(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2018 년 1 월 18 일 (18.01.2018)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2018/012935 A1

(51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 35/36* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/007597

(22) 국제출원일: 2017 년 7 월 14 일 (14.07.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2016-0089385 2016 년 7 월 14 일 (14.07.2016) KR

(71) 출원인: **경희대학교 산학협력단 (UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY)** [KR/KR]; 17104 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, Gyeonggi-do (KR).

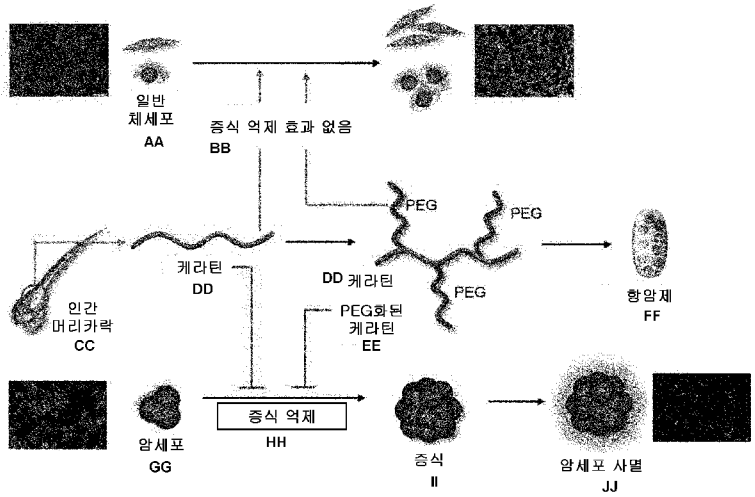
(72) 발명자: **황유식 (HWANG, Yu-Shik)**; 02704 서울시 성북구 보국문로37길 14-5, 102동 901호, Seoul (KR). **권일근 (KWON, Il Keun)**; 01721 서울시 노원구 중계로 184, 102동 401호, Seoul (KR). **김정목 (KIM, Joungmok)**; 05711 서울시 송파구 송파대로32길 8, 6동 1402호, Seoul (KR). **이재형 (LEE, Jae-Hyung)**; 04773 서울시 성동구 왕십리로 36, 104동 304호, Seoul (KR). **반세영 (VAN, Se Young)**; 34049 대전시 유성구 엑스포로 448, 402동 1201호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: **안소영 (AHN, So Young)**; 06632 서울시 서초구 서초대로 344, 4층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA,

(54) **Title:** ANTICANCER COMPOSITION COMPRISING KERATIN

(54) **발명의 명칭:** 케라틴을 포함하는 항암용 조성물



AA ... Normal somatic cell
BB ... No proliferation inhibitory effect
CC ... Human hair
DD ... Keratin
EE ... PEGylated keratin
FF ... Anticancer agent
GG ... Cancer cell
HH ... Proliferation inhibition
II ... Proliferation
JJ ... Cancer cell death

(57) **Abstract:** The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating cancer, comprising keratin. The composition increases the expression of various genes associated with apoptosis, inhibits the expression of genes associated with cell proliferation, and inhibits the proliferation of cancer cells, and thus may be useful as an agent for preventing or treating cancer.

(57) **요약서:** 본 발명은 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 것으로, 상기 조성물은 세포 사멸과 연관된 다양한 유전자의 발현을 증가시키고, 세포 증식과 연관된 유전자들의 발현을 억제하며, 암 세포의 증식을 억제하므로, 암의 예방 또는 치료제로서 유용하게 사용될 수 있다.

WO 2018/012935 A1

[다음 쪽 계속]

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 케라틴을 포함하는 항암용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[2] 세포는 수명이 다하거나 손상되면 스스로 사멸하여 전반적인 수의 균형을 유지한다. 그러나 여러 가지 원인에 의해 세포의 조절 기능에 문제가 생기면, 정상적으로는 사멸해야 할 비정상 세포들이 과다 증식하게 되며, 경우에 따라 주위 조직 및 장기에 침입하여 종괴를 형성하고 기존의 구조를 파괴하거나 변형시키는데, 이러한 상태를 암이라 한다.

[3] 암의 치료방법으로는 외과적 수술, 방사선 요법, 생물요법 및 화학요법 등이 있다. 이 중에서 항암제를 이용한 화학요법은 현재 암 치료를 위해 많이 사용되고 있으며, 잘 확립된 치료방법 중 하나이다. 많은 항암제들은 탁월한 암세포 사멸 효과 및 증식 억제 효과를 가지고 있으나, 통상적인 항암제는 암세포에만 특이적으로 작용하는 것이 아니라 정상세포에도 동시에 작용하며, 그로 인하여 혈구 감소증, 모낭세포 파괴로 인한 탈모증상, 난소와 고환에 대한 부작용으로 인한 월경불순 및 불임, 소화기의 점막 세포 파괴로 인한 구내염, 오심구토 및 음식 연하장애와 소화 장애, 설사증상, 세뇨관 괴사에 의한 신장독성, 신경계 장애로 인해 발생하는 말초 신경염과 쇠약감, 혈관통증 및 발진 등의 혈관장애, 피부 및 손발톱 변색 등의 다양한 부작용이 나타난다. 따라서 항암제에 의한 부작용을 최소화하면서 치료 효과를 상승시키기 위한 연구가 절실하다.

[4] 한편, 케라틴은 모발, 손톱, 발톱, 깃털 등을 구성하는 구조 단백질이다. 일반적으로 케라틴은 히스티딘 : 리신 : 아르기닌이 약 1 : 4 : 12의 몰비로 이루어져 있으며, 시스틴의 함량이 많아 황의 함량이 3 내지 5 %를 차지한다. 케라틴은 생체에 포함되어 있는 물질이기 때문에, 생체적합성이 매우 높으나, 용해가 낮은 편이어서 활용이 제한적인 실정이다.

[5] 다른 한편, 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, 이하 PEG)은 $HO-(-CH_2CH_2O-)_n-H$의 구조를 갖는 고분자 화합물로, 친수성이 강하기 때문에 다양한 단백질에 결합시켜 그 용해도를 증가시킬 수 있다. 단백질에 결합 가능한 PEG의 분자량 범위는 대략 1,000-100,000으로, PEG 분자량이 1,000 이상일 경우에는 독성이 상당히 낮은 편으로 알려져 있다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [비특허문헌]

[8] Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers, V. Karantza *et al.*, Oncogene, 2001 January 13, 30(2), 127-138

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 목적은 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 목적은 PEG화된 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명자들은 케라틴 단백질이 암세포의 증식억제에 효과가 있으면서도, 일반적인 정상세포들에 대해서는 증식억제 효과가 미약한 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[13] 따라서 본 발명은 일 양태로서, 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[14] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 케라틴은 상업적으로 이용가능한 임의의 케라틴일 수 있으나, 바람직하게는 사람 머리카락에서 추출한 케라틴일 수 있다.

[15] 본 발명의 약학적 조성물에서, 케라틴은 순수한 케라틴뿐만 아니라 다른 화합물과 결합되거나 또는 복합체를 형성한 케라틴을 모두 포함하며, 구체적으로 PEG화된 케라틴, 케라틴-히알루론산 복합체 등을 모두 포함하는 개념이다.

[16] 구체적으로, 본 발명의 케라틴은, 사람 머리카락을 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 섞은 혼합액에 넣어 지질을 제거하고, 2 % 과산화아세트산 용액에서 12시간 교반한 후, 5 % 2-머캅토에탄올, 5 M 우레아, 2.6 M 티오우레아 및 25 mM Tris-HCl(pH 8.5)에 넣고, 50 ℃에서 72시간동안 반응시켜 수득할 수 있다.

[17] 본 발명에서, 암은 포유동물에서 발견되는 모든 유형의 암, 신생물 또는 악성 종양을 지칭하며, 백혈병, 암종 및 육종을 포함한다.

[18] 본 발명의 약학적 조성물에서, 상기 암은 예를 들어, 간암, 폐암, 비소세포성 폐암, 골암, 유방암, 선암종, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 대장암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 식도암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 뇌종양, 척수종양 또는 혈액암 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 간암, 폐암, 골암 또는 유방암일 수 있다.

[19] 본 발명의 약학적 조성물에서, 케라틴은 총 조성물의 중량에 대하여 0.001 %(w/v) 내지 10 %(w/v), 바람직하게는 0.01 %(w/v) 내지 5 %(w/v), 더욱 바람직하게는 0.05 %(w/v) 내지 2 %(w/v)의 함량으로 포함될 수 있다.

[20] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 폐암 세포, 골육종 세포 및 선암종 세포에 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물을 투여한 후 Live&Dead assay를

수행하였다. 또한, 본 발명의 구체적인 다른 실시예에서, 상기 암 세포의 세포 증식 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물이 상기 암 세포의 증식을 현저히 억제함을 확인하였다.

[21] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 간암 세포에 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물을 투여한 후 세포 증식 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물이 상기 암 세포의 증식을 억제함을 확인하였다.

[22] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 간암 세포에 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물을 투여한 후 ID1(Inhibitor of DNA binding 1) 및 HipK2(Homeodomain-interacting protein kinase 2)의 발현을 RT-PCR로 측정하였다. 상기 ID1은 암 증식과 혈관생성에 관여하는 단백질이며, 상기 HipK2는 세포사멸에 관여하는 단백질인 p53의 음성 조절자이다. 그 결과, 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물이 ID1과 HipK2의 발현을 현저히 저하시킴을 확인하였다.

[23] 또한, 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 간암 세포에 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물을 투여한 후 RNA 염기서열 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 케라틴을 포함하는 조성물이 세포 사멸과 연관된 유전자들의 발현을 증가시키고, 세포 증식과 연관된 유전자들의 발현을 억제시킴을 확인하였다.

[24] 따라서, 본 발명의 케라틴을 포함하는 약학적 조성물은 다양한 세포 사멸과 연관된 유전자의 발현을 증가시키고, 세포 증식과 연관된 유전자들의 발현을 억제하며, 암 세포의 증식을 억제여, 암의 예방 또는 치료에 매우 효과적일 수 있다.

[25] 또한, 케라틴은 생체적합성이 높은 물질이므로 정상세포에 대해서는 증식억제 효과가 미약하다. 즉, 본 발명의 케라틴을 포함하는 약학적 조성물은 암세포의 증식억제에 효과가 있으면서도, 정상세포에 대해서는 증식억제 효과가 미약하여, 기존 항암제에 의한 부작용을 경감시키면서도 암의 치료 효과를 상승시킬 수 있다.

[26] 본 발명자들은 케라틴을 폴리에틸렌글리콜(Polyethylene glycol, PEG)화하여 용해성을 증가시켰으며, 상기 PEG화된 케라틴이 암세포 증식 억제에 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[27] 따라서 본 발명은 일 양태로서, PEG화된 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[28] 상기 케라틴 및 암은 앞서 기술한 바와 같다.

[29] 본 발명에서, PEG화된 케라틴이란 케라틴의 아미노산 잔기에 PEG가 결합되어 있는 물질을 의미한다. 본 발명의 PEG화된 케라틴에 있어서, PEG는 케라틴의 임의의 아미노산 잔기에 제한 없이 결합될 수 있으나, 바람직하게는 아민기에 결합한다.

