



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0082864
(43) 공개일자 2017년07월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/47 (2006.01) A61K 8/67 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01) B82Y 5/00 (2017.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/4741 (2013.01)

A61K 8/671 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0002138

(22) 출원일자 2016년01월07일

심사청구일자 2016년12월16일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

황유식

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 616호 (회기동)

이상천

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 719호 (회기동)

이재형

서울특별시 동대문구 경희대로 26, 치의학전문대학원 305호 (회기동)

(74) 대리인

안소영

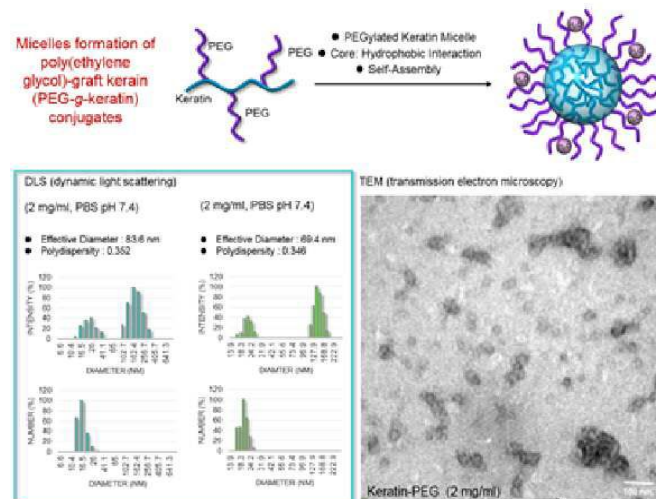
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 PEG화된 케라틴 나노입자

(57) 요약

본 발명은 케라틴의 아민기에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)이 결합된 PEG화된 케라틴 나노입자에 대한 것으로, 상기 나노입자는 그 내부에 소수성 생리활성물질을 담지할 수 있으며, UGT1A1의 발현을 촉진시킴으로써, 피부 주름의 예방 또는 개선, 미백, 또는 광채 향상에 탁월한 효과를 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61Q 19/02 (2013.01)

B82Y 5/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A5A2051387

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 기초의과학연구센터 (MRC) 과제

연구과제명 치아와 치주조직재생연구

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2009706

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단(학술진흥)

연구사업명 일반연구자 -기본연구

연구과제명 치아줄기세포의 크기에 따른 골형성세포 및 신경세포 분화능 연구와 이를 응용한 마이크로
골/신경조직 구현

기 여 율 50/100

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

케라틴의 아민기에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)이 결합된 PEG화된(PEGylated) 케라틴 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 소수성 생리활성물질이 담지된 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 생리활성물질은 레티놀, 플라보노이드 또는 그 혼합물 중 어느 하나인 나노입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 UGT1A1 발현 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 화장품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 조성물은 피부 주름의 예방 또는 개선; 미백; 또는 광채 향상용인 화장품 조성물.

청구항 7

i) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계;

ii) 단계 i)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계; 및

iii) 단계 ii)에서 생성된 PEG화된 케라틴을 pH 6 이상 pH 9 이하의 용매에 첨가하는 단계를 포함하는 제1항의 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조방법.

청구항 8

1) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계;

2) 단계 1)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계; 및

3) pH 9 이상의 용매에 PEG화된 케라틴 및 생리활성물질을 첨가한 후, 반응물의 pH를 6 이상 9 이하로 감소시키는 단계를 포함하는 제2항의 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 케라틴의 아민기에 PEG(polyethylene glycol)가 결합된 PEG화된(PEGylated) 케라틴 나노입자에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 용해도가 낮아 보통의 용매에는 거의 녹지 않는다. 케라틴은 생체에 포함되어 있는 물질이기 때문에, 생체적합성이 매우 높으나, 낮은 용해도 때문에 그 활용이 제한적인 실정이다.

[0003] 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, 이하 PEG)은 $\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{H}$ 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.

[0004] 한편, 플라보노이드 화합물은 식물화학물질(phytochemicals) 중 가장 주목받고 있는 생리활성물질의 하나로서, 항-자유 라디칼 특성 및 항산화 특성을 갖는 중요한 천연 물질 중 하나이다. 플라보노이드는 항산화 작용, 항암, 항혈전, 항염증, 항알러지 및 항균작용 등 다양한 생리활성을 나타내며, 자유 라디칼이 피부에 미치는 해로운 효과를 예방할 수 있어, 태양광과 피부 노화에 대한 보호 작용을 한다. 이와 같은 플라보노이드의 생리활성 효능이 널리 알려지면서 이 물질을 이용한 식품, 의약품과 화장품의 개발에 대한 관심이 증가되고 있다. 특히 화장품 분야에서는 플라보노이드의 피부 주름 개선, 미백, 보습력 강화, 항산화 효과에 주목하여 화장품 성분으로 다양하게 사용되고 있다.

