



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0165510
(43) 공개일자 2024년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/54 (2006.01) A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01) A61L 27/52 (2006.01)
A61L 27/56 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/54 (2013.01)
A61L 27/227 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0062587

(22) 출원일자 2023년05월15일

심사청구일자 2023년05월15일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

주식회사 바이오프렌즈

서울특별시 동대문구 경희대로 26 ,비118호(회기동, 경희대학교내오르네상스관)

(72) 발명자

권일근

서울특별시 성북구 월계로36길 27, 104동 1705호 (장위동, 꿈의숲대명루첸아파트)

허동녕

서울특별시 성북구 한천로 713, 506동 2101호(장위동, 래미안장위퍼스트하이)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 천지

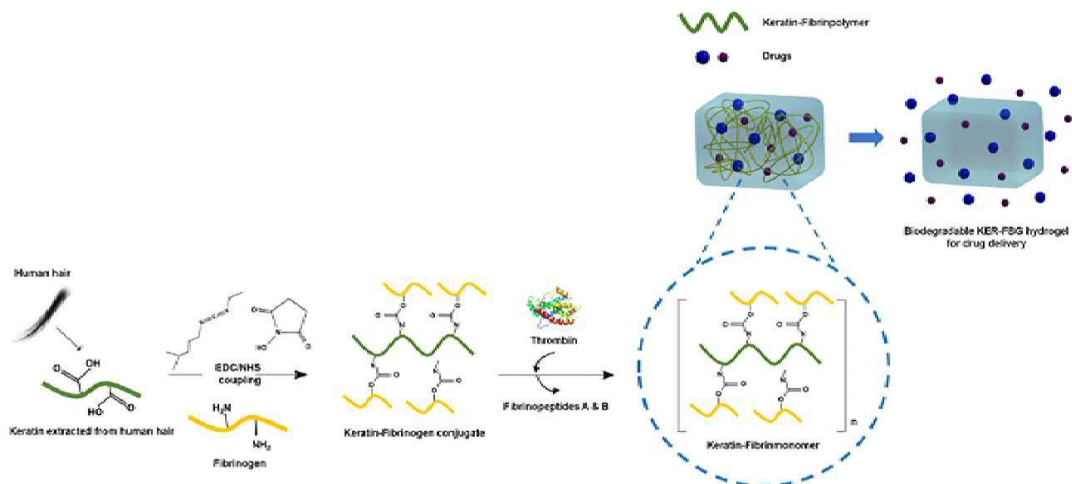
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 생리활성물질 전달체, 이의 제조방법 및 조직재생용 지지체

(57) 요약

생체적합성이 우수하며, 생리활성물질의 방출 거동을 효과적으로 제어할 수 있는 생리활성물질 전달체가 제공된다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함하는 가교 하이드로겔; 을 포함하는 생리활성물질 전달체를 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/3604 (2013.01)

A61L 27/52 (2013.01)

A61L 27/56 (2013.01)

(72) 발명자

이재서

서울특별시 서대문구 충정로7길 9, 803호(충정로3가, 미동아파트)

민성준

서울특별시 동대문구 망우로 46, 101동 1605호(회경동)

나하람

경기도 고양시 일산서구 강선로 187, 1006동 701호
(일산동, 후곡마을10단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711184645
과제번호	2020R1A2C2011937
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	3차원 골조직 융복합 지지체 골 재생 네트워크 기전 연구 및 유효성 평가
기 여 율	0.5/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465037189
과제번호	HI22C1572000022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	재생의료 임상연구 기반조성 사업
연구과제명	GMP 등급 인체유래 케라틴 기반 바이오잉크의 개발과 이를 기반한 창상피복재 개발
기 여 율	0.5/1
과제수행기관명	(주)바이오프렌즈
연구기간	2022.07.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함하는 가교 하이드로겔; 을 포함하는, 생리활성물질 전달체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 케라틴은,

동물 털, 동물 뿔, 동물 손톱 및 동물 발톱 중 적어도 1종 이상에서 유래된 것인,

생리활성물질 전달체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 케라틴은 인체 모발에서 유래된 것인,

생리활성물질 전달체.

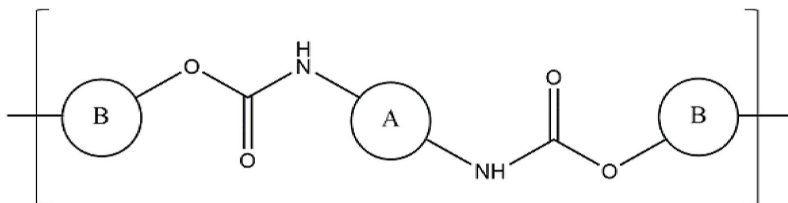
청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가교 하이드로겔은 하기 일반식 1로 표시되는 반복단위를 포함하는,

생리활성물질 전달체:

[일반식 1]



상기 일반식 1에서,

A는 상기 케라틴에서 유도된 제1 구조를 포함하고,

B는 상기 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함한다.

청구항 5

제1항에 있어서,

생리활성물질; 을 더 포함하는,
생리활성물질 전달체.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 생리활성물질은,
단백질, 펩타이드, 세포외기질, 핵산, 지질, 탄수화물, 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인,
생리활성물질 전달체.

청구항 7

제6항에 있어서,
상기 단백질은,
혈장단백질, 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액응고인자, 백신, 리간드 단백질, 세포표면항원무리(Cluster of differentiation), 및 수용체길항제(Antagonist)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는,
생리활성물질 전달체.

청구항 8

제7항에 있어서,
상기 혈장단백질은,
알부민, 글로불린, 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는,
생리활성물질 전달체.

청구항 9

제6항에 있어서,
상기 약물은,
항생제, 항암제, 소염제, 항바이러스제 및 항균제 중 적어도 1종 이상을 포함하는,
생리활성물질 전달체.

청구항 10

제5항에 있어서,
상기 생리활성물질은,
상기 가교 하이드로겔에 담지되거나, 상기 가교 하이드로겔과 화학적으로 결합된,
생리활성물질 전달체.

청구항 11

제1항에 있어서,
상기 가교 하이드로겔에 포함된 기공의 평균크기는 20 내지 120 μm 인,
생리활성물질 전달체.

청구항 12

제1항에 있어서,
1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 저장탄성률(G')은 10 내지 10,000Pa인,
생리활성물질 전달체.

청구항 13

제1항에 있어서,
1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 손실탄성률(G'')은 10 내지 10,000Pa인,
생리활성물질 전달체.

청구항 14

제1항에 있어서,
상기 가교 하이드로겔은,
가교제에서 유도된 제3 구조를 더 포함하는,
생리활성물질 전달체.

청구항 15

(S1) 케라틴, 피브리노겐 및 커플링제를 포함하는 혼합물을 준비하는 단계;
(S2) 상기 혼합물을 교반하여 복합 생체단백질을 제조하는 단계; 및
(S3) 상기 복합 생체단백질과 가교제를 혼합하여 가교 하이드로겔을 제조하는 단계; 를 포함하는,
생리활성물질 전달체의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서,
상기 가교 하이드로겔과 생리활성물질을 혼합하는 단계; 를 더 포함하는,
생리활성물질 전달체의 제조방법.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 따른 생리활성물질 전달체를 포함하는 조직재생용 지지체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 생리활성물질 전달체에 관한 것으로, 보다 구체적으로 생리활성물질 전달체, 이의 제조방법 및 조직 재생용 지지체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 케라틴은 인체 내 상피 세포 및 기타 조직에 대한 구조적 안정성을 제공하는 섬유질 단백질의 종류로서, 상처 치유 과정에서 손상 부위를 보호하여 조직 재생에 기여할 수 있다. 한편, 피브리노겐도 인체 내 존재하는 물질로 생분해성이 우수하여 조직 공학 분야에서 널리 사용되고 있다. 그러나 케라틴이나 피브리노겐을 단일로 이용한 하이드로겔은 물성이 약하며, 빠르게 분해되는 단점을 가지고 있었다.

