 필러가 주름 개선, 얼굴 볼륨 복원, 피부 수분 공급 등에서 중요한 역할을 하고 있다. 히알루론산은 체내에 자연적으로 존재하며, 뛰어난 수분 흡수 성질로 인해 피부에 탄력과 수분을 제공한다. 이 필러는 자연스러운 조직 복원과 주름 개선이 가능하며, 부작용이 적고 체내에서 자연적으로 분해되는 안전한 소재로 인기를 끌고 있다. 국내 필러 시장은 2012년부터 2020년까지 연평균 9.69% 성장했으며, 2020년에는 약 101억 달러 규모에 도달했다. 주요 경쟁사로 엘지화학, 휴젤, 메디톡스, 휴메딕스가 시장을 주도하고 있으며, 이들은 각각 이브아르, 더채움, 뉴라미스, 엘라비에 브랜드를 가지고 있다 (Fig. 1). 그러나 COVID-19로 외국인 환자가 감소하고, 저가 경쟁이 심화되면서 내수 시장이 포화 상태에 이르고 있다. 해외 필러 시장도 2013년부터 2020년까지 연평균 9.78%



성장하여 2020년 약 27억 달러 규모에 도달했다. 주요 경쟁사로는 앤더간, 갈더마, 멀츠 에스테틱스가 있으며, 이들은 각각 쥬비덤, 레스틸렌, 벨로테로와 레디어스 브랜드를 판매하고 있다(Fig. 2). 필러는 현재 미국을 포함해서 전 세계적으로 두 번째로 많이 시행되는 비침습적 미용 시술로, 글로벌 안면 주사제 시장 규모는 2023년 189.5억 달러로 평가되었으며 2032년에는 368억 달러에 달할 것으로 예상되며, 2023년부터 2032년까지 예측 기간 동안 7.64%의 연평균 성장률(CAGR)로 성장할 것으로 전망된다 (Fig. 3). 북미 시장은 2022년 약 6,70백만 달러로 평가되었다⁴. 고령화 사회에서 노화 징후를 개선하려는 사람들의 수요 증가, 그리고 빠른 시술과 회복 시간을 원하는 사람들에게 인기가 많다. 이로 인해 필러 시장의 점유율을 살펴보면, 2022년을 기준으로 북아메리카가 36%, 유럽이 30%, 아시아 및 태평양 지역이 22.5%이고, 라틴 아메리카가 7.4%, 중동이 4.1%였다. 전 세계적으로 비침습적 필러 시술에 대한 두려움이 많이 개선되고, 안전하고 효과적인 신제품 필러가 개발되면서 시장 성장에 크게 기여했다.

국내 필러 시장

(단위 : 백만 달러)

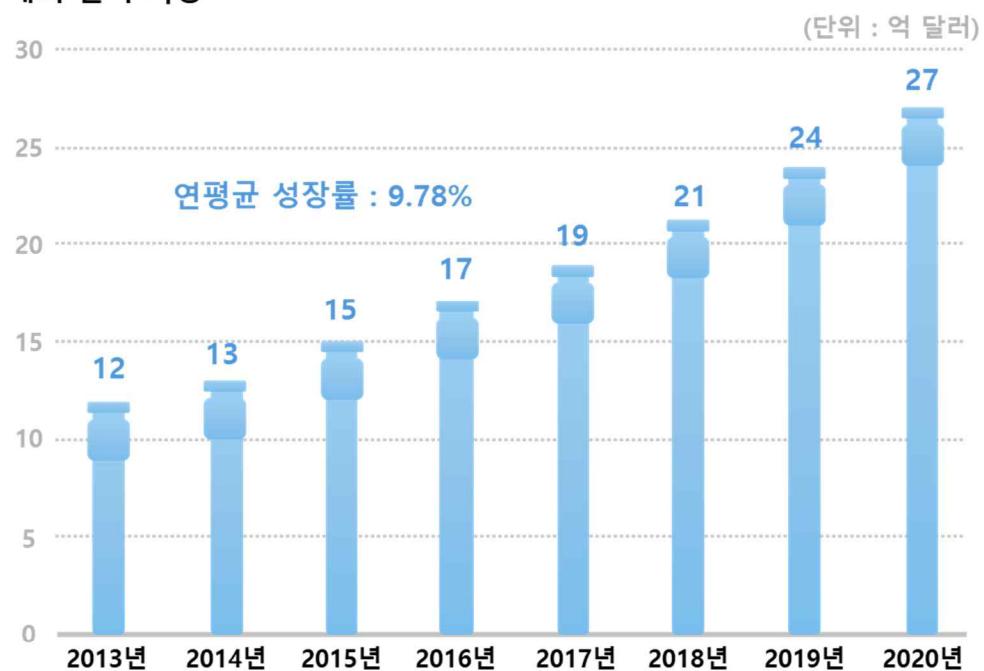


국내 경쟁사 시장 점유율

주요경쟁사	휴젤	메디톡스	엘지화학	휴메딕스
대표브랜드	더채움	뉴라미스	이브아르	엘라비에
시장점유율 (월 매출액)	18억원 내수 : 12억원 수출 : 6억원	14억원 내수 : 10억원 수출 : 3억원	50억원 내수 : 8억원 수출 : 42억원	17억원 내수 : 7억원 수출 : 10억원

Figure 1. 국내 경쟁사 시장 점유율 (시장조사기관 GBI 리서치, NICE 디엔비기술분석 보고서)

해외 필러 시장



해외 경쟁사 시장 점유율

주요경쟁사	Allergan	Galderma	Merz Asetheics	기타
대표브랜드	쥬비덤	레스틸렌	벨로테로, 레디어스	테오시알, 페펙타 등
시장점유율	36%	34%	15%	15%

Figure 2. 해외 경쟁사 시장점유율 (시장조사기관 GBI 리서치, UBS 파마슈티컬 핸드북(Pharmaceutical Handbook 2019))

FACIAL INJECTABLE MARKET SIZE, 2022 TO 2032 (USD BILLION)

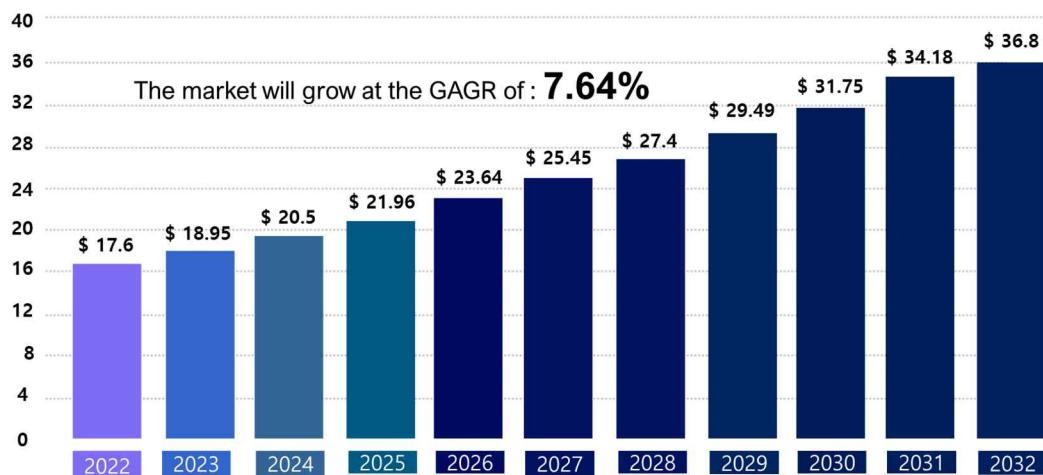


Figure 3. Dermal Fillers Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034

최초의 필러 시술은 1983년 Dr. Neuber가 환자의 팔에서 취한 지방조직을 얼굴 결손 부위에 이식한 것으로 알려져 있다⁵. 이후 지방, 파라핀, 액상 실리콘 등이 활용되었지만 심각한 부작용이 계속 발생하면서 사회적 문제가 되어 판매가 중단되었다⁶. 이후 콜라겐 필러가 등장하면서, 소, 돼지, 인간유래 등 다양한 기원의 콜라겐 필러가 개발 및 연구되었다. 2000년대 초까지만 해도 콜라겐이 필러의 Gold standard로 언급되었지만, 수명이 3~6개월로 짧은 데다가 시술 전 감작성 시험을 미리 수행하는 단점을 가지고 있었다⁷. 성형용 필러는 한국의 「의료기기 품목 및 품목별 등급에 관한 규정」에 따라 “조직수복용생체재료”와 “조직수복용재료”로 구분된다. 이러한 필러는 인체에 미치는 잠재적 위험도가 가장 높은 4등급으로 분류되며(표 2), 이는 안전성 및 유효성에 대한 엄격한 검증을 요구한다. 이러한 분류는 필러의 안전한 사용과 효과적인 적용을 보장하기 위한 중요한 기준이 되며, 국내에서 허가를 받은 필러는 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS)의 승인을 필요로 하며, 이는 필러가 생리적 영향을 미칠 수 있는 고위험 의료기기로 취급되기 때문이다. 허가 절차는 제품의 안전성과 유효성을 입증하는 임상 시험 자료 제출이 포함되며, 필러의 성분, 가교제의 안전성, 물리적 특성(예: 점도와 탄성) 등이 고려된다. 23년도 제조 및 수입 별 다수 허가품목은 총 1,126건으로 제조가 905건(80.4%), 수입은 221건(19.6%)이었고, 조직수복용



생체재료는 78건, 조직수복용 재료는 26건으로, 이 두 카테고리는 상위 10개 품목에 포함되었다⁸. 이러한 통계는 의료기기 시장의 동향을 반영하며, 특히 국내 제조의 비중이 높음을 보여준다(표 1-4).

표 1. 의료기기의 품목 분류

분류번호	품목명	영문명 [등급]	정의
B04230.01	조직수복용생체재료	Graft /prosthesis, Biomaterial [4]	혈관, 심장, 격막, 근막, 피부(dermal, cutanoeous 등) 등 인체 조직 및 기관의 대체 · 수복 · 재건(reconstruction)에 사용되는 생체 유래 재료. 기능의 향상을 위하여 첨가물을 혼합하여 2차 가공된 인체유래 피부를 함유한 제품을 포함한다.
B04230.02	조직수복용재료	Graft /prosthesis	혈관, 심장, 격막, 근막, 피부(dermal,cutaneous) 등 인체 조직의 대체·수복·재건 (reconstruction)에 사용되는 재료. 다만, 생체 유래 재료로 만든 것은 여기에서 제외된다.



표 2. 23년도 제조 및 수입별 다수 허가 품목 (단위: 건수)

순위	제조			수입		
	품목명	건수	'22년 순위	품목명	건수	'22년 순위
1	고위험군감영체유전자검사시약	107	2	비흡수성체내용스태플	9	9
2	고위험성감염체면역검사시약	103	1	다초점인공수정체	8	1
3	조직수복용생체재료	78	3	인공엉덩이관절	8	-
4	매일착용소프트콘택렌즈	54	4	중심정맥용카테터삽입기	7	-
5	치과용임플란트고정체	50	5	고위험성감염체면역검사시약	6	-
6	조직수복용재료	26	9	고위험성감염체유전자검사시약	6	3
7	추간체유합보형재	18	-	인공무릎관절	6	2
8	폴리디옥사논봉합사	18	7	2차치유품제창상피복재	5	-
9	범용전기수술기	17	-	범용전기수술기	5	-
10	추간체공정재	16	-	ABO · RhD이외의혈액형면역검사시약	4	-
				ABO · RhD혈액형면역검사시약	4	-
				양압지속유지기	4	-
				펄스광선조사기	4	-
				펄스옥시미터	4	-

표 3. 23년도 인체이식형 의료기기 다수 품목 (상위 10개, 단위: 건수)

순위	분류번호	품목명	제조	수입	총계	'22년 순위
1	B04230.01	조직수복용생체재료	77	-	77	1
2	C20030.01	치과용임플란트고정체	50	2	52	2
3	B04230.02	조직수복용재료	26	-	26	5
4	B03160.03	추간체유합보형재	18	2	20	6
5	B02020.20	폴리디옥사논봉합사	18	-	18	3
6	B03160.01	추간체고정재	16	-	16	9
7	B02020.22	기타흡수성봉합사	15	-	15	-
8	B03090.01	골절합용판	10	2	12	-
9	B02040.01	안면조직고정용실	10	-	10	4
	B03040.01	인공엉덩이관절	2	8	10	-



표 4. 23년 일회용 의료기기 다수 품목 현황 (상위 15개, 단위: 건수)

순위	분류번호	품목명	제조	수입	총계	'22년 순위
1	B07090.02	압박용밴드	75	55	130	1
2	C20040.01	치과용임플란트상부구조물	104	12	116	3
3	K05030.01	고위험성감염체면역검사시약	90	-	90	2
4	B07010.02	진료용장갑	3	86	89	4
5	B04230.01	조직수복용생체재료	78	-	78	7
6	I03020.01	핵산추출용시약	49	23	72	5
7	B07000	외과용품	39	23	62	6
8	C20030.01	치과용임플란트고정체	50	2	52	-
9	B07080.01	피부보호대	33	14	47	-
10	A57090.01	흡인용튜브·카테터	18	28	46	10
11	A38090.05	의료기구용클립	29	14	43	11
12	A66070.01	진공채혈관	7	36	43	-
13	N05030.01	고위험성감염체유전자검사시약	37	3	40	-
14	A58020.01	체외형변용프로브	12	21	33	-
15	I20020.01	검체수송배지	27	2	29	9

승인을 받은 필러는 약 10여 개에 불과하며, 전 세계 시장에는 150개 이상의 주사 가능한 필러가 존재한다. 그 중 히알루론산은 가장 널리 사용되고 있으며, FDA에 등록되어 판매되고 있는 더마 필러 종류는 콜라겐, 히알루론산, Poly-L-lactic acid, Calcium hydroxylapatite 등이 있다⁹(표 5).

