



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0157252
(43) 공개일자 2024년11월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) A61K 47/42 (2017.01)
A61L 26/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4741 (2013.01)
A61K 38/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0053808

(22) 출원일자 2023년04월25일

심사청구일자 2023년04월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

권일근

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

손태일

경기도 용인시 수지구 신봉2로 72, 220동 501호 (신봉동, 신봉마을자이2차아파트)

민성준

서울특별시 동대문구 회기로23가길 37-1, 305호 (회기동)

(74) 대리인

특허법인 천지

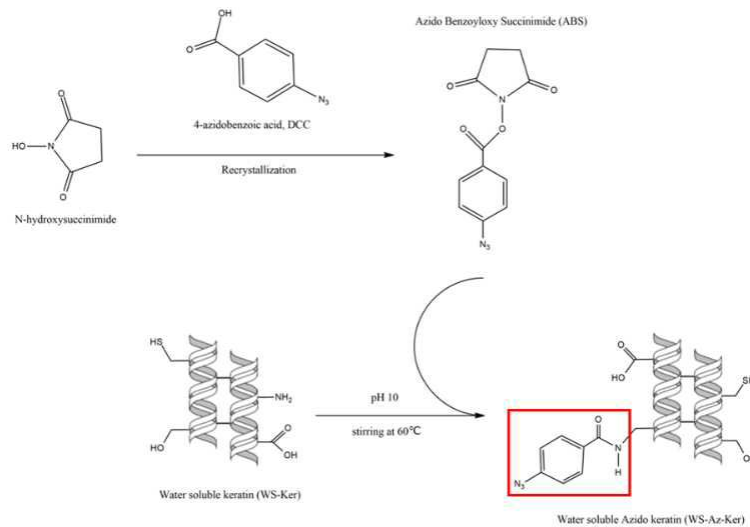
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 광반응성 케라틴 유도체, 이의 용도, 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 케라틴 유도체, 구체적으로는 자외선 조사에 의해 경화되는 광반응성 작용기를 갖는 광 반응성 케라틴 유도체, 이의 용도 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체는 약물과 혼합하여 자외선을 조사하면 광 반응성기가 경화되어 약물을 고정화할 수 있다. 이에 따라 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체는 약물 전달체로 사용될 수 있으며, 상기 약물 전달체는 외부원으로부터 약물을 보호하고 안정화할 수 있으며 생체 내에서 약물을 서서히 방출할 수 있다. 또한, 본 발명의 약물 전달체를 지지체에 고정시켜, 상처의 치료에 이용할 수 있는 창상 피복재를 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/22 (2013.01)

A61K 47/42 (2013.01)

A61L 26/0028 (2013.01)

A61L 26/0066 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

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	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

케라틴 및 광반응성 화합물 유래의 모이어티(moiety)를 포함하고,
상기 광반응성 화합물 유래의 모이어티는 자외선(UV) 조사에 의해 경화되는 광반응성 작용기를 갖는,
광반응성 케라틴 유도체.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 광반응성 작용기는 아지도기(Azido group)인, 광반응성 케라틴 유도체.

청구항 3

제1항에 있어서,
상기 광반응성 화합물은 N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)인, 광반응성 케라틴 유도체.

청구항 4

약물이 담지된 제1항의 케라틴 유도체를 포함하고,
상기 케라틴 유도체는 자외선 조사에 의해 광반응성기가 경화된 것인, 약물 전달체.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 약물은 단백질, 펩타이드, 유전자, 항암제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 소염제, 및 진통제 중에서 선택되는 적어도 1종인, 약물 전달체.

청구항 6

제5항에 있어서,
상기 약물은 성장 인자(growth factor)인, 약물 전달체.

청구항 7

제1항에 기재된 광반응성 케라틴 유도체를 약물과 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에 자외선을 조사하여 광반응성 케라틴 유도체에 약물을 고정화하는 단계를 포함하는, 약물 전달체의 제조 방법.

청구항 8

제4항의 약물 전달체를 창상피복재의 지지체에 고정시킨, 케라틴 유도체 기반의 창상피복재.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 창상피복재의 지지체는 하이드로콜로이드(hydro -colloid), 알지네이트(alginate), 폼(foam) 및 하이드로겔(hydrogel)중에서 선택되는 1종 이상인, 창상피복재.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 케라틴 유도체, 구체적으로는 자외선 조사에 의해 경화되는 광반응성 작용기를 갖는 광 반응성 케라틴 유도체, 이의 용도, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 지난 수세기 동안 모발과 양모 섬유에서 케라틴 단백질을 추출, 정제 및 특성화하는 기술이 발전하면서 케라틴 기반 생체 재료 플랫폼이 개발되어왔다. 케라틴은 많은 천연 유래 생체 고분자와 마찬가지로 고유한 생물학적 활성과 생체 적합성을 가지고 있으며, 추출된 케라틴은 세포의 인식과 행동을 조절하는 자기조직 구조를 형성할 수 있다. 이러한 특성으로 인해, 특히 케라틴의 물리적, 기계적 특성을 제어하여 관심 분야에 적합한 특성을 가진 생체 재료를 만드는 방법에 대한 연구가 꾸준히 진행되고 있다.