[0003] 생리활성물질 전달체 중 바이러스 유전자, 재조합 단백질, 리포솜(Liposome), 양이온성 고분자, 그리고 다양한 형태의 나노입자와 나노물질들이 세포 내로의 약물전달을 위해 이용되었다. 그러나 많은 양이온성 리포솜들과 양이온성 고분자들은 임상에 적용하기에는 세포 독성이 강하여 부적합한 것으로 밝혀졌다. 또한, 안정적인 핵산의 세포막 투과를 위하여 핵산의 주 사슬을 화학적으로 변형시키는 방법도 시도되었다. 그러나, 이러한 방법은 비용이 비싸고 오랜 시간이 걸리며 노동 집약적인 공정이 요구되므로 임상 적용에는 적합하지 않았다. 양자점, 자성입자, 또는 금 나노입자를 포함한 다양한 형태의 나노입자를 이용한 약물전달 시스템(Drug delivery system, DDS)이 개발된 바 있지만, 이러한 입자들은 세포 독성을 가지며 핵산 등의 생체 고분자의 도입에 용이하지 않은 구조를 가지며, 세포 내로의 도입 효율도 낮다는 단점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 목적은 생체분해성 및 세포증식 성능이 우수하며, 세포독성이 없는 생리활성물질 전달체를 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 목적은, 생리활성물질의 방출 거동을 효과적으로 조절할 수 있는 생리활성물질 전달체를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 기계적 물성이 쉽게 조절될 수 있는 생리활성물질 전달체를 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생리활성물질 전달체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 생리활성물질 전달체를 포함하는 조직재생용 지지체를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 발명의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 발명의 실시예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 발명의 목적 및 장점들은 청구범위에 나타난 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

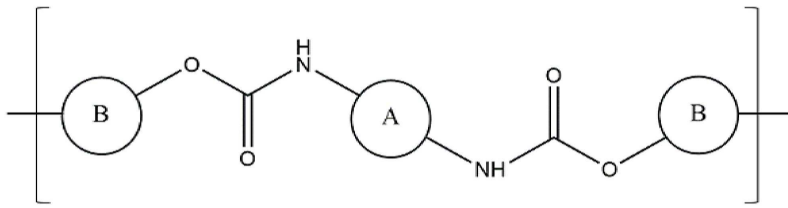
[0010] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 제1 측면에 따르면, 케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함하는 가교 하이드로겔; 을 포함하는 생리활성물질 전달체를 제공한다.

[0011] 본 발명의 제2 측면에 따르면, 상기 제1 측면에 있어서 상기 케라틴은 동물 털, 동물 뿔, 동물 손톱 및 동물 발톱 중 적어도 1종 이상에서 유래된 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 제3 측면에 따르면, 상기 제1 또는 제2 측면에 있어서 상기 케라틴은 인체 모발에서 유래된 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 제4 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제3 측면에 있어서 상기 가교 하이드로겔은 하기 일반식 1로 표시되는 반복단위를 포함할 수 있다.

[0014] [일반식 1]



[0015]

[0016] 상기 일반식 1에서 A는 상기 케라틴에서 유도된 제1 구조를 포함하고, B는 상기 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함할 수 있다.

[0017] 본 발명의 제5 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제4 측면 중 어느 하나에 있어서, 생리활성물질; 을 더 포함하는, 생리활성물질 전달체를 제공할 수 있다.

[0018] 본 발명의 제6 측면에 따르면, 상기 제5 측면에 있어서 상기 생리활성물질은 단백질, 펩타이드, 세포외기질, 핵산, 지질, 탄수화물, 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 제7 측면에 따르면, 상기 제6 측면에 있어서 상기 단백질은 혈장단백질, 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액응고인자, 백신, 리간드 단백질, 세포표면항원무리, 및 수용체 길항제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 제8 측면에 따르면, 상기 제7 측면에 있어서, 상기 혈장단백질은 알부민, 글로불린, 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0021] 본 발명의 제9 측면에 따르면, 상기 제6 측면에 있어서 상기 약물은 항생제, 항암제, 소염제, 항바이러스제 및 항균제 중 적어도 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0022] 본 발명의 제10 측면에 따르면, 상기 제5 내지 제9 측면 중 어느 하나에 있어서, 상기 생리활성물질은 상기 가교 하이드로겔에 담지되거나, 상기 가교 하이드로겔과 화학적으로 결합될 수 있다.

[0023] 본 발명의 제11 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제10 측면 중 어느 하나에 있어서 상기 가교 하이드로겔에 포함된 기공의 평균크기는 20 내지 120 μ m일 수 있다.

[0024] 본 발명의 제12 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제11 측면 중 어느 하나에 있어서 1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 저장탄성률(G')은 10 내지 10,000Pa일 수 있다.

[0025] 본 발명의 제13 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제12 측면 중 어느 하나에 있어서 1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 손실탄성률(G'')은 10 내지 10,000Pa일 수 있다.

[0026] 본 발명의 제14 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제13 측면 중 어느 하나에 있어서 상기 가교 하이드로겔은 가교제에서 유도된 제3 구조를 더 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명의 제15 측면에 따르면, (S1) 케라틴, 피브리노겐 및 커플링제를 포함하는 혼합물을 준비하는 단계; (S2) 상기 혼합물을 교반하여 복합 생체단백질을 제조하는 단계; 및 (S3) 상기 복합 생체단백질과 가교제를 혼합하여 가교 하이드로겔을 제조하는 단계를 포함하는 생리활성물질 전달체의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0028] 본 발명의 제16 측면에 따르면, 상기 제15 측면에 있어서 상기 가교 하이드로겔과 생리활성물질을 혼합하는 단계; 를 더 포함하는, 생리활성물질 전달체의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0029] 본 발명의 제17 측면에 따르면, 상기 제1 내지 제14 측면 중 어느 하나에 따른 생리활성물질 전달체를 포함하는 조직재생용 지지체를 제공할 수 있다.

[0030] 상기 과제에 해결 수단은, 본 발명의 특징을 모두 열거한 것은 아니다. 본 발명의 다양한 특징과 그에 따른 장점과 효과는 아래의 구체적인 실시예를 참조하여 보다 상세하게 이해될 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0031] 본 발명의 일 측면에 따른 생리활성물질 전달체는 생리활성물질의 방출량을 효과적으로 조절할 수 있음과 동시에 세포 독성이 없으면서, 높은 세포 증식률 및 생체분해성이 우수한 효과를 구현할 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 측면에 따른 생리활성물질 전달체는 손실탄성률, 저장탄성률 등과 같은 기계적 물성이 효과적으로 조절됨으로써 생체 내 부위 별로 적용될 수 있는 응용성이 다양할 수 있다.

[0033] 상술한 효과와 더불어 본 발명의 구체적인 효과는 이하 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면서 함께 기술한다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 생리활성물질 전달체의 제조방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 KER, FBG 및 실시예 1에 따른 KER-FBG 각각의 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 분석 결과(a)이고, KER, FBG 및 실시예 1에 따른 KER-FBG 각각의 TGA(Thermogravimetric Analysis) 그래프(b)이고, KER 및 KER-FBG 각각의 아민 함량(%)에 대한 막대그래프(c)이다.