표 5. Summary of FDA-approved dermal fillers on the market

Filler type	Subtype	Name (manufacturer)	Durability (months)	Market status
Collagens	Bovine	Zyderm 1, 2	2~6	FDA(1981) CE-marked
		Zyplast	2~6	FDA(1981) CE-marked
	Cell-cultured	Cosmoderm	3~4	FDA(2003) CE-marked
		Cosmoplast	3~4	FDA(2003) CE-marked
	Cadaveric	Alloderm	6~12	CE-marked
		Cymetra micronized injectable Alloderm	3~6	CE-marked
Hyaluronic acid	Avian derived	Hylaform (Genzyme)	3~4	FDA(2004) CE-marked
		Prevelle Silk (Genzyme)	3~4	FDA(2008) CE-marked
	Bacterial-cultured	Perlane (Qmed)	6~12	FDA(2003) CE-marked
		Perlane lidocaine (Qmed)	6~12	FDA(2010) CE-marked
	Restylane/Restylane touch (Qmed)	Restylane/Restylane touch (Qmed)	6~12	FDA(2003) CE-marked
		Restylane lidocaine (Qmed)	6~12	FDA(2010) CE-marked
	Elevee (Annika Therapeutics)	Elevee (Annika Therapeutics)	6~12	FDA(2006) CE-marked
		Captique (Genzyme)	3~6	FDA(2004) CE-marked
	Juvederm (Corneal, Paris)	Juvederm (Corneal, Paris)	6~12	FDA(2006) CE-marked
		Juvederm lidocaine (Corneal, Paris)	6~12	FDA(2010) CE-marked
Synthetic polymers	Poly-L-lactic acid	Sculptra	12~24	FDA(2004) CE-marked
	Calcium hydroxyapatite	Radiesse	12~24	FDA(2006) CE-marked
	4% Polyalkylimide	Bio-alcamid	Permanent	CE-marked
	Polyacrylamide hydrogel	Aquamid	Permanent	CE-marked

히알루론산은 다양한 분야에서 응용되고 활용되며, 특히 제약 및 화장품분야에서 중요한 역할을 한다. 히알루론산은 피부 건강을 증진하고 관절을 윤활하며, 조직 회복에 필수적인 생리적 과정에 관여하여 의료용 등급 히알루론산은 활성 제약성분(Active pharmaceutical ingredient, API)로 사용되어 약물과 의료기기의 부형제로 활용된다. 정형외과에서는 골관절염 치료에 점성 보충제로 사용되어 관절을 윤활하고 통증을 완화시키고 히알루론산은 손상된 연골 재생 및 관절 기능 회복에 중요한 역할을 한다¹⁰. 조직공학분야 및 세포치료분야에서는 생체적합성 스캐폴드, 세포 부착 및 증식을 촉진하여 조직 재생에 관여한다¹¹. 또한, 상처치유 과정을 가속화하고 흉터를 줄이며, 나노기술을 통해 표적 전달시스템을 개발하여 치료적 응용분야에서 혁신기술 및 생체재료로 사용되고 있다¹².

현재 시판되고 있는 더말 필러 소재의 76%는 히알루론산으로 제조된 필러이다. 그 외 재료로는 calcium hydroxyl apatite, poly(methyl methacrylate)계 고분자, poly-L-lactic acid와 지질로 이루어진 소재가 판매되고 있다. 히알루론산기반으로 제조된 필러가 안전하다는 인식이 자리 잡으면서, 미용 시술에 대한 수요가 증가했기 때문에 현재 히알루론산은 필러 소재로 Gold standard라고 볼 수 있다. 음이온성 다당류로 N-acetyl-D-glucosamine과 D-glucuronic acid가 반복된 선형 고분자이며¹³ (Fig. 4a), 히알루론산은 다른 글루코사민과 달리 비황산염을 가진 선형 다당류이다¹⁴. 히알루론산 (Hyaluronic acid, HA)은 신체의 거의 모든 부분에 존재하며 특히 탯줄 (umbilical cord), 비연골 (nasal cartilages), 유리케 (vitreous body), 진피 (dermis), 소변 (urine), 혈청 (serum) 등에 주로 많이 존재한다 (표 6)¹⁵. 히알루론산은 pKa가 3~4이고, 생물학적 pH인 7에서 히알루론산에 있는 카르복실기가 이온화면서 sodium과 같은 금속이온과 결합을 이루게 된다. 이러한 음이온성 때문에 최대 1,000배에 달하는 많은 양의 물을 흡수할 수 있다고 알려져 있으며, 신체에서 중요한 구조적 기능적 역할을 나타낸다¹⁶. 히알루론산은 인체의 피부, 관절의 윤활액 세포 외 기질의 주성분 중 하나로 상처치유¹⁷, 골 관절염 및 조직학대와 같은 다양한 응용분야에 사용이 가능하다. 히알루론산은 과거 소의 유리액이나 수탉의 빗에서 추출되어 사용되어 왔으나, 가격이 고비용이고, 동물성 히알루론산이기 때문에 면역원성 문제를 해결해야만 했다. 그러나, 최근에는 *Streptococcus* sp.에서 높은 수율로 히알루론산 생산이 가능하여, 현재 대부분의 히알루론산은 *Streptococcus* sp.에서 생산된 히알루론산이 식 · 의약품 및 의료기기 분야에서 사용하고 있다¹⁸. *Streptococcus* sp.에서 생산된 히알루론산의 경우, 내독소가 완벽히 제거되어야 의약품이나 의료기기로 사용이 가능하다¹⁹. 따라서, 인체에 주입되어 조직을 확대 혹은 수복하기 위한 재료로 사용하기 위해서는 천연의 히알루론산 자체만으로는 사용하기 어려운데, 그 이유는 히알루론산 용액은 점도가



매우 높으며²⁰ 신체에 주입된 후, 히알루론산 분해효소에 의해 쉽게 분해되기 때문이다²¹.

조직수복용생체재료로 사용되기 위해서는 신체 내에 주입되어 생체 조직과 호환될 수 있는 기계적 강도를 나타낼 수 있는 물성을 가지고 있어야 하며, 적절한 분해시간을 갖는 생분해성이 요구된다²². 화학적 가교제를 통해 제조된 히알루론산 기반의 하이드로겔은 천연의 히알루론산과 달리 높은 기계적 강도를 가지고 있고, 히알루론산 분해효소에 의한 민감도가 낮아 분해 속도가 느린다²³. 히알루론산 기반의 하이드로겔은 다양한 화학적 가교제를 활용하여 개발되었다. 가교제의 예로는 대표적으로 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르 (1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)²³, 디비닐설폰 (divinyl sulfone, DVS)²⁴, poly(ethyleneglycol)diglycidylether(PEGDGE)²⁵, adipic acid dihydrazide²⁶, carbodiimide²⁷등이 히알루론산 기반 하이드로겔을 제조에 활용되었다. 화학적 가교제는 양쪽에 히알루론산과 반응할 수 있는 작용기를 가지고 있다. 이러한 작용기는 히알루론산 뿐만 아니라 단백질, 핵산, 세포 등과도 결합이 가능하여 독성을 가지고 있기 때문에 히알루론산 하이드로겔을 제조하기 위한 가교제는 독성이 최대한 낮아야 하며, 핸들링이 쉬워야 하고, 또한 가교 반응에 참여하지 않은 가교제를 손쉽게 제거할 수 있어야 한다.

현재 시판되고 있는 히알루론산 기반 필러는 BDDE와 DVS가 사용된 필러가 대부분이다. BDDE는 양쪽 말단에 에폭시 그룹을 가지고 있는 Bis-epoxy계 가교제이며 (Fig. 4b), DVS는 양쪽 말단에 바이닐 그룹을 가지고 있는 가교제이다 (Fig. 4c). 두 가교제 모두 NaOH 수용액과 같은 알칼리 환경에서 활성화되어 히알루론산의 하이드록시 그룹을 공격하여 가교반응을 수행한다. BDDE의 경우 glycidyl 브리지를 히알루론산과 히알루론산 사이를 연결하고 있고, 이 구조는 대사과정에서 해당과정을 통해 분해되는 것으로 알려져 있다.

표 6. 체내에 존재하는 히알루론산 분포

Tissue or Fluid	Hyaluronan concentration (mg/L)
Umbilical cord	14,100
Synovial fluid	1,420~3,600
Vitreous body	140~338
Dermis	200
Thoracic lymph	8.5~18
Urine	0.1~0.5
Serum	0.01~0.1

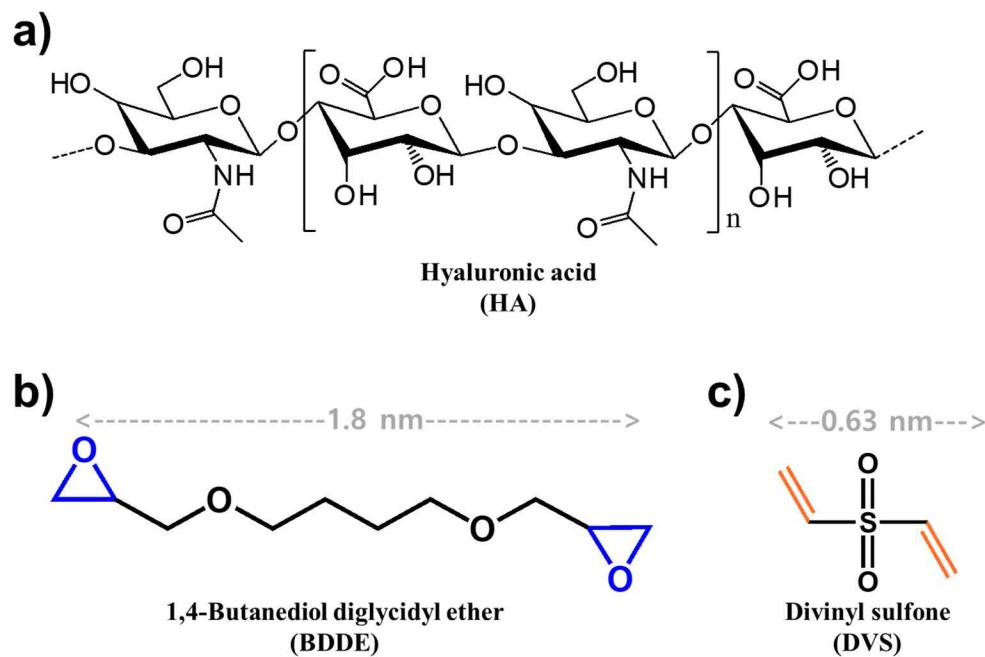


Figure 4. Chemical structures of a) hyaluronic acid and b) BDDE, c) DVS

DVS는 dimethyl sulfone 형태로 히알루론산 사이를 연결한다. 반응이 완료된 DVS와 BDDE의 생성물은 안전한 것으로 알려져 있으나, 히알루론산 사이를 가교하고 있는 BDDE와 DVS의 양이 (가교도) 많으면 많을수록 기계적 강도가 올라가지만, 지나치게 많은 가교결합으로 인해 이물질로 인식하여 면역세포들이 막을 형성하여 체내에서 캡슐화를 야기시키며, 가교도가 높을수록 생체안전성이 떨어진다는 보고가 있다. 따라서 적절하게 가교반응을 수행해야 하며, 적은 양을 사용해서 원하는 기계적 강도를 가진 하이드로겔을 제조할 수 있는 가교기술이 요구된다. BDDE와 DVS의 반응 양식은 앞서 언급한 것처럼 유사하고, 생성되는 하이드로겔의 물성을 사용되는 가교제 양과 반응 조건을 이용하여 조절이 가능하고, 필러를 만드는 회사마다 독자적인 가교 기술을 활용하여 제조하고 있다. 2022년에 발표된 논문에 따르면 미국에서 시판되는 약 20종의 HA 기반 필러는 BDDE로 가교된 것이며, 유럽에서 단 2개만이 DVS로 가교되고 한 개의 제품라인은 PEGDE로 가교된 것으로 보고되었다²⁸. 이러한 필러들의 기계적 물성들은 거의 유사하며, 분해정도, 생체독성도 유사한 것으로 알려져 있기 때문에 어떠한 제품이 더 우월하다고 평가하기 어렵다.