[0005] 그런데 플라보노이드는 물과 오일에 대한 용해도가 매우 낮다는 문제점이 있다. 플라보노이드가 화장품 기제로 사용되는 경우, 물 또는 오일에 대한 용해도가 낮아 일정 농도 이상 적용할 경우 침상의 결정형태 그대로 분산 배합되기 때문에 거친 입자감을 많이 나타낸다. 즉, 플라보노이드는 생리활성 효과가 우수함에도 불구하고 화장품으로의 응용이 매우 제한적인 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-0781604호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 PEG화된 케라틴 나노입자를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 UGT1A1 발현 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 케라틴의 아민기에 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol, PEG)이 결합된 PEG화된(PEGylated) 케라틴 나노입자를 제공한다.

[0012] 본 발명에서 PEG화된 케라틴이란 케라틴의 아미노산 잔기에 PEG가 결합된 것을 의미하며, 본 발명 경우 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 구조를 의미한다.

[0013] 본 발명에서, 상기 케라틴은 상업적으로 이용가능한 임의의 케라틴을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는 본 발명의 케라틴은 사람 머리카락에서 추출한 케라틴을 사용할 수 있다.

[0014] 본 발명의 구체적인 일 실시양태에서 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 °C에서 72시간동안 반응시켜 케라틴을 수득하였다.

[0015] 본 발명에서, PEG는 예를 들어, 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜, 2염기산 폴리에틸렌글리콜, α, ω-비스(2-카르복시에틸)-폴리에틸렌글리콜, 0,0'-비스(2-브로모에틸)폴리에틸렌글리콜, 0,0'-비스(2-클로로에틸)폴리에틸렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 디메실산, 메톡시폴리에틸렌글리콜 아세트산, 0-[2-(3-숙시닐아미노)에틸]-0'-메틸-폴리에틸렌글리콜, 0-(2-브로모에틸)-0'-메틸폴리에틸렌글리콜, 0-(2-클로로에틸)-0'-메틸폴리에틸렌글리콜

리콜, 폴리에틸렌글리콜 모노메틸 에테르 메실산(mesylate), 알데히드 기능화 폴리에틸렌글리콜, 글리시딜이썬 기능화 폴리에틸렌글리콜, 나이트로페틸 카보네이트 기능화 폴리에틸렌글리콜, 메실(Mesyl) 기능화 폴리에틸렌 글리콜 또는 토실(Tosyl) 기능화 폴리에틸렌글리콜일 수 있으며, 바람직하게는 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌 글리콜일 수 있다. 상기 PEG의 분자량은 1000 내지 20000일 수 있으며, 바람직하게는 2000 내지 10000 일 수 있다.

[0016] 종래에 케라틴은 높은 생체 적합성을 가지고 있으나, 매우 낮은 용해도에 의해 생체재료 및 화장품 원료로서 사용에 제약이 많았다. 본 발명에서는 놀랍게도 케라틴을 PEG화하는 경우, 그 용해도를 크게 증가시킬 수 있음을 발견하였다.

[0017] 본 발명의 PEG화된 케라틴은 예를 들어, 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜 5000 용액에 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시몰폴리늄 클로라이드(DMTMM)를 첨가하여 교반한 후, 케라틴을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴은 마이셀 나노입자를 형성하여 소수성 생리활성물질을 담지할 수 있다. 상기 나노입자는 본 발명의 PEG화된 케라틴을 pH 6 내지 pH 9, 바람직하게는 pH 7 내지 pH 8, 가장 바람직하게는 pH 7 내지 pH 7.5의 용매에 첨가하고, 볼텍스(vortex), 교반 또는 음파처리(sonication)하여 형성시킬 수 있다.

[0019] 본 발명의 나노입자 형성에 사용하는 용매로는, 증류수, 이차수, 삼차수, 인산완충식염수, 정제수, 멸균수, C₁ 내지 C₄ 알코올 또는 에틸렌 글라이콜 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 삼차수 또는 인산완충식염수일 수 있다.

[0020] 본 발명의 나노입자 형성 시, PEG화된 케라틴은 0.2 (w/v)% 이상 5 (w/v)% 이하의 농도로 용매에 첨가될 수 있으며, 바람직하게는 0.2 (w/v)% 이상 0.5 (w/v)% 이하의 농도로 첨가될 수 있다.

[0021] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자의 크기는 PEG화된 케라틴이 첨가된 용액의 볼텍스, 교반 또는 음파처리 속도에 따라 조절될 수 있으며, 바람직하게는 20 nm 내지 500 nm, 더 바람직하게는 60 nm 내지 100 nm 일 수 있다.

[0022] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자에 담지되는 생리활성물질은 예를 들어, 레티놀, 플라보노이드 또는 그 혼합물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 생리활성물질의 나노입자 내 담지량은 1 중량% 내지 10 중량% 일 수 있으며, 바람직하게는 3 중량% 내지 8 중량%일 수 있다.

[0024] 본 발명의 구체적인 일 실시양태에서, PEG화된 케라틴을 pH 10.0의 삼차수 10 mL에 용해시키고, 낮아진 pH를 pH 10.0으로 다시 조절한 후, 별도로 레티놀을 DMSO에 용해시켜, 레티놀 용액을 PEG화된 케라틴 수용액에 교반하여 적가하고, 혼합하여 레티놀이 담지된 PEG화된 케라틴 나노입자를 제조하였다.