[30] 본 발명에서, PEG는 예를 들어, O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜, 2염기산 폴리에틸렌글리콜, α,ω-비스(2-카르복시에틸-폴리에틸렌글리콜,

O,O`-비스(2-브로모에틸)폴리에틸렌글리콜,
O,O`-비스(2-클로로에틸)폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 디메실산,
메톡시폴리에틸렌글리콜 아세트산,
O-[2-(3-숙시닐아미노)에틸]-O`-메틸-폴리에틸렌글리콜,
O-(2-브로모에틸)-O`-메틸폴리에틸렌글리콜,
O-(2-클로로에틸)-O`-메틸폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 메실산(mesylate), 알데히드 기능화 폴리에틸렌글리콜, 글리시딜이써 기능화 폴리에틸렌글리콜, 나이트로페틸 카보네이트 기능화 폴리에틸렌글리콜, 메실(Mesyl) 기능화 폴리에틸렌글리콜 또는 토실(Tosyl) 기능화 폴리에틸렌글리콜일 수 있으며, 바람직하게는 O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜일 수 있다. 상기 PEG의 분자량은 1000 내지 20000일 수 있으며, 바람직하게는 2000 내지 10000 일 수 있다.

[31] 본 발명의 바람직한 일 양태에서, PEG화된 케라틴은

[32] i) O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계; 및

[33] ii) 단계i)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된다.

[34] 상기 제i) 단계는 O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜의 숙신산 작용기를 활성화시키는 단계이며, 상기 제ii) 단계는 케라틴의 아미노산의 아민 잔기가 숙시닐기와 반응하여 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계이다.

[35] 본 발명의 구체적일 일 실시예에서, 폐암 세포, 골육종 세포 및 간암 세포에 본 발명의 PEG화된 케라틴을 포함하는 조성물을 투여한 후 Live&Dead assay를 수행하였다. 또한, 본 발명의 구체적인 다른 실시예에서, 상기 암 세포의 세포 증식 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 PEG화된 케라틴을 포함하는 조성물이 상기 암 세포의 증식을 현저히 억제함을 확인하였다.

[36] 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴을 포함하는 약학적 조성물은 암 세포의 증식을 억제하여 암의 예방 또는 치료에 매우 효과적일 수 있다.

[37] 본 발명자들은 케라틴을 히알루론산(Hyalonunic acid)와 결합시켜 복합체를 형성하여 용해성을 증가시켰으며, 이러한 케라틴-히알루론산 복합체가 암세포 증식 억제에 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[38] 따라서 본 발명은 일 양태로서, 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[39] 상기 케라틴 및 암은 앞서 기술한 바와 같다.

[40] 본 발명에서, 케라틴-히알루론산 복합체란 케라틴의 아미노산 잔기에 히알루론산이 결합되어 있는 물질을 의미한다. 본 발명의 케라틴-히알루론산 복합체에 있어서, 히알루론산은 케라틴의 임의의 아미노산 잔기에 제한 없이 결합될 수 있으나, 바람직하게는 아민기에 결합한다.

[41] 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 케라틴-히알루론산 복합체는 히알루론산의

카르복실기(Carboxyl group)와 케라틴의 아민기(amine group)를 아미드화 반응으로 결합시켜 제조된다.

[42] 본 발명의 구체적일 일 실시예에서, 선암종 세포에 본 발명의 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 조성물을 투여한 후 세포 증식 분석을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 조성물이 선암종 세포의 증식을 현저히 억제함을 확인하였다.

[43] 따라서 본 발명의 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 약학적 조성물은 암 세포의 증식을 억제하여 암의 예방 또는 치료에 매우 효과적일 수 있다.

[44] 본 발명의 약학적 조성물은 케라틴, PEG화된 케라틴 또는 케라틴-히알루론산 복합체 외에 추가적인 유효성분을 1 종 이상 더 포함할 수 있다. 상기 추가적인 유효성분으로는 대부분의 항암제가 포함될 수 있으며, 예를 들어, 이리노테칸 및 트로포테칸 등이 포함될 수 있다. 상기 추가적인 유효성분은 케라틴과 함께 시너지 효과 또는 상가적 효과를 나타낼 수 있으며, 케라틴에 의해 부작용이 억제될 수 있다.

[45] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로 사용될 수 있으며, 호르몬 치료, 약물 치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수도 있다.

[46] 본 발명의 약학적 조성물은 투여를 위해서 케라틴, PEG화된 케라틴 또는 케라틴-히알루론산 복합체 외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 더 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 따라서 본 발명의 약학적 조성물은 패치제, 액제, 환약, 캡슐, 과립, 정제, 좌제 등이 될 수 있다. 이들 제제는 각 질환에 따라 및/또는 성분에 따라 이 분야에서 제제화에 사용되는 통상의 방법 또는 Remington's Pharmaceutical Science (최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법으로 제제화될 수 있다.

[47] 본 발명은 또한 일 양태로서, 케라틴을 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[48] 상기 암을 예방 또는 치료하는 방법에서, 케라틴은 PEG화된 케라틴 일 수 있다.

[49] 상기 암을 예방 또는 치료하는 방법에서, 케라틴은 케라틴-히알루론산 복합체일 수 있다.

[50] 상기 케라틴, 약학적 조성물, 암은 앞서 상세히 기술한 바와 같다.

[51] 본 발명에서 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 목적조직에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예를 들어, 경구투여, 복강 내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여, 강내 투여, 복강내 투여, 경막내 투여될 수 있으나, 이에 한정되지는

않는다.

[52] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[53] 본 발명은 또한 일 양태로서, 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 케라틴을 포함하는 약학적 조성물의 용도를 제공한다.

[54] 상기 용도에서, 케라틴은 PEG화된 케라틴 일 수 있다.

[55] 상기 용도에서, 케라틴은 케라틴-히알루론산 복합체일 수 있다.

[56] 상기 케라틴, 약학적 조성물, 암은 앞서 상세히 기술한 바와 같다.

발명의 효과

[57] 본 발명의 케라틴을 포함하는 약학적 조성물은, 암세포의 증식을 억제하고, 세포 증식과 연관된 유전자들의 발현을 억제하며, 암세포의 증식을 억제하면서도, 정상세포에는 영향을 미치지 않는다.

[58] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴 또는 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 약학적 조성물은, 케라틴의 용해도를 증가시켜, 암세포의 증식을 보다 효과적으로 억제할 수 있다.

[59] 따라서, 본 발명의 약학적 조성물은 암의 예방 또는 치료에 매우 효과적으로 작용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[60] 도 1은 PEG화된 케라틴을 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

[61] 도 2는 PEG화된 케라틴을 NMR 분석한 데이터이다.

[62] 도 3은 폐암 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 억제능을 Live&Dead assay와 세포 증식 분석으로 확인한 것을 나타낸 것이다.

[63] 도 4는 골육종 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[64] 도 5는 샘/유방 선암종 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[65] 도 6은 인간 유방 선암종 세포 및 쥐 선암종 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[66] 도 7은 간암 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 정도를 도립 현미경으로 관찰한 것이다.

[67] 도 8은 간암 세포에 케라틴을 처리한 경우의 ID1 및 HipK2 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

[68] 도 9는 간암 세포에 케라틴을 처리한 경우의 RNA 서열정보 분석 결과를 나타낸 것이다.

[69] 도 10은 간암 세포에 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 억제능을 Live&Dead assay로 확인한 것을 나타낸 것이다.

[70] 도 11은 간암 세포, 폐암 세포 및 샘/유방 선암종 세포에 PEG화된 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 억제능을 Live&Dead assay로 확인한 것을 나타낸 것이다.

[71] 도 12는 간암 세포, 폐암 세포 및 샘/유방 선암종 세포에 PEG화된 케라틴을 처리한 경우의 세포 증식 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

[72] 도 13은 케라틴이 나타내는 항암 활성의 작용 메카니즘을 도식화한 것이다.

[73] 도 14는 인간 유방 선암종 세포 및 쥐 선암종 세포에 케라틴-히알루론산 복합체를 처리한 경우의 세포 증식 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[74]

발명의 실시를 위한 형태

[75] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 제조예 및 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 이에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[76] 제조예

[77] <제조예 1> 케라틴의 수득

[78] 사람 머리카락을 약한 세제를 이용해서 깨끗하게 세척한 후 증류수로 여러 번 씻어주었다. 지질제거를 위해 머리카락을 비이커에 담고, 클로로포름과 메탄올을 2:1의 비율로 섞은 혼합액에 머리카락이 잠길 때까지 넣어주었다. 24시간 후 지질 제거에 사용한 용액이 머리카락에 남아있지 않을 때까지 증류수로 여러 번 세척한 후 머리카락을 기건(air-dry)시켰다. 2 % 과산화아세트산(Sigma aldrich) 800 mL에 기건시킨 머리카락 20 g을 넣고 37 ℃에서 12시간동안 300 rpm의 속도로 교반하였다. 12시간 후, 머리카락을 체에 거르고 증류수로 세척하여 남아있는 산화물을 제거하였다. 머리카락을 400 mL 신다이(Shindai) 용액(5 % 2-머캅토에탄올, 5 M 우레아, 2.6 M 티오우레아(이상 Sigma aldrich) 및 25mM Tris-HCl(pH 8.5))에 넣고, 50 ℃, 400 rpm의 조건에서 72시간동안 반응시켰다. 그 후, 머리카락 용액을 50 mL 튜브에 넣고 3500 rpm으로 20분 동안 원심분리하였다. 상등액을 모아 12-14 kDa 컷오프 Spectra/Por®4 투석막(Spectrum)을 이용해서 투석하였다. 투석이 끝난 케라틴 액체샘플을 동결 건조하여 케라틴 파우더를 제조하였다.

[79] **<제조예 2> PEG화된 케라틴의 제조**

[80] **제조예 2-1: PEG화된 케라틴의 합성**

[81] 도 1에 제시된 반응과정으로 PEG화된 케라틴을 합성하였다.

[82] 먼저, 케라틴 파우더 0.5 g을 미세부품 단위계수 측정 전자저울(0.001 g ~ 620 g, AJ-620E)로 달아 500 mL 파이렉스 비이커(ISOLAB, YLS, 독일)에 넣었다. 비이커에 삼차수 100 mL를 넣고, 40×8 mm 마그네틱 교반봉([B00C3ME4ZA], 1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를

이용하여 300 rpm의 속도로 24시간 동안 교반하였다.

[83] 메톡시폴리에틸렌글리콜을 변형시킨 O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜 5000(mPEG, 17929-5G-F, Lot#R063737/2V Sigma aldrich) 300 mg을 삼차수 20 mL에 1시간 동안 녹였다. mPEG 용액에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM) n-수화물(327-53752, wako chemical) 16 mg을 넣고 1시간동안 교반하였다. 케라틴 용액과 mPEG 및 DMTMM의 결합 용액을 500 mL 비커에 넣어, 40×8mm 마그네틱 교반봉(1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 500 rpm의 속도로 실온에서 3일 동안 교반하여 PEG와 케라틴을 반응시켰다.

[84] **제조예** 2-2: PEG화된 케라틴의 정제

[85] 제조예 2-1의 반응이 끝난 후, Spectra/Por 투과막 튜브(직경 16 mm, 평폭 25 mm, MW10000, Spectrum)에 PEG화된 케라틴 용액을 한 튜브당 100 mL씩 넣고, Spectra/Por RC 투석 튜빙 클로져(최대 폭 55 mm, Orange, Spectrum)를 양쪽 튜브에 패킹하였다. 5 L 플라스틱 비이커(지름 197 mm, 높이 265 mm)에 삼차수 4 L를 채워 PEG화된 케라틴 용액이 담긴 튜브를 넣고 마그네틱 바를 넣고 교반하면서 투석하였다. 이때, 12시간마다 새로운 삼차수로 갈아주었으며, 실온에서 3일동안 삼차수로 총 6번을 갈아주면서 투석하였다. 최종 PEG화된 케라틴 용액을 50 mL 원심관(17×120 mm, BD Falcon)에 40 mL 씩 나눠 담은 후, 초저온냉장고(Nihon freezer, Upright type, Single cooling type, 542ℓ)에서 -70 ℃로 24시간 동안 완전히 동결시켰다. 원심관 뚜껑을 열고, 동결건조기(ALPHA 2-4 LSC PLUS, Laboratory freeze dryers, Christ)에 넣고 -85 ℃의 진공상태에서 완전히 파우더 형태가 되도록 3일동안 건조시켰다.