최근 비침습적 미용 시술이 증가함¹에 따라, 국내외에서 조직수복용생체재료로 히알루론산 기반 필러와 스킨부스터 제품을 연구 및 판매하는 기업이 꾸준히 증가하고 있으며, 각 기업들은 가교제 간의 우위성을 평가하지 않고, 공정 기술에 대한 내용만 언급하여 제품의 차별성을 주장하고 있다. 따라서 가장 많이 알려진 BDDE와 DVS 간의 가교제의 우위성을 평가하기 위해서는 동일한 공정기술로 히알루론산 기반 필러를 제조하여, 물리화학적 분석을 통한 평가가 필요하다.



1.2. 연구 목적

본 연구에서는 제조 공정 기술과 반응 조건 (교반속도, NaOH 함량, 반응온도 등)에서 BDDE와 DVS를 이용하여 하이드로겔을 제조하여 비교 분석을 수행하고자 한다. BDDE와 DVS는 유사하게 NaOH 수용액 상에서 반응이 진행되지만, 각 가교제마다 최적의 NaOH 농도가 있다. 또한, 동일한 질량의 가교제를 넣어줘도 BDDE와 DVS는 분자량이 다르고 물에 대한 용해도도 다르기 때문에, 반응 조건 (온도, 시간)과 반응속도, 가교도가 다르기 때문에 그에 따른 점탄성도 달라질 것으로 예상된다. 일반적으로 필러의 점탄성은 적용 부위 혹은 효과를 보고자 하는 목적에 따라 점탄성이 디자인되기 때문에, 기존의 연구에서는 유사한 물성 혹은 점탄성을 가진 필러들 간의 비교 분석이 대부분이었다. 따라서, 본 연구를 통해 각각 특정 반응 조건에서 BDDE와 DVS로 제조되는 하이드로겔을 제조하고, 제조한 하이드로겔을 필러화 하여 퓨리에 변환 적외선 분광법의 한 기술인 attenuated total reflection(ATR)을 통해 BDDE와 DVS로 제조된 하이드로겔의 화학적 기능기의 정성적 차이를 확인하고, 레오미터를 통해 유연학적 특성을 비교 분석하였다. 최종적으로, 효소 민감도, 필러의 용출물에 대한 세포독성을 종합적으로 비교 분석하여 BDDE와 DVS의 필러 제조에 있어서의 가교제의 우월성을 확인하자고 한다. 이러한 연구를 통해 가교제가 가지는 장점과 단점을 파악하여, 목적으로자 하는 물성을 구현할 수 있는 최적을 가교제를 선택하고, 이를 기반으로 반응 조건을 확립한다면, 히알루론산 뿐만 아니라 다양한 생체고분자에 적용이 가능하여 산업적 활용도가 매우 높을 것으로 사료된다.



2. 재료 및 방법

2.1. 재료

히알루론산 나트륨 (sodium hyaluronate, HA)은 Bloomage (Jinan, China)에서 구입하고, 1, 4-부탄디올 디글리시딜 에테르 (1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDE)와 디비닐설폰 (divinyl sulfone, DVS)는 시그마알드리치 (St. Louis, MO, USA), 수산화나트륨 (sodium hydroxide, NaOH)과 염화나트륨 (sodium chloride, NaCl), 인산일수소나트륨 (sodium phosphate dibasic dihydrate, Na₂HPO₄ · 2H₂O, 인산이수소나트륨 (sodium phosphate monobasic dihydrate, NaH₂HPO₄ · 2H₂O)은 덕산약품 (Ansan, Korea)에서 각각 구입하여 사용하였다.

2.2. 가교 히알루론산 하이드로겔 제조

수산화나트륨 수용액 0.25 M을 준비하여 여기에 히알루론산을 녹여, 12% 농도로 히알루론산 용액을 제조하였다. 하이드로겔 제조를 위해 12% 히알루론산 용액에 히알루론산 용액 대비 가교제 BDDE와 DVS를 첨가하여 혼합하였다. 가교제의 양은 히알루론산 용액 대비 중량 퍼센트로 표 7에서 나타낸 조성과 같이 계산하여 첨가하였고, HA-BDDE 반응조건은 37 °C에서 18 시간, HA-DVS 반응조건은 25 °C에서 1 시간 동안 인큐베이터에서 반응하였다. Fig. 5는 제조과정의 흐름을 모식도로 보여주며, 각각의 단계에서 히알루론산과 가교제의 반응 과정을 나타내었다. 가교된 하이드로겔은 10 mM의 농도와 pH 7인 인산완충생리식염수 (phosphate buffered saline, PBS)로 정제 및 세척하여 잔류 가교제를 제거하고 pH를 중화시켰다. 하이드로겔의 입자를 균일하게 분쇄하기 위해 200 μm의 공극을 갖는 시브팬에 2회 밀링하고, 분쇄된 하이드로겔을 주사기에 충전하고 121.1 °C에서 20분간 고압증기멸균 하였다.

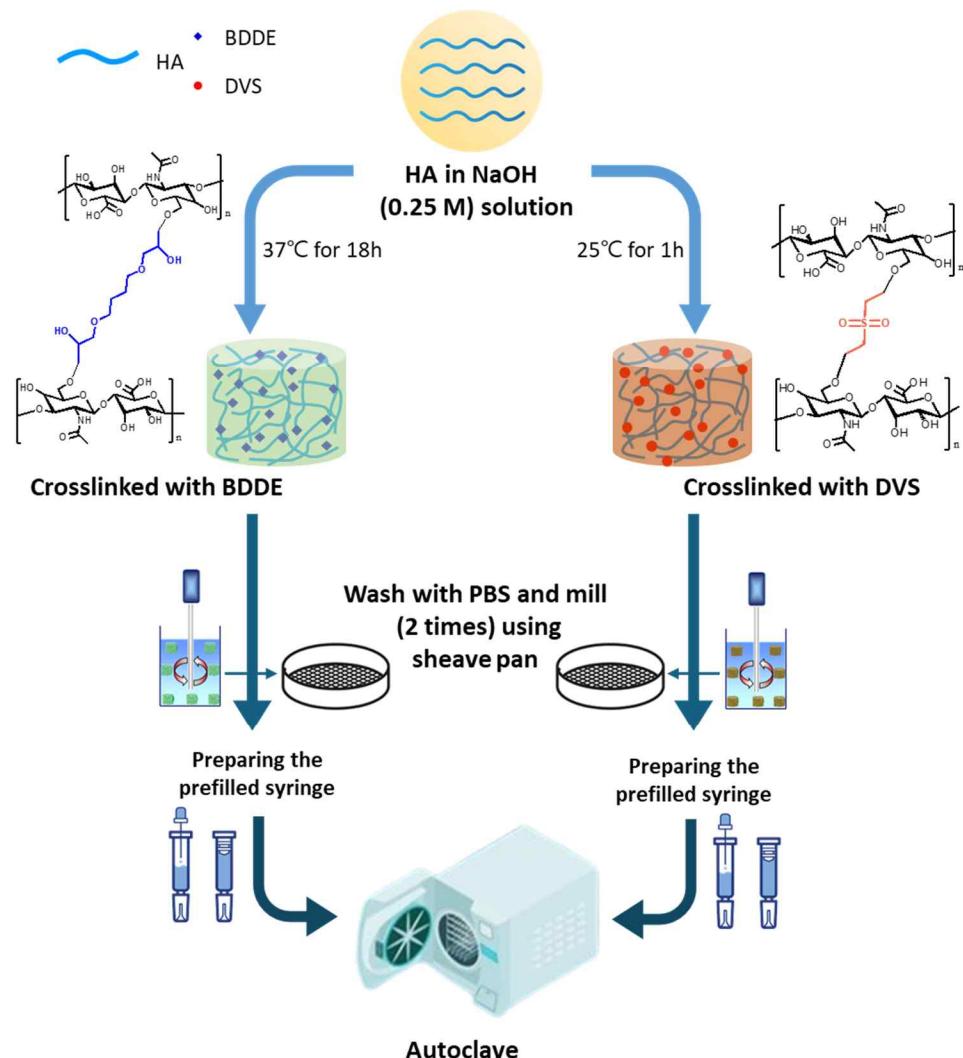


Figure 5. Scheme for preparation of hyaluronic acid-based hydrogel crosslinked by BDDE or DVS

표 7. 가교 히알루론산의 조성과 시료명

시료명	가교제	히알루론산 농도	가교제 농도
HA-BDDE 1	BDDE	24 mg/mL	0.25 wt%
HA-BDDE 2	BDDE	24 mg/mL	0.5 wt%
HA-BDDE 3	BDDE	24 mg/mL	1.0 wt%
HA-DVS 1	DVS	24 mg/mL	0.25 wt%
HA-DVS 2	DVS	24 mg/mL	0.5 wt%
HA-DVS 3	DVS	24 mg/mL	1.0 wt%

2.3. 히알루론산 하이드로겔의 물리화학적 특성

2.3.1. FTIR-ATR 분석

가교되지 않은 히알루론산(HA)과 가교된 히알루론산 하이드로겔인 HA-BDDE 3과 HA-DVS3의 FTIR-ATR 스펙트럼은 PerkinElmer Spectrum TWO FTIR-ATR (PerkinElmer, USA)를 사용하여 $4,000 \sim 700 \text{ cm}^{-1}$ 범위에서 측정되었다. 측정하기 전 모든 샘플은 동결건조를 통해 완전히 건조하였으며, 이를 분쇄하여 측정하였다.

2.3.2. 유연학적 특성 분석

하이드로겔의 유연학적 특성은 레오미터 (Kinexus Pro, NETZSCH, Germany)를 사용하여 측정하였다. 실험은 $0.1 \sim 10 \text{ Hz}$ 사이의 3% 변형률을 적용하여 25°C 에서 Oscillation test 분석법으로 수행되었다. 20 mm 원형 plate geometry를 장착하여 parallel plate 조건에서 플레이트 간격은 1 mm로 설정하였다. 표 7과 같은 조성으로 제조된 하이드로겔들을 저장탄성계수(G'), 손실탄성계수(G''), Tangent delta, 복소점도(Complex viscosity, η^*) 값은 1.0 Hz에서 얻어진 평균값으로 분석하였다.

2.3.3 팽윤도

팽윤도는 중국약전 [YYT 0962 6.6 Swelling degree (Appendix B of YY/T 0962-2021)]에 기재된 시험방법에 따라 진행하였다. 시브 무게를 측정하고, 0.2 g의 시료를 시브에 청량하고 시료가 담긴 시브를 80 °C로 맞추어진 열풍 건조기에 넣어서 24시간 건조한 후 중량을 측정하고 기록하였다. 이후, 건조된 시료 (시브와 건조된 겔)을 시브팬에 넣어두고 0.9% 생리식염수 (0.9% NaCl 용액)을 넣어 2시간 동안 팽윤시키고, 아래의 식을 이용하여 팽윤도를 계산하였다.

$$Q = m_l - m_2 / m_2 - m_0$$

Q : 가교된 히알루론산 겔의 팽윤도

m_l : 팽창 후 시브와 가교된 히알루론산 겔의 질량(g)

m_2 : 건조 후 시브와 가교된 히알루론산 겔의 질량(g)

m_0 : 시브의 무게(g)

2.3.4. 응집력

레오미터 (Kinexus Pro, NETZSCH, Germany)을 사용하여, 하이드로겔의 응집력을 측정하였다. 측정 조건은 20 mm parallel plate를 이용하여 25 °C에서 하이드로겔을 로딩하여 0.1 N의 힘으로 10 초 동안 접촉을 한 뒤 3 mm/s의 속도로 parallel plate를 수직으로 움직여 하이드로겔의 저항력을 측정하였다.

2.3.5. 주입력

인장압축시험기 (JSV H1000, Japan)를 사용하여 주입력을 측정하였다. 하이드로겔이 충전된 OVS 프리필드 주사기에 27 게이지 니들 (JBP nanoneedle, Japan)을 결합하고, 측정속도를 12 mm/min로 설정하여 결과값은 5 mm 지점부터 25 mm 지점까지의 주입력 평균값으로 제조된 필러의 주입력으로 평가하였다.

2.4. 히알루론산 하이드로겔의 생체외 평가

2.4.1. 세포독성 평가

하이드로겔의 세포독성 평가는 ISO 10993-5: Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity에 따라 시험하였다. 히알루론산 필러에 대한 세포독성 유발여부를 평가하기 위하여 시험세포주는 L-929 (NCTC Clone 929, ATCC, USA)를 사용하였고, 10% 우태아혈청 (Horse serum, gibco, NY, USA)과 1% 폐니실린/스트렙토마이신이 함유된 Minimum essential medium (MEM, Hyclone, Logan, UT, USA)를 사용하여 수행하였다. 시험에 사용된 용출물은 위에 언급된 MEM 배지를 이용하여 시험물질 0.2 g 당 10% 혈청이 첨가된 MEM 배지 1 mL 의 비율로 (37 ± 1) °C에서 (72 ± 2) 시간 동안 진탕배양기에서 교반 하며 용출 후, 상온에서 1 시간 정지한 후 상충액을 사용하였다. 음성대조군 (Negative control, NC)은 MEM 배지를 사용하였고, 양성대조군 (Positive control, PC)은 천연고무 라텍스 (PT. Universal gloves, Indonesia) 시험에 사용된 용출물은 위에 언급된 MEM 배지를 이용하여 시험물질을 용출하는 방식으로 조제하였다. 세포독성 평가를 위해 세포농도 웰 당 1×10^4 개로 조정한 후, 96 웰 플레이트에 200 uL 씩 접종하고 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포 중 적절한 웰을 선택하여 시험군과 대조군으로 구분한 뒤, 배지를 제거하고 각각의 용출물, 음성대조군, 양성대조군을 200 uL 첨가하여 24 시간 동안 (37 ± 1) °C, (5 ± 1) % CO₂ 상에서 24 시간 배양하였다. 이후 혼미경상으로 각 세포의 형태적 변화와 용해를 관찰하고, 세포생존도는 세포 내의 NADH dehydrogenase에 의해 수용성 포르마잔 염을 생성하는 원리를 이용한 CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Biomax, Korea) assay 방법으로 하여 평가하였으며, 각 well은 CCK-8 시약 처리 2 시간 후, 마이크로플레이트 리더 (Synergy HTX; BioTek, USA)를 이용하여 파장 450 nm에서 측정되어 계산되었다.