[0003] 한편, 성장인자(EGF, BMP-2, TGF 등)와 같은 생리활성 물질은 세포 증식을 촉진하는 분열촉진 효과와 세포 분화 조절 효과로 인해 조직 공학에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 성장인자는 고분자량의 생체신호로 관련 세포 표면 수용체와 상호 작용해 가용성 상태에서 복합체를 형성한 후 세포 내로 내재화 되기전 세포 표면에 응집하는 경로 보고되었으며, 내재화된 복합체는 리소좀에서 해리되고 분해된다. 이러한 빠른 내재화 과정의 결과로 성장 인자가 유사 분열 활동에 미치는 지속적인 영향이 감소하고, 열적, 화학적 불안정성과 높은 비용으로 인해 그 적용이 제한되어 왔다. 이러한 단점을 극복하기 위해 다양한 생체 소재 매트릭스에 성장인자를 고정화하여 열적 또는 효소 안정성을 향상시키는 연구가 많이 진행되어왔으며, 성장인자(EGF, BMP-2, TGF 등)와 같은 생리활성 물질의 고정화에 결합제를 이용한 화학적 고정화 방식이 널리 사용되고 있다. 그러나 화학적 고정화 방법은 반응 조건 제어가 어렵고 반응 시간이 길어 성장인자의 변형과 낮은 고정화 효율을 보이는 단점이 존재하며, 고정화를 위한 화학 반응 과정에서 발생하는 부산물과 미반응된 고반응성 결합 시약이 세포와 조직에 독성이 있는 것으로 알려져있다.

[0004] 따라서, 생체 적합성과 생분해성을 갖는 물질을 이용해 반응 부산물이 발생하지 않고, 세포 독성이 없는 활성물질의 고정화 방법의 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 반응 부산물이 발생하지 않고, 세포 독성이 없으면서도 생분해성과 생체 적합성을 가지며, 성장 인자와 같은 약물을 담지할 수 있는 유도체와 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 약물이 담지된, 상기 유도체를 포함하는 약물 전달체 및 이의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 또한, 피복재에 상기 약물 전달체를 고정시켜, 상처의 치료에 이용할 수 있는 창상 피복재를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 일 양태에 따르면, 케라틴 및 광반응성 화합물 유래의 모이어티(moiety)를 포함하고, 상기 광반응성 화합물 유래의 모이어티는 자외선(UV) 조사에 의해 경화되는 광반응성 작용기를 갖는, 광반응성 케라틴 유도체가 제공된다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 광반응성 작용기는 아지도기(Azido group)일 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 광반응성 화합물은 N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)일 수 있다.

[0011] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 약물이 담지된 상기 케라틴 유도체를 포함하고, 상기 케라틴 유도체는 자외선 조사에 의해 광반응성이 경화된 것인, 약물 전달체가 제공된다.

[0012] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 단백질, 펩타이드, 유전자, 항암제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 소염제, 및 진통제 중에서 선택되는 적어도 1종일 수 있다.

[0013] 본 발명의 다른 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 성장 인자(growth factor)일 수 있다.

[0014] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, 상기 광반응성 케라틴 유도체를 약물과 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에

자외선을 조사하여 광반응성 케라틴 유도체에 약물을 고정화하는 단계를 포함하는, 약물 전달체의 제조 방법이 제공된다.