[86] **제조예 2-3: PEG화된 케라틴의 확인**

[87] 제조예 2-2에서 얻은 PEG화된 케라틴을 NMR을 통해 분석하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 PEG화된 케라틴에서 각기 케라틴 및 PEG에서 특이적으로 나타나는 피크가 동시에 존재하고 있음을 확인하였다.

[88] **<제조예 3> 케라틴-히알루론산 복합체 (keratin-Hyaluronic acid Conjugate) 하이드로젤의 제조**

[89] **제조예 3-1: 케라틴-히알루론산 복합체의 합성**

[90] 500 mL 증류수에 히알루론산나트륨염(Hyaluronic acid sodium salt, HA)(분자량: 50000 Da & 2500000 Da (LifeCore biomedical, chaska, MN, 미국)) 800mg을 녹였다. 40 X 8 mm 마그네틱 교반봉([B00C3ME4ZA], 1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 300 rpm의 속도로 완전히 녹게 24시간 동안 교반하였다.

[91] 10 mL 증류수에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일)-4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM) n-수화물(327-53752, wako chemical) 16mg을 넣고 실온에서 2시간 교반하여 녹인 후 상기 히알루론산나트륨염 용액에 넣고 히알루론산나트륨염의 카르복실기(Carboxyl group)와 케라틴의 아민기(amine

group)가 아미드화 반응을 할 수 있게 반응시켰다. 히알루론산나트륨염과 DMTMM이 반응된 용액을 Spectra/Por 투과막 튜브(직경 16 mm, 평폭 25 mm, MW10000, Spectrum)에 넣고 반응 후 DMTMM을 석출하기 위해 4L 증류수에 담궜다. 40 X 8 mm 마그네틱 교반봉([B00C3ME4ZA], 1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 500rpm의 속도로 실온에서 24시간 동안 교반기를 이용해서 제거하였다. 케라틴 파우더 (분자량:4~60000 Da) 1200mg 무게를 측정하여 300mL 증류수에 녹인 후 히알루론산나트륨염과 DMTMM이 반응된 용액의 카르복실기와 케라틴의 아민기가 아미드화 반응을 하여 최종 몰농도가 1:1 또는 3:1가 되도록 합성시켰다. 40 X 8 mm 마그네틱 교반봉([B00C3ME4ZA], 1572500 IKAFLON 40, IKA)과 MS-H-S10 10-Channel 마그네틱 교반기를 이용하여 500 rpm의 속도로 실온에서 3일 동안 교반기를 이용해서 합성하였다.

[92] **제조예 3-2: 케라틴-히알루론산 복합체의 정제**

[93] 제조예 3-1의 반응이 끝난 후, Spectra/Por 투과막 튜브(직경 16 mm, 평폭 25 mm, MW10000, Spectrum)에 합성된 히알루론산-케라틴 용액을 한 튜브 당 100 mL씩 넣고, Spectra/Por RC 투석 튜빙 클로져(최대 폭 55 mm, Orange, Spectrum)를 양쪽 튜브에 패킹하였다. 5 L의 플라스틱 비이커 (5000cc, 지름 197mm, 높이 265mm)에 4L 증류수를 채워 합성된 히알루론산-케라틴 용액이 담긴 튜브를 넣고 마그네틱바를 교반하면서 투석하였다. 히알루론산-케라틴 용액 중 반응이 된 케라틴과 DMTMM을 완전히 제거하였다. 이때, 3시간마다 새로운 4 L의 증류수로 갈아주었으며, 실온에서 5일간 증류수를 갈아주면서 투석하였다. 최종적으로 완성된 히알루론산-케라틴 용액을 50 mL 원심관(17×120 mm, BD Falcon)에 35mL씩 나눠 담은 후, -70 ℃의 초저온냉장고 (Nihon freezer, Upright type, Single cooling type, 542ℓ)에 넣어 24시간 동안 완전히 동결시켰다. 원심관 뚜껑을 열고, 동결건조기(ALPHA 2-4 LSC PLUS, Laboratory freeze dryers, Christ)에 넣고 진공상태에서 완전히 파우더 형태가 되도록 3일 이상 동안 건조시켜, 최종 히알루론산-케라틴 젤 파우더를 얻었다.

[94] <u>실시예</u>

[95] **<실시예 1> 폐암, 골육종 및 선암종 세포에서의 케라틴의 암세포 증식 억제능 확인**

[96] 인간 폐암 세포(A549 ATCC® CCL-185™), 골육종 세포(U205), 인간 포유류 샘/유방 선암종 세포(MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™), 인간 유방 선암종 세포(MCF-7 ATCC®) 및 쥐 선암종 세포 (4T1) 각각을, 24 웰 플레이트에 $5x10^3$ 또는 $1x10^4$개씩 접종하고, 24시간 후에 high glucose DMEM 일반배지 또는 1%(w/v)의 케라틴이 포함된 high glucose DMEM 일반 배지로 바꾸어 주었다. 배양배지는 이틀에 한번씩 새로운 배지로 교환해 주었으며, 일정시간 배양한 후 인간 폐암 세포(A549 ATCC® CCL-185™), 골육종 세포(U205), 인간 포유류 샘/유방 선암종 세포(MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™)에 대해서 Live&Dead

assay를 수행하였으며, 인간 폐암 세포(A549 ATCC® CCL-185™), 골육종 세포(U205), 인간 포유류 샘/유방 선암종 세포(MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™), 인간 유방 선암종 세포(MCF-7 ATCC®) 및 쥐 선암종 세포 (4T1)에 대해서 세포 증식 분석을 수행하였다.

[97] **실시예 1-1: Live&Dead assay**

[98] 폐암 세포에 대하여 Live/Dead viability/cytotoxicity 키트(invitrogen)를 사용하여, Live&Dead assay를 수행하였다. DPBS 1ml에 0.5μl의 칼세인(Calcein)과 2.0μl의 에티듐 호모다이머(Ethidium Homodimer)를 넣고 섞어주었다. 배지를 제거한 후 DPBS로 세척한 각각의 웰에 위 혼합액을 200μl씩 넣어주었다. 알루미늄 호일로 빛을 차단하고, 37 ℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후, DPBS로 세척해주고, 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다.

[99] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 접종한 세포 밀도에 크게 상관없이 암세포의 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[100] **실시예 1-2: 세포 증식 분석**

[101] DPBS로 웰을 세척한 후, 각각의 웰에 high glucose DMEM 일반배지로 10배 희석된 Cell Counting Kit-8 용액(Dojindo laboratory)을 넣고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 37 ℃에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다(인큐베이션 시간은 4시간을 넘지 않는다). 인큐베이션 후, 각각의 웰에서 100μl씩을 96웰 플레이트에 옮기고, 96웰 포맷 플레이트 리더(format plate reader, ELX 800 universal microplate Reader, Bio Tek, Inc.) 기기를 이용하여 450nm 파장(O.D 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[102] 케라틴 처리 1일, 4일 및 7일 후에 인간 폐암 세포(A549 ATCC® CCL-185™), 골육종 세포(U205) 및 인간 포유류 샘/유방 선암종 세포(MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™)의 증식능을 평가한 결과, 도 3 내지 5에 나타난 바와 같이, 케라틴을 처리하지 않은 그룹에 비해 케라틴을 처리한 그룹에서 세포의 증식이 현저히 억제됨을 확인하였다. 또한 케라틴 처리 1일, 2일 및 3일 후에 인간 유방 선암종 세포(MCF-7 ATCC®) 및 쥐 선암종 세포 (4T1)의 증식능을 평가한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 케라틴을 처리하지 않은 그룹에 비해 0.5% 이상의 농도인 케라틴을 처리한 그룹에서 세포의 증식이 현저히 억제됨을 확인하였다.

[103] **<실시예 2> 간암 세포에서 케라틴의 암세포 증식 억제능 확인**

[104] 6웰 플레이트 또는 125㎠ 배양 플라스크에 간암 세포(HepG2 ATCC-HB-8065) $5x10^4$개를 접종하고, 24시간 후 high glucose DMEM 일반 배지 또는 1%(w/v)의 케라틴이 포함된 high glucose DMEM 일반배지로 바꾸어 주었다. 48시간 동안 배양한 후, 세포의 증식 정도를 도립 현미경(inverted microscope)으로 관찰하고, RT-PCR과 RNA 염기서열 분석을 수행하였다.

[105] **실시예 2-1: 도립 현미경 관찰**

[106] 현미경 관찰 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 간암 세포(HepG2 ATCC-HB-8065)에 케라틴 처리시, 48시간 후에 세포의 증식이 억제됨을

확인하였다.

[107] 실시예 2-2: RT-PCR

[108] RT-PCR분석을 위해 6웰 플레이트에서 배양한 세포들의 배양배지를 제거하고 DPBS로 세척해 주었다. RNA의 추출에 Hybrid-R 키트(Gene All)를 사용하였고, 나노드롭(MICROP UV-Vis Spectrophotometer M600)을 사용하여 정량 하였다. 1μg의 RNA를 AccuPower Cycle Script RT Premix (Bioneer, 대전, 한국)에 첨가하고, 열 순환기(T106, Bio-Rad)를 이용해 cDNA를 만들었다. 사용한 프라이머의 서열은 하기 [표 1]과 같다.

[109] [표 1]

[110]

	Sense	Antisense
ID1	5'- AGCAGGTAAACGTGCTGCTC -3'	5'- GAATCTCCACCTTGCTCACC -3'
HipK2	5'- GCTACCTGCTGGAGAACTGG -3'	5'- ACGTGCTTGGTCTTCGAGAT -3'
β-Actin	5'- GTCAGGCAGCTCGTAGCTCT -3'	5'- TCGTGCGTGACATTAAGGAG -3'

[111] 각각의 반응에 SYBR Green PCR Mix 10μL, 0.5pm의 프라이머(sense와 antisense)와 50nm의 주형(template)을 넣어주었다. RT-PCR은 RG6000 5plex HRM (Corbett Research)기기를 사용하였으며, 95 ℃에서 15초, 어닐링(annealing) 온도 57℃에서 45초로, 40 사이클을 설정하였다. 역치주기(Threshold cycle, Ct) 값을 측정하기 위해, 상대정량(comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$))법을 사용하였다.

[112] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 암증식과 혈관생성에 관여하는 ID1과, 세포사멸에 관여하는 p53의 음성 조절자인 HipK2의 유전자 발현이 현저히 저하됨을 확인하였다.

[113] **실시예 2-3: RNA 염기서열 분석**

[114] RNA 염기서열 분석을 위해 125㎠ 배양 플라스크의 배양배지를 제거하고 DPBS로 세척해 주었다. RNA의 추출에 Hybrid-R 키트(Gene All)를 사용하였고, 나노드롭(MICROP UV-Vis Spectrophotometer M600)을 사용하여 정량 하였다. 추출된 10μg의 RNA를 무-RNase 마이크로원심분리기(RNase free microcentrifuge)에 옮기고, 얼음이 채워진 아이스박스에 넣어 마크로젠사에 보내 분석을 의뢰하였다.