도 3은 실시예 2-1 내지 2-3의 하이드로겔을 제조하는 과정에 있어서, 트롬빈을 첨가하기 전 비가교된 KER-FBG(왼쪽) 및 트롬빈을 첨가한 이후 가교된 KER-FBG(오른쪽)의 실제 사진(a)이고, 각각의 실시예 2-1 내지 2-3 및 3-1 내지 3-3의 하이드로겔의 SEM 사진(b) 및 기공크기(c)를 나타낸 것이다.

도 4는 실시예 3-1 내지 3-3에 따른 하이드로겔 각각의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')(a) 및 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 하이드로겔 각각의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')(b)이다.

도 5는 시간의 경과에 따른 실시예 2-1 내지 2-3의 KER-FBG 하이드로겔의 팽윤율(a)과 무게비율(b) 및 누적 BSA(Bovine Serum Albumin) 방출률(c)을 나타낸 것이다.

도 6(a)는 배양시간을 24시간 또는 48시간으로 조절할 때 대조군, 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔 각각의 염색된 세포의 형광현미경 사진이고, 도 6(b)는 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 세포증식 효과를 확인하기 위해, 5일 경과하였을 때 F-actin 염색된 세포의 이미지이고, 도 6(c)는 도 6(a)의 실험결과를 막대그래프로 나타낸 것이고, 도 6(d)는 대조군과 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 세포증식률을 막대그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 명세서에서 단수의 표현은 문맥 상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0036] 본 명세서에서 용어 '내지'를 사용하여 나타낸 수치 범위는, 상기 용어의 앞과 뒤에 기재된 값을 각각 하한 값과 상한 값으로 포함하는 수치의 범위를 나타낸다. 임의의 수치범위의 상한과 하한으로의 수치 값이 각각 복수 개로 개시된 경우, 본 명세서에서 개시하는 수치의 범위는 복수의 하한 값 중 임의의 하나의 값 및 복수의 상한 값 중 임의의 하나의 값을 각각 하한 값 및 상한 값으로 하는 임의의 수치의 범위로 이해될 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 측면에 따르면, 케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함하는 가교 하이드로겔;을 포함하는 생리활성물질 전달체를 제공한다. 본 발명의 일 측면에 따른 생리활성물질 전달체는 생리활성물질의 방출량을 효과적으로 조절할 수 있음과 동시에 세포 독성이 없으면서, 높은 세포 증식률 및 생체 분해성이 우수한 효과를 구현할 수 있다. 본 발명의 다른 측면에 따른 생리활성물질 전달체는 손실탄성률, 저장탄성률 등과 같은 기계적 물성이 효과적으로 조절됨으로써 생체 내 부위 별로 적용될 수 있는 응용성이 다양할 수 있다.

[0038] 이하에서는, 본 발명의 구성을 보다 상세히 설명한다.

[0039] 1. 생리활성물질 전달체

[0040] 본 발명에 따른 생리활성물질 전달체는 가교 하이드로겔을 포함한다.

[0041] 본 발명에 따른 가교 하이드로겔은 케라틴에서 유도된 반복단위 및 피브리노겐에서 유도된 반복단위를 포함하는 가교 매트릭스일 수 있다. 구체적으로 상기 케라틴과 피브리노겐은 커플링제를 통해 커플링 반응이 진행되어 케라틴-피브리노겐 컨쥬게이트(Keratin-Fibrinogen conjugate)가 생성될 수 있다. 상기 케라틴-피브리노겐 컨쥬게이트는 가교제와 반응하여 케라틴-피브린폴리머(Keratin-Fibrinpolymer)가 생성될 수 있다. 여기서 가교 매트릭스는 케라틴-피브린폴리머일 수 있다.

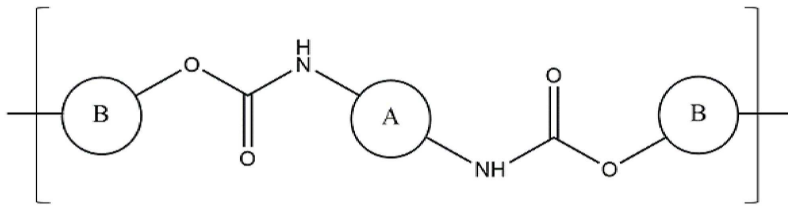
[0042] 본 발명에 따른 케라틴은 동물 털, 동물 뿔, 동물 손톱 및 동물 발톱 중 적어도 1종 이상에서 유래된 것일 수 있고, 구체적으로 인체 모발에서 유래된 것일 수 있다. 인체 모발에는 케라틴이 풍부하게 함유될 수 있기 때문

에 인체 모발을 케라틴의 오리진(Origin)으로 사용할 경우 가교 하이드로겔의 제조공정이 용이하게 이루어질 수 있다.

[0043] 본 발명에 따른 가교 하이드로겔은 케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함한다. 구체적으로 상기 제1 구조 및 상기 제2 구조는 다른 연결기를 통해 화학적으로 연결될 수 있다. 예를 들어 상기 연결기는 2가 연결기일 수 있고 구체적으로 $-NH-COO-$ 일 수 있다. 여기서 N은 케라틴의 주쇄(Main chain)와 연결될 수 있고 O는 피브리노겐의 주쇄와 연결될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 가교 하이드로겔은 케라틴에서 유도된 제1 구조 및 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함함으로써, 생리활성물질의 방출량을 효과적으로 조절할 수 있음과 동시에 세포 독성이 없으면서 높은 세포 증식률을 구현할 수 있다. 이에 따라 조직재생 분야의 지지체로 널리 사용될 수 있는 이점을 제공할 수 있다.

[0044] 본 발명에 따른 가교 하이드로겔은 하기 일반식 1로 표시되는 반복단위를 포함할 수 있다.

[일반식 1]



[0046] 구체적으로 상기 일반식 1에서 A는 상기 케라틴에서 유도된 제1 구조를 포함하고, B는 상기 피브리노겐에서 유도된 제2 구조를 포함할 수 있다. 구체적으로 2가 연결기인 $-NH-COO-$ 는 측쇄에 카르복실기를 함유하는 케라틴, 측쇄에 아민기를 함유하는 피브리노겐 및 커플링제의 조합으로 EDC/NHS 커플링 반응을 통해 형성될 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 생리활성물질 전달체는 생리활성물질을 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 생리활성물질은 단백질, 펩타이드, 세포외기질, 핵산, 지질, 탄수화물, 약물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0049] 예를 들어 상기 단백질은 혈장단백질, 호르몬, 사이토카인, 효소, 항체, 성장인자, 전사조절인자, 혈액응고인자, 백신, 세포표면항원무리(Cluster of differentiation), 및 수용체길항제(Antagonist)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0050] 예를 들어, 상기 혈장단백질은 알부민, 글로불린, 및 피브리노겐으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로 상기 알부민은 소혈청 알부민(Bovine Serum Albumin, BSA)을 포함할 수 있다.