[0015] 본 발명의 또다른 일 양태에 따르면, 상기 약물 전달체를 창상피복재의 지지체에 고정시킨, 케라틴 유도체 기반의 창상피복재가 제공된다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 창상피복재의 지지체는 하이드로콜로이드(hydro-colloid), 알지네이트(alginate), 폼(foam) 및 하이드로겔(hydrogel)중에서 선택되는 1종 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체는 부산물이 발생하지 않고, 세포 독성이 없으면서도 생분해성과 생체 적합성을 갖는 약물의 고정화 방법을 제공할 수 있다. 이에 따라 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체는 약물 전달체로 사용될 수 있으며, 상기 약물 전달체는 외부원으로부터 약물을 보호하고 안정화할 수 있으며 생체 내에서 약물을 서서히 방출할 수 있다. 또한, 본 발명의 약물 전달체를 지지체에 고정시켜, 상처의 치료에 이용할 수 있는 창상 피복재를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체의 제조과정을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 활성물질 담지 광반응성 케라틴 유도체에서 활성물질이 방출되는 모습을 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체의 제조 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체를 창상 피복재에 고정시키는 과정을 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체와 케라틴의 FT-IR 스펙트럼을 측정한 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 광경화된 광반응성 케라틴 유도체와 광경화되지 않은 광반응성 케라틴 유도체를 비교한 사진이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 광경화된 소 혈청 알부민 포함 광반응성 케라틴 유도체와 광경화되지 않은 소 혈청 알부민 포함 광반응성 케라틴 유도체의 형광 이미지이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체 농도에 따른 소혈청 알부민의 누적 방출 프로파일 이미지이다.

도 9에서 (a)는 Live & Dead 염색 이미지(스케일 바아(scale bar) = 300 μ m)이고 (b)는 이미지 J 프로그램 하에서 Live & Dead 분석으로 세포 생존율을 확인한 결과를 보여주는 그래프 (n = 5)이다.

도 10에서 (a)는 트랜스 웰(trans well)을 사용하여 Az-Ker 로 광-고정화된 단백질을 간접적으로 평가하기 위한 실험 개략도이고 (b)는 CCK-8 에 따른 세포 증식율을 보여주는 그래프 (n = 4)이다. 상기 그래프에서 ** 는 $p < 0.01$ 에서의 유효 차이를 나타내고 *** 는 $p < 0.001$ 에서의 유효 차이를 나타낸다.

도 11은 5일째되는 날에서의 F-actin 염색 이미지이다 (스케일 바아 = 200 μ m).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 상세하게 살펴본다. 본 명세서 및 청구범위에 사용된 용어나 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니 되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다.

[0020] 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들은 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0021] 도 1은 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체의 제조과정을 나타내며, 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 환

성물질 담지 광반응성 케라틴 유도체에서 활성물질이 방출되는 모습을 나타내고, 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체의 제조 방법을 나타낸 흐름도를 나타내며, 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체를 창상 피복재에 고정시키는 과정을 나타낸다.

- [0022] 본 발명의 일 양태에 따르면, 케라틴 및 광반응성 화합물 유래의 모이어티(moiety)를 포함하고, 상기 광반응성 화합물 유래의 모이어티는 자외선(UV) 조사에 의해 경화되는 광반응성 작용기를 갖는, 광반응성 케라틴 유도체가 제공된다.
- [0023] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 광반응성 작용기는 자외선 조사에 의해 경화되고 세포 독성을 일으키지 않는 광반응성 작용기로서, 예를 들어 비닐기(Vinyl group) 또는 아지도기(Azido group)일 수 있고, 구체적으로는 아지도기(Azido group)일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 광반응성 화합물은 N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)일 수 있다.
- [0026] 도 3에 따르면 본 발명에 따른 광반응성 케라틴 유도체의 제조 방법은 케라틴 용액 제조 단계(S100), 광반응성 화합물 용액 제조 단계(S200), 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 제조 단계(S300), 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 반응 단계 (S400), 광반응성 케라틴 유도체 제조 단계(S500)를 포함한다.
- [0027] 케라틴 용액 제조 단계(S100)는 케라틴을 증류수와 같은 용매에 녹인 후, 염기성 용액을 첨가하여 케라틴 용액을 제조 한다.
- [0028] 본 발명의 일 실시예에 따른 케라틴 용액 제조에 사용되는 케라틴은 양모나 인체의 헤어(hair)에서 추출된 케라틴이며, 구체적으로는 인체의 헤어 중에서도 인체의 모발에서 추출된 케라틴일 수 있다. 상기 케라틴은 분말 형태로 사용될 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 케라틴 용액 제조시, 용매 2.5ml 내지 17.5ml, 구체적으로는 5ml 내지 15ml, 더욱 구체적으로는 7.5ml 내지 12.5ml 중에, 케라틴 125mg 내지 275mg, 구체적으로는 150mg 내지 250mg, 더욱 구체적으로는 125mg 내지 225mg을 용해하여 용액을 제조할 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 케라틴 용액 제조에 사용되는 염기성 용액은 NaOH 용액일 수 있다. 상기 염기성 용액의 노르말 농도는 0.25N 내지 1.75N 이고, 구체적으로는 0.5N 내지 1.5N이며, 더욱 구체적으로는 0.75N 내지 1.25N 일 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 케라틴 용액의 pH는 8.5 내지 11.5이고, 구체적으로는 9 내지 11이고, 더욱 구체적으로는 9.5 내지 10.5 일 수 있다.
- [0032] 광반응성 화합물 용액 제조 단계(S200)는 광반응성기를 갖는 화합물인 화합물은 N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)를 용매, 예를 들어 1,4-다이옥산 (1,4-Dioxane)에 용해시켜 광반응성 화합물 용액을 제조할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 화합물 용액 제조에 사용되는 광반응성 화합물의 광반응성기는 비닐기 (Vinyl group) 또는 아지도기(Azido group)이며, 구체적으로는 아지도기(Azido group)일 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 화합물 용액 제조에 사용되는 아지도기(Azido group)를 갖는 화합물은 N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)일 수 있다.
- [0035] 상기 아지도기를 갖는 화합물의 양은, 케라틴 125mg 내지 275mg, 구체적으로는 150mg 내지 250mg, 더욱 구체적으로는 125mg 내지 225mg 에 대하여, 25mg 내지 175mg, 구체적으로는 50mg 내지 150mg, 더욱 구체적으로는 75mg 내지 125mg 일 수 있다.
- [0036] 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 제조 단계(S300)는 케라틴 용액 제조 단계(S100)에서 제조된 케라틴 용액에 광반응성 화합물 용액 제조 단계(S200)에서 제조된 광반응성 화합물을 추가해 광반응성 케라틴 유도체 혼합물을 제조할 수 있다.
- [0037] 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 반응 단계(S400)는 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 제조 단계(S300)에서 제조된 광반응성 케라틴 유도체 혼합물을 2차레에 걸쳐 반응을 진행시킬 수 있다. 예를 들어, 상기 혼합물을 실온에서 3-10시간, 예를 들어 6시간 동안 1차 반응 시킨 뒤, 36 내지 60시간, 예를 들어 48시간 동안 추가의 2차 반응을