[115] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이 RNA 염기서열 분석에서도 세포 사멸와 연관된 유전자인 GO:0043067, GO:0010941 및 GO:0042987 등의 발현이 증가되고, 세포 증식과 연관된 유전자인 GO:0022403, GO:0007049 및 GO:0000279 등의 발현이 억제됨을 확인하였다.

[116] **실시예 2-4: Live&Dead assay**

[117] 삼차원적 *in vitro* 마이크로 간암세포유래 조직을 만들기 위해 직경 450 μm의 폴리에틸렌글리콜(PEG) 마이크로웰 어레이에 1×10^6세포/mL 농도의 세포 현탁액을 200 μL씩 접종 하여 세포 스페로이드(spheroid)를 형성 시킨 후, 1일 동안 high glucose DMEM 일반배지에 배양하였다. 24시간 후에 배양배지를 제거하고, PBS를 넣고 피펫팅을 통해 형성된 세포 스페로이드를 회수하였다.

회수된 세포를 HARV bioreactor (Synthecon)의 10ml 용기(vessel)에 옮기고, 각각의 용기에 high glucose DMEM 일반배지를 넣어 20rpm의 속도로 회전시키면서 동적 배양(dynamic culture)을 수행하였다. 4일간 배양 후, Live/Dead viability/cytotoxicity 키트(invitrogen)를 사용하여 Live&Dead assay를 수행하였다. DPBS 1ml에 0.5μl의 칼세인(Calcein)과 2.0μl의 에티듐 호모다이머(Ethidium Homodimer)를 넣고 섞어주었다. 배지를 제거한 후 DPBS로 세척한 각각의 웰에 위 혼합액을 200μl씩 넣어주었다. 알루미늄 호일로 빛을 차단하고, 37 ℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후, DPBS로 세척해주고, 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다.

[118] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 삼차원적 간암 세포 유래 마이크로조직에서도 케라틴 처리 시 세포가 사멸되는 것을 확인하였다.

[119] **<실시예 3> PEG화된 케라틴의 암세포 증식 억제능 확인**

[120] 인간 폐암 세포(A549 ATCC® CCL-185™), 인간 포유류 샘/유방 선암종 세포(MDA-MB-231 ATCC® HTB-26™) 및 간암 세포(HepG2 ATCC-HB-8065) 각각을, 24 웰 플레이트에 $5x10^3$ 또는 $1x10^4$개씩 접종하고, high glucose DMEM 일반 배지, 1%(w/v)의 케라틴이 포함된 high glucose DMEM 일반 배지, 또는 2%(w/v)의 PEG화된 케라틴이 포함된 high glucose DMEM 일반 배지로 바꾸어 주었다. 배양배지는 이틀에 한번씩 새로운 배지로 교환해 주었다. 일정 시간 배양한 후에 Live&Dead assay 및 세포 증식 분석을 수행하였다.

[121] **실시예 3-1: Live&Dead assay**

[122] Live/Dead viability/cytotoxicity 키트(invitrogen)를 사용하여, Live&Dead assay를 수행하였다. DPBS 1ml에 0.5μl의 칼세인(Calcein)과 2.0μl의 에티듐 호모다이머(Ethidium Homodimer)를 넣고 섞어주었다. 배지를 제거한 후 DPBS로 세척한 각각의 웰에 위 혼합액을 200μl씩 넣어주었다. 알루미늄 호일로 빛을 차단하고, 37 ℃에서 10분 동안 인큐베이션한 후, DPBS로 세척해주고, 형광현미경(Olympus BX51)으로 관찰하였다.

[123] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 각 암세포들의 증식이 억제되는 것을 확인하였다.

[124] **실시예 3-2: 세포 증식 분석**

[125] DPBS로 웰을 세척한 후, 각각의 웰에 high glucose DMEM 일반 배지로 10배 희석된 Cell Counting Kit-8 용액(Dojindo laboratory)을 넣고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 37 ℃에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다 (인큐베이션 시간은 4시간을 넘지 않는다). 인큐베이션 후, 각각의 웰에서 100μl씩을 96웰 플레이트에 옮기고, 96웰 포맷 플레이트 리더(ELX 800 universal micro plate Reader, Bio Tek, Inc.) 기기를 이용하여 450nm 파장(O.D 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[126] PEG화된 케라틴 처리 1일, 4일 및 7일 후에 각 암세포들의 증식능을 평가한 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, PEG화된 케라틴을 처리하지 않은 그룹에 비해

PEG화된 케라틴을 처리한 그룹에서 세포의 증식이 현저히 억제됨을 확인하였다.

[127] **<실시예 4> 케라틴-히알루론산 복합체의 암세포 증식 억제능 확인**

[128] 사람 유방 선암종 세포(MCF-7 ATCC®) 및 쥐 유방 선암종 세포 (4T1) 각각을, 24웰 플레이트에 $1x10^4$개씩 접종하고, 24시간 후에 high glucose DMEM 일반배지 또는 0.25-4% (w/v)의 케라틴 또는 2% 케라틴-히알루론산 복합체가 포함된 high glucose DMEM 일반 배지로 바꾸어 주었다. 배양배지는 매일 한번씩 새로운 배지로 교환해 주었으며, 일정시간 배양한 후 세포 증식 분석을 수행하였다.

[129] DPBS로 웰을 세척한 후, 각각의 웰에 high glucose DMEM 일반 배지로 10배 희석된 Cell Counting Kit-8 용액(Dojindo laboratory)을 넣고, 알루미늄 호일로 빛을 차단한 후, 37 ℃에서 1시간 30분 동안 인큐베이션하였다 (인큐베이션 시간은 4시간을 넘지 않는다). 인큐베이션 후, 각각의 웰에서 100μl씩을 96웰 플레이트에 옮기고, 96웰 포맷 플레이트 리더(ELX 800 universal micro plate Reader, Bio Tek, Inc.) 기기를 이용하여 450nm 파장(O.D 450nm)에서 흡광도를 측정하였다.

[130] 케라틴-히알루론산 복합체 처리 1일, 2일 및 3일 후에 각 암세포들의 증식능을 평가한 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 케라틴-히알루론산 복합체의 처리시 세포의 증식이 현저히 억제됨을 확인하였다.

청구범위

[청구항 1] 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 케라틴은 사람의 머리카락으로부터 수득된 것인 약학적 조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 비소세포성 폐암, 골암, 유방암, 선암종, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 대장암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 식도암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 뇌종양, 척수종양 또는 혈액암인 약학적 조성물.

[청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 골암 또는 유방암인 약학적 조성물.

[청구항 5] 제1항에 있어서, 상기 케라틴이 0.001 %(w/v) 내지 10 %(w/v)의 함량으로 포함되는 약학적 조성물.

[청구항 6] PEG화된 케라틴을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 PEG화된 케라틴은 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 것인 약학적 조성물.

[청구항 8] 제6항에 있어서, 상기 PEG화된 케라틴은
i) O-메틸-O`-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을
4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄
클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계; 및
ii) 단계i)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계를 포함하는 방법으로 제조된 것인 약학적 조성물.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 비소세포성 폐암, 골암, 유방암, 선암종, 위암, 췌장암, 방광암, 신장암, 수뇨관 암, 대장암, 자궁암, 자궁경부암, 전립선암, 식도암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 뇌종양, 척수종양 또는 혈액암인 약학적 조성물.

[청구항 10] 제8항에 있어서, 상기 암은 간암, 폐암, 골암 또는 유방암인 약학적 조성물.

[청구항 11] 케라틴-히알루론산 복합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 12] 제 11항에 있어서, 케라틴-히알루론산 복합체는 케라틴과 히알루론산이 아미드 결합한 것인 약학적 조성물.

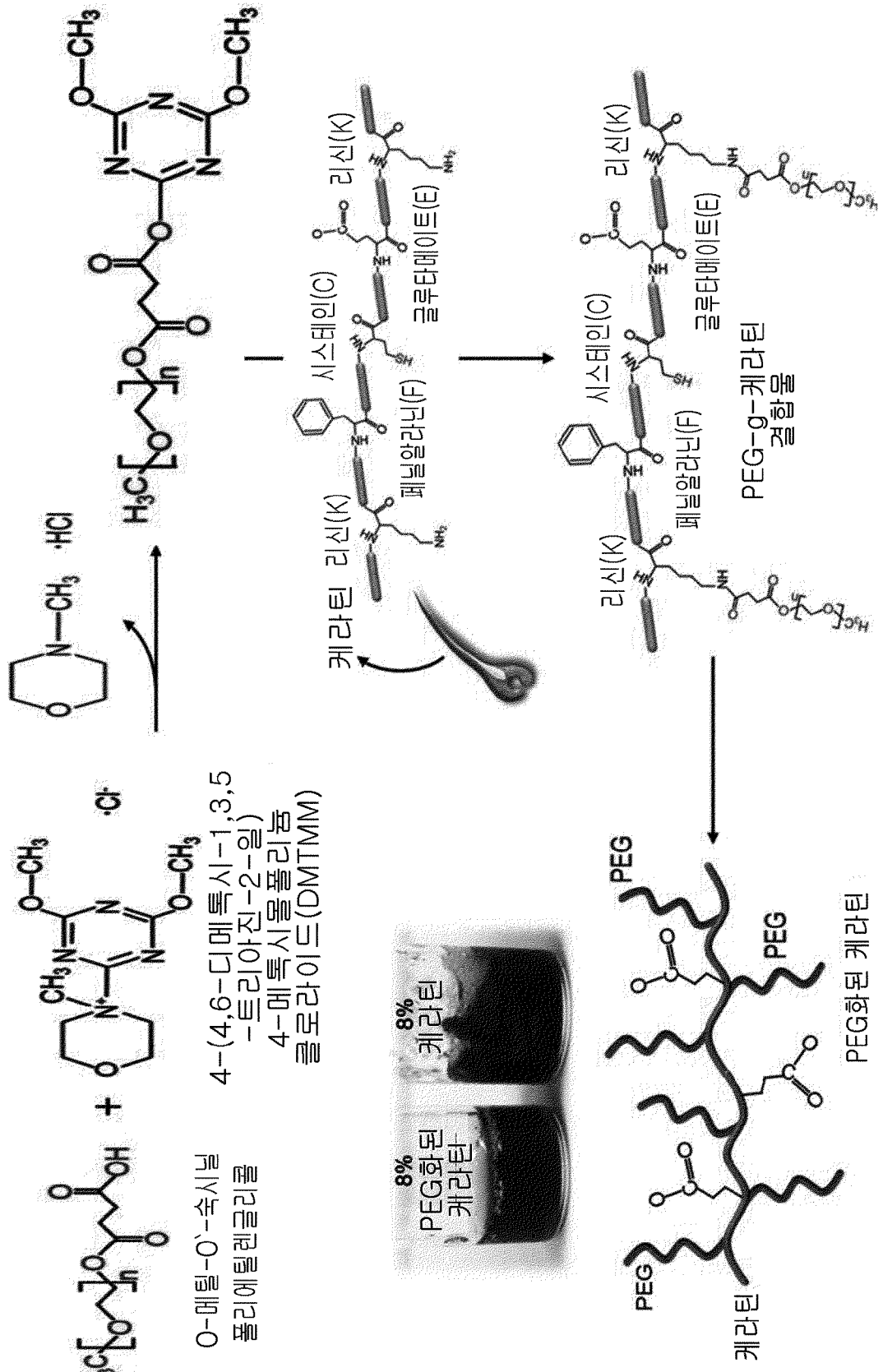
[청구항 13] 제 11항에 있어서, 케라틴-히알루론산 복합체는 히알루론산의 카르복실기(Carboxyl group)와 케라틴의 아민기(amine group)를 아미드화 반응으로 결합시켜 제조된 것인 약학적 조성물.