[0051] 예를 들어, 상기 호르몬은 간 성장 호르몬, 여포자극 호르몬, 황체형성 호르몬, 황체형성 호르몬 방출 호르몬, 부신피질 호르몬, 및 갑상선자극 호르몬으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0052] 예를 들어 상기 효소는 글루코세레브로시데이즈(Glucocerebrosidase), 이두로네이트-2-설퍼테이즈(Iduronate-2-sulfatase), 알파-갈락토시데이즈-A, 아갈시데이즈 알파(Agalsidasealpha), 알파-L-이두로니데이즈(Alpha-L-iduronidase), 뷰티릴콜린에스테르테이즈(Butyrylcholinesterase), 키티네이즈(Chitinase), 글루타메이트 디카르복실레이즈(Glutamate decarboxylase), 이미글루세레이즈(Imiglucerase), 리파아제(Lipase), 유리케이즈(Uricase), 혈소판-활성인자 아세틸하이드롤레이즈(Platelet-activating factor acetylhydrolase), 중성 엔도펩티데이즈(Neutral endopeptidase), 및 마이엘로퍼옥시데이즈(Myeloperoxidase)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0053] 예를 들어, 상기 항체는 단일클론 항체; 다중클론 항체; 및 scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ 및 Fd 등의 항체단편류로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0054] 예를 들어, 상기 성장인자는 혈소판 유래 성장인자, 상피세포 성장인자, 표피세포 성장인자, 및 신경 성장인자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다. 여기서 신경 성장인자는 모양체 신경 영양인자(Ciliary neurotrophic factor), 악소제네시스 인자-1(Axogenesis factor-1), 뇌-나트륨 이뇨 펩타이드(Brain-natriuretic peptide), 네트린(Netrin), 중성구 억제인자(Neutrophil inhibitor factor), 신경영양인자, 뉴트린(Neuturin) 등일 수 있다.

- [0055] 예를 들어 상기 전사조절인자는 RNA 중합효소와 결합하여 전사를 조절하는 인자로 전가개시전 복합체 또는 프로모터에 결합하는 전사복합체를 포함할 수 있다. 일 예시에 따르면, 상기 전사복합체는 DNA의 TATA박스에 결합되는 TATA 결합 단백질일 수 있고 구체적으로 TFIIA, TFIIB, TFIID 등일 수 있다.
- [0056] 예를 들어 상기 혈액응고인자는 팩터 I-섬유소원(Fibrinogen), 팩터 II-프로트롬빈(Prothrombin), V-팩터 V(factor V 또는 Proaccelerin 또는 labile factor), VII-팩터VII(프로콘버틴(Proconvertin) 또는 제7인자), VIII-항혈우병인자A(Antihemophilic factor A), IX-항혈우병인자B(Antihemophilic factor B), X-스튜어트-프라우 인자(Stuart-Prower factor), XI-혈장 트롬보플라스틴 전구물질(PTA, Plasma thromboplastin antecedent), XIII-피브리안안정화인자(Fibrin stabilizing factor) 등일 수 있다.
- [0057] 예를 들어, 상기 백신은 인체를 치료할 수 있는 백신이면 특별히 제한되지 않고 모두 적용될 수 있다. 일 예시에 따르면, 상기 백신은 바이러스에서 유래된 백신 항원일 수 있다.
- [0058] 예를 들어, 상기 세포표면항원무리(Cluster of differentiation)는 수용체를 활성화하는 리간드로 작용할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 세포표면항원무리는 줄기세포, 백혈구 등에 적용될 수 있는 CD 표지자일 수 있다.
- [0059] 예를 들어, 상기 수용체길항제는 생체 내의 수용체 분자에 작용하여 신경전달물질이나 호르몬 등 기능을 억제 또는 저해하는 단백질일 수 있다.
- [0060] 예를 들어 상기 펩타이드는 성장호르몬 방출 펩타이드, 글루카곤-유사 펩타이드류(GLP-1 등), 마크로파지 펩타이드, 트롬빈 수용체 활성 펩타이드, 피브리-결합 펩타이드, 체장 폴리펩타이드, 가스트린 방출 펩타이드 등일 수 있다.
- [0061] 예를 들어, 상기 세포외기질은, 콜라겐(Collagen), 젤라틴(Gelatin), 엘라스틴(Elastin), 오스티오칼신(Osteocalcin), 피브리노겐(Fibrinogen), 피브로모듈린(Fibromodulin), 테나신(Tenascin), 라미닌(Laminin), 오스티오폰틴(Osteopontin), 오스티오넥틴(Oteonectin), 퍼레칸(Perlecan), 베르시칸(Versican), 본 윌리브랜드 팩터(Von Willebrand factor) 및 비트로넥틴(Vitronectin)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.
- [0062] 예를 들어, 상기 핵산은 DNA, RNA, 올리고뉴클레오타이드 등일 수 있다.
- [0063] 예를 들어 상기 지질은, 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스터, 중성지방, 인지질 및 지방산 등일 수 있다.
- [0064] 예를 들어, 상기 탄수화물은 단당류(Sugars), 올리고당류(Oligosaccharides), 다당류(Polysaccharides) 등일 수 있다.
- [0065] 예를 들어, 상기 약물은, 항생제, 항암제, 소염제, 항바이러스제 및 항균제 중 적어도 1종 이상을 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 항생제는 테트라사이클린, 미노사이클린, 독시사이클린, 오픈로록사신, 레보플록사신, 시프로플록사신, 클라리스로마이신, 에리쓰로마이신, 세파클러, 세포탁심, 이미페넴, 페니실린, 겐타마이신, 스트렙토마이신, 및 반코마이신로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 항암제는 메토틱렉세이트, 카보플라틴, 탁솔, 시스플라틴, 5-플루오로우라실, 독소루비신, 에토포사이드, 파클리탁셀, 캄토테신, 및 사이토신 아라비노스로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 소염제는 인도메타신, 이부프로펜, 케토프로펜, 피록시캅, 플루비프로펜, 및 디클로페낙으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 항바이러스제는 아시콜로버, 및 로바빈 중 적어도 1종 이상 또는 유도체를 포함할 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 항균제는 케토코나졸, 이트라코나졸, 플루코나졸, 암포테리신-B, 및 그리세오폴린 중 적어도 1종 이상 또는 유도체를 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 생리활성물질은 상기 가교 하이드로겔에 담지되거나 상기 가교 하이드로겔과 화학적으로 결합될 수 있다. 여기서 생리활성물질이 가교 하이드로겔에 담지된다는 것의 의미는, 화학적 결합 없이 물리적으로 가교 하이드로겔의 표면 또는 내부에 생리활성물질이 배치되는 것을 의미할 수 있다. 또한, 상기 생리활성물질은 상기 가교 하이드로겔과 공유결합 등의 다양한 화학적 결합을 통해 연결될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 생리활성물질이 가교 하이드로겔에 담지되거나 화학적으로 결합됨으로써, 예정된 인체 내 부위에서 예정된 시간에 걸쳐 일정하게 상기 생리활성물질이 방출될 수 있다. 이에 따라 생리활성물질의 농도를 오랫동안 인체 내 유지하거나 국소적으로 상기 생리활성물질을 예정된 부위에 전달할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 가교 하이드로겔에 포함된 기공의 평균크기는 20 내지 120 μ m, 25 내

지 120 μ m, 30 내지 100 μ m, 35 내지 90 μ m, 40 내지 85 μ m, 50 내지 80 μ m, 또는 55 내지 75 μ m일 수 있다. 상기 가교 하이드로겔에 포함된 기공에 영향을 미치는 요인은 각각 독립적으로 비가교 케라틴-피브리노겐(건조된 상태)의 함량 및 가교제의 함량일 수 있다. 구체적으로 상기 가교 하이드로겔에 포함된 기공의 평균크기가 상기 수치 범위 미만일 경우 생리활성물질이 잘 담지되지 못하거나 화학적으로 결합되기 어려운 문제가 발생할 수 있고 상기 수치 범위를 초과할 경우 가교 하이드로겔의 기계적 물성이 떨어지는 문제가 발생할 수 있다.