2.4.2. 효소 분해 시험

Hyaluronidase는 결합조직의 세포 외 기질에서 히알루론산을 분해하는데 관여하는 효소이다. hyaluronidase 시약은 시그마알드리치 (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 제조된 하이드로겔을 마이크로튜브에 0.5 g씩 분주한다. 4,000 rpm에서 1 분간 원심분리하여 마이크로튜브 내에 있는 시료를 바닥에 모아주고 제조한 히알루론산 분해효소 (50, 75, 100 U/mL)를 150 μL를 넣고, 그 무게를 정밀하게 측정한다. 특정 시간 (5, 24, 72 h) 마다 검체를 샘플링하여 4,000 rpm에서 3분간 원심분리를 하고, 분해된 상등액을 취하여 무게를 측정한다. 아래 식을 활용하여 각 하이드로겔의 분해되는 정도인 잔류 하이드로겔 (Residual hydrogel, %)을 구했다.

$$\text{Residual hydrogel (\%)} = \left(1 - \frac{m_l - E_o}{m_{hydrogel}}\right) \times 100\%$$

m_l = 분해된 상등액의 무게 (g)

E_o = 첨가된 히알루론산 분해효소의 무게 (g)

$m_{hydrogel}$ = 마이크로튜브에 최초 분주된 하이드로겔 무게 (g)

3. 결과

3.1 가교된 히알루론산 하이드로겔의 제조

표 7의 조성대로 가교된 히알루론산 하이드로겔을 동일한 NaOH의 농도와 특정 조건 (시간, 온도)에서 반응시켜 제조하였다. 그러나, DVS의 경우 표 7에서 나타난 HA-DVS 3보다 높은 농도인 1.5 wt%로 DVS를 처리했을 경우 반응이 급격하게 일어나서, 균일한 하이드로겔을 제조할 수 없었다. 그러나 BDDE는 1.5wt% 로도 균일하게 하이드로겔을 제조할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서는 1.0wt% 이하의 가교제의 농도로 제조된 하이드로겔 간의 물리화학적 성질을 비교 분석하였다. Fig. 6은 제조된 시료들의 사진이다. BDDE로 제조된 시료들은 대부분 매우 투명했으며, HA-BDDE 1의 경우, 유체와 같은 물성을 나타냈다. HA-DVS 3의 경우, 가장 투명도가 떨어지고 질감이 거친 편이었다.

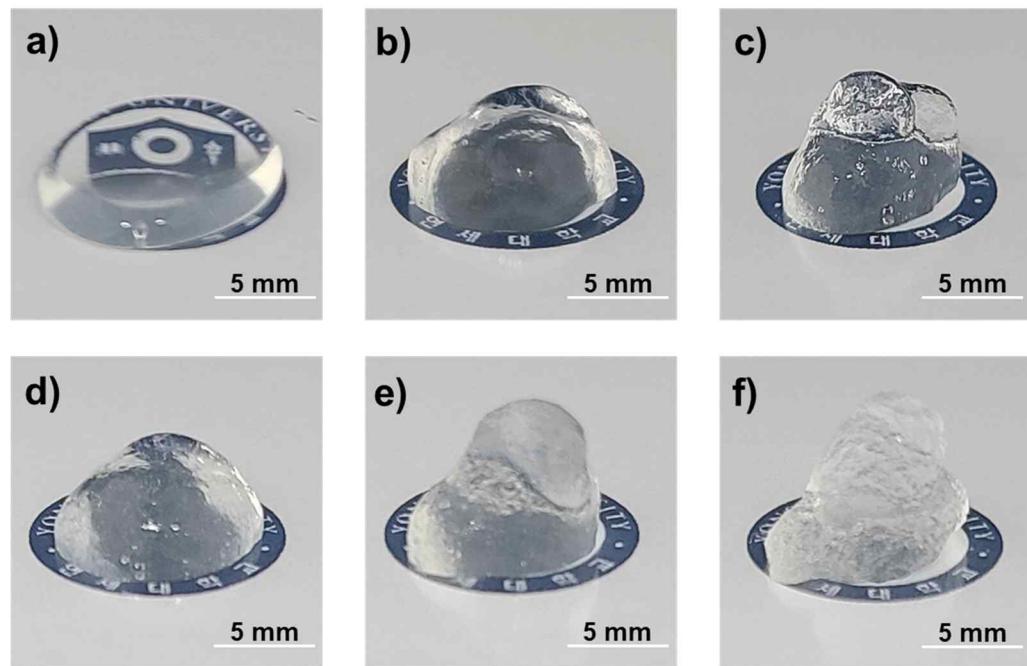


Figure 6. Photograph of hydrogels, a) HA-BDDE 1, b) HA-BDDE 2, c) HA-BDDE 3, d) HA-DVS 1, e) HA-DVS 2 and d) HA-DVS 3

3.2 히알루론산 하이드로겔의 물리화학적 특성

3.2.1 FTIR-ATR 분석

퓨리에 변환 적외선 분광기 (FTIR)는 유기물질의 구조분석, 재질분석, 정성분석에 효과적인 방법으로 알려져 있다. 특히 반사모드 (attenuated total internal reflection, ATR)는 고체 시료를 특별한 조작 없이 손쉽게 측정할 수 있는 장점이 있어 하이드로겔의 기능기 분석에 자주 사용된다²⁹. Fig. 7은 가교되지 않은 히알루론산과 1.0 wt%의 농도의 BDDE로 가교된 HA-BDDE 3과 1.0 wt% 농도의 DVS로 가교된 HA-DVS 3 하이드로겔의 건조된 시료의 FTIR-ATR 스펙트럼을 나타낸다. 모든 스펙트럼은 1,100 cm⁻¹에서 나타난 가장 큰 피크를 기준으로 평준화하였다. 히알루론산과 가교된 히알루론산 하이드로겔들은 매우 유사한 스펙트럼을 나타냈다. 약 3,300 ppm에서 -OH 신축 진동 대역 피크가 나타나는 것이 보이는데 HA가 그 피크가 가장 큰 것이 확인된다. 그 다음으로 큰 것은 HA-BDDE 3이며 HA-DVS 3가 가장 낮은 것으로 측정되었다. 음이온성 다당류들이 가지고 있는 특유의 C=O 신축 진동이 나타나는 영역인 약 1,700 cm⁻¹의 피크도 -OH와 유사하게 HA가 가장 크고, HA-DVS 3가 가장 작은 것으로 측정되었다. 약 1,000 cm⁻¹에서 나타나는 C-C 굽힘 피크가 모든 하이드로겔에서 유사하게 나타난 것이 관찰되었다. 대부분의 피크가 히알루론산과 가교 히알루론산 하이드로겔과 유사하게 나타났지만, FTIR의 지문영역에 속하는 600 ~ 1,400cm⁻¹ 영역의 크기나 약간의 피크 모양이 차이가 있어 3개의 시료가 유사하지만 동일하지 않는 화합물로 확인된다. 위 결과를 통해 BDDE와 DVS가 효과적으로 HA의 -OH 기와 반응하여 히알루론산 내의 -OH기와 히알루론산의 C=O 신축 진동의 피크가 줄어든 것으로 확인되어진다. 이는 가교 히알루론산 하이드로겔들의 특징으로 알려져 있다³⁰.

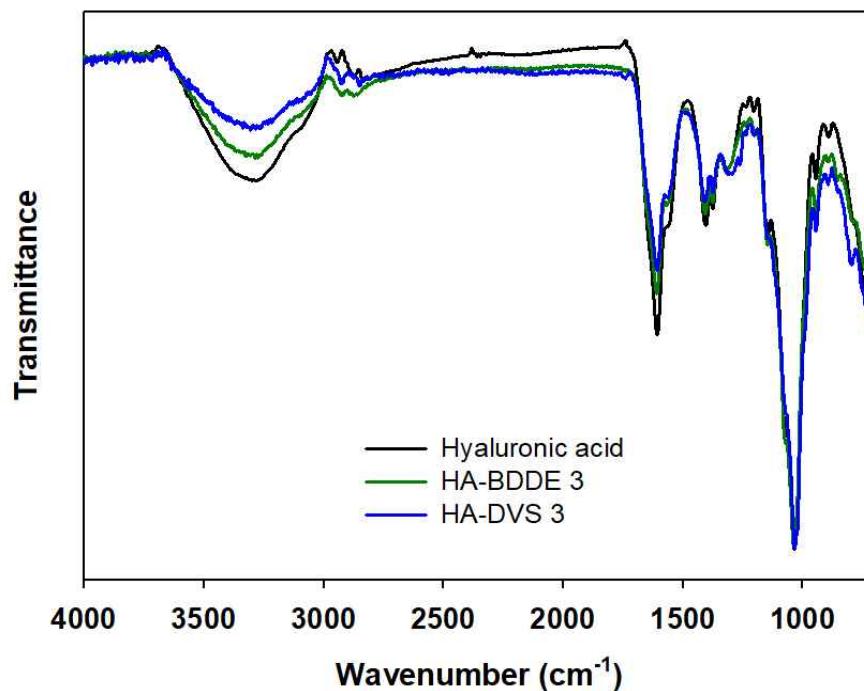


Figure 7. FT-IR spectra of Hyaluronic acid, HA-BDDE 3 and HA-DVS 3

3.2.2 유변학적 특성 분석

더말 필러에서 유변학적 성질은 매우 중요한 물리적 특성이다³¹. 표 8에서 제조된 하이드로겔의 유변학적 특성인 저장탄성계수 (G')와 손실탄성계수 (G''), Tangent delta, 복소점도 (Complex viscosity)를 나타냈다. 0.25 wt%의 가교제를 첨가한 HA-BDDE 1과 HA-DVS 1의 G' 는 각각 0.80 ± 0.21 , 112.58 ± 6.67 Pa으로 나타났으며 0.5 wt%의 가교제를 첨가한 HA-BDDE 2과 HA-DVS 2의 G' 는 55.49 ± 2.24 , 289.70 ± 17.61 Pa으로 나타났고, 1.0 wt%의 가교제를 첨가한 HA-BDDE 3과 HA-DVS 3의 G' 는 186.28 ± 12.38 , $1,412 \pm 72.65$ Pa으로 나타났다. 모든 하이드로겔에서 가교제의 농도를 높일수록 저장탄성계수가 증가하는 것으로 확인하였다. 첨가한 가교제의 농도의 비율에 따라 저장

탄성계수가 비슷한 비율로 증가하지 않고, 급격히 증가하는 것으로 확인하였다. HA-BDDE 1, HA-BDDE 2, HA-BDDE 3의 손실탄성계수는 1.62 ± 0.53 , 10.27 ± 0.98 , 12.67 ± 0.74 Pa로 나타났고, HA-DVS 1, HA-DVS 2, HA-DVS 3의 손실탄성계수는 30.85 ± 1.25 , 31.58 ± 1.76 , 175.60 ± 11.10 Pa로 나타났다. HA-BDDE의 경우 첨가된 가교제의 농도에 따라 손실탄성계수가 증가하는 것이 관찰되었으나 HA-BDDE 2와 HA-BDDE 3의 손실탄성계수의 차이는 크지 않았다. HA-DVS의 경우도 이와 유사한 현상이 나타났으나 HA-DVS 1과 HA-DVS 2가 유사했으며, HA-DVS 3에서 손실탄성계수가 급격히 높아졌다. BDDE가 첨가된 하이드로겔의 경우 BDDE를 첨가한 양이 증가함에 따라 Tangent delta 값이 0.50 ± 0.04 , 0.18 ± 0.01 , 0.07 으로 점점 감소하였다. DVS의 경우는 0.27 ± 0.01 , 0.11 , 0.12 로 나타나, DVS의 첨가한 양과 비례하지 않게 변화되는 값으로 나타났다. 제조된 하이드로겔들의 복소점도 (complex viscosity)는 HA-BDDE 1, HA-BDDE 2, HA-BDDE 3의 경우, 0.29 ± 0.09 , 8.98 ± 0.38 , 29.71 ± 1.98 Pa · s로 나타났고, HA-DVS 1, HA-DVS 2, HA-DVS 3의 경우는 18.58 ± 1.07 , 46.38 ± 2.81 , 226.44 ± 11.76 Pa · s로 측정되었다.