[청구항 14] 제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여함으로써 암을 예방 또는 치료하는 방법.

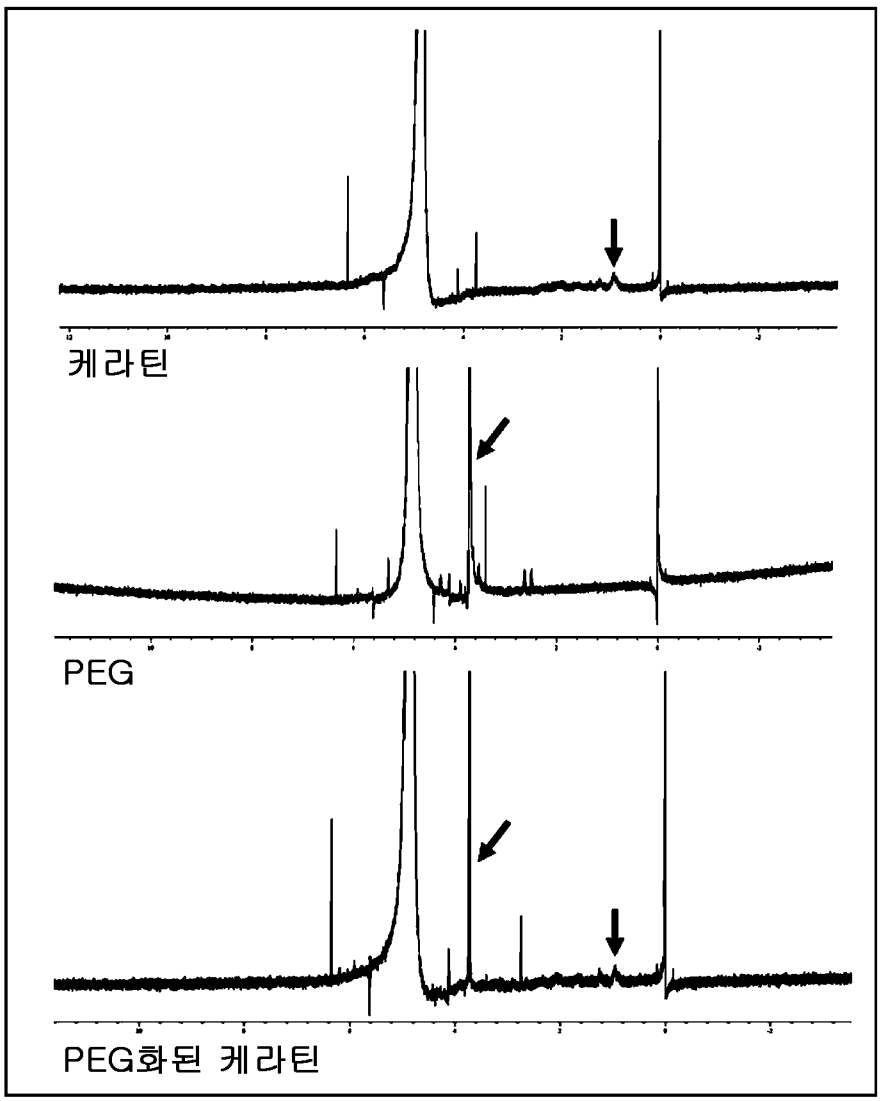
[청구항 15] 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 제1항 내지 제13항 중 어느 한

항에 따른 약학적 조성물의 용도.

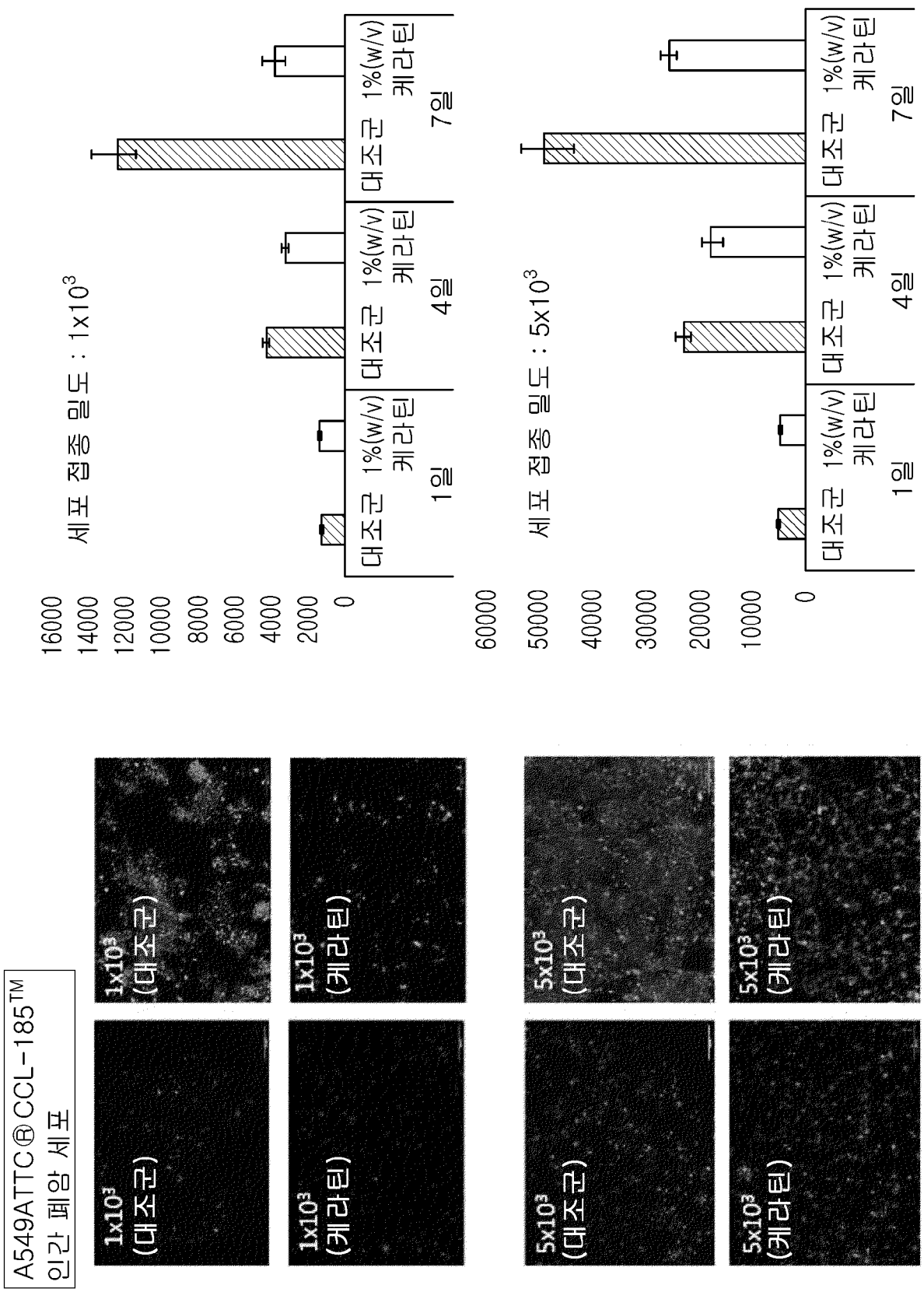
[도1]


O-메틸-O`-숙시닐
폴리에틸렌글리콜
4-(4,6-디메톡시-1,3,5
-트리아진-2-일)
4-메톡시몰폴리늄
클로라이드(DMTMM)
케라틴 리신(K) 페닐알라닌(F) 시스테인(C) 글루타메이트(E) 리신(K)
PEG-g-케라틴
결합물
8%
PEG화된
케라틴
8%
케라틴
PEG
PEG
PEG
케라틴
PEG화된 케라틴

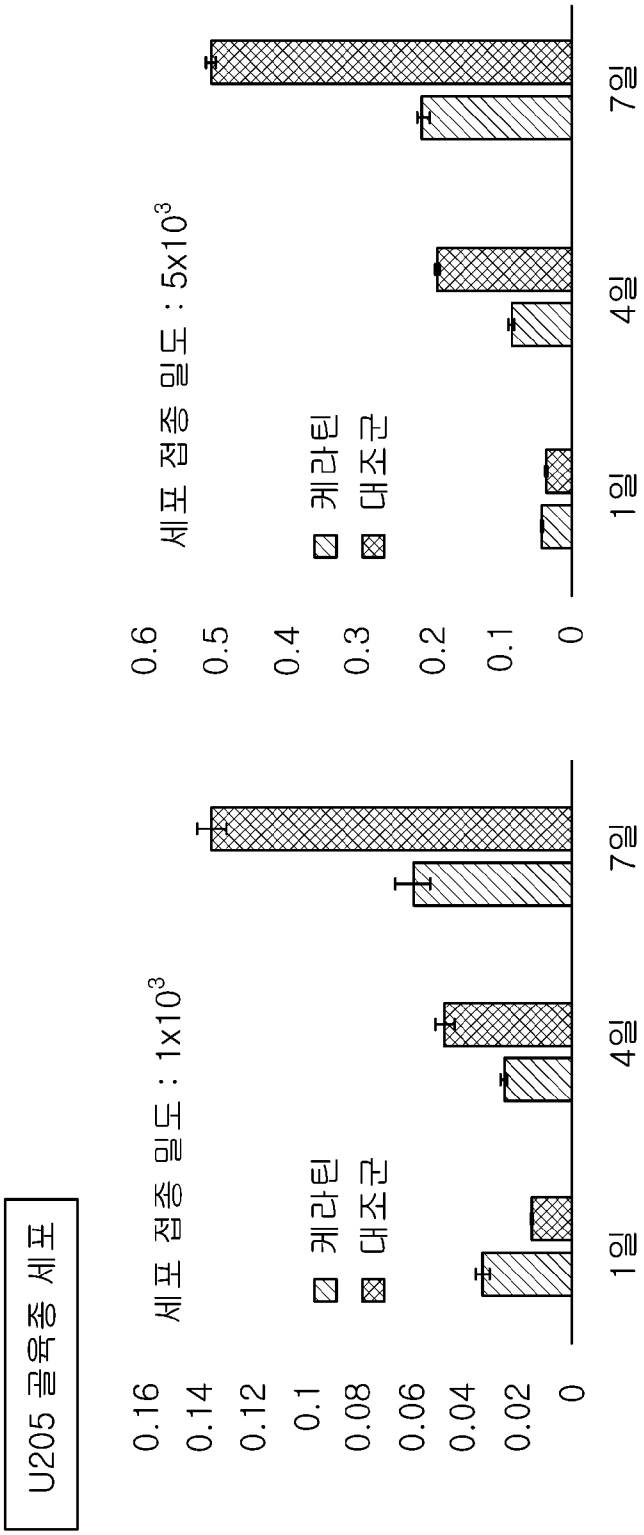
[도2]