[0025] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 마이셀 형태이므로, 생리활성물질, 특히 소수성 생리활성물질을 효과적으로 담지할 수 있다.

[0026] 본 발명의 PEG화된 케라틴은 UGT1A1 효소 및 UGT1A1과 관련된 수용체인 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor), GR(Glucocorticoid Receptor), AhR(Aryl Hydrocarbon Receptor) 및 PXR(Pregnenolone Xenobiotic Receptor)의 발현을 향상시킨다.

[0027] UGT1A1은 다양한 생리활성물질들을 글루쿠론산화 하여 용해도를 증가시키는 역할을 하고, 레티놀의 단백 결합을 촉진시켜 세포핵 내 유입을 증가시키며, 빌리루빈을 대사시켜 체외로 배출시키는 유익한 효소이다.

[0028] 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 플라보노이드를 비롯한 용해도가 낮은 생리활성물질을 글루쿠론산화하여 용해도를 증가시킴으로써, 상기 물질의 활성을 향상시킬 수 있으며, 체내 빌리루빈의 배출을 촉진시킬 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 레티놀이 멜라노사이트 내부로 들어가 레티노산으로 전환되고, 레티노산이 단백질결합을 통해 세포핵으로 이동하는 과정을 촉진한다.

[0030] 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 레티놀의 생리활성을 향상시키는 효과가 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 UGT1A1 발현 촉진용 조

성물을 제공한다.

- [0032] 상기 PEG화된 케라틴 나노입자는 앞서 기술한 바와 같다.
- [0033] 본 발명의 조성물은, PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하고 있으므로, UGT1A1의 발현을 촉진시키는 효과가 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 케라틴의 아민기에 PEG가 결합된 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하는 조성물은 생리활성물질의 활성을 증가시키며, 빌리루빈의 배출을 증가시킴으로써, 피부 주름의 예방 또는 개선, 미백, 또는 광채 향상에 효과가 있다.
- [0036] 본 발명의 화장료 조성물은 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하므로, UGT1A1의 발현을 촉진시키며, 그에 따라 생리활성물질의 용해도 증가 및 빌리루빈을 배출시키는 효과가 있다. 또한 본 발명의 화장료 조성물은 PEG화된 케라틴 나노입자를 포함하므로, 생리활성물질, 예컨대, 레티놀의 생리활성을 증가시키는 효과가 있다.
- [0037] 본 발명에서 화장료 조성물은 PEG화된 케라틴 나노입자 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 색소 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 팩, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드록사본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 글리세롤, 글리세린, 지방족 에스테르, 페녹시에탄올, 트리에탄올아민, 폴리에틸렌 글리콜, 밀납, 폴리솔베이트 60, 솔비탄세스퀴오레이드, 파라핀, 소르비탄 스테아레이트, 친유형 모노스테아린산 글리세린, 스테아린산, 글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트, 카르복시폴리머, 시토스테롤, 폴리글리세릴 2-올레이트, 세라마이드, 콜레스테롤, 스테아레스-4, 디세틸포스페이트, 마카다미아 오일, 카르복시비닐폴리머, 산탄검 또는 소르비탄의 지방산 에스테르 등이 있다.
- [0042] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올, 부틸렌글리콜 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 하이드록시에틸셀룰로오스, 소디움히아루로네이트, 페녹시에탄올, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0044] 한편, 본 발명은 i) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시폴리늄 클로라이드(DMTMM)와 반응시키는 단계;
- [0045] ii) 단계 i)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계; 및

