116159-02

히알루론산을활용한고기능성피부외용제의제조및제품화기술개발 최종보고서

2019

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부

발간등록번호
11-1543000-002627-01

히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발

최종보고서

2019. 3. 27.

주관연구기관 / (주)진우바이오

협동연구기관 / 고려대학교

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발” (개발기간 : 2016.12.05 ~ 2018.12.04)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 01. 15.

주관연구기관명 : ㈜진우바이오 (대표자) 권 동 건 (인)

협동연구기관명 : 고려대학교산학협력단 (대표자) 고 제 상 (인)

주관연구책임자 : 권 동 건
협동연구책임자 : 임 승 택

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116159-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.12.05. ~ 2018.12.04	단 계 구 분	2/2
연 구 사 업 명	단 위 사 업	농생명산업기술개발사업			
	사 업 명	농식품창업·벤처지원 R&D바우처시범사업			
연 구 과 제 명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발			
연 구 책 임 자	권동건	해당단계 참여연구원 수	총: 11명 내부: 11명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 150,000천원 민간: 50,000천원 계: 200,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 11명 내부: 11명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 300,000천원 민간: 100,000천원 계: 400,000천원
연구기관명 및 소 속 부 서 명	㈜진우바이오			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위 탁 연 구	연구기관명: 고려대학교산학협력단			연구책임자: 이성준	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	보안 (특허권 출원되고 일부 확보하였으므로 공개해도 무방하나 PCT 출원과 등록 완료를 위해 가능하다면 3년 정도 보안 유지 요청)

9대 성과
등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	○	○	○								

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약	보고서 면수
1. 생체 적합성이 있고 항노화 효과가 우수한 히알루론산 (HA)의 추가 기능성 향상과 안정성 증대를 위해 조직 재생 능력이 우수한 Poly(deoxynucleotide) (PDRN)를 사용하여 이온 결합에 의한 HA-PDRN complex 제조 공정 확립 2. HA-PDRN complex의 대량 생산 공정 확보를 통한 다양한 형태의 피부 외용제로 활용한 시제품 생산을 통한 원가 파악 -화장품과 피부 외용제 또는 조직수복용 의료기기 3. 제품화를 위한 차별화된 기능성 자료 확보 4. 관련 기술 특허 출원 완료 5. 2019년도 당사가 구비할 의약, 의료기기, 의약외품 관련 GMP 생산 기지에서 생산 판매 진행 또는 화장품 또는 피부 외용제를 전문으로 하는 제약 기반 전문업체에 기술이전 예정	70