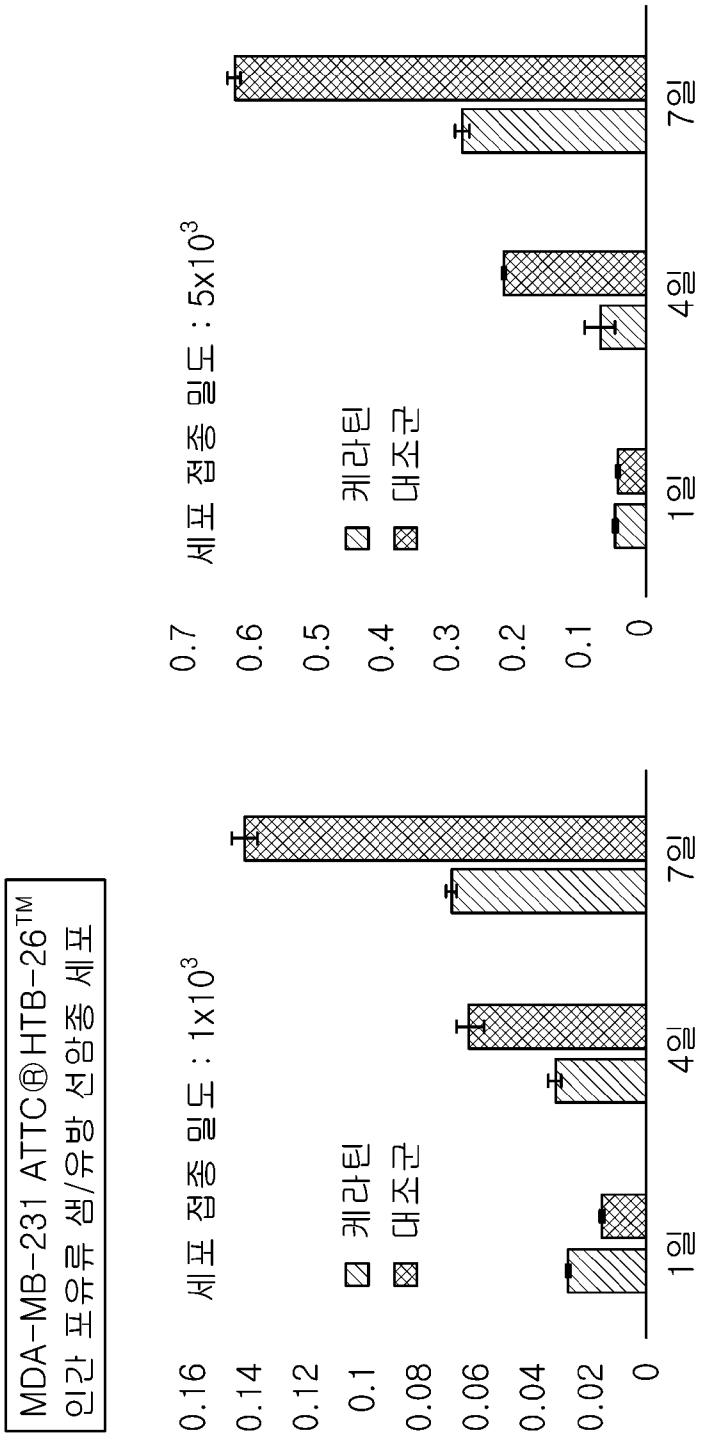
[도3]


A549ATTC®CCL-185™
인간 폐암 세포
1x10³ (대조군)
1x10³ (케라틴)
5x10³ (대조군)
5x10³ (케라틴)
세포 접종 밀도 : 1x10³
세포 접종 밀도 : 5x10³
대조군
1%(w/v) 케라틴
1일
4일
7일

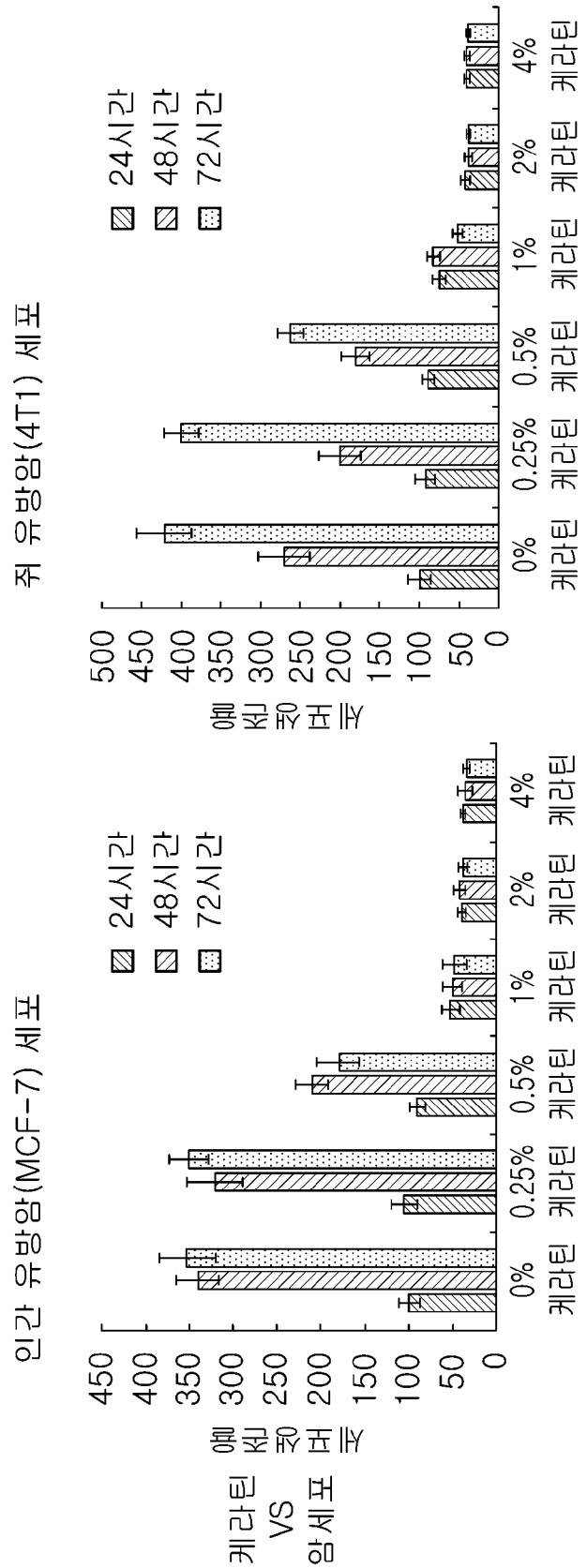
[도4]


U205 골육종 세포
세포 접종 밀도 : 1x10^3
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
케라틴
대조군
1일
4일
7일
세포 접종 밀도 : 5x10^3
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
케라틴
대조군
1일
4일
7일

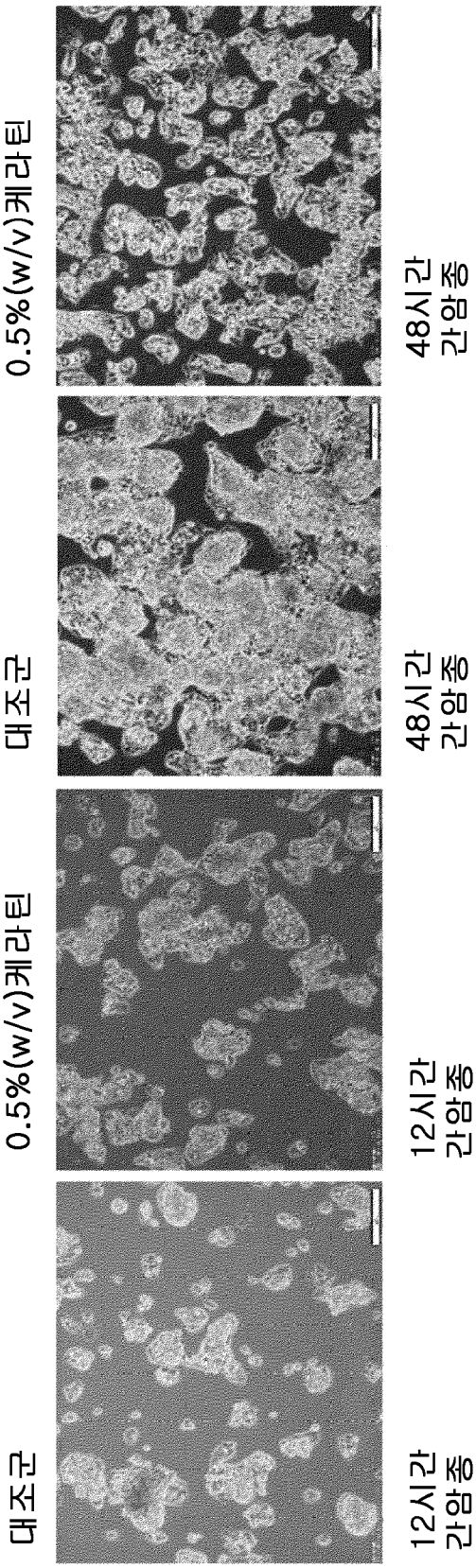
[도5]


MDA-MB-231 ATTC® HTB-26™
인간 포유류 샘/유방 선암종 세포
세포 접종 밀도 : 1x10³
세포 접종 밀도 : 5x10³
케라틴
대조군
1일
4일
7일
0
0.02
0.04
0.06
0.08
0.1
0.12
0.14
0.16
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7

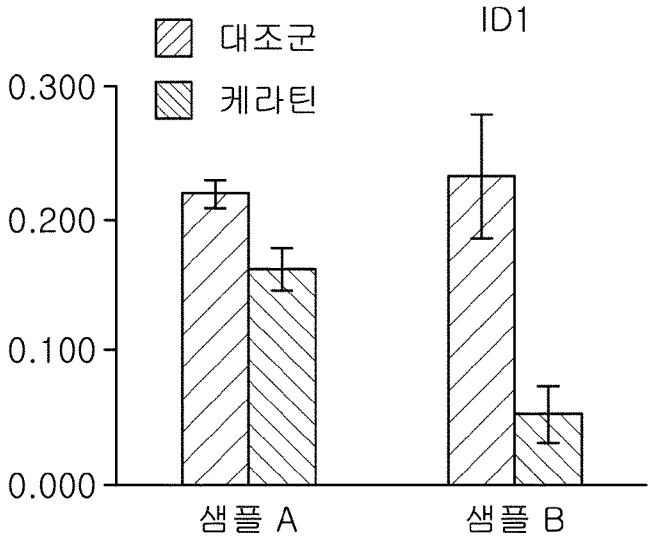
[도6]

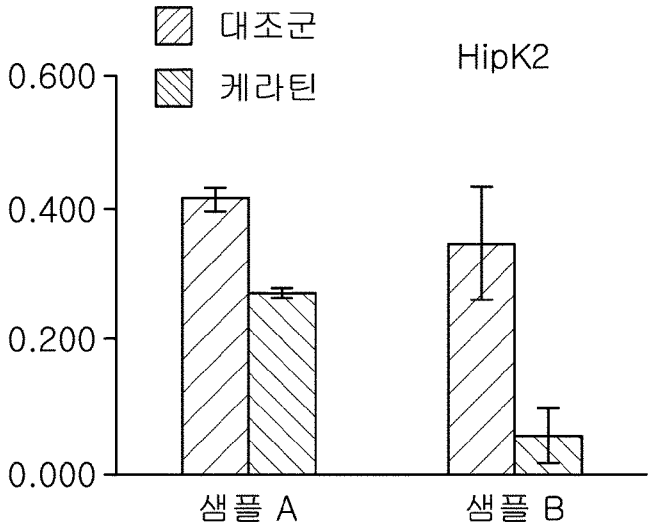

케라틴 VS 암세포 생존율
인간 유방암(MCF-7) 세포
쥐 유방암(4T1) 세포
24시간
48시간
72시간
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
500
0%
0.25%
0.5%
1%
2%
4%
케라틴

[도7]



[도8]


ID1
대조군
케라틴
0.300
0.200
0.100
0.000
샘플 A
샘플 B


HipK2
대조군
케라틴
0.600
0.400
0.200
0.000
샘플 A
샘플 B

[도9]