진행해 광반응성 케라틴 유도체 반응물을 제조할 수 있다.

- [0038] 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체 반응 단계(S400)의 추가의 2차 반응을 위한 온도는 45℃ 내지 75℃이고, 구체적으로는 50℃ 내지 70℃이며, 더욱 구체적으로는 55℃ 내지 65℃이다.
- [0039] 광반응성 케라틴 유도체 제조 단계(S500)는 광반응성 케라틴 유도체 혼합물 반응 단계(S400)에서 제조된 광반응성 케라틴 유도체 반응물에 산성 용액을 추가하여, 광반응성 케라틴 유도체를 제조할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체 반응물에 추가되는 산성 용액은 HCl 용액일 수 있으며, 추가되는 HCl 용액의 노르말농도는 0.25N 내지 1.75N 이고, 구체적으로는 0.5N 내지 1.5N이며, 더욱 구체적으로는 0.75N 내지 1.25N 일 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명의 일 실시예에 따라 제조되는 광반응성 케라틴 유도체는 케라틴에 포함되어 있는 아르기닌과 라이신의 측쇄에 광반응성기가 도입될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면 광반응성 케라틴 유도체의 제조방법에 약물과 같은 활성물질 담지 단계(S600)를 추가로 포함하는 약물 전달체의 제조 방법을 제공할 수 있다.
- [0044] 활성물질 담지 단계(S600)는 활성물질과 광반응성 케라틴 유도체를 혼합 후, 자외선을 조사하여 광반응성 케라틴 유도체의 광반응성 작용기를 경화시켜 약물과 같은 활성물질이 고정화되어 담지되도록 함으로써 약물 전달체를 제조할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 양태에 따르면, 약물이 담지된 케라틴 유도체를 포함하고, 상기 케라틴 유도체는 자외선 조사에 의해 광반응성기가 경화된 것인, 약물 전달체가 제공된다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 따른 광반응성 케라틴 유도체는 자외선에 의해 케라틴의 아르기닌과 라이신 측쇄 도입된 광반응성기가 경화되면서, 생리활성 물질을 함께 담지할 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 “약물(drug)”은 생체에 투여하기에 적합한 화학적 또는 생물학적 물질 또는 화합물, 예를 들어, 단백질, 펩타이드, 유전자, 추출물, 합성 화합물 등을 포함하며, 본 발명에 따른 약물 전달체는 전술한 약물 중 임의 1종 또는 2종 이상을 담지하고 있어도 된다. 상기 합성 화합물은 항암제, 항생제, 항바이러스제, 항진균제, 소염제, 진통제 등에서 선택될 수 있다. 상기 단백질 및 펩타이드 약물로는 성장 인자, 성장 호르몬 등의 각종 호르몬, 인슐린, 인터페론 등을 들 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 약물은 성장 인자(growth factor)일 수 있다. 또한, 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 성장 인자는 형질전환성장인자(transforming growth factor), 형질전환성장인자1(transforming growth factor-1), 표피성장인자(epidermal growth factor), 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor), 에나멜 단백질(enamel protein), 인슐린유사성장인자(insulin-like growth factor), 섬유아세포성장인자(fibroblast growth factor), 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor)중에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.
- [0050] 본 발명의 다른 일 양태에 따르면, 전술한 약물 담지체를 지지체에 고정시켜 케라틴 유도체 기반 창상피복재를 제공할 수 있다.
- [0051] 일 실시예에 따르면, 상기 창상피복재의 지지체는 하이드로콜로이드(hydro-colloid), 알지네이트(alginate), 폼(foam) 및 하이드로겔(hydrogel)중에서 선택되는 1종 이상이나 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 일 실시예에 따르면, 지지체에 활성물질과 광반응성 케라틴 유도체 혼합물을 추가한 뒤, 자외선을 조사하여 케라틴의 아르기닌과 라이신 측쇄 도입된 광반응성기가 경화되면서, 생리활성 물질을 함께 담지하면서 지지체에 부착될 수 있으며, 아지도기를 가진 광반응성 천연 고분자는 자외선 조사에 의해 반응성이 높은 니트렌 종을 생성하고 동시에 질소 가스를 방출하며, 자외선 조사에 의해 생성된 니트렌은 비특이적 결합을 형성하고 고정 효율이 높고, 불안정한 니트렌 종은 몇 분 내에 모두 제거되기 때문에 부산물이 형성되지 않는다. 또한, 광경화성기에 의해 담지된 활성물질은 외부 환경으로부터 보호되고 안정화 되며, 생체 내에서 약물을 서서히 방출될 수 있다.