- [0046] iii) 단계 ii)에서 생성된 PEG화된 케라틴을 pH 7 이상 pH 9 이하의 용매에 첨가하는 단계를 포함하는 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0047] 상기 제 i) 단계는 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜의 숙신산 작용기를 활성화시키는 단계이며, 상기 제 ii) 단계는 케라틴의 아미노산의 아민 잔기가 숙시닐기와 반응하여 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계이다. 또한 상기 제 iii) 단계는 PEG화된 케라틴으로 나노입자를 형성시키는 단계이다.
- [0048] 상기 제 iii) 단계에서 사용되는 용매로는 증류수, 이차수, 삼차수, 인산완충식염수, 정제수, 멸균수, C₁ 내지 C₄ 알코올 또는 에틸렌 글라이콜 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 삼차수 또는 인산 완충식염수일 수 있다.
- [0049] 상기 제 iii) 단계에서 사용되는 용매의 pH는 pH 6.0 내지 pH 9.0일 수 있으며, 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 8.0, 가장 바람직하게는 pH 7 내지 pH 7.5일 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한,
- [0051] 1) 0-메틸-0'-숙시닐 폴리에틸렌글리콜을 4-(4,6-디메톡시-1,3,5-트리아진-2-일) 4-메톡시폴리닐 클로라이드 (DMTMM)와 반응시키는 단계;
- [0052] 2) 단계 1)에서 생성된 물질을 케라틴과 반응시켜 PEG화된 케라틴을 생성하는 단계; 및
- [0053] 3) pH 9 이상의 용매에 PEG화된 케라틴 및 생리활성물질을 첨가한 후, pH를 7이상 9 이하로 감소시키는 단계를 포함하는 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0054] 상기 제1) 단계 및 제2) 단계는 각각 앞서 제 i) 단계 및 제 ii)에서 기술한 바와 같으며, 생리활성물질은 예를 들어, 레티놀, 플라보노이드 또는 그 혼합물 일수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0055] 상기 제3) 단계는 생리활성물질을 봉입하여 PEG화된 케라틴 나노입자를 형성시키는 단계이다. 상기 제3) 단계에 있어서, PEG화된 케라틴 및 생리활성물질이 첨가되는 용매는 증류수, 이차수, 삼차수, 인산완충식염수, 정제수, 멸균수, C₁ 내지 C₄ 알코올 또는 에틸렌 글라이콜 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 삼차수 또는 인산완충식염수일 수 있다. 상기 제3) 단계에서 PEG화된 케라틴 및 생리활성물질의 첨가 후 감소시키는 용매의 pH는 pH 6.0 내지 pH 9.0일 수 있으며, 바람직하게는 pH 7.0 내지 pH 8.0, 가장 바람직하게는 pH 7 내지 pH 7.5일 수 있다.
- [0056] 본원발명의 제3) 단계에 있어서, 생리활성물질을 첨가하는 방법은 제한되지 않으나, 생리활성물질을 용매에 용해시켜 첨가하는 것이 바람직하다. 생리활성물질의 용해에 사용되는 용매는 첨가되는 생리활성물질의 용해도 및 극성 등을 고려하여, 약물을 변형시키지 않고 충분히 용해시킬 수 있는 용매 중에서 적절히 선택할 수 있으며, 예를 들어, 레티놀 또는 플라보노이드의 경우 DMSO를 용매로 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명의 제조방법에 의하면, PEG화된 케라틴 나노입자 및 생리활성물질을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 효과적으로 제조할 수 있다.

발명의 효과

- [0058] 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 생리활성물질, 특히 소수성 생리활성물질을 효과적으로 담지할 수 있다.
- [0059] 또한, 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 UGT1A1의 발현을 향상시키는 효과가 있어 다양한 생리활성물질의 글루쿠론산화를 촉진하여, 용해도가 낮은 물질들의 활성을 향상시키며, 빌리루빈의 배출을 증가시킨다. 더불어, 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 레티놀의 생리활성을 향상시키는 효과가 있다.
- [0060] 따라서 본 발명의 PEG화된 케라틴 나노입자는 빌리루빈 배출을 촉진하여 피부 미백, 광채 향상에 효과가 있으며, 플라보노이드, 레티놀 또는 그 혼합물을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자의 경우 피부의 미백, 광채 향상 및 피부 주름의 예방 또는 개선에 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 PEG화된 케라틴을 제조하는 방법을 도식화한 것이다.
- 도 2는 PEG화된 케라틴을 NMR 분석한 데이터이다.

도 3의 a는 PEG화된 케라틴 나노입자를 도식화한 것이고, b는 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기를 동적 광산란으로 측정한 그래프이며, c는 PEG화된 케라틴 나노입자를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 것이다.

도 4는 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기를 동적 광산란으로 측정한 그래프와 PEG화된 케라틴 나노입자를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 것을 나타낸 것이다.

도 5는 레티놀을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

도 6은 PEG화된 케라틴을 pH 9 이상의 용매에 첨가하였을 때 나노입자가 형성되지 않은 것을 확인한 것이다.

도 7은 케라틴 또는 PEG화된 케라틴을 케라티노사이트에 처리하였을 때의 UGT1A1의 발현 정도를 농도별로 나타낸 그래프이다.

도 8은 케라틴 또는 PEG화된 케라틴을 케라티노사이트에 처리하였을 때의 UGT1A1 및 관련 수용체의 발현을 농도별로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

<제조예> PEG화된 케라틴의 제조

제조예 1: 케라틴의 수득

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 °C에서 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 °C, 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.

제조예 2: PEG화된 케라틴의 합성

도 1에 제시된 반응과정으로 PEG화된 케라틴을 합성하였다.

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.

메톡시폴리에틸렌글리콜을 변형시킨 0-메틸-0'-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-메톡시몰폴리뉴 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.

제조예 3: PEG화된 케라틴의 정제

제조예 2의 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 클로저(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, 542 ℓ)에서 -70 °C로 24시간 동안 완전히 동결시켰다. 원심관 뚜껑을 열고, 동결건조기(ALPHA 2-4 LSC PLUS, Laboratory freeze dryers, Christ)에 넣고 -85 °C의 진공상태에서 완전히 파우더 형태

가 되도록 3일동안 건조시켰다.