[0068] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 저장탄성률(G')은 10 내지 10,000Pa일 수 있다. 여기서 저장탄성률(G')은 탄성에 의해 손실 없이 저장되는 에너지를 의미하고, 그 수치가 높을수록 완전탄성체에 가깝다는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어 상기 저장탄성률은 동적기계분석기를 이용하여 0.1-10rad/s의 진동수 범위 및 1%의 일정한 스트레인(Strain) 조건에서 측정될 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 1% 스트레인(Strain) 및 0.1 내지 10rad/s 조건에서 상기 가교 하이드로겔의 손실탄성률(G'')은 10 내지 10,000Pa일 수 있다. 여기서 손실탄성률(G'')은 점성에 의해 손실되는 에너지를 의미하고, 그 수치가 높을수록 물과 가까운 거동을 보인다는 것을 의미할 수 있다. 예를 들어 상기 손실탄성률은 동적기계분석기를 이용하여 0.1-10rad/s의 진동수 범위 및 1%의 일정한 스트레인(Strain) 조건에서 측정될 수 있다.

[0070] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 가교 하이드로겔은 가교제에서 유도된 제3 구조를 더 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 가교제는 트롬빈을 포함할 수 있고 필요에 따라 칼슘이온을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 가교제는 가교반응을 통해 케라틴-피브리노겐 컨쥬게이트를 케라틴-피브린폴리머로 변환시킬 수 있다.

[0071] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 37 $^{\circ}$ C에서 DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline)에 3시간 동안 침지된 상기 가교 하이드로겔의 팽윤율은 1,000 내지 3,000%일 수 있다. 구체적으로 상기 가교 하이드로겔의 팽윤율은 비가교 케라틴-피브리노겐(건조된 상태)의 함량, 가교 하이드로겔의 기공 크기 및 기계적 물성에 따라 달라질 수 있다.

[0072] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 7일이 경과한 상기 가교 하이드로겔의 분해율은 60%이하, 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 또는 20% 이하일 수 있다. 예를 들어, 상기 가교 하이드로겔의 분해율은 후술할 수학적 2를 통해 계산될 수 있다. 구체적으로 상기 가교 하이드로겔의 분해율은 비가교 케라틴-피브리노겐(건조된 상태)의 함량, 가교 하이드로겔의 기공 크기 및 기계적 물성에 따라 달라질 수 있다.

[0073] 2, 생리활성물질 전달체의 제조방법

[0074] 이하, 도 1을 참고하여 본 발명의 구성을 보다 상세히 설명한다.

[0075] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 생리활성물질 전달체의 제조방법을 나타낸 모식도이다.

[0076] 도 1을 참고하면, 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, (S1) 케라틴, 피브리노겐 및 커플링제를 포함하는 혼합물을 준비하는 단계; (S2) 상기 혼합물을 교반하여 복합 생체단백질을 제조하는 단계; 및 (S3) 상기 복합 생체단백질과 가교제를 혼합하여 가교 하이드로겔을 제조하는 단계를 포함하는 생리활성물질 전달체의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0077] 예를 들어, 상기 케라틴은 인체 모발에서 유래된 케라틴 분말일 수 있다.

[0078] 예를 들어, 상기 커플링제는 EDC/NHS(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride/N-hydroxysulfosuccinimide)를 포함할 수 있다. 상기 케라틴과 피브리노겐은 커플링제의 존재 하에 EDC/NHS 커플링 반응이 진행되어 케라틴-피브리노겐 컨쥬게이트로 변환될 수 있다. 구체적으로 상기 케라틴-피브리노겐 컨쥬게이트는 상기 복합 생체단백질일 수 있다.

[0079] 본 발명에 따른 복합 생체단백질은 가교제의 존재 하에 케라틴-피브린폴리머로 변환될 수 있다. 여기서 케라틴-피브린폴리머는 가교 하이드로겔과 대응될 수 있다.

[0080] 본 발명에 따른 생리활성물질 전달체의 제조방법은 상기 가교 하이드로겔과 생리활성물질을 혼합하는 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어 상기 가교 하이드로겔과 생리활성물질이 혼합됨으로써, 상기 생리활성물질은 상기 가교 하이드로겔에 담지되거나 화학적으로 결합할 수 있다. 이러한 단계를 통해 생리활성물질 전달체가 결과적으로 제조될 수 있다.

[0081] 3. 조직재생용 지지체

[0082] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 상기 생리활성물질 전달체를 포함하는 조직재생용 지지체를 제공할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 조직재생용 지지체를 통해 예정된 인체 내 부위에서 예정된 시간에 걸쳐 일정하게 상기 생리활성물질이 방출될 수 있다. 이에 따라 생리활성물질의 농도를 오랫동안 인체 내 유지하거나 국소적으로 상기 생리활성물질을 예정된 부위에 전달할 수 있다.

[0083] 본 발명에 따른 생리활성물질 전달체는 생체분해성이 우수하고 기계적 물성이 쉽게 조절되는 특징을 가질 수 있다. 이에 따라 인체 내에서 손상된 조직과 장기의 재생을 위한 생체 내 삽입용 지지체의 소재로 구현될 수 있다. 또 다른 예시에 따르면, 상기 조직재생용 지지체는 3D 프린터 장치로 제조된 지지체일 수 있다.

[0084] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명하나, 이는 하나의 예시에 불과할 뿐, 본 발명의 권리범위가 다음 내용에 의해 제한되지 아니한다.

[0085] [재료준비에: 재료의 준비]

표 1

재료의 명칭	화합물 명칭
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride
NHS	N-hydroxysulfosuccinimide
KER-FBG	Keratin-Fibrinogen

[0087] [제조준비예 1: 인체 모발에서 유래된 케라틴 분말의 제조방법]

[0088] 인체 모발 샘플(20g)을 행구고 증류수를 사용하여 완전히 세척하였다. 모발을 탈지하기 위해, 세척된 모발 샘플을 메탄올 및 클로로포름이 1:2의 부피비로 혼합된 혼합물에 24시간 동안 주변온도(Ambient temperature) 조건에서 침지한 후 자연건조하였다. 상기 탈지된 모발을 800mL의 2%(v/v) 과산화아세트산에서 37℃에서 12시간 동안 전자기 교반하였다. 상기 교반된 모발(20g)을 탈이온수를 이용하여 세척한 후, 우레아(5M), 싸이오우레아(2.6M), Tris-HCl(25mM, pH 8.5) 및 2-머캅토에탄올(5%(v/v))로 구성된 Shindai 용액(400mL) 내에서 50℃ 및 72시간 동안 교반하였다. 그 결과물을 4,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 12 내지 14kDa의 투석막을 이용하여 상등액을 5일 동안 투석하여 인체 모발에서 유래된 케라틴 분말을 제조하였다.

[0089] [제조예 1: KER-FBG의 합성예]

[0090] 상기 제조준비예 1의 케라틴 분말(200mg)을 MES(2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid; 0.1M) 및 NaCl(0.5M)을 포함하는 활성 버퍼(100mL, pH=6.0)에 용해시킨 용액을 제조하였다. 상기 용액에 NHS(108.57mg, 5mM) 및 EDC(31mg, 2mM)를 첨가한 후 용해시켜 혼합물을 제조하였다. NaOH(1N)를 이용하여 상기 혼합물의 pH를 7.0으로 조절한 후, 인간 혈장의 피브리노겐(400mg, FBG)을 첨가한 다음, 그 결과물을 2시간 동안 부드럽게 교반하였다.

[0091] 반응이 종결된 다음, 생성된 혼합물을 4,000rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 12 내지 14kDa의 투석막을 이용하여 3일 동안 탈이온수에 대해 투석하였다. 상기 투석된 KER-FBG 용액을 0.2 μ m의 기공 크기를 갖는 필터로 통과시킨 다음, 통과물을 동결건조하여 -20℃에서 보관하였다. 그 결과 최종적으로 KER-FBG를 합성하였다.