표 8. 제조된 HA 하이드로겔의 유변학적 특성

Samples	G' (Pa)	G'' (Pa)	Tangent delta	Complex viscosity (Pa · s)
HA-BDDE 1	0.80 ± 0.21	1.62 ± 0.53	0.50 ± 0.0	0.29 ± 0.09
HA-BDDE 2	55.49 ± 2.24	10.27 ± 0.98	0.18 ± 0.01	8.98 ± 0.38
HA-BDDE 3	186.28 ± 12.38	12.67 ± 0.74	0.07	29.71 ± 1.98
HA-DVS 1	112.58 ± 6.67	30.85 ± 1.25	0.27 ± 0.01	18.58 ± 1.07
HA-DVS 2	289.70 ± 17.61	31.58 ± 1.76	0.11	46.38 ± 2.81
HA-DVS 3	$1,412 \pm 72.65$	175.60 ± 11.10	0.12	226.44 ± 11.76

3.2.3 팽윤도

하이드로겔에서 팽윤도는 생물의학적 응용분야뿐만 아니라 다양한 산업 분야에서도 여러 장점을 가지고 있는 특징 중 하나이다³². Fig. 8은 제조된 필러들의 팽윤도를 나타낸다. HA-BDDE 1, HA-BDDE 2, HA-BDDE 3의 팽윤도는 72.15 ± 10.12 , 65.40 ± 5.68 , 57.80 ± 7.41 으로 나타났고, HA-DVS 1, HA-DVS 2, HA-DVS 3의 팽윤도는 75.16 ± 2.14 , 64.53 ± 2.83 , 51.27 ± 1.22 로 나타났다. 모든 하이드로겔들은 첨가된 가교제의 농도가 높아짐에 따라 팽윤도가 높아짐에 따라 팽윤도가 유의하게 낮아지는 경향을 보였다. 각 시료의 팽윤도를 Student t-test를 수행하여 측정된 값의 통계적인 유의성을 확인하였다. HA-BDDE 1은 HA-BDDE 2와 비교하였을 때 p-value가 0.05 이하로 통계적으로 유의미하게 나타났으며, HA-BDDE 3의 경우, 0.01 이하로 p-value가 계산되어 통계적 크게 유의한 차이를 나타냈다. HA-BDDE 2과 HA-BDDE 3의 경우 p-value는 0.05 이하였다. 또한 HA-DVS 그룹에서도 HA-DVS 1은 HA-BDDE 1과 동일하게 HA-DVS 2와는 0.05 이하로, HA-DVS 3와는 0.01 이하로 확인되었다. HA-DVS 2와 HA-DVS 3 간의 차이는 0.01로 HA-BDDE 2와 HA-BDDE 3 보다 통계적으로 유의한 차이가 보이는 결과였다. 그러나, 두 가교제 (HA-BDDE와 HA-DVS) 간의 전반적인 팽윤도 차이는 크지 않고 유사한 수준을 보였다.

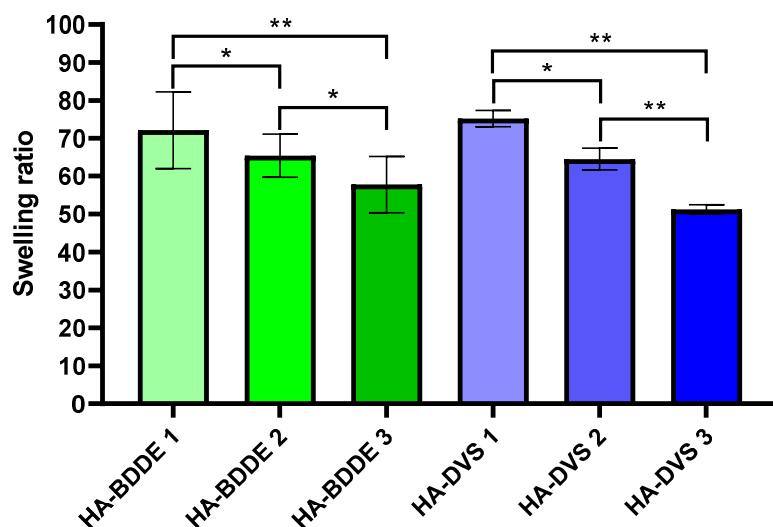


Figure 8. Swelling ratio of HA hydrogels. The error bars represent SD ($n = 3$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t-test)

3.2.4 응집력

Fig. 9는 제조된 하이드로겔의 응집력을 나타낸다. 0.25 wt%의 가교제를 첨가한 HA-BDDE 1과 HA-DVS 1의 응집력은 각각 0.476 ± 0.07 , 0.161 ± 0.02 N으로 나타나 큰 차이가 없었으나 HA-BDDE 1이 매우 높았다. 0.5 wt%의 가교제를 첨가한 HA-BDDE 2과 HA-DVS 2의 경우, 0.225 ± 0.49 , 0.269 ± 0.03 N으로 각각 나타나 유사하다는 것이 확인되었다. 1.0 wt%의 가교제를 첨가한 HA-DVS 3의 응집력은 0.695 ± 0.04 N으로 0.388 ± 0.05 N의 응집력을 갖는 HA-BDDE 3 보다 약 1.79배 높은 값으로 나타났다. 0.5 wt% 에서는 두 가교제 모두 유사한 응집력을 나타냈지만 HA-DVS 3가 더 높은 응집력이 나타나는 것으로 확인되었다. DVS로 가교한 경우, 첨가된 가교제의 양에 따라 응집력이 증가하는 것이 확인되었지만, BDDE로 가교한 경우, 가교제가 가장 작게 들어간 HA-BDDE 1이 가장 높은 응집력이 나타났다.

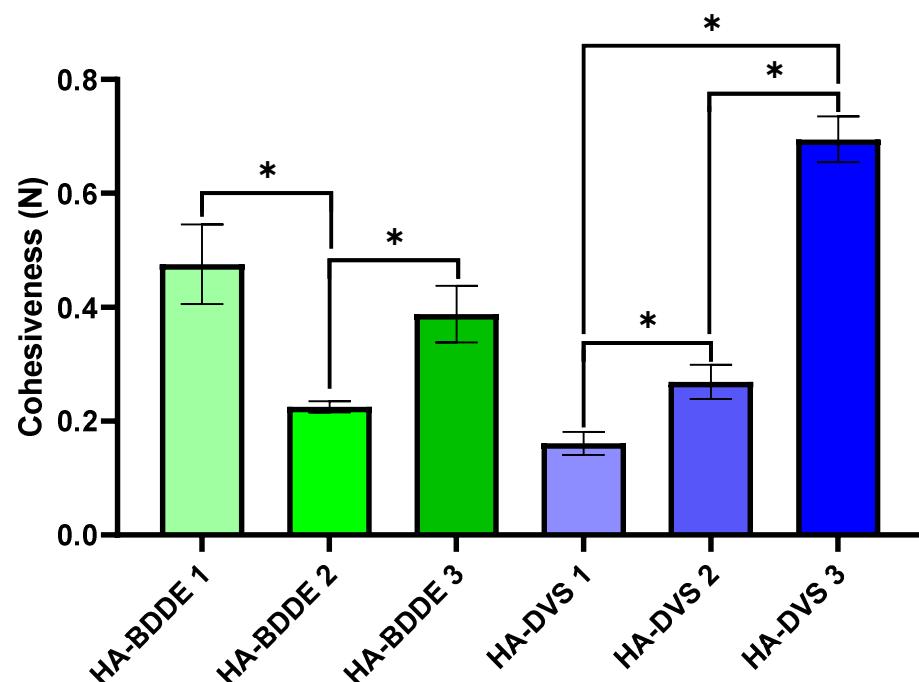


Figure 9. Cohesiveness of HA hydrogels. The error bars represent SD ($n = 3$) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (t-test)

3.2.5 주입력

제조된 하이드로겔들의 주입력을 Fig. 10에서 나타냈다. HA-BDDE 1, HA-BDDE 2, HA-BDDE 3의 주입력은 1.1 ± 0.13 , 8.5 ± 0.27 , 11.6 ± 0.62 N으로 나타나, 첨가된 BDDE의 농도에 따라 주입력이 높아지는 것으로 확인되었다. 그러나, HA-DVS 1, HA-DVS 2, HA-DVS 3의 주입력은 6.6 ± 1.22 , 6.8 ± 1.36 , 47.9 ± 3.31 N으로 나타났으며, 첨가된 DVS의 농도에 따라 주입력이 높아지는 것이 관찰되기는 했지만 0.25 wt%와 0.5 wt%의 DVS가 첨가된 하이드로겔의 주입력의 차이는 크지 않았으며, 1.0 wt%에서 급격히 주입력이 높아지는 것이 관찰되었다. 또한, BDDE로 가교된 하이드로겔들의 비해 DVS로 가교된 하이드로겔의 저농도와 고농도에서 주입력이 크게 차이 나는 것으로 나타났다.

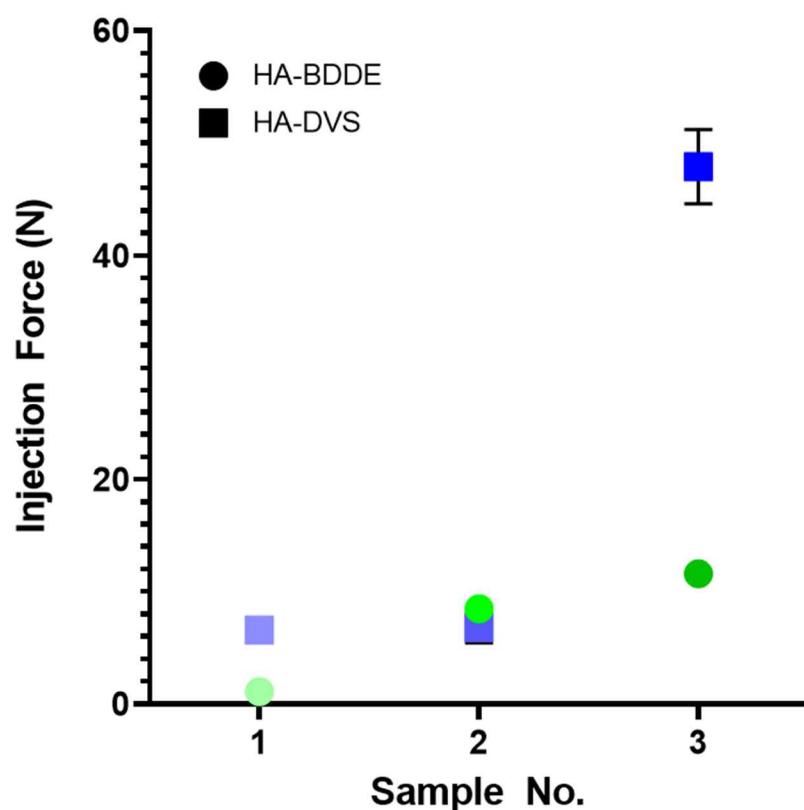


Figure 10. Injection force of HA hydrogels. The error bars represent SD ($n = 3$)

3.3 히알루론산 하이드로겔의 생체외 평가

3.3.1 세포독성 평가

제조된 하이드로겔들의 세포독성은 ISO 10993-5 : Biological Evaluation of Medical Devices, Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity에 보고 되어있는 용출물 시험법을 통해 평가되었다. Fig. 11은 제조된 하이드로겔의 용출물과 음성대조군 (NC), 양성대조군 (PC, latex 용출물)들의 쥐섬유아세포 (L929)에 대한 세포독성을 나타낸다. 세포 생존율은 음성대조군을 기준으로 계산되었다. Fig. 11에서 PC에서는 세포의 생존율이 $39.20 \pm 0.52\%$ 로 나타나, 세포독성이 있는 물질이 함유되어있는 용출물의 경우 세포 생존율이 낮아지는 것이 확실히 나타났다. 그에 비해 HA-BDDE 1, HA-BDDE 2, HA-BDDE 3의 용출물의 세포 생존율(%)은 107.05 ± 8.32 , 100.28 ± 2.48 , 104.78 ± 1.91 로 모두 100% 이상으로 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다. HA-DVS의 경우에도 101.37 ± 1.68 , 104.78 ± 6.50 , 101.37 ± 7.26 으로 나타나 모두 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다. 가교제가 1 wt% 이하로 첨가되어 제조된 히알루론산 하이드로겔의 경우, BDDE와 DVS 모두 동일하게 세포 독성이 없었다. 또한, Fig. 12는 현미경으로 각 세포의 형태적 변화와 용해를 관찰한 결과 모두 음성대조군과 동일한 세포의 형태가 나타났으며 용해 역시 발견되지 않았다.