[0071] **제조예 4: PEG화된 케라틴의 확인**

[0072] 제조예 3에서 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.

[0074] **<실시예 1> PEG화된 케라틴 나노입자의 제조**

[0075] 상기 제조예로 제조한 PEG화된 케라틴을 2 mg/ml 농도로 pH 7.4의 인산완충식염수(PBS)에 첨가하여 교반(stirring)하여 PEG화된 케라틴으로 구성된 나노입자를 형성시켰다.

[0076] 위 방법으로 얻은 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기(hydrodynamic diameter)를 동적 광산란을 통해 계산하였다. 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기가 약 65 내지 85 nm 인 것을 확인하였다.

[0077] **<실시예 2> PEG화된 케라틴 나노입자의 제조**

[0078] 상기 제조예로 제조한 PEG화된 케라틴을 2 mg/ml의 농도로 pH 9.0의 인산완충식염수(PBS)에 첨가한후 20 rpm의 속도로 교반(stirring)하여 녹인 후에, PEG화된 케라틴 용액에 1N HCl을 천천히 첨가하여 pH를 7.4까지 점차 감소시켜 PEG화된 케라틴으로 구성된 나노입자를 형성시켰다.

[0079] 위 방법으로 얻은 PEG화된 케라틴 나노입자의 평균 입자 크기(hydrodynamic diameter)를 동적 광산란을 통해 계산하였다. 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, PEG화된 케라틴나노입자의 평균 입자 크기는 약 85 nm인 것으로 확인되었다.

[0080] **<실시예 3> 레티놀 담지 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조**

[0081] 도 5에 제시된 과정으로 레티놀을 담지하는 PEG화된 케라틴 나노입자를 제조하였다.

[0082] 상기 제조예로 제조한 PEG화된 케라틴(50 mg)을 pH 10.0의 삼차수 10 mL에 완전히 용해시켰다. PEG화된 케라틴이 용해되면서 pH가 6.0으로 낮아져 0.1N NaOH를 사용하여 pH 10.0으로 조정하였다. 별도로 레티놀(5 mg)을 DMSO(2 mL)에 완전히 용해시킨 후, 레티놀의 DMSO 용액을 PEG화된 케라틴 수용액(pH 10.0)에 1200 rpm 속도의 교반하에 적가하여 혼합하였다. 혼합 용액을 삼투막 멤브레인(분자량 제한: 25,000 g/mol)을 이용하여 24시간 동안 과량의 pH 7.0 증류수로 삼투교환하였다. 최종적으로 삼투교환된 멤브레인백 내 수용액을 회수한 후, 48시간 동안 동결건조하여 레티놀 담지 PEG화된 케라틴 나노입자를 얻었다. 레티놀 담지 PEG화된 케라틴 나노입자 수율은 (레티놀 담지 나노입자)÷(PEG화된 케라틴+레티놀)의 식으로 계산하였으며 50%의 수율로 확인되었다.

[0083] PEG화된 케라틴 나노입자 내 레티놀의 담지량은 역상 HPLC (reverse-phase high-performance liquid chromatography)로 측정하였다. C₁₈ 역상 컬럼 및 0.5% 포름산/아세트나이트릴/증류수 혼합액을 유동상으로 사용하여, UV 검출기로 325 nm에서 흡광도를 측정하여 5.0 중량%로 레티놀이 나노입자내에 담지된 것을 확인하였다.

[0084] **<실시예 4> 플라보노이드(루테올린) 담지 PEG화된 케라틴 나노입자의 제조**

[0085] 상기 제조예로 제조한 PEG화된 케라틴(50 mg)을 pH 10.0의 삼차수 10 mL에 완전히 용해시켰다. PEG화된 케라틴이 용해되면서 pH가 6.0으로 낮아져 0.1N NaOH를 사용하여 pH 10.0으로 조정하였다. 별도로 루테올린(5 mg)을 DMSO(2 mL)에 완전히 용해시킨 후, 루테올린의 DMSO 용액을 PEG화된 케라틴 수용액(pH 10.0)에 1200 rpm 속도의 교반하에 적가하여 혼합하였다. 혼합 용액을 삼투막 멤브레인(분자량 제한: 25,000 g/mol)을 이용하여 24시간 동안 과량의 pH 7.0 증류수로 삼투교환하였다. 최종적으로 삼투교환된 멤브레인백 내 수용액을 회수한 후, 48 시간 동안 동결건조를 통하여 루테올린 담지 PEG화된 케라틴 나노입자를 얻었다. 루테올린 담지 PEG화된 케라틴 나노입자 수율은 (루테올린 담지 나노입자)÷(PEG화된 케라틴+루테올린)의 식으로 계산하였으며 50%의 수율로 확인되었다.

[0086] PEG화된 케라틴 나노입자 내 루테올린의 담지량은 역상 HPLC (reverse-phase high-performance liquid chromatography)로 측정하였다. C₁₈ reverse phase 컬럼 및 0.5% 인산/메탄올 혼합액을 유동상으로 사용하였으며, UV 검출기로 340 nm에서 흡광도를 측정하여 5.0 중량%로 루테올린이 나노입자내에 담지된 것을 확인하였다.