<요약문>

연구의 목적 및 내용	I. 연구 목적 1. 히알루론산(Sodium Hyaluronate, Hyaluronic Acid) (HA)에 Poly(deoxy-ribonucleotide) (PDRN) 도입을 통한 HA-PDRN complex 제조 조건 확보 - 피부외용제로 활용하기 위한 최적 HA-PDRN complex 제조 조건 확립 2. PDRN 도입에 따른 HA의 특성과 구조 변화 확인 - 기계적 특성, 열적 특성, 안정성, 분해성 등 측정 3. PDRN 도입에 HA의 기능성 향상 확인 - 항노화 관련 (콜라겐 생성, 피부 세포 재생 능력 등) 4. HA-PDRN complex 제품화 기술 확보 (특허 출원, 시제품 제조) - 제품화를 위한 대량생산 조건 확립 / 특허권 확보 II. 내용 1. HA-PDRN complex 제조 1) HA 관련 미생물 발효/정제 후 분말화를 위한 최종 결정화 단계에서 다양한 salt를 활용하여 Na-, K-, Ca-Hyaluronate 대량생산조건 확립 2) Salt별 HA의 물리적 특성 확인 3) 최적 HA-PDRN complex 형성 조건 확립 - Salt별 HA-PDRN complex 형성 및 반응 형성 위한 pH 범위 확인 4) HA-PDRN complex의 구조 변화 및 물성 변화 확인 2. HA-PDRN complex 효능 관련 기능성 확인 1) HA의 분자량별 기능성 확인 - 피부외용제로 활용하기 위한 최적 분자량 확인 2) PDRN 도입에 따른 HA-PDRN complex의 항노화 관련 기능성 확인 -피부 조직 재생 능력이 뛰어난 PDRN 도입에 따른 기능성 향상 확인 3. HA-PDRN complex 활용한 시제품 제조 - 피부외용제 (미스트와 세럼 형태) 및 경피용 필름 형태의 제품화를 위한 대량생산 조건 확립과 제조 원가 파악
연구개발성과	특허 출원 4건, 특허 등록 1건, PCT 출원 1건, SCI 논문 1건, 학술 발표 4건, 제품화 1건, 투자 유치 1건
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	1. 제품화 1) 시제품 생산 통해 원가 파악 (화장품/피부 외용제/조직수복용 의료기기) 2) 특허 출원을 통한 기술 확보 3) 제품화 위한 법규 검토 완료 4) 2019년도 당사가 구비할 의약, 의료기기, 의약외품 기반 GMP 생산 기지에서 생산 판매 진행 또는 화장품 또는 피부외용제로 제약 기반 전문업체에 기술이전 2. 판로 확보 계획 1) 수출 관련 - 중국의 C사, H사, S사 등을 통해 중국 내 등록하여 판매 진행 예정 2) 국내 판매 관련 - 국내 화장품과 제약 또는 의약외품, 의료기기 전문업체와 제휴/기술이전으로 판매 진행/병원 기반업체에 기술이전을 통해 제품화 예정 (협의 진행 중) 3. 기대 효과 1) HA-PDRN complex의 제조 기술을 확보하여 기존 HA 및 PDRN 응용 분야에 모두 진입 가능 2) 현재 가격 경쟁력이 심한 화장품용/피부외용제용 HA와 PDRN 원료 시장 상황에서 차별화된 HA-PDRN complex 제조 기술을 확보하여 이를 통해 고부가가치 제품화 가능 3) HA는 당사 원료 OEM 생산기지인 중국 (B사)에서 생산/활용, PDRN의 경우 당사 전략적 파트너사인 일본(M사)에서 원료를 입수/활용하여 이를 한국 내에서 HA-PDRN complex 제형을 개발하여 이를 고부가가치 제품화 가능

국문핵심어 (5개 이내)	히알루론산	DNA유사체	히알루론산- DNA 복합체	항노화	피부외용제
영문핵심어 (5개 이내)	Hyaluronic Acid	Polydeoxyribo- nucleotide	HA-PDRN complex	Anti-aging	Skin External Agent

<본문목차>

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의 개요 ····· 8
2. 연구수행 내용 및 결과 ····· 13
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 ····· 58
4. 연구결과의 활용 계획 등 ····· 59
붙임. 참고 문헌 ····· 61

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

(1) 히알루론산(Sodium Hyaluronate, Hyaluronic Acid) (HA)이란?

○ 미생물 배양에 의해 생산되는 HA는 생체 내에서 피부 보습과 피부 노화에 관여하는 피부 주요 성분 (Lapcik. et. al., 1998)

○ 또한 관절 내 연골 부분의 주성분 물질인 고분자 다당체로써, 화장품, 식품, 의약품 용도로 광범위하게 사용 중

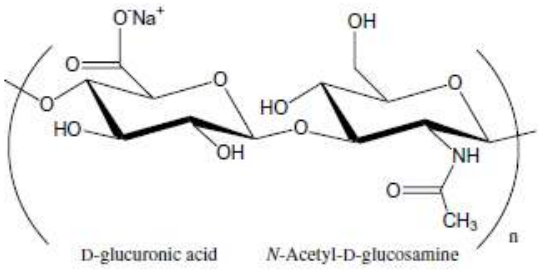


그림 1. HA의 화학적 구조

○ 생체 적합성 물질로 항노화 관련 화장품용 피부 보습용 소재와 의료용 관련 관절 주사제 및 성형 필러 등으로 활용 중임

○ 인체 내에서 상처 치유와 조직 재생 등에도 관여하지만 주로 Space Filler로서 공간을 채워 주는 물리적 역할 수행함

○ 고점도성, 보습성, 생체 적합성 등의 특징을 지닌 수용성 다당류의 생체 고분자 물질로서 콜라겐 및 엘라스틴과 함께 피부 3대 요소 중의 하나임