[0092] [실험예 1: KER-FBG의 특징 분석]

[0093] 도 2는 KER, FBG 및 실시예 1에 따른 KER-FBG 각각의 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectroscopy) 분석 결과(a)이고, KER, FBG 및 실시예 1에 따른 KER-FBG 각각의 TGA(Thermogravimetric Analysis) 그래프(b)이고, KER 및 KER-FBG 각각의 아민 함량(%)에 대한 막대그래프(c)이다.

[0094] 도 2(a)의 FT-IR 분석결과는 FT-IR 분광기(Bruker, Invenio-R, USA)를 이용하여 4,000~400cm⁻¹에서 측정되었다.

[0095] 도 2(a)를 참고하면, KER 및 FBG의 아마이드 I(1,638cm⁻¹), 아마이드 II(1,439cm⁻¹) 밴드가 동일한 파수에서 나타났다. 하지만 KER-FBG의 아마이드 A 밴드(3,283 cm⁻¹)는 KER(3,270 cm⁻¹) 및 FBG(3,175 cm⁻¹)의 아마이드 A 밴드보다 높은 파수의 피크를 나타냈다.

[0096] 도 2(b)의 TGA 그래프 분석을 위해, 질소가스 흐름 조건 하에서 시료를 25 내지 800℃에서 10℃/min의 승온속도로 가열하였다.

- [0097] 도 2(b)를 참고하면, KER, FBG 및 실시예 1에 따른 KER-FBG은 25 내지 800℃에서 무게가 모두 감소하였다. 이는 고분자의 주사슬에 존재하는 결합인 에스테르 결합이 400℃에서 분해되며, 400℃를 초과하는 온도에서 아마이드 결합이 절단되는 것으로부터 기인한 것임을 유추할 수 있다. 또한, 실시예 1에 따른 KER-FBG의 잔존무게는 KER 및 FBG의 잔존무게보다 높았으며, KER-FBG의 열적안정성이 KER 및 FBG보다 개선되었음을 확인할 수 있다.
- [0098] 도 2(c)의 아민 함량을 분석하기 위한 방법으로 TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic acid) 분석법을 사용하였다. 구체적으로 표준 L-라이신을 다양한 농도(0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.5mmol)로 제조하고 KER 및 KER-FBG 시료(2mg)를 각각 0.1M 중탄산나트륨 완충액(pH 8.5)에 용해시켰다. 각 시료가 포함된 용액(0.5mL)을 각각 0.1%(w/v) TNBS 용액(0.25mL)과 별도로 혼합한 후, 상기 혼합물을 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 그 후 염산(0.125mL, 1N) 및 소듐도데실설페이트(0.25mL, 10% w/v)를 용액에 첨가한 후, 335 nm에서의 흡광도를 각 시료에 대해 기록하였다. 도 2(c)를 참고하면, KER-FBG의 치환도를 나타내는 아민의 함량이 약 42.1% 높아졌음을 확인할 수 있다.
- [0099] **[제조예 2: KER-FBG 하이드로겔의 제조]**
- [0100] 건조된 상기 실시예 1에 따른 KER-FBG을, 인간 혈장에서 유래되며 가교제 역할을 하는 트롬빈(가교제)을 포함하는 DPBS(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline) 용액에 용해한 결과물을 하이드로겔이 형성될 때까지 수초 동안 균질화하였다.
- [0101] **<실시예 2-1 내지 2-3: KER-FBG의 함량이 서로 상이한 경우>**
- [0102] 상기 트롬빈의 농도가 300IU인 조건에서, 100 μ L 기준 건조된 KER-FBG의 함량을 1%(w/v)(실시예 2-1), 3%(w/v)(실시예 2-2) 및 5%(w/v)(실시예 2-3)로 각각 조절하여 하이드로겔을 제조하였다.
- [0103] **<실시예 3-1 내지 3-3: 트롬빈의 함량이 서로 상이한 경우>**
- [0104] 100 μ L 기준 건조된 KER-FBG의 함량이 5%(w/v)인 조건에서, 트롬빈의 함량을 50IU(실시예 3-1), 100IU(실시예 3-2) 및 300IU(실시예 3-3)로 각각 조절하여 하이드로겔을 제조하였다.
- [0105] **[실험예 3: KER-FBG의 가교 특성, SEM 사진 및 기공 특성]**
- [0106] 도 3은 실시예 2-1 내지 2-3의 하이드로겔을 제조하는 과정에 있어서, 트롬빈을 첨가하기 전 비가교된 KER-FBG(왼쪽) 및 트롬빈을 첨가한 이후 가교된 KER-FBG(오른쪽)의 실제 사진(a)이고, 각각의 실시예 2-1 내지 2-3 및 3-1 내지 3-3의 하이드로겔의 SEM 사진(b) 및 기공크기(c)를 나타낸 것이다.
- [0107] 도 3(a)를 참고하면, 트롬빈을 첨가하기 전 비가교된 KER-FBG은 흐름 특성을 나타냈고, 트롬빈을 첨가한 이후 가교된 KER-FBG 하이드로겔은 흐름 특성을 나타내지 않았다. 즉 가교제 역할을 수행하는 트롬빈을 통해 흐름 특성이 없는 KER-FBG 하이드로겔이 구현되었음을 확인할 수 있다.
- [0108] 도 3(b) 및 3(c)를 참고하면, KER-FBG의 함량이 높아지거나, 트롬빈의 함량이 높아질수록 하이드로겔에 포함된 기공의 크기가 작아지는 것을 확인할 수 있다. 이러한 하이드로겔의 기공 구조는 하이드로겔 매트릭스 내 세포의 침투 및 이동에 영향을 미치는 것을 고려할 때, KER-FBG의 함량 또는 트롬빈의 함량을 조절함으로써 복잡한 조직을 모방할 수 있음을 유추할 수 있다. 예를 들어 상기 KER-FBG 하이드로겔에 포함된 기공의 크기는 25 내지 110 μ m일 수 있다.
- [0109] **[실험예 4: KER-FBG 하이드로겔의 기계적 물성 평가]**
- [0110] 도 4는 실시예 3-1 내지 3-3에 따른 하이드로겔 각각의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')(a); 및 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 하이드로겔 각각의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')(b)이다. 구체적으로 상기 하이드로겔 각각의 저장탄성률 및 손실탄성률은 0.1-10rad/s의 진동수 범위에서 측정되었고, 상기 진동수 범위는 1%의 일정한 스트레인(Strain) 조건에서 수행되었고, 분석장비로 동적기계분석기(레오미터, Anton Paar MCR 92)를 사용하였다.
- [0111] 저장탄성률(G')은 탄성에 의해 손실 없이 저장되는 에너지를 의미하고, 그 수치가 높을수록 완전탄성체에 가깝다는 것을 의미할 수 있다. 손실탄성률(G'')은 점성에 의해 손실되는 에너지를 의미하고, 그 수치가 높을수록 물과 가까운 거동을 보인다는 것을 의미할 수 있다.
- [0112] 도 4(a)를 참고하면, 트롬빈의 농도가 조절됨에 따라 하이드로겔의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')이 달라지는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 트롬빈의 농도에 따라 하이드로겔의 기계적 물성이 조절됨을 확인할 수

있다.

[0113] 도 4(b)를 참고하면, 건조된 KER-FBG의 농도가 조절됨에 따라 하이드로겔의 저장탄성률(G') 및 손실탄성률(G'')이 달라지는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 건조된 KER-FBG의 농도에 따라 하이드로겔의 기계적 물성이 조절됨을 확인할 수 있다.