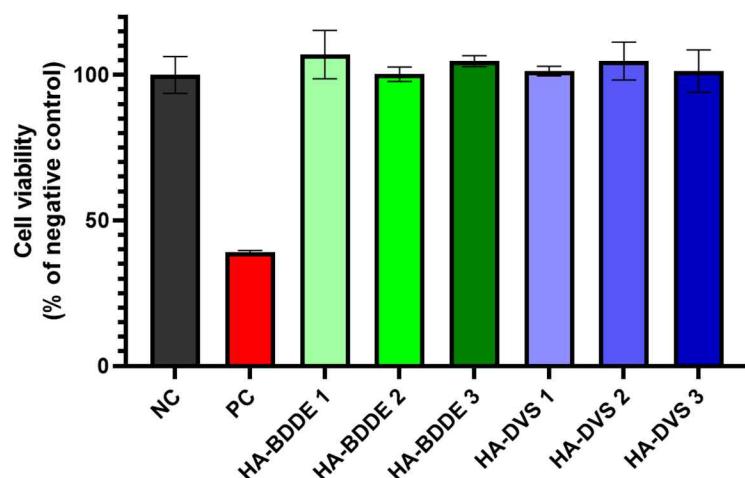


Figure 11. Cell viability for extract of HA hydrogels against Fibroblast cell (L929). NC is negative control. PC is positive control as extract of latex. The error bars represent SD ($n = 3$)

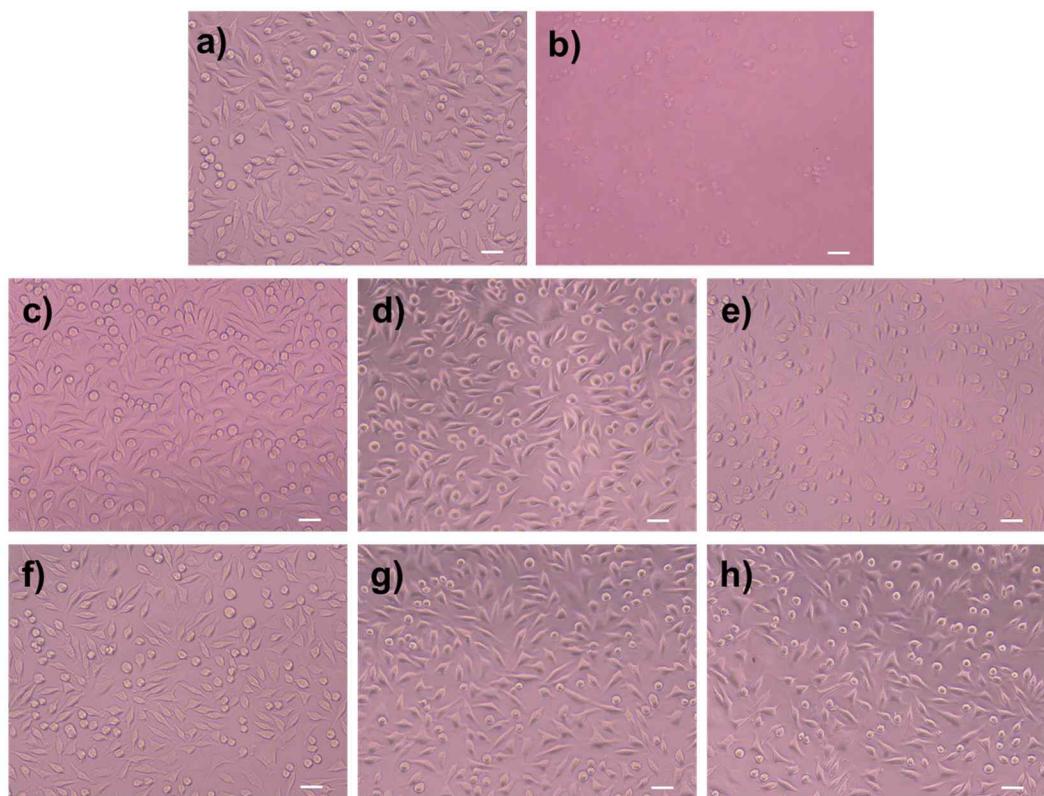


Figure 12. Inverted microscope image of the L929 fibroblast cell morphology after treatment with a) negative control (NC), b) positive control (PC), c) HA-BDDE 1, d) HA-BDDE 2, e) HA-BDDE 3, f) HA-DVS 1, g) HA-DVS 2 and h) HA-DVS 3 (scale bar = 20 μ m, 200x magnification)

3.3.2 효소 분해 시험

히알루론산은 D-glucuronic acid와 N-acetyl glucosamine이 글라이코시딕 결합으로 반복 구성되어 있으며, 신체 내 거의 모든 조직에 존재한다. 히알루론산은 히알루론산 분해효소인 (hyaluronidase)에 의해 글라이코시딕 결합이 분해된다. 히알루론산 분해효소 역시 신체 내에 존재하며, 고분자 히알루론산을 저분자로 분해한다. 히알루론산 하이드로겔도 대부분 히알루론산으로 이루어져 있기 때문에, 히알루론산 분해효소에 의해 물에 녹지 않는 히알루론산 하이드로겔이 분해되어 분자량의 감소로 인해 점탄성을 점차 잃게 된다. Hyaluronidase는 농도에 따라 필러의 분해 효소가 달라지고 50, 75, 100 U/mL와 같은 농도 범위는 일반적으로 가속조건에서 분해하기 위한 농도이며, 이 농도는 범위는 임상적으로 필러를 제거하거나 수정할 때 사용된다³³. 효소의 농도가 높을수록 분해 속도가 빨리지며³⁴, 이러한 원리를 이용하여 제조된 하이드로겔에 일정량의 히알루론산을 인위적으로 주입하여 시간별로 가교된 하이드로겔이 분해되는 정도를 측정함으로써 하이드로겔의 분해정도를 확인하였다. Fig. 13은 분해효소의 농도와 시간에 따른 히알루론산 하이드로겔의 분해되는 정도를 나타낸 것이다. 50 U/mL로 처리한 BDDE로 가교한 하이드로겔의 경우, 첨가된 가교제의 농도에 크게 영향을 받지 않는 것이 확인된다 (Fig. 13a). 그러나 75 U/mL의 농도로 처리한 경우에는, 0.5 wt% 이하로 첨가되어 제조된 HA-BDDE 1과 HA-BDDE 2는 5시간 만에 45% 이상 분해되는 것이 확인되어진다 (Fig 13b, c). 그에 비해 HA-BDDE 3은 60% 이상 젤이 잔존해 있어, 가교가 더 많이 될수록 분해효소의 민감도가 낮아지는 것으로 확인되었다. DVS로 가교된 하이드로겔도 비슷한 패턴으로 나타났으며, 분해효소 100 U/mL의 농도에서 HA-DVS 2가 HA-BDDE 3과 비슷한 분해효소 민감도를 갖는 것으로 확인된다 (Fig. 13c, f). 가장 높은 분해효소 농도인 100 U/mL에서 24시간을 기준으로 가장 분해가 덜 된 것은 HA-DVS 3 시료였다.

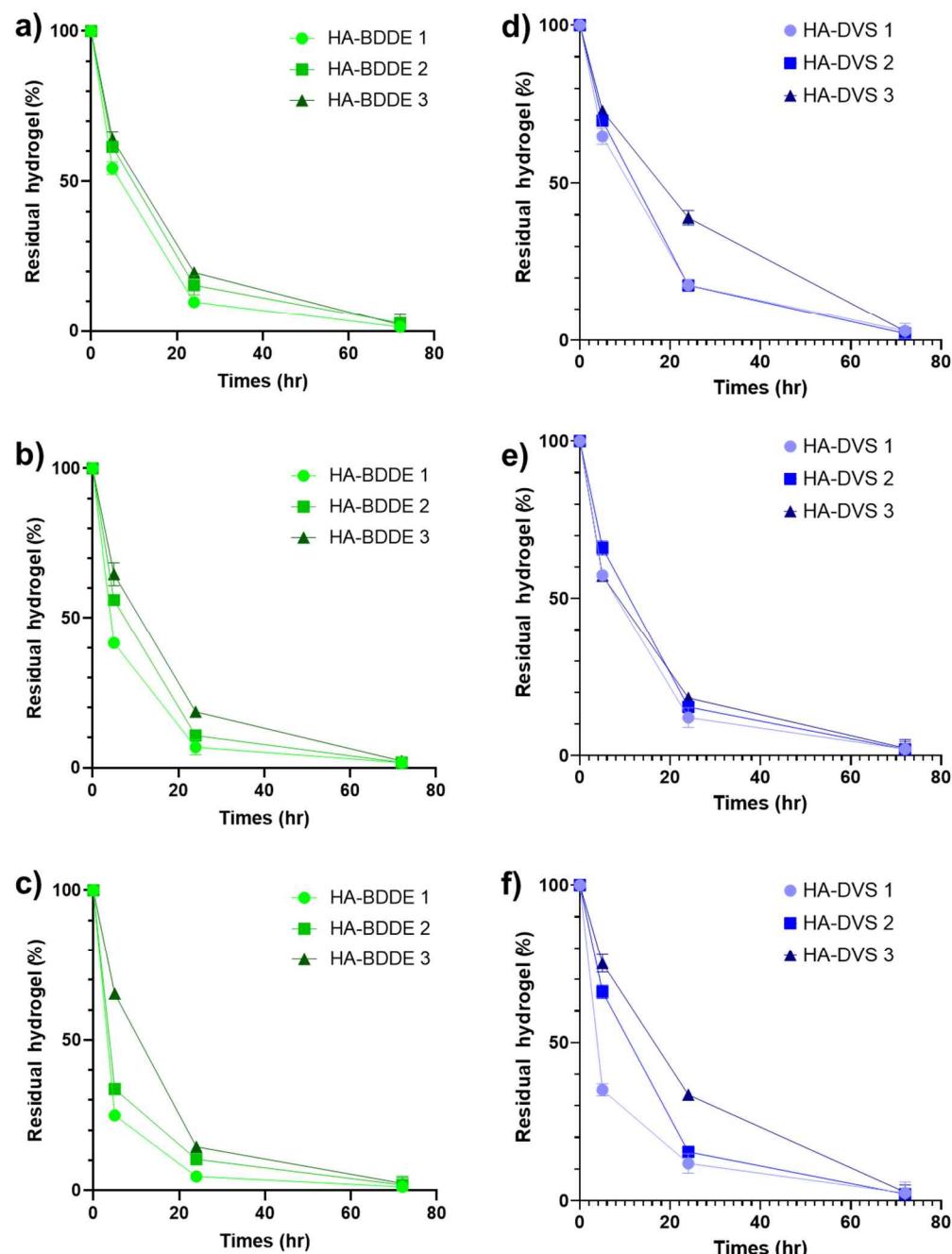


Figure 13. Enzymatic degradation of HA hydrogels with 50 U/mL (a, d), 75 U/mL (b, e) and 100 U/mL (c, f) hyaluronidase, respectively. The error bars represent SD ($n = 3$)

4. 고찰

더말 필러는 인체에 주입되는 의료기기로 분류되어 있기 때문에, 생체 안전성이 최우선적으로 보장되어야 한다. 더말 필러는 히알루론산을 가교제를 통해 하이드로겔로 제조하는데, 이때 사용되는 화학적 가교제가 독성을 가지고 있어 이에 대한 이슈가 여전히 존재한다. 이상적인 가교제는 높은 효율로 히알루론산과 반응되어야 하며 반응 조건이 마일드해야 한다. 히알루론산은 높은 pH에서 분해되는 특징을 가지고 있기 때문에, 높은 pH에서 가교반응을 진행하게 되면 가교반응이 잘 일어나더라도 히알루론산의 분자량이 작아져 원하는 기계적 강도를 구현하지 못하게 된다. 또한, 하이드로겔은 인체에 주입되어야 하므로, 가교 반응과 제조 공정은 최대한 수용액에서 이루어져야 한다. 사용되는 가교제는 기본적으로 세포독성이 낮아야 하고 반응 후에 생성된 생성물도 생분해되어야 한다. 일반적으로 가교제는 양쪽 말단이 히알루론산과 반응을 하는데 양쪽 말단 중 한 개만 히알루론산과 반응하고 다른 말단은 불활 되지 않으면 독성을 야기시키기 때문에, 특정 환경에서 반응되지 않은 반응기 말단이 쉽게 불활 되어서 인체 내 조직, 세포, 단백질, 핵산 등과 반응하지 않아야 한다. 최종적으로 높은 가교효율, 마일드한 반응조건, 낮은 세포독성을 가지고 있는 가교제가 이상적인 가교제라고 볼 수 있다.