[0054] 하기의 제조예와 실험예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 제조예와 실험예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0056] **[제조예 1] 인체 모발 케라틴 추출**

[0057] 사람의 모발 샘플(20g)을 증류수(DW)를 사용해 세척한 뒤, 모발의 지질화를 위해 세척한 모발을 클로로포름과 메탄올(2:1, v/v)의 혼합물에 실온에서 24시간 동안 담근 후 자연 건조시킨다. 지질화된 모발을 37℃에서 12시간 동안 2%(v/v) 과초산 800mL로 자기 교반 시킨다. 이후 증류수(DW)를 사용하여 세척한 후 5 M 요소, 2.6 M 티오우레아, 25 mM Tris-HCl(pH 8.5), 5% (v/v) 2-머캅토에탄올(2-Mercaptoethanol)이 포함된 신다이 용액 400 mL에 첨가하여 50 ℃에서 72시간 동안 교반 시킨다. 이후, 생성된 혼합물을 20분 동안 4000rpm으로 원심분리하고 상청액을 12-14kDa 투석막을 사용하여 5일 동안 DW에 대해 투석한 뒤, 투석된 용액을 동결 건조하여 케라틴 분말을 제조한다.

[0059] **[제조예 2] N-(4-아지도벤조일옥시) 석신이미드(N-(4-Azidobenzoyloxy) succinimide, ABS)제조**

[0060] N-하이드록시석신이미드(N-Hydroxysuccinimide, NHS) 2100 mg를 다이옥산 (Dioxane, 21mL)에 용해시킨다. 4-아지도벤조익산(4-Azidobenzoic acid) 3000 mg과 N,N-디사이클로헥실카보디이미드(N,N-Dicyclohexylcarbodiimide, DCC) 3800 mg를 . 다이옥산 (Dioxane) 15 mL에 용해 시킨 뒤 얼음욕에서 NHS 용액에 부드럽게 첨가한다. 혼합물을 실온에서 24시간 동안 교반한 뒤, 반응 혼합물에서 형성된 백색 침전물을 여과하고 여과 액을 감압하에 증발시킨다. 마지막으로 진공 오븐에서 건조한 뒤, 다이옥산과 디에틸 에테르를 사용해 두 번의 재결정 단계를 거친 노란색 ABS 분말을 제조한다.

[0062] **[제조예 3] 광반응성 케라틴 유도체 제조**

[0063] 케라틴 분말 200mg을 증류수 10ml에 녹인 후, 1N의 NaOH용액에 첨가하여 용액의 pH를 10으로 조절한다. 이 후, ABS 100mg을 가능한 한 적은 양의 1,4-다이옥산(1,4-Dioxane)에 용해 시킨 뒤, 이 용액을 케라틴 용액에 첨가하고 실온에서 6시간 동안 방치 후 60℃에서 48시간 동안 방치시켜 반응시킨다. 반응이 완료된 후 1N의 HCl용액을 사용해 pH를 7로 조절한다.