[0114] **[실험예 5: KER-FBG 하이드로겔의 팽윤율, 분해율]**

[0115] 도 5는 시간의 경과에 따른 실시예 2-1 내지 2-3의 KER-FBG 하이드로겔의 팽윤율(a)과 무게비율(b) 및 누적 BSA(Bovine Serum Albumin) 방출률(c)을 나타낸 것이다.

[0116] 도 5(a)의 KER-FBG 하이드로겔의 팽윤율 측정을 위해, 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔을 DPBS에 37℃에서 3시간 동안 침지시켜 평형 팽윤 상태를 달성하였다. 상기 팽윤된 하이드로겔은 소형분석저울(HR-250AZ, A&D 회사, 한국)을 이용하여 하기 수학적 1로부터 계산되었다.

[0117] [수학적 1]

$$\text{Swelling ratio (\%)} = \frac{(W_t - W_0)}{W_0} \times 100$$

[0118]

[0119] 상기 수학적 1에서, W_0 는 동결건조된 KER-FBG 하이드로겔의 초기 무게이고, W_t 는 3시간 동안 팽윤된 이후 동결건조된 KER-FBG 하이드로겔의 무게이다.

[0120] 도 5(a)를 참고하면, 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 경우 180분이 지나서는 물에 의해 포화된 평형 상태에 도달되었음을 확인할 수 있다. 또한, 동결건조된 KER-FBG의 함량 관점에서 그래프를 분석하면 KER-FBG의 함량이 낮아질수록 팽윤율이 높아지는 것을 확인할 수 있다.

[0121] 도 5(b)의 KER-FBG 하이드로겔의 분해율은 하기 수학적 2로부터 계산되었다. 구체적으로 상기 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔을 DPBS에 37℃에서 3시간 동안 침지시킨 다음, 용액 상태에서 상기 침지된 하이드로겔을 꺼낸 후 건조된 하이드로겔의 무게를 측정하였다.

[0122] [수학적 2]

$$\text{Degradation(\%)} = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100$$

[0123]

[0124] 상기 수학적 2에서, W_0 는 동결건조된 KER-FBG 하이드로겔의 초기 무게이고, W_t 는 분해된 KER-FBG 하이드로겔의 무게이며, 분해율은 질량감을 의미한다.

[0125] 도 5(b)를 참고하면, KER-FBG의 함량이 높아질수록 분해율이 낮아지는 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 KER-FBG의 결정화도에 따라 KER-FBG 하이드로겔의 분해율이 달라지는 것을 확인할 수 있었고, 구체적으로 KER-FBG의 결정화도가 높아질수록 KER-FBG 하이드로겔의 분해율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었다.

[0126] **[제조예 3: 생리활성물질 전달체의 제조]**

[0127] **<실시예 4-1 내지 4-3: 생리활성물질 전달체>**

[0128] 각각의 상기 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔에 BSA(1mg/mL)를 캡슐화하여 캡슐화된 하이드로겔을 제조하였다. 실시예 4-1의 생리활성물질 전달체는 실시예 2-1의 하이드로겔을 포함하고, 실시예 4-2의 생리활성물질 전달체는 실시예 2-2의 하이드로겔을 포함하고, 실시예 4-3의 생리활성물질 전달체는 실시예 2-3의 하이드로겔을 포함한다.

[0129] **[실험예 6: 생리활성물질 전달체의 시간의 경과에 따른 누적 BSA 방출 거동]**

[0130] 도 5(c)의 시간의 경과에 따른 누적 BSA 방출 거동을 측정하기 위해 각각의 상기 실시예 4-1 내지 4-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔을 24-웰 플레이트 내 1mL DPBS에서 배양하였다. 정해진 시간(Day)에 방출된 100 μ L의 용액을 수거하였고, 동일한 부피의 DPBS를 보충하였다. 상기 방출된 BSA의 함량은 280nm에서 측정된 UV 분광기를 이

용하여 상기 용액의 흡수량을 측정함으로써 분석되었다.

[0131] 도 5(c)를 참고하면, KER-FBG의 함량이 낮아질수록 누적 BSA 방출률이 높아지는 경향성을 나타냄을 확인할 수 있다. 이는 KER-FBG의 가교밀도가 증가함에 따라, KER-FBG의 가수분해에 대한 저항성이 증가하기 때문인 것으로 유추할 수 있다.

[0132] **[실험예 7: KER-FBG의 생체적합성]**

[0133] 세포 독성 테스트

[0134] 상기 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 세포 독성을 평가하기 위해 세포와 간접적으로 접촉하는 트랜스웰(Transwell) 방법을 사용하였다. 구체적으로 각각의 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔을 트랜스웰(SPL, USA)의 인서트 상에 놓았다. CLS(Cell Lines Service)에서 입수한 인간 상피세포주(Human keratinocyte; HaCaT)를 5×10^3 cells/mL의 밀도를 갖는 24웰 플레이트에서 씨딩(Seeding)한 후, 37°C에서 5% CO₂ 분위기 내 10% 소태아혈청(Fetal bovine serum) 및 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에서 배양하였다. 24시간 및 48시간 배양 종료 시, 살아있는 세포를 Calcein-AM 및 Ethidium homodimer-1(Invitrogen, USA)을 포함하는 DPBS 기반 혼합액으로 30분간 처리한 후, 염색된 세포를 형광현미경(EVOS M7000, Invitrogen, USA)을 이용하여 관찰하였다.

[0135] 도 6(a)는 배양시간을 24시간 또는 48시간으로 조절할 때 대조군, 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔 각각의 염색된 세포의 형광현미경 사진이다. 도 6(c)는 도 6(a)의 실험결과를 막대그래프로 나타낸 것이다.

[0136] 도 6(a) 및 6(c)를 참고하면, 대부분의 살아있는 세포들이 밝은 초록색으로 나타났고, 죽은 세포로 명확하게 식별할 수 있는 세포는 관찰되지 않았다. 배양시간이 24시간일 때 모든 세포그룹에서 세포생존율이 98%를 초과하였고, 48시간일 때 세포생존율이 거의 100%로 높아졌음을 확인할 수 있다.

[0137] 세포 증식 테스트

[0138] 세포 증식을 확인하기 위해 배양액 배지를 48시간마다 교체하였다. 1, 3, 5 일 상기 조건에서 배양한 후, 500 μL의 세포계수 키트 assay(CCK-8, 도진도 연구소의 쿠마모토, 일본)를 각 웰에 첨가한 후 플레이트를 90분 동안 배양하고 각 배양 샘플의 흡광도를 450nm에서 측정하였다. 상기 흡광도는 분광광도계로 측정되었다. 상기 5일 동안 배양된 모든 샘플을 DPBS를 사용하여 세척하였고 4%(v/v)의 파라포르말데하이드를 사용하여 고정한 다음, DPBS를 사용하여 3회 세척하였다. 로다민 팔로이딘(R415, Invitrogen, 미국)을 DPBS에 1:200의 부피비(v/v)로 희석하고 30분 동안 HaCaT 세포를 염색하는 데 사용하였다. 세포 핵을 DPBS에 1:1000의 중량비로 희석된 2-(4-아미디오노페닐)-6-인돌카바미딘다이드로클로라이드(시그마-알드리치, 미국)를 사용하여 염색하였다. 염색된 샘플은 형광 현미경(EVOS M7000, Invitrogen, 미국)을 사용하여 관찰되었다.

[0139] 도 6(b)는 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 세포증식 효과를 확인하기 위해, 5일 경과하였을 때 F-actin 염색된 세포의 이미지이다.