○ 피부 속 HA는 섬유아세포에서 생성되며, 진피에서 수분과 결합되어 세포가 정상적으로 활동할 수 있는 환경을 조성하는 중요한 역할을 담당

○ 체내에 존재하는 HA는 고분자량의 다당류로서 사람의 눈 조직, 혈관벽, 피부, 탯줄, 연결 근육, 관절 등에 널리 분포하며, 세포의 분화와 증식에 중요한 역할을 담당 (Kolar et. al., 2008)

○ 세포의 활발한 이동과 증식이 이루어지는 재생 및 재형성 과정 중의 조직에 풍부하게 존재하는 것은 HA이 초기 조직 치유반응에 관여하는 것을 시사하며, 실제로 이를 뒷받침하는 연구가 많이 이루어져 있음

○ 이러한 HA은 특히 인체 피부에서 노화와 함께 감소되는 것이 보고되었고, 이는 피부 탄력 저하 및 수분 함유량 감소의 직접적인 원인 중 하나로 확인됨 (Bonte et. al., 2007, Karakiulakis et. al., 2012)

○ HA은 β-D-glucuronic acid와 β-D-N-acetylglucosamine이 상호 결합으로 이루어진 다당류 (그림 1 참조)로 물에 녹아 매우 점성을 띠는 액체를 이루며, 그 분자량은 기원, 제조 및 정제 방법에 따라 $1.0\times10^{3}\sim1.0\times10^{7}$ Da으로 매우 다양함 (Becker et. al., 2009)

○ 그러나, HA는 체내 분해 효소에 의해 빠르게 분해되어 혈액 내 반감기가 수 분 정도로 매우 짧기 때문에 이러한 HA의 불안정성을 개선하기 위해 'HA 유도체'에 대한 연구도

많아지고 있으며, 동시에 고분자량의 HA 분자량을 낮추어 피부 흡수가 용이한 화장품 용도로 응용하려는 연구가 활발히 진행 중임 (Farwick et. al., 2011, Piot et. al., 2016))

(2) HA 원료 시장 현황

○ HA 원료 제조에 관한 대부분의 기술 부분은 특허권은 만료되어 생산 기술(HA 균주, 배양 설비, 정제 설비)을 보유하고 있는 업체일 경우 생산과 판매가 모두 가능함

○ 중국산 제품이 가격 경쟁력을 구비하여 전 세계 유통 물량의 90% 이상 점유

○ 기존 발표된 여러 연구 논문에서 피부 투과율이 높은 것으로 알려진 저분자 HA 원료의 활용이 증대 중

-그러나, 산처리와 열처리 등에 의해 HA가 저분자화 되면서 수율 저하 등의 문제로 고가의 가격으로 판매되고 있음

(3) HA 활용 완제품 시장 현황

○ 화장품용의 경우

- 무게 기준 일반적으로 화장품 내에 0.01~0.05% 함유된 액상 형태로 제품화
- 피부 흡수가 곤란한 고분자 HA 제품 대신 최근 (초)저분자 HA를 활용한 피부 투과와 흡수율 등을 강조한 화장품 군 등장
- HA 가격이 대중화되고 항노화 관련 소대로서 효능과 안전성 등의 인지도가 증가하면서 HA 활용 완제품군 사용량 증대

○ 기타 HA를 활용한 의약, 의료기기 제품 증대 중

(4) Polydeoxyribonucleotide (PDRN)란?