[0065] **[실험예 1] 광반응성 케라틴 유도체의 특성 분석**

[0066] 케라틴과 본 발명의 광반응성 케라틴 유도체의 구조를 FT-IR 분광법을 이용해 분석하였고, 아지도기를 갖는 광반응성 케라틴 유도체의 FT-IR 스펙트럼은 2140cm⁻¹에서 피크를 나타내어 아지도 그룹이 도입된 것을 확인하였다(도 5).

[0068] **[실험예 2] 광반응성 케라틴 유도체의 광경화성 확인**

[0069] 단백질 약물의 고정화를 확인하기 위해 로다민을 함유한 2%의 광반응성 케라틴 유도체 용액 (2%-Az-Ker) 500 μl을 두 개의 페트리 접시에 떨어트린 뒤, 한 개의 페트리 접시는 120초 동안 자외선을 조사(도 6 좌측)하고, 다른 접시에는 자외선을 조사하지 않은(도 6 우측) 후, 2시간 마다 증류수를 교체한 뒤, 12시간 후 페트리 접시에서 물을 제거하고 건조시킨 후 현미경을 사용해 비교하였다.

[0071] **[실험예 3] 창상 피복재로 사용되는 칼슘알긴산 시트의 단백질 약물 고정 확인**

[0072] 창상피복재로 사용되는 알긴산칼슘 시트(1cm X 1cm) 2장을 각각 2개의 페트리 접시에 부착하며, 페트리 접시에 부착된 시트는 물을 넣었을 때 뜨지 않아한다. 각 페트리 접시에 부착된 알긴산칼슘 시트 위에 0.1%-FITC-BSA(50 μl)가 포함된 2%-Az-Ker 용액(500 μl)을 도포 한 뒤, 한쪽은 120초 동안 자외선을 조사(도 7 좌측)하고 다른 쪽은 자외선을 조사하지 않는다(도 7 우측). 그 후, 2시간 마다 증류수를 교체한 뒤, 12시간 후 페트리 접

시에서 물을 제거하고 건조시킨 후 현미경을 사용해 비교하였다.

[0074] [실험예 4] 단백질 방출 테스트

[0075] 소 혈청 알부민(BSA)을 알긴산칼슘 시트에 고정시킨 후 브래드포드법에 의해 방출되는 BSA의 양을 측정하였다. 각 페트리 접시의 칼슘 알긴산 시트에 BSA(1 mg/250 μ l)를 함유한 2.5, 7% Az-Ker 용액 100 μ l를 도포한 후 120초 동안 자외선(4000 mW/cm²)을 조사하여 BSA를 고정시켰다. 광 고정된 알긴산칼슘 시트를 증류수에 담가 60 시간 동안 BSA를 방출시켰으며, 방출된 BSA의 양은 UV/Vis 분광광도계를 사용해 측정하였다(도 8).

[0077] [실험예 5] 광반응성 아지도기를 포함하는 케라틴 유도체의 *in vitro* 특성 분석

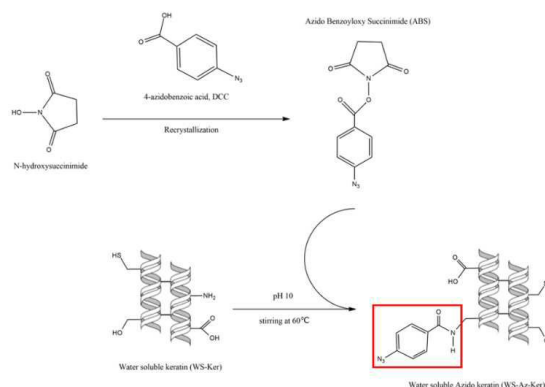
[0078] Az-Ker (광반응성 아지도기를 포함하는 케라틴 유도체)의 세포 독성을 평가하기 위해 칼슘 알긴산 시트에 2%, 5%, 또는 7%의 Az-Ker 용액을 UV 경화시킨 후 트랜스 웰(SPL, USA 제품)에 넣었다. 인간 각질 세포(HaCaT) 세포를 24웰 배양 플레이트의 웰 바닥에 5×10^3 세포/mL의 밀도로 시드(seeding)하고 CO₂ 5%가 포함된 분위기에서 10% 소 태아 알부민과 1% 페니실린-스트렙토마이신을 보충한 돌베코 배지 (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)) (Gibco, USA 제품)에서 37°C에서 배양하였다. 배양 배지는 48시간마다 교체하였으며 1일, 3일, 5일 배양한 후 세포 계수 키트 분석물(CCK-8) (도진도 연구소 구마모토, 일본 제품) 500 μ l를 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 상기 플레이트를 90분 동안 배양하고 각 배양 시료의 흡광도를 마이크로플레이트 흡광 분광광도계를 사용하여 450 nm에서 측정하였다.