[0088] <비교예>

[0089] 실시예 1의 PEG화된 케라틴을 2 mg/ml 농도로 pH 9.0 이상의 인산완충식염수(PBS)에 첨가한 후 교반하였다.

[0090] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, pH 9 이상에서는 PEG화된 케라틴이 마이셀 나노입자를 형성하지 않는 것을 확인하였다.

[0092] <실험예> PEG화된 케라틴의 처리에 따른 케라티노사이트에서의 UGT1A1 mRNA 발현 향상 효과

[0093] 실험예 1: UGT1A1 발현 향상 효과

[0094] 1×10^4 cells/cm² 케라티노사이트(HACAT) 세포를 6웰 플레이트에 접종하고 24시간동안 인큐베이션한 후, 일반배지, 0.5 % (w/v) 케라틴 배지, 0.75 % (w/v) 케라틴 배지, 0.5 % (w/v) PEG화된 케라틴 배지 또는 0.75 % (w/v) PEG화된 케라틴 배지로 교체하였다. 24시간 또는 48시간동안 인큐베이션한 후, 배지를 제거하고 DPBS로 세척해 주었다. RNA를 추출하기 위해 하이브리드-R 키트(Gene A11)를 사용하였고, 나노드롭(MICROP UV-Vis Spectrophotometer M600)을 사용하여 정량하였다.

[0095] 1 µg의 RNA를 AccuPower[®] Cycle Script RT Premix (Bioneer, 대전, 한국)에 첨가해서 열순환기(T106, Bio-Rad)를 이용해 cDNA를 만들었다. 사용한 프라이머의 서열은 하기 [표 1]과 같다.

[0096] [표 1]

	sense	antisense
UGT1A1	5'-GAG AGA GGT GAC TGT CCA GGA C-3'	5'-CAA ATT CCT GGG ATA GTG GAT TTT-3'
β-Actin	5'-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3'	5'-TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG-3'

[0097]

[0098] 각각의 반응에 SYBR Green PCR Mix 10 µL, 0.5pmole의 프라이머(sense와 antisense)와 50nmole의 주형(template)을 넣어주었다. RT-PCR은 RG6000 5plex HRM (Corbett Research)기기를 사용하였으며, 95 °C에서 15 초, 어닐링(annealing) 온도 57 °C에서 45초로, 40 사이클을 설정하였다.

[0099] 역치주기(Threshold cycle, Ct) 값을 측정하기 위해, 상대정량(comparative Ct ($2^{-\Delta \Delta Ct}$))법을 사용하였다.

[0100] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 케라틴 및 PEG화된 케라틴을 처리한 경우, UGT1A1 mRNA의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 구체적으로, PEG화된 케라틴을 처리한 세포에서는 24시간 만에 UGT1A1 발현이 크게 증가하였으며, 48시간 후에는 케라틴을 처리한 세포에서의 UGT1A1 발현이 크게 증가함을 알 수 있었다.

[0101] 따라서, 케라틴은 UGT1A1 발현 향상 효과가 있으며, PEG화된 케라틴의 경우 흡수가 용이하여 신속히 UGT1A1의 발현을 향상시키는 것으로 볼 수 있다.

[0102] 실험예 2: UGT1A1 관련 수용체 발현 향상 효과

[0103] 실험예 1-1과 동일한 방법으로 멤브레인 및 시토솔 수용체인 EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor), GR(Glucocorticoid Receptor), AhR(Aryl Hydrocarbon Receptor) 및 PXR(Pregnenolone Xenobiotic Receptor)의 mRNA의 발현을 확인하였다. 사용한 프라이머의 서열은 하기 [표 2]와 같다.

[0104] [표 2]

	sense	antisense
UGT1A1	5'-GAG AGA GGT GAC TGT CCA GGA C-3'	5'-CAA ATT CCT GGG ATA GTG GAT TTT-3'
β-Actin	5'-GTC AGG CAG CTC GTA GCT CT-3'	5'-TCG TGC GTG ACA TTA AGG AG-3'
EGFR	5'-TGC TGT CCT GTT CAC CAC TC-3'	5'-TCA TCC TCA TCA TCT TCA CAT TG-3'
GR	5'-CT AAT GGC TAT TCA AGC CCC AGC AT-3'	5'-TGA TTT CAG CTA ACA TCT CGG GGA ATT CAA T-3'
AhR	5'-TG GTC TCC CCC AGA CAG TAG-3'	5'-TTC ATT GCC AGA AAA CCA GA-3'
PXR	5'-GCA AGG GCT TTT TCA GGA-3'	5'-TCT TCC GCT TGA TCA AGG-3'