○ 연어나 송어의 정액 DNA 추출물이며, 조직 재생을 돕는 성분으로 세포 재생에 효과가 있고 인체 태반 대체물로 사용되고 있음 (Balbi et. al., 1996)

○ DNA 유사체로서 현재 피부 재생 관련 의약품 등 다양한 용도로 제품 개발 중

○ 인체 내에서 미토콘드리아 활성화 등 통해 피부 재생 능력 향상 등에 생리학적으로 관여하는 것으로 알려짐

○ PDRN은 생체 내(인체의 태반) 극미량 존재하는 핵산 기반의 생리 물질로서 조직 재생에 관련한 여러 자극을 일으켜 상처 치유 작용이 뛰어난 것으로 알려져 있음 (Tonello et. al., 1996)

○ 최근 연어/송어 정자에서 추출한 PDRN이 인간 태반 PDRN과 같이 조직 재생 효능을 나타내는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 기능들을 활용하여 피부 이식 후 재생, 족부 궤양, 욕창, 화상, 건, 인대 재생, 각막 재생 등 다양한 인체조직의 재생 목적으로 사용 중임 (Altavilla et. al., 2008)

○ PDRN을 이용한 세포 재생 촉진제는 이미 유럽에서 송어 추출성분을 제품화하여 상처 치유 및 미용 시술 등에 사용

○ PDRN은 고온 추출 공정을 거치며 부가적인 약리학적 활성 단백질 및 펩타이드 첨가 없이 순도 95%의 활성 성분이 포함될 수 있음 (Bianchiniet al., 1981)

- 이 화합물은 50~2,000 염기쌍 길이를 갖는 데옥시리보뉴클레오타이드 중합체로 형성되어 있으며, 퓨린 및 피리미딘 디옥시뉴클레오사이드/디옥시리보뉴클레오타이드 염기들이 포함됨

(Galeano et al., 2008)

○ PDRN의 조직 재생 기전

- PDRN은 4개의 adenosine 수용체 중 adenosine A2 수용체에 작용하는데 조직 손상 회복 과정에 관여하여 IL-6, TNF-α, HMGB1과 같은 염증유발 cytokine은 줄여주고, IL-10과 같은 항염증 cytokine level은 높여줌
- 세포증식 단계에서는 혈관 내피세포 성장인자(VEGF), 섬유아세포인자(FGF), 상피세포성장인자(EGF) 등 각종 성장인자의 분비를 활성화하여 신생혈관생성과 fibroblast, osteoblast, chondrocyte 등의 blast cell의 분화를 유도하며, 조직 리모델링 단계에서는 콜라겐, 비콜라겐성 단백질의 고른 분비로 정상적인 ECM(extracellular matrix)을 생성하게 함
- 또한 PDRN은 우회경로(salvage pathway) 활성화를 통해 적은 에너지로 신속하게 DNA합성 및 세포 재생을 유도함

5) PDRN 원료 시장 현황

- 국내 2~3개 제약사가 제조 방법과 추출원에 대한 문제로 특허 소송 진행 중

6) PDRN 완제품 시장 현황

- 조직 재생용 주사제로 항노화 관련 의약용 주사제로 시장 확대 중임
- 판매가가 kg당 1억 이상의 고가 소재이므로 화장품과 같은 용도로 사용 할 수 없음

1-2. 연구개발의 필요성

(1) HA 관련

○ HA는 체내 분해 효소에 의해 빠르게 분해

○ 혈액 내 반감기가 매우 짧기 때문에 불안정한 HA의 단점을 개선하기 위해 'HA 유도체'에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음

○ HA는 화학적으로 변성시킬 경우 신규 물질로 인식되어 신규 물질로의 등록 및 안전성 확인이 반드시 필요함

○ 따라서 의약품 등의 용도가 아닌 식품용/화장품용으로 활용하기 위해 화학적으로 변성된 HA는 여러 인허가 단계를 거치게 되어 이에 따른 고액의 비용 발생으로 제품화 진행이 어려움