Fig. 4b와 Fig. 4c처럼 BDDE와 DVS의 분자길이는 차이가 있고, 분자량의 차이도 있다. BDDE의 분자길이는 약 1.8 nm이며, 분자량은 202.3 g/mol이고, DVS의 경우 분자길이는 약 0.63 nm이며, 분자량은 118.15 g/mol이다³⁵. 따라서 히알루론산을 BDDE와 DVS가 가교할 경우, 가교된 히알루론산 사이 간에 거리가 달라 그 물성이 달라질 것으로 예상할 수 있다. 또한, 서론에서 언급했듯이 BDDE와 DVS는 특정 NaOH 농도에서 활성화된 히알루론산의 -OH 그룹과 반응하여 가교제의 역할을 하게 되는데, BDDE는 양쪽 반응기 에폭시그룹 중 한 개만 히알루론산과 반응하고, 반대편 에폭시 그룹은 링이 열려서 히알루론산과 반응하지 못하고 -OH 그룹을 생성한 상태로 히알루론산을 가교하지 않고, 단순히 매달려 있는 펜던트 상태로 되기도 한다. 그러나 이러한 펜던트 상태의 -OH 그룹이 만약에 다른 BDDE와 반응하게 되는 경우, 매우 긴 글리시딜 브리지를 갖는 가교제 역할을 하게 된다³⁶. BDDE와 달리 DVS의 경우, 대부분 히알루론산과 반응하게 되고, 반응되지 않은 반응기가 다른 DVS와 반응하지 않기 때문에 매우 긴 브리지를 갖는 가교제의 역할을 하지 못한다³. 위 내용을 종합해 보면, 같은 중량대비 가교제를 첨가할 경우 BDDE보다 DVS 분자가 더 많이 첨가되게 되고, 또한 BDDE는 자기끼리 결합할 가능성이 있어, 화학양론적으로 DVS가 반응성이 더 좋고 가교되는 양도 많을 것으로 예상할 수 있다. Fig. 7의 FTIR-ATR 결과를 보면, BDDE보다 DVS로 가교된



경우에서 약 $3,300\text{ cm}^{-1}$ 에서 나타나는 $-\text{OH}$ 굽힘이 피크가 더 작게 나타나는 것을 볼 수 있다. 이는 DVS가 BDDE와 동일한 중량대비로 처리하였을 때, 히알루론산의 $-\text{OH}$ 와 더 많이 반응했다는 것을 의미한다. 이 결과는 중량 대비로 처리하였을 때, DVS가 BDDE보다 더 효율적으로 히알루론산을 가교 하는 것으로 확인된다. 히알루론산의 $-\text{OH}$ 굽힙 피크뿐만 아니라 이러한 변화는 히알루론산의 $\text{C}=\text{O}$ 신축 진동이 나타나는 $1,700\text{ cm}^{-1}$ 영역의 피크가 가교 후 줄어든 것을 보아도 확인할 수 있다.

더말 필러는 고체가 아닌 반유체 물질이기 때문에 점성과 탄성을 고려해야 한다. 탄성을 저장탄성계수 (G')이라고 말하며, 점성을 손실탄성계수 (G'')이라고도 말한다. 저장탄성계수는 전단력이 발생했다가 제거될 때 회복되는 정도, 즉 변형 후 원래의 형상으로 복원되는 에너지의 분율이다. 손실탄성계수는 전단 변형에 의해서 손실되는 에너지의 분율로, 변형 후 원래 모양을 회복할 수 없는 것을 의미한다. 따라서 손실탄성계수가 저장탄성계수 이를 표현하는 것이 Tangent delta로 손실탄성계수를 저장탄성 계수로 나눈 값이다. 복소점도는 저장탄성계수와 손실탄성계수를 복합적으로 표현하는 수치로 복소탄성계수 (G^*)를 변형률로 나눈 값이다. 이는 전단력이 재료를 변형시키는데 필요한 에너지를 의미한다. FTIR-ATR 분석 결과처럼 DVS가 첨가된 하이드로겔이 중량대비 동일하게 BDDE가 처리된 하이드로겔 보다 더욱 높은 저장탄성계수를 가진 것으로 나타났다. 이는 앞서 언급한 대로, DVS가 중량대비 효율적으로 히알루론산과 가교했기 때문이라고 볼 수 있다. 그러나 손실탄성계수를 보면, BDDE의 경우 첨가된 가교제의 농도에 따라 손실탄성계수가 증가하는 정도가 DVS보다 좀 더 배수적 증가하였으며, DVS는 지수적으로 급격히 증가하였다. 또한 Tangent delta의 변화량도 BDDE의 경우 첨가된 양에 따라 유체가 고체에 가까워지는 경향을 배수적으로 보였지만, DVS는 첨가된 양에 따라 변화하지 않는 지점이 있었다. 또한, 제조된 하이드로겔의 복소점도의 경우 저장탄성계수의 변화와 유사한데 이는 복소점도가 저장탄성계수를 손실탄성계수로 복합적으로 표현하는 수치를 복소탄성계수 (G^*)를 변형률로 나눈 값이기 때문이다. 시판되는 더말 필러는 점탄성 특성에 따라 치료 목적이 달라질 수 있기 때문에 다양한 점탄성 특성을 가진 제품 개발이 필요하다³¹. 따라서 이러한 결과를 종합해 볼 때, BDDE가 좀 더 DVS보다 핸들링 쉽다는 것을 의미한다. 필러의 점탄성은 가교제의 우월성을 판단하기 위해 매우 중요한 수치이다. 높은 가교도를 가진 필러들이 낮은 가교도를 가진 필러에 비해 잠재적인 생체 독성이 크다는 문헌이 보고됨에 따라서 낮은 가교도를 가지면서도 높은 점탄성을 가진 필러 개발이 필요하기 때문이다.

팽윤도는 가교도가 높을수록 팽윤이 적게 일어나는 것으로 알려져 있다. 그러나, 갈더마에서 발표한 문헌에 따르면, 가교도가 단순히 높다고 팽윤이 적게 일어나는 것이 아니라, 히알루론산의 고분자의 네트워크를 효과적으로 가교한 경우에는 팽윤이 적게 일어나는 현상으로 고려해야 한다고 주장했다³⁷. DVS를 처리하여 제조된 하이드로겔이 팽윤도가 BDDE보다 매우 낮게 나타날 것으로 예상하였지만, Fig. 8의 결과를 보면 두 개의 가교제에 따른 팽윤도의 차이는 크지 않은 것으로 나타났다. 이는 DVS가 BDDE보다 가교되는 정도는 매우 높아 하이드로겔의 저장탄성계수를 높일 수는 있었지만, 효율적으로 히알루론산 고분자를 가교하지 못하기 때문에 팽윤되는 정도가 비슷한 것으로 여겨진다. 따라서, BDDE가 DVS보다 효율적인 가교를 유도할 수 있는 더 우월한 가교제로 여겨진다.

응집력은 성형성에 매우 중요한 요소로, 높은 응집력을 가진 더말 필러는 깊은 주름을 치료할 수 있다. 또한 낮은 응집력을 가진 필러의 경우보다 성형이 쉽고 낮은 주름에 넓게 퍼져 치료할 수 있는 장점이 있다³⁸. Fig. 9에서 HA-BDDE 1이 HA-BDDE 3보다 높은 응집력을 나타냈다. HA-BDDE 1의 Fig. 6의 사진과 Tangent delta 값으로 예상할 수 있듯이 다른 시료와 달리 유체처럼 행동하기 때문에 HA-BDDE 2와 HA-BDDE 3보다 캘내 고분자 간의 마찰력이 증가하여 응집력이 높은 것으로 예상된다. HA-DVS 2는 HA-BDDE 3보다 약 100정도 높은 저장탄성계수를 가지면서도 응집력은 오히려 낮은 것을 볼 수 있다. 따라서 DVS로는 높은 기계적 강도와 성형성이 좋은 필러로 개발하기에는 용이하다는 장점이 있을 수 있다는 것을 시사한다. 그러나 HA-BDDE 2와 HA-BDDE 3의 응집력의 차이는 배수적으로 증가한 반면, HA-DVS 2와 HA-DVS 3의 응집력 차이는 지수적으로 급격히 증가하여, 응집력 제어가 용이하지 않다는 단점이 있다. 종합적으로 이러한 장단점 때문에, 응집력 측면에서는 BDDE와 DVS간의 우월성을 판단하기가 어렵다.

국내 식약처에서 발표한 성형용 필러 허가심사 가이드라인에 따르면, 성형용 더말 필러의 주입력은 40 N 이하로 제조할 것을 고시하고 있다³⁹ 이는 낮은 주입력을 통해 시술자가 용이하게 시술할 수 있기 때문이다. 일반적으로 주사제의 주입력은 Hagen-Poiseuille's Law를 따르는 것으로 알려져 있지만, 이는 용액이 뉴턴 유체일 때 해당하며, 히알루론산 더말 필러의 경우 비뉴턴 유체이기 때문에 Hagen-Poiseuille's Law를 완전히 따른다고 보기 어렵다⁴⁰. 일반적으로 주입력을 낮추는 방법은 일반 니들보다 직경이 큰 나노니들을 사용하거나, 주사기 배럴의 직경, 바늘의 길이, 주사 속도를 낮추거나 주사액의 점도를 낮추는 방법이 있다. 따라서 히알루론산 더말 필러의 경우, 점도의 크기에 따라 주입력의 크기도 변화한다고 예상할 수 있다. 제조된 하이드로겔들의 복소점도를 살펴보면 HA-DVS 3의 값이 약 226 Pa · s로 가장 높으며 HA-DVS 2는 2번째로 높은 약 46 Pa · s이며, HA-DVS 1은 18

Pa · s이다. 그러나 주입력은 HA-DVS 1과 2가 거의 유사하며, HA-BDDE 3는 HA-DVS 2보다 낮은 복소점도와 저장탄성계수를 가지면서도 높은 주입력을 나타냈다. 히알루론산 하이드로겔로 제조된 더말 필러는 단순히 복소점도, 저장탄성계수로 등으로 주입력을 예측하기 힘들다는 것을 의미한다. HA-DVS 3을 제외한 DVS로 제조된 하이드로겔은 BDDE로 가교된 하이드로겔보다 높은 저장탄성계수를 가지면서도 낮은 주입력을 가져 더말 필러로써 우월하다고 볼 수 있지만, DVS의 첨가된 농도와 비례하지 않고 주입력이 변화하기 때문에 여전히 BDDE보다 핸들링이 어렵다는 단점이 있다. 실제로 HA-DVS 3의 경우 주입력이 40 N이 넘어 실질적인 사용이 어렵다.

히알루론산의 *in vitro* 평가는 임상 시험 전에 그 특성, 효능 및 안전성을 확인하는데 매우 중요하다. *In vitro* 세포독성 시험은 일반적으로 *in vivo* 시험보다 접근이 상대적으로 용이하기 때문에 다양한 의료기기나 시험물질들에 대한 생체 적합성을 평가하기 위한 초기 수단으로 이용되고 있다⁴¹. BDDE와 DVS는 모두 알칼리 환경에서 -OH와 반응하는 화합물질로 모두 독성 물질에 속한다. BDDE의 반수치사량 (LD50)은 쥐에게 구강투여 했을 때 1,134 mg/kg이었으며 DVS는 32 mg/kg으로 DVS가 BDDE보다 매우 높은 독성이 있는 화합물로 알려져 있다⁴². BDDE의 경우 양쪽 에폭시 그룹이 모두 개환 되게 되면, 세포독성이 거의 없어지고, 체내에서 히알루론산 분해효소에 의해서 히알루론산이 분해될 때 부산물로 나와 체내에서 대사 된다고 알려져 있다. DVS의 경우에는 BDDE와 달리 양쪽 반응기 중 한쪽만 히알루론산과 반응하는 경우는 없다고 여겨지지만, 체내에서 대사 되는 메커니즘과 관련된 문헌은 보고되지 않았다. 이미 BDDE와 DVS로 가교된 히알루론산 더말 필러는 제품화되어 있으며, 안전하다고 평가되어 의료기기로 판매되고 있다. Fig. 11에서도 본 연구에서 제조된 히알루론산 하이드로겔들은 모두 유사하게 세포독성이 나타나지 않았다. 본 연구에서는 세포독성으로 가교제의 우월성을 비교하기는 어려웠다.

히알루론산 분해효소는 히알루론산과 같이 다양한 체내 장기와 체액에 모두 존재하며 신체에 존재하는 히알루론산을 조절하는데 활용된다⁴³. 예를 들면 고환에 있는 히알루론산 분해효소는 인간 정자 표면과 형질막에 존재하여 수정 중에 난자 내에 있는 히알루론산을 분해하는 역할을 한다⁴⁴. 히알루론산 분해효소는 히알루론산 더말 필러를 용해시킬 수 있어, 히알루론산 더말 필러의 생체안정성을 보장해 주는 역할을 한다. 히알루론산 더말 필러는 히알루론산 분해효소에 의해 분해되어야 생분해성 소재로 사용될 수 있는 것이지만, 너무 빠르게 분해되게 되면 잣은 시술이 필요하기 때문에 적절한 분해 민감도를 가져야 한다. 일반적으로 가교도와 히알루론산의 농도가 높으면 히알루론산 분해효소가 히알루론산 내부의 분자 내에



접근이 어려워지기 때문에 분해가 지연된다. Fig. 13의 히알루론산 분해효소에 의한 효소 분해 시험 결과를 보면, 많은 가교제를 첨가하여 제조된 히알루론산 하이드로겔인 HA-BDDE 3과 HA-DVS 3이 가장 느리게 분해되는 것이 확인된다. 그러나 HA-BDDE와 HA-DVS간의 분해도 비교해 보면 크게 차이가 나지 않는 것으로 관찰되는데, 이는 HA-BDDE 하이드로겔들과 HA-DVS 하이드로겔들의 팽윤 되는 정도가 유사하여, 히알루론산의 분해효소에 의한 접근의 용이성이 두 종류의 하이드로겔들 모두 비슷한 것으로 판단된다. DVS로 처리한 히알루론산 하이드로겔이 BDDE로 처리한 하이드로겔 보다 비교적 낮은 분해정도를 나타냈지만, 저장탄성계수 대비 분해되는 정도를 비교하면 BDDE로 제조된 하이드로겔이 더 성능적으로 우월한 것으로 보인다.