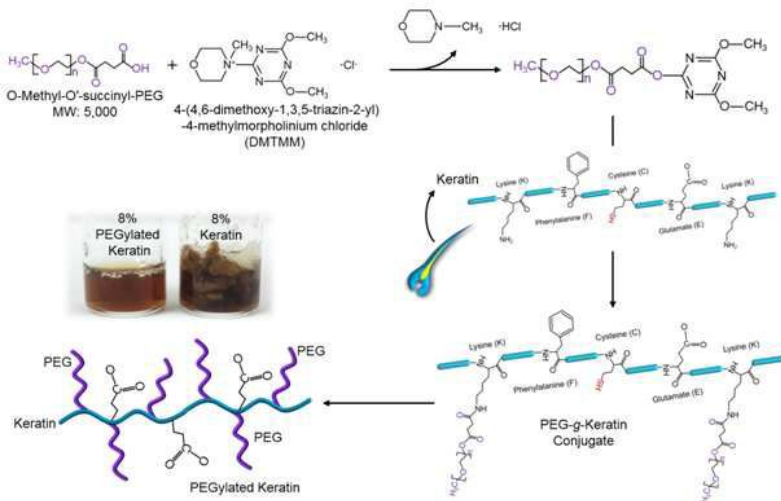
[0105]

[0106] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 케라틴 또는 PEG화된 케라틴을 처리한 경우, UGT1A1 관련 수용체인 PXR, EGFR, GR 및 AhR의 발현이 증가함을 확인할 수 있었으며, PEG화된 케라틴이 케라틴보다 발현 향상 효과가 더 큰

것을 알 수 있었다.

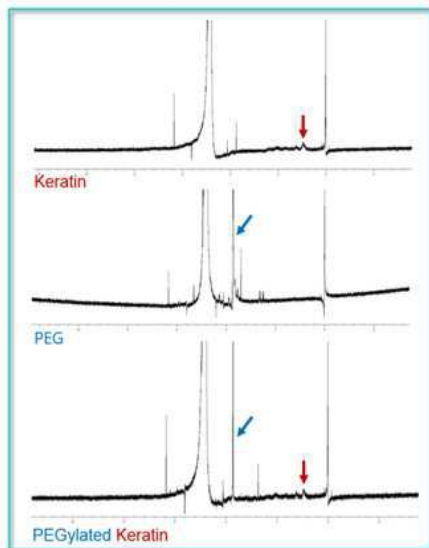
도면

도면1

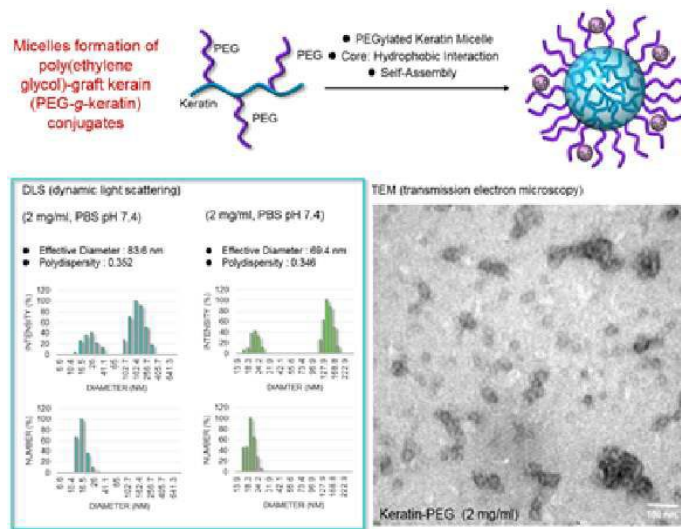


도면2

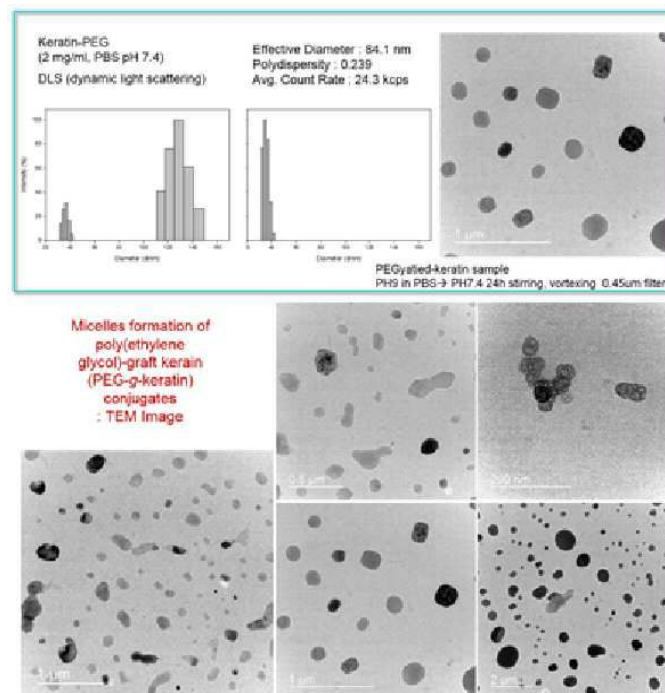
NMR Analysis of poly(ethylene glycol)-graft keratin (PEG-g-keratin) conjugates