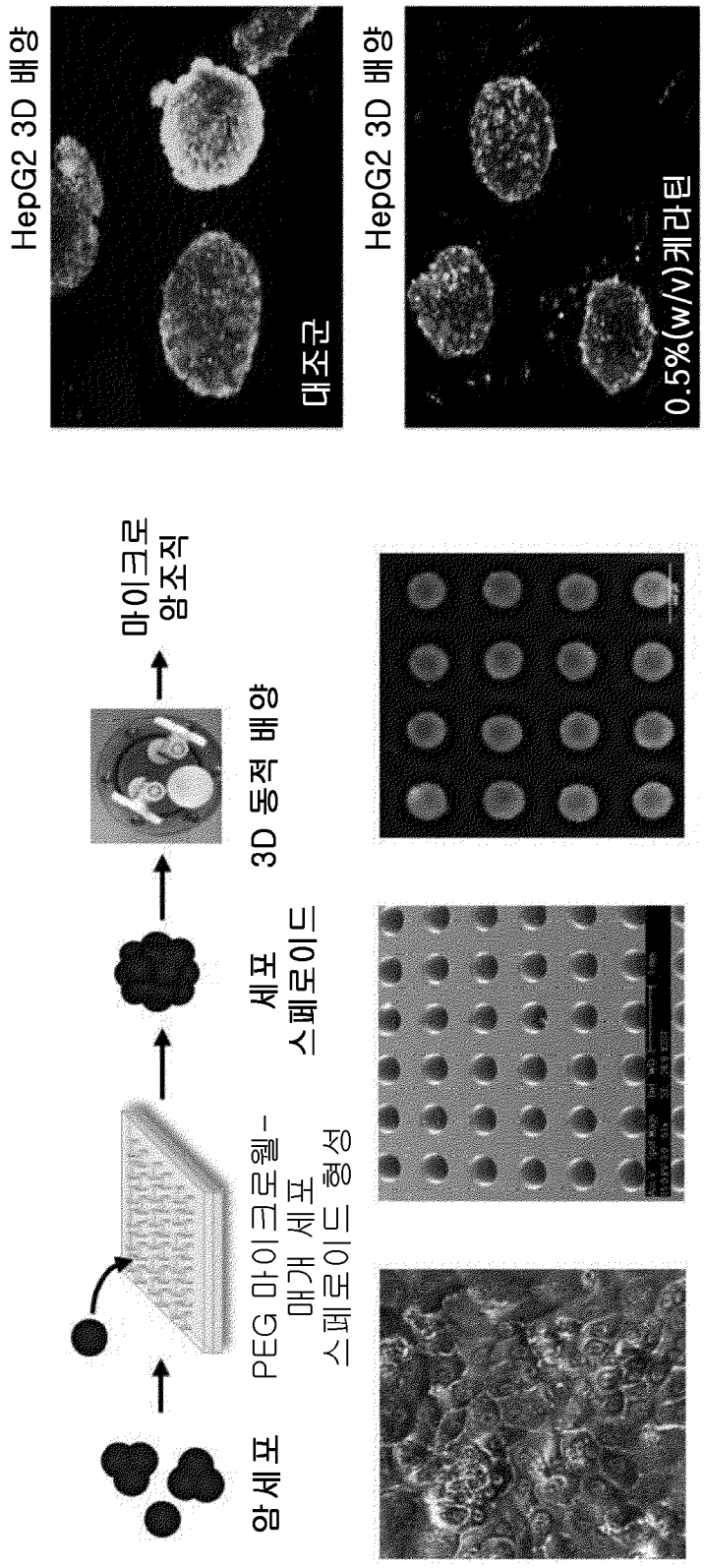
차등 발현-HepG2

배수 차이 (FC)	상승 조절	하향 조절	합계
FC>=1.5	4297	4127	8424
FC>=2	2753	2390	5143
FC>=4	1191	619	1810

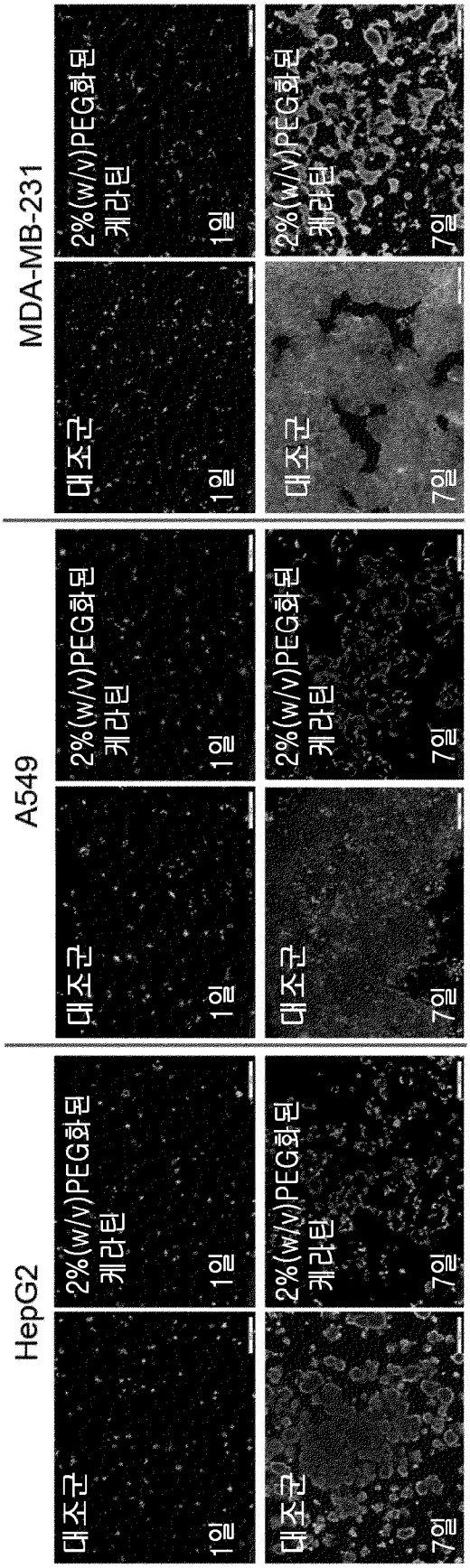
상승 조절	q-값
hsa04010:MAPK 신호 경로	6.83E-06
hsa04012:ErbB 신호 경로	0.018453
hsa04510:국소 접착	0.02135
hsa04115:p53 신호 경로	0.045029

하향 조절	q-값
hsa03030:DNA 복제	2.26E-07
hsa04110:세포 주기	9.87E-05
hsa00071:지방산 대사	6.13E-04
hsa03430:불일치 복구	0.003217

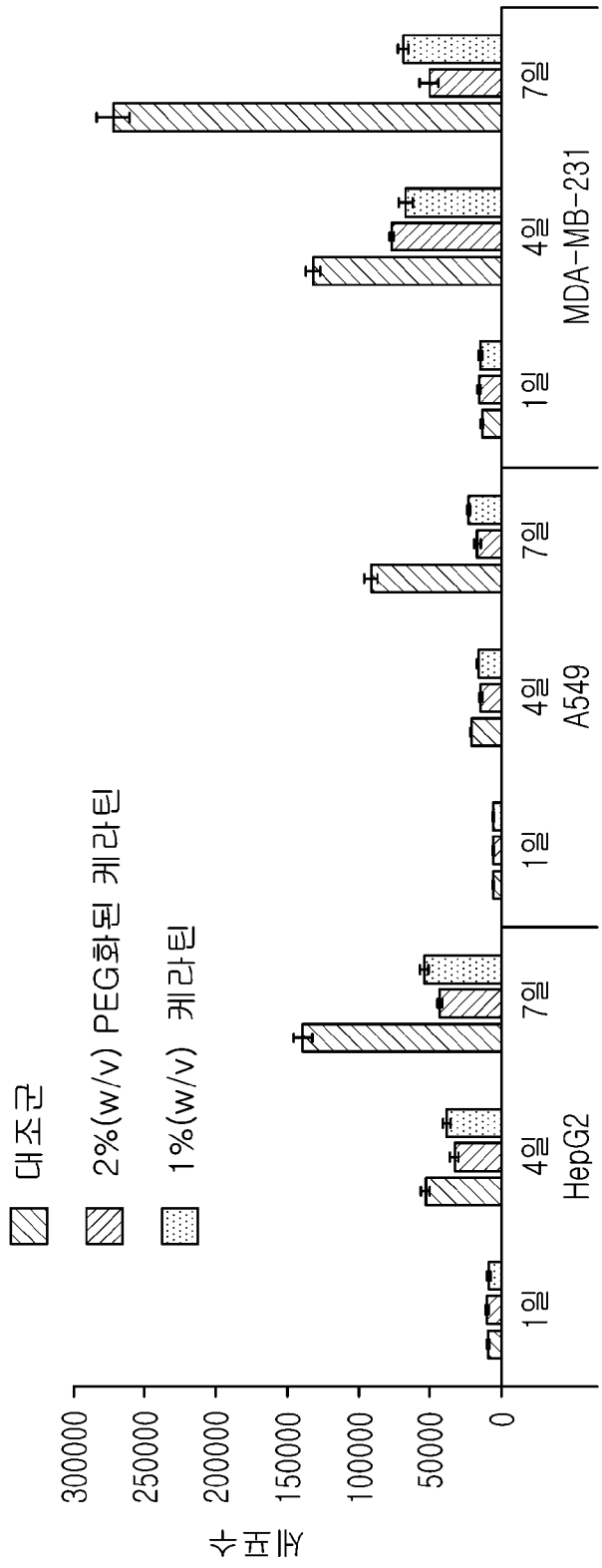
[도10]


HepG2 3D 배양
대조군
HepG2 3D 배양
0.5%(w/v)케라틴
암세포
PEG 마이크로웰-
매개 세포
스페로이드 형성
세포
스페로이드
3D 동적 배양
마이크로
암조직