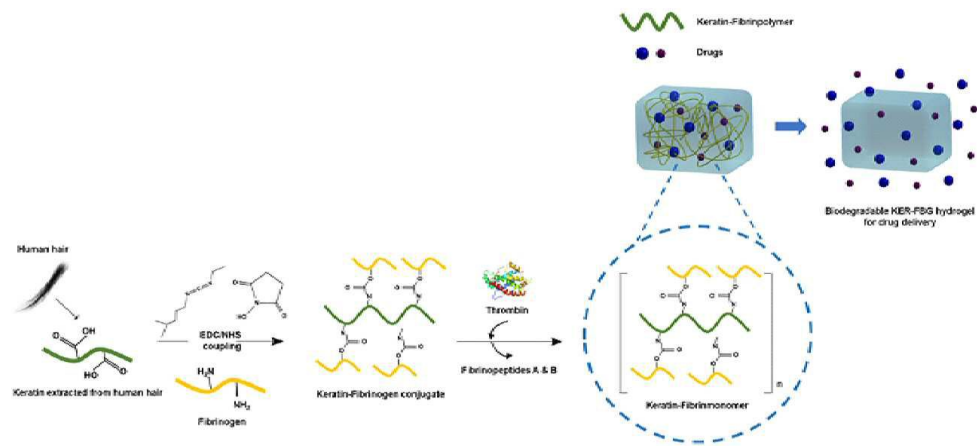
[0140] 도 6(d)는 대조군과 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔의 세포증식률을 막대그래프로 나타낸 것이다. 여기서 대조군은 1일자 그룹으로 설정되었다.

[0141] 도 6(b) 및 6(d)를 참고하면, 실시예 2-1 내지 2-3에 따른 KER-FBG 하이드로겔 모두 향상된 세포 증식률을 나타냈고, 세포 모폴로지도 상기 세포 증식률과 상응하는 경향성을 나타냈다. 또한, 건조된 KER-FBG의 함량이 3%(w/v)를 만족하는 실시예 2-2에 따른 KER-FBG 하이드로겔이 가장 높은 세포 증식률을 나타냈음을 확인할 수 있다.

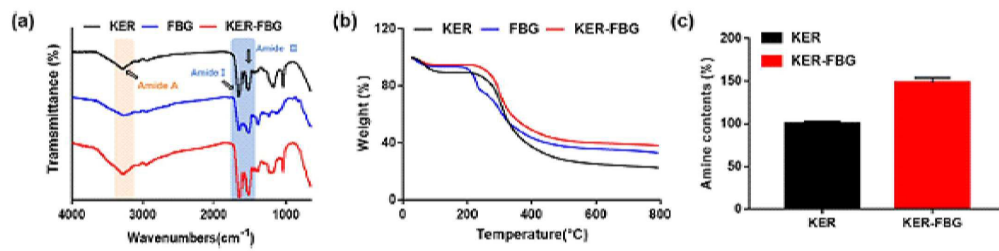
[0142] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예들에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리 범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리 범위에 속하는 것이다.

도면

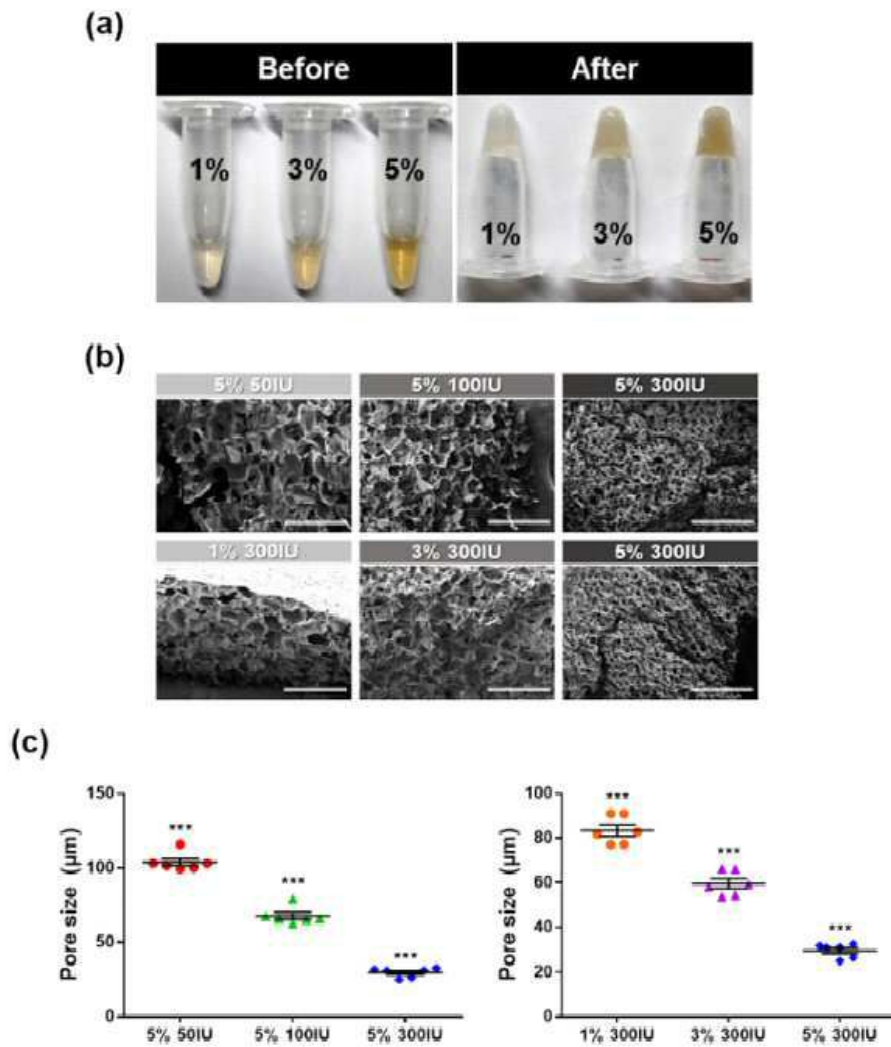
도면1



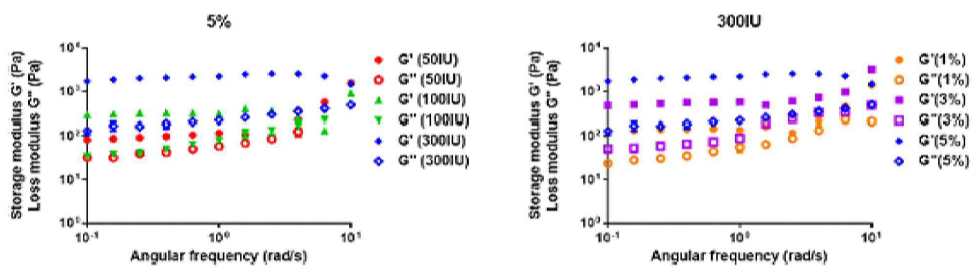
도면2



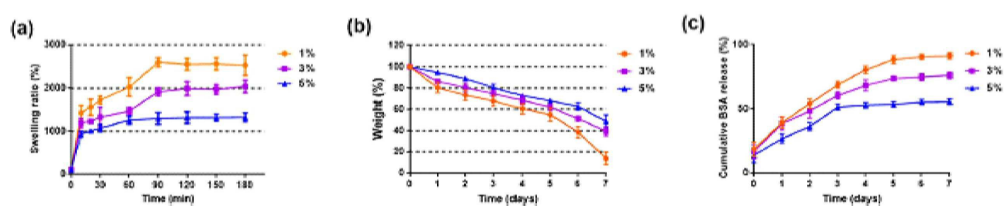
도면3



도면4



도면5



도면6