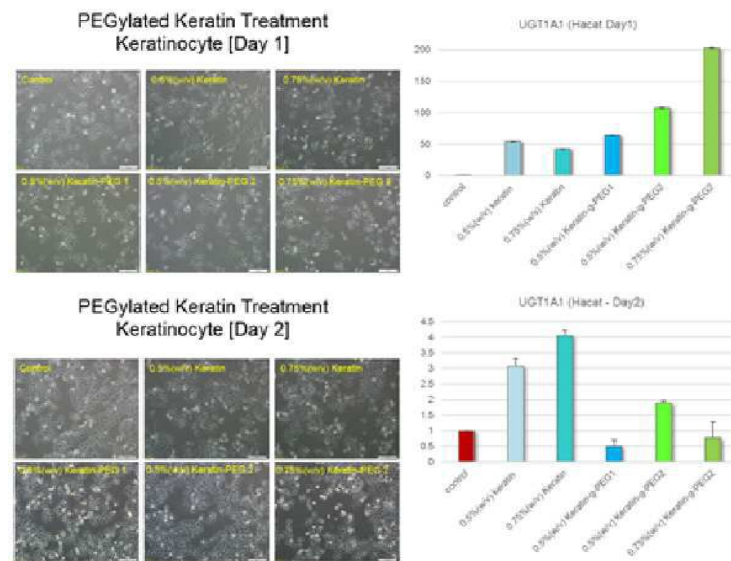
도면3



도면4



도면7



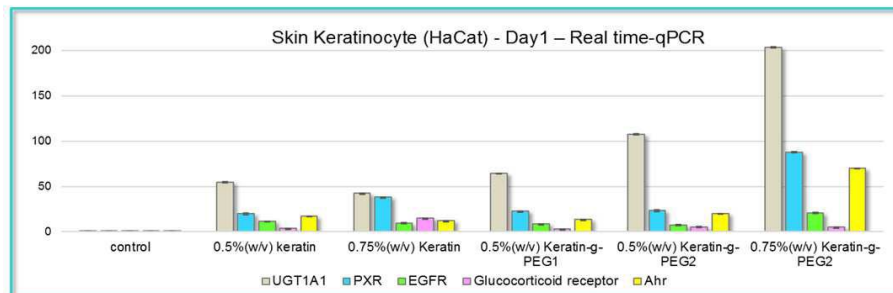
도면8

Receptors related to UGT1A1 Expression

- EGF-R: Cell Surface Receptor
- Constitutive Androstane Receptor (CAR): Nuclear Receptor
- Glucocorticoid Receptor: Cytosol Receptor
- Aryl hydrocarbon (Ah) receptor: Nuclear Receptor
- Pregnenolone Xenobiotic Receptor (PXR): Nuclear Receptor

● AhR mediated Signaling?

● CAR/PXR mediated Signaling?



UGT1A1 Upregulation-related Characteristics

HGF	CYP2B6 ↑, CDK2 ↓, Cell Proliferation ↓ (Only effective in Hepatocyte, not in CaCo2)
EGF	Cell Proliferation ↑, EMT ↑
Cortisol	Glucocorticoid Receptor & CAR/PXR mediated
AhR	EMT ↑, Cell Cycle Block, Uncontrolled Proliferation (Proliferation ↑), Tumor Progression, Cell Differentiation ↑ [Loss of Cell to Cell Contact induces AhR ↑ / Cell density mediated AhR localization] [in HACAT, AhR Localization: Nuclear Space in Low Cell Density / Cytosol Space in High Cell Density]
CAR/PXR	

서열 목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY
- <120> Pegylated keratin nanoparticle
- <130> P15-159-KHU
- <160> 12
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of UGT1A1

<400> 1

gagagaggtg actgtccagg ac 22

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of UGT1A1

<400> 2

caaattcctg ggatagtgga tttt 24

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of beta-actin

<400> 3

gtcaggcagc tcgtagctct 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense primer of beta-actin

<400> 4

tcgtgcgtga cattaaggag 20

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense primer of Epidermal Growth Factor Receptor

<400> 5

gcaagggtt tttcagga 18

<210> 6

<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense primer of Epidermal Growth Factor Receptor	
<400>	6	
	tcatctcat catcttcaca ttg	23
<210>	7	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense primer of Glucocorticoid Receptor	
<400>	7	
	ctaattggcta ttcaagcccc agcat	25
<210>	8	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense primer of Glucocorticoid Receptor	
<400>	8	
	tgatttcagc taacatctcg gggaattcaa t	31
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	sense primer of Aryl Hydrocarbon Receptor	
<400>	9	
	tggtctcccc cagacagtag	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	antisense primer of Aryl Hydrocarbon Receptor	
<400>	10	

ttcattgccg gaaaaccaga	20
<210> 11	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> sense primer of Pregnenolone Xenobiotic Receptor	
<400> 11	
gcaagggttt tttcagga	18
<210> 12	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antisense primer of Pregnenolone Xenobiotic Receptor	
<400> 12	
tcttcgctt gatcaagg	18