[0079] 배양 5일 후, 모든 시료를 DPBS로 세척하고 4% (v/v) 파라포름알데히드로 고정화하고 이어서, DPBS 로 3회 세척하였다. 로다민 팔로이딘(Rhodamine phalloidin)(R415, Invitrogen, USA 제품)을 DPBS 중에서 1:200의 비로 희석하여 HaCaT 세포를 30분 동안 염색하였다. 핵은 DPBS 중에 1:1000의 비로 희석된 2-(4-아미디오노페닐)-6-인돌카르바미딘 디하이드로클로라이드 (시그마-알드리치, USA 제품)로 염색하였다. 염색된 시료는 형광 현미경 (EVOS M7000, Invitrogen, USA 제품)으로 관찰하였다.

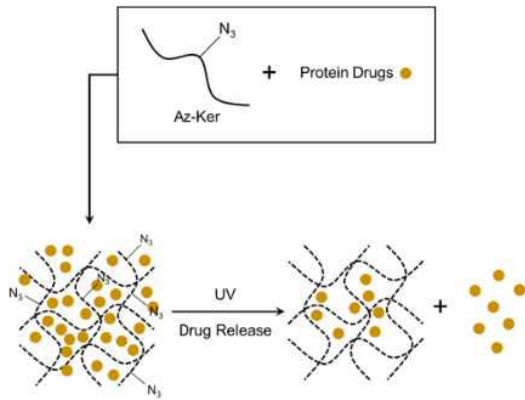
[0080] 상기 실험에 따른 세포 생존율 분석 결과를 도 9에 도시하고, 세포 증식을 실험 결과를 도 10에 도시하고, F-actin 염색 이미지를 도 11에 도시하였다. 도 9의 (b)로부터 본 발명에 따른 케라틴 유도체는 대조군(Cell only)과 세포 생존율이 유사한 바, 세포 독성이 없다는 것을 알 수 있다. 또한, 도 10의 (b)로부터 EGF를 담지한 본 발명의 약물 전달체 (Az-Ker + EGF)를 이용한 경우 (빨간색 그래프), 세포 증식율이 가장 우수하다는 것을 알 수 있으며, 이로부터 Free EGF를 사용한 경우에 비해 본 발명의 약물 전달체가 EGF를 더욱 안전하게 보호하여 세포 증식을 위해 전달할 수 있음을 알 수 있다. 또한, 도 11로부터 본 발명에 따른 Az-Ker 은 EGF를 담지한 약물 전달체로 사용하였을 때 세포에 EGF를 고르게 잘 분산 및 전달한다는 것을 확인할 수 있다.