5. 결론

본 연구에서는 BDDE와 DVS를 각각 특정 조건에서 반응시켜 히알루론산 중량대비 BDDE와 DVS를 처리하여 제조한 하이드로겔들의 물리화학적 특성과 생체외 시험을 통해 가교제의 우월성을 비교 분석하였다. BDDE와 DVS를 처리한 하이드로겔들은 FTIR-ATR을 통해 분석한 결과, 가교되지 않은 히알루론산과 큰 차이가 없었다. 이는 히알루론산 하이드로겔이 대부분 히알루론산으로 이루어져 있는 것을 의미한다. 중량대비 동일한 양을 처리하였을 때 BDDE보다 DVS를 처리한 하이드로겔이 유변학적 특성 중 저장탄성계수와 손실탄성계수, 복소점도가 높게 나타났다. 그러나, BDDE를 처리한 하이드로겔들이 DVS로 처리한 하이드로겔 보다, BDDE처리량에 따라 유변학적 특성이 배수적으로 변화하여, 이로 인해 핸들링이 용이하다는 것으로 확인되었다. 특히, 팽윤도 시험에서는 HA-DVS 3의 저장탄성계수가 HA-BDDE 3 보다 13배 이상 높았지만, 팽윤도는 유사하였다. 이는 HA-BDDE 3이 더 효과적으로 히알루론산을 가교하고 있다는 것을 의미한다. 응집력에서는 BDDE가 첨가된 양에 따라 배수적으로 응집력이 증가하여 DVS 보다 핸들링이 쉬운 점이 장점이었지만, DVS는 높은 저장탄성계수를 가지면서도 낮은 응집력을 보이는 물성이 있어, 제품의 특성에 맞게 사용될 수 있어 우월성을 판단하기 어려웠다. 주입력에서는 DVS로 처리하여 만든 히알루론산 하이드로겔이 높은 저장탄성계수를 가지면서도 낮은 주입력을 보여 BDDE보다 우월하였지만, 첨가된 가교제의 1 wt% 농도에서 40 N 이상의 높은 주입력을 보여 핸들링이 어렵다는 단점을 나타냈다. BDDE와 DVS로 제조된 히알루론산 하이드로겔 모두 L929 섬유아세포에 대해서 세포독성이 나타나지 않았다. 히알루론산 분해효소에 의해 BDDE와 DVS로 제조된 히알루론산 하이드로겔은 50 U/mL 농도 이상에서 72시간이면 대부분 분해되는 것이 확인되었다. DVS로 히알루론산을 가교할 경우, BDDE보다 같은 중량대비 반응성이 높아 높은 가교도, 저장탄성계수를 유도할 수 있지만, BDDE보다 저장탄성계수 대비 낮은 팽윤도와 높은 히알루론산 분해효소 민감도, 핸들링이 어려워 원하는 물성을 이끌어내기 어렵다는 단점들이 있었다. 위 결과들을 종합해 볼 때, BDDE는 비교적 DVS보다 반응성이 낮지만, 화합물자체의 낮은 생체독성, DVS보다 낮은 반응성으로 인한 효율적인 반응 유도가 가능하여, BDDE 가 DVS보다 우월한 가교제로 판단된다. 최근 더불어 필러 시장에서 대부분 필러가 BDDE로 제조되고 있는 트렌드와 맞물리는 것으로 볼 때, 추후 신규 가교제 개발이나 제조공정 개발에 본 연구 결과가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

- 1 Selyanin, M. A., Boykov, P. Y., Khabarov, V. N., Polyak, F. J. H. A. P., Properties, Application in Biology & Medicine. The history of hyaluronic acid discovery, foundational research and initial use. 1-8 (2015).
- 2 Abatangelo, G., Vindigni, V., Avruscio, G., Pandis, L. & Brun, P. J. C. Hyaluronic acid: redefining its role. 9, 1743 (2020).
- 3 Faivre, J. *et al.* Crosslinking hyaluronic acid soft-tissue fillers: Current status and perspectives from an industrial point of view. 18, 1175-1187 (2021).
- 4 PRECEDENCE RESEARCH. Dermal Fillers Market Size, Share, and Trends 2024 to 2034. Report No. 2010, (2023).
- 5 Billings Jr, E., May Jr, J. W. J. P. & surgery, r. Historical review and present status of free fat graft autotransplantation in plastic and reconstructive surgery. 83, 368-381 (1989).
- 6 Glicenstein, J. in *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 157-161.
- 7 Cockerham, K. & Hsu, V. J. J. F. p. s. Collagen-based dermal fillers: past, present, future. 25, 106-113 (2009).
- 8 식약처, 첨. 2023년 의료기기 허가보고서. 11-1471000-000216-10 (2024).
- 9 Buck II, D. W., Alam, M., Kim, J. Y. J. J. o. P., Reconstructive & Surgery, A. Injectable fillers for facial rejuvenation: a review. 62, 11-18 (2009).
- 10 Huynh, A. & Priefer, R. J. C. r. Hyaluronic acid applications in ophthalmology, rheumatology, and dermatology. 489, 107950 (2020).
- 11 Chircov, C., Grumezescu, A. M. & Bejenaru, L. E. J. R. J. M. E. Hyaluronic acid-based scaffolds for tissue engineering. 59, 71-76 (2018).
- 12 Jia, Y. *et al.* Hyaluronic acid-based nano drug delivery systems for breast cancer treatment: Recent advances. 10, 990145 (2022).
- 13 Graça, M. F., Miguel, S. P., Cabral, C. S. & Correia, I. J. J. C. p. Hyaluronic acid—Based wound dressings: A review. 241, 116364 (2020).
- 14 Khunmanee, S., Jeong, Y. & Park, H. J. J. o. t. e. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. 8, 2041731417726464 (2017).
- 15 Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. J. V. m. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. 53, 397-411 (2008).
- 16 Luo, Y., Kirker, K. R. & Prestwich, G. D. J. J. o. c. r. Cross-linked hyaluronic acid hydrogel films: new biomaterials for drug delivery. 69, 169-184 (2000).

- 17 Kenne, L. *et al.* Modification and cross-linking parameters in hyaluronic acid hydrogels—Definitions and analytical methods. 91, 410-418 (2013).
- 18 Saranraj, P. & Naidu, M. J. I. J. P. B. A. Hyaluronic acid production and its applications-a review. 4, 853-859 (2013).
- 19 Rodriguez-Marquez, C. D., Arteaga-Marin, S., Rivas-Sánchez, A., Autrique-Hernández, R. & Castro-Muñoz, R. J. I. J. o. M. S. A review on current strategies for extraction and purification of hyaluronic acid. 23, 6038 (2022).
- 20 Shimada, E. & Matsumura, G. J. T. J. o. B. Viscosity and molecular weight of hyaluronic acids. 78, 513-517 (1975).
- 21 Meyer, K. J. P. r. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. 27, 335-359 (1947).
- 22 Bonferoni, M. C. *et al.* Biomaterials for soft tissue repair and regeneration: A focus on italian research in the field. 13, 1341 (2021).
- 23 Snetkov, P., Zakhарова, К., Morozkina, S., Olekhovich, R. & Uspenskaya, M. J. P. Hyaluronic acid: The influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. 12, 1800 (2020).
- 24 Lai, J.-Y. J. C. p. Relationship between structure and cytocompatibility of divinyl sulfone cross-linked hyaluronic acid. 101, 203-212 (2014).
- 25 Grimaudo, M. A., Nicoli, S., Santi, P., Concheiro, A. & Alvarez-Lorenzo, C. J. C. p. Cyclosporine-loaded cross-linked inserts of sodium hyaluronan and hydroxypropyl- β -cyclodextrin for ocular administration. 201, 308-316 (2018).
- 26 Shoham, N. *et al.* The mechanics of hyaluronic acid/adipic acid dihydrazide hydrogel: towards developing a vessel for delivery of preadipocytes to native tissues. 28, 320-331 (2013).
- 27 Tomihata, K., Ikada, Y. J. J. o. B. M. R. A. O. J. o. T. S. f. B. & Biomaterials, T. J. S. f. Crosslinking of hyaluronic acid with water-soluble carbodiimide. 37, 243-251 (1997).
- 28 Lee, Y., Oh, S. M., Lee, W. & Yang, E. J. J. J. o. C. D. Comparison of hyaluronic acid filler ejection pressure with injection force for safe filler injection. 20, 1551-1556 (2021).
- 29 Jeong, D., Kim, C., Kim, Y. & Jung, S. Dual crosslinked carboxymethyl cellulose/polyacrylamide interpenetrating hydrogels with highly enhanced mechanical strength and superabsorbent properties. *European Polymer Journal* 127, 109586, doi:<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109586> (2020).
- 30 Al-Sibani, M., Al-Harrasi, A. & Neubert, R. J. D. P.-A. I. J. o. P. S. Effect of hyaluronic acid initial concentration on cross-linking efficiency of hyaluronic acid-based hydrogels used in biomedical and cosmetic applications. 72, 81-86 (2017).

- 31 Choi, M. S. J. A. o. P. S. Basic rheology of dermal filler. 47, 301-304 (2020).
- 32 Kim, S., Bae, Y. & Okano, T. Hydrogels: Swelling, Drug Loading, and Release. *Pharm Res* 9, 283-290, doi:10.1023/A:1015887213431 (1992).
- 33 Vartanian, A. J., Frankel, A. S. & Rubin, M. G. J. A. o. F. P. S. Injected hyaluronidase reduces restylane-mediated cutaneous augmentation. (2005).
- 34 Cavallini, M., Papagni, M. & Trocchi, G. J. J. C. E. D. R. Sensitivity of hyaluronic acid fillers to hyaluronidase: an in vitro analysis. 11 (2020).
- 35 Kim, M. et al. Effect of cross-linker chain length on biophysical property of hyaluronic acid hydrogel dermal filler. 31, 843-850 (2023).
- 36 Guarise, C. et al. HA-based dermal filler: Downstream process comparison, impurity quantitation by validated HPLC-MS analysis, and in vivo residence time study. 17, 2280800019867075 (2019).
- 37 Edsman, K., Nord, L. I., Öhrlund, Å., Lärkner, H. & Kenne, A. H. J. D. S. Gel properties of hyaluronic acid dermal fillers. 38, 1170-1179 (2012).
- 38 Wongprasert, P., Dreiss, C. A. & Murray, G. J. D. t. Evaluating hyaluronic acid dermal fillers: A critique of current characterization methods. 35, e15453 (2022).
- 39 식약처. 성형용 필러 허가심사 가이드라인 [민원인 안내서]. (2020).
- 40 Allmendinger, A. & Fischer, S. J. P. r. Tissue resistance during large-volume injections in subcutaneous tissue of Minipigs. 37, 1-10 (2020).
- 41 Li, W., Zhou, J. & Xu, Y. J. B. r. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. 3, 617-620 (2015).
- 42 Seo, K. K. *Facial volumization with fillers.* (Springer, 2021).
- 43 Jung, H. J. A. o. p. s. Hyaluronidase: An overview of its properties, applications, and side effects. 47, 297-300 (2020).
- 44 DeLorenzi, C. J. A. S. J. New high dose pulsed hyaluronidase protocol for hyaluronic acid filler vascular adverse events. 37, 814-825 (2017).

ABSTRACT

Toward Physicochemical and Rheological Characterization of Hyaluronic Acid Dermal Fillers Cross-Linked with 1,4- Butanediol Diglycidyl Ether or Divinyl Sulfone

Hyaluronic acid-based dermal fillers dominate the global filler market. These fillers are produced by forming hydrogels through chemical crosslinking, with BDDE and DVS being the most commonly used crosslinkers. Although BDDE is predominantly used in current manufacturing, the comparative superiority of BDDE and DVS as crosslinkers has not been rigorously evaluated. To assess the performance of these crosslinkers, we prepared hyaluronic acid-based hydrogels using either BDDE or DVS at identical weight percent concentrations and converted the hydrogels into fillers. We analyzed the chemical structure of the hydrogels using FTIR-ATR and evaluated their physical properties, including rheological properties, cohesiveness, and injection force, with a rheometer and an injection force measuring device. Additionally, we assessed the cytotoxicity of each filler's extracts on fibroblasts (L929) and evaluated their sensitivity to hyaluronidase through an *in vitro* enzymatic degradation test. Finally, we compared the rheological properties, swelling ratio, injection force, and sensitivity to decomposition enzymes to determine the superiority of DVS and BDDE as crosslinking agents. Due to its lower molecular weight, DVS crosslinked more extensively with hyaluronic acid at the same concentration per weight, resulting in a higher storage modulus. However, the swelling ratio, cohesiveness, and injection force increased exponentially with the amount of DVS added, complicating reaction control. In contrast, BDDE exhibited a more predictable, multiplicative increase, making it easier to handle and control. *In vitro* evaluations showed that fillers made with both BDDE and DVS had no cytotoxicity, and their response to decomposition enzymes was similar. Ultimately, BDDE was deemed superior to DVS due to its ease of handling, efficient crosslinking, and controllable properties. The findings from this study are expected to aid in the development of new crosslinking agents or processes in the future.

Keywords: Hyaluronic acid-based filler, 1,4-butanediol diglycidyl Ether, divinyl sulfone, crosslinking agent, hydrogel, rheological properties