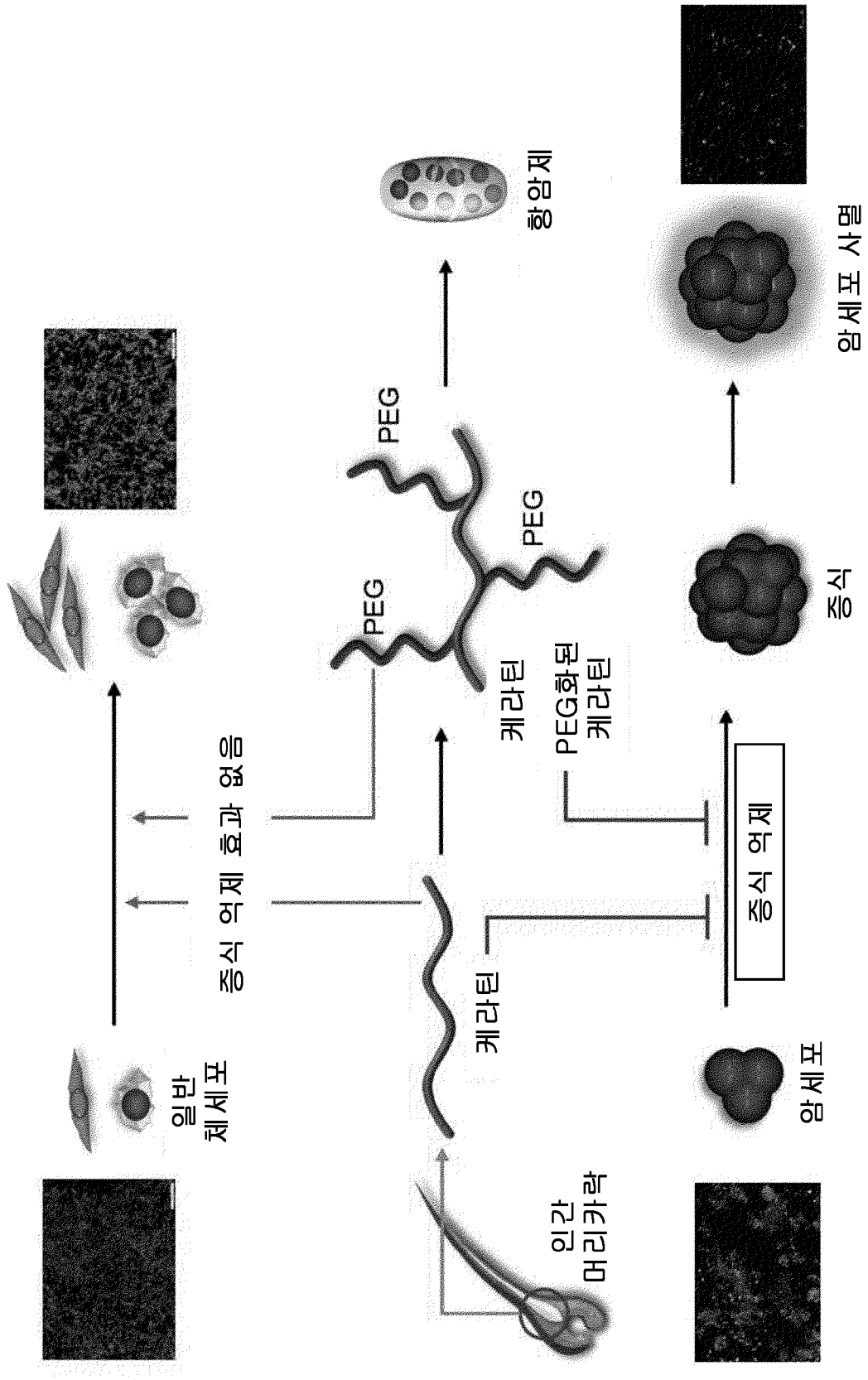
[도11]



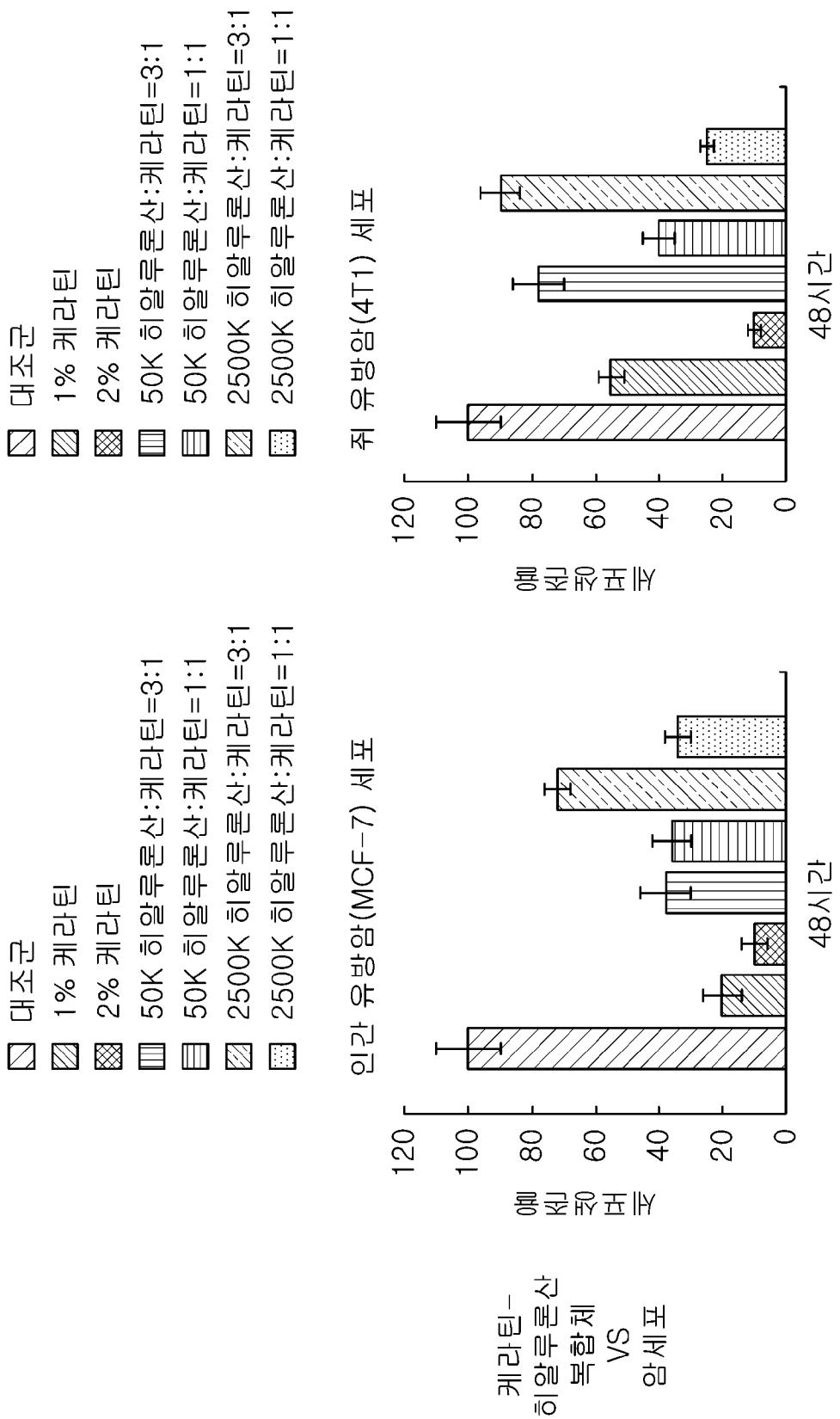
[도12]


대조군
2%(w/v) PEG화된 케라틴
1%(w/v) 케라틴
세포수
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
1일
4일
7일
HepG2
1일
4일
7일
A549
1일
4일
7일
MDA-MB-231

[도13]


항암제
암세포 사멸
증식
암세포
일반
체세포
증식 억제 효과 없음
PEG
PEG
PEG
케라틴
PEG화된
케라틴
케라틴
증식 억제
인간
머리카락

[도14]


대조군
1% 케라틴
2% 케라틴
50K 히알루론산:케라틴=3:1
50K 히알루론산:케라틴=1:1
2500K 히알루론산:케라틴=3:1
2500K 히알루론산:케라틴=1:1
쥐 유방암(4T1) 세포
세포 생존율
120
100
80
60
40
20
0
48시간
대조군
1% 케라틴
2% 케라틴
50K 히알루론산:케라틴=3:1
50K 히알루론산:케라틴=1:1
2500K 히알루론산:케라틴=3:1
2500K 히알루론산:케라틴=1:1
인간 유방암(MCF-7) 세포
세포 생존율
120
100
80
60
40
20
0
48시간
케라틴-
히알루론산
복합체
VS
암세포

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/007597

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 35/36(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17; A61K 039/395; C07K 14/78; C07K 7/06; A61K 048/00; C12Q 1/68; A61K 35/36

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: keratin, anticancer, polyethylene glycolated, hyaluronic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MARKOWICZ, Sergiusz et al., "Anticancer Properties of Peptide Fragments of Hair Proteins", PloS One, 2014, vol. 9, no. 6, e98073, internal pages 1-6 See abstract; internal pages 2-3; and figures 1-2.	1-5,15
A		6-13
X	US 9365633 B2 (LIPKOWSKI, Andrzej et al.) 14 June 2016 See abstract; claims 1, 5, 8; and table of column 2-5.	1-5,15
X	US 2004-0043063 A1 (SCHALLER, Gerhard) 04 March 2004 See abstract; claims 1-13; paragraph [0016]; and example 1.	1-5,15
A	WO 2015-021346 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 12 February 2015 See the entire document.	1-13,15
A	KARANTZA, V., "Keratins in Health and Cancer: More than Mere Epithelial Cell Markers", Oncogene, NIH Public Access Author Manuscript, 2011, vol. 30, no. 2, pages 127-138 See the entire document.	1-13,15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 OCTOBER 2017 (26.10.2017)	**26 OCTOBER 2017 (26.10.2017)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2017/007597

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **14**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claim 14 pertains to a method for treatment of the human body by therapy, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2017/007597

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 9365633 B2	14/06/2016	EP 2649089 A2	16/10/2013
		PL 393153 A1	18/06/2012
		US 2014-0315824 A1	23/10/2014
		WO 2012-078060 A2	14/06/2012
		WO 2012-078060 A3	03/01/2013
US 2004-0043063 A1	04/03/2004	AU 2628702 A	18/06/2002
		CA 2430998 A1	13/06/2002
		DE 10061110 A1	11/07/2002
		DE 10061110 B4	21/12/2006
		EP 1339433 A2	03/09/2003
		EP 1339433 B1	14/11/2007
		WO 02-045755 A3	03/01/2003
		WO 02-45755 A2	13/06/2002
WO 2015-021346 A1	12/02/2015	CN 105899673 A	24/08/2016
		EP 3030679 A1	15/06/2016
		US 2016-0187341 A1	30/06/2016

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/007597

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 35/36(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17; A61K 039/395; C07K 14/78; C07K 7/06; A61K 048/00; C12Q 1/68; A61K 35/36

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 케라틴, 항암, PEG화, 히알루론산

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	MARKOWICZ, SERGIUSZ 등, 'Anticancer properties of peptide fragments of hair proteins', PloS One, 2014, 9권, 6호, e98073, 내부페이지 1-6 요약; 내부페이지 2-3; 및 도면 1-2 참조.	1-5,15
A		6-13
X	US 9365633 B2 (LIPKOWSKI, ANDRZEJ 등) 2016.06.14 요약; 청구항 1, 5, 8; 및 컬럼 2-5의 테이블 참조.	1-5,15
X	US 2004-0043063 A1 (SCHALLER, GERHARD) 2004.03.04 요약; 청구항 1-13; 문단 [0016]; 및 실시예 1 참조.	1-5,15
A	WO 2015-021346 A1 (THE RESEARCH FOUNDATION FOR THE STATE UNIVERSITY OF NEW YORK) 2015.02.12 전체 문헌 참조.	1-13,15
A	KARANTZA, V., 'Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers', Oncogene, NIH Public Access Author Manuscript, 2011, 30권, 2호, 페이지 127-138 전체 문헌 참조.	1-13,15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2017년 10월 26일 (26.10.2017)	2017년 10월 26일 (26.10.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
김선희
전화번호 +82-42-481-5405

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2017/007597

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 14
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 14는 치료에 의한 인체의 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.

2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.

3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.

4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.

☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.

☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/007597

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 9365633 B2	2016/06/14	EP 2649089 A2	2013/10/16
		PL 393153 A1	2012/06/18
		US 2014-0315824 A1	2014/10/23
		WO 2012-078060 A2	2012/06/14
		WO 2012-078060 A3	2013/01/03
US 2004-0043063 A1	2004/03/04	AU 2628702 A	2002/06/18
		CA 2430998 A1	2002/06/13
		DE 10061110 A1	2002/07/11
		DE 10061110 B4	2006/12/21
		EP 1339433 A2	2003/09/03
		EP 1339433 B1	2007/11/14
		WO 02-045755 A3	2003/01/03
		WO 02-45755 A2	2002/06/13
WO 2015-021346 A1	2015/02/12	CN 105899673 A	2016/08/24
		EP 3030679 A1	2016/06/15
		US 2016-0187341 A1	2016/06/30