도면

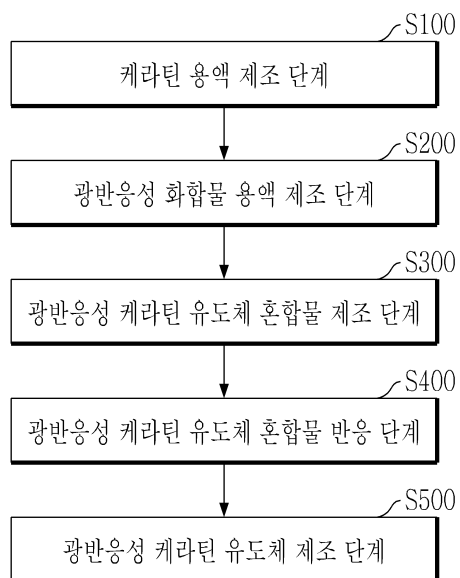
도면1



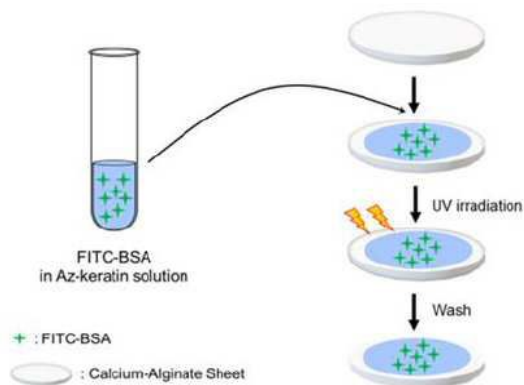
도면2



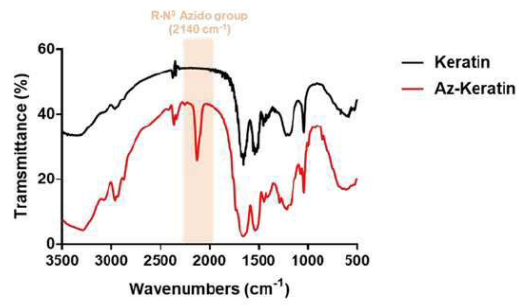
도면3



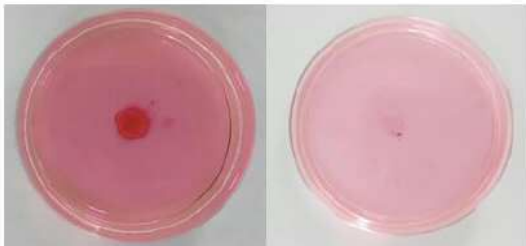
도면4



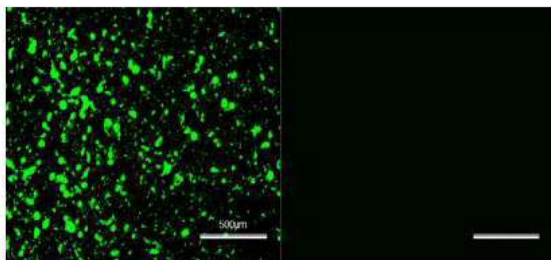
도면5



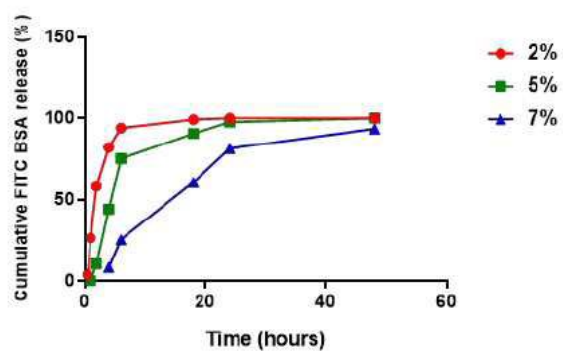
도면6



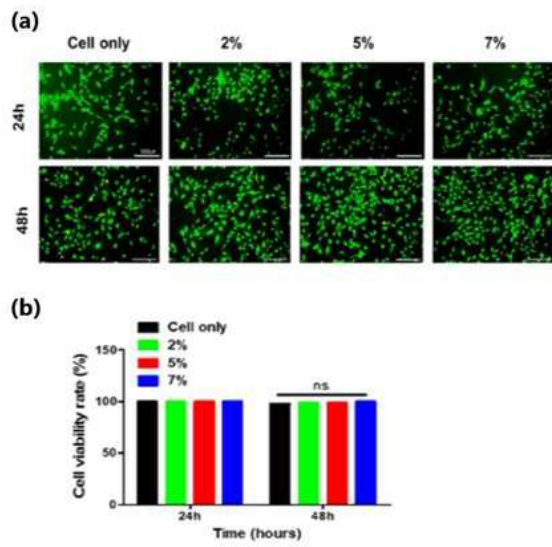
도면7



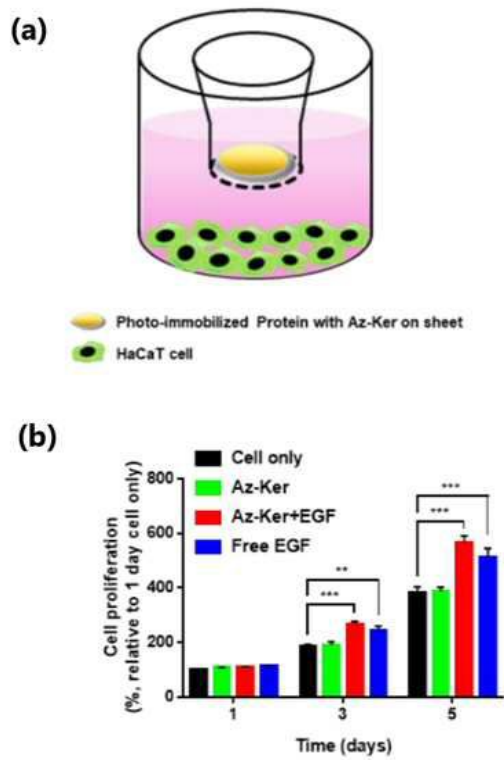
도면8



도면9



도면10



도면11