(2) PDRN 관련

○ 조직 재생 효과에 기인하여 최근 항노화 관련 의약용 주사제로 시장 확대 중

○ 면역 증강 등의 효과로 동물성 태반 대체 물질로 활용 범위 확대 중

○ 그러나 현재 국내에서 생산되는 PDRN은 kg당 1억 이상의 높은 가격으로 인해 화장품과 같은 상품(화장품 등)의 용도로 사용 불가

(3) 필요성

○ HA의 제품 안정성 증대를 위한 분해 저항성 향상과 추가 항노화 관련 추가 기능성 증대를 위한 차별화 제품 개발을 위하여 식품용/화장품용 PDRN (일본 M사)을 사용하여 안정성과 기능성이 향상된 고기능성 변성체를 제조하여 차별화된 고부가가치 소재 개발이 필요함

○ 추가적으로 사용할 식품, 화장품용 PDRN 원료의 의약용 PDRN 원료와의 피부 노화 관련 기능의 유사성 확인을 통한 제품화 가능성 확인 필요

○ HA-PDRN complex 제조와 HA-PDRN 제형화물의 물리적 특성 연구 및 피부 기능성에 관한 연구는 현재 국내외 모두 전무함

○ 기존 HA의 단점(고가, 짧은 체내 지속성 등)을 보완할 수 있었으며 HA 및 PDRN 응용 분야 개발에 모두 활용이 가능한 새로운 소재로 검증할 기회임

○ 변성체 제조 시 특수 용매/반응물 등을 사용한 화학적 반응 유발이 아닌 일반 정제수를 이용한 수용액 상 제형화 과정에서 complex 형성 반응 유발 (그림 2)

○ HA의 안정성과 조직 재생능이 증가된 HA-PDRN complex 제조 기술을 확보하여 일반 화장품/기타 조직 수복용 재료로의 제품화가 시장 진입에 용이할 것으로 예상됨

○ 항노화 및 뷰티 관련 신규 제형 개발과 시장 진입을 통해 경제·산업적으로도 높은 가치가 있을 것으로 기대됨

○ 추가로 HA-PDRN complex 형성을 통한 분자량 증대와 용액 상에서의 점성 증대를 통해 다양한 형태의 고점도 제형화 제품화 가능성 확인 가능

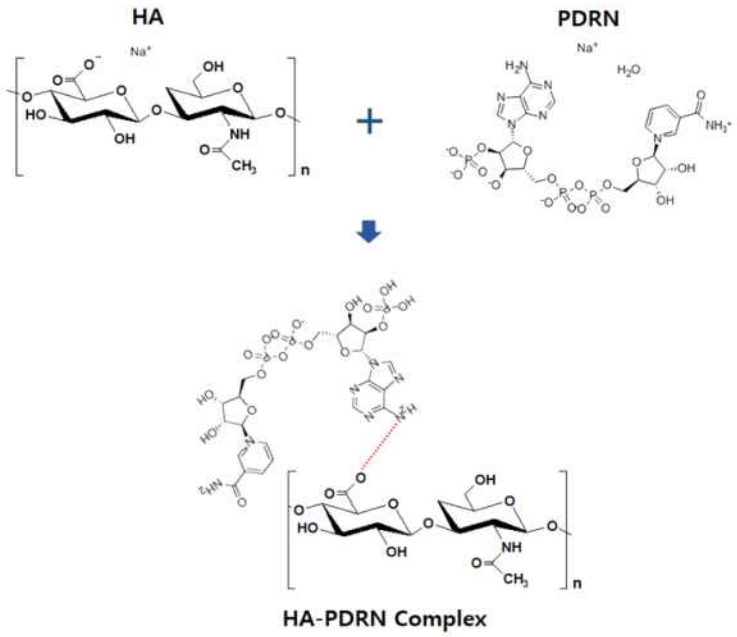


그림 2. HA-PDRN complex 형성 반응 scheme

1-3. 연구개발 범위

(1) HA-PDRN complex 제조

❍ HA 관련 미생물 발효 후 결정화 시 다양한 salt기를 가진 HA 대량생산 조건 확립

- 미생물 발효 후 최종 정제공정에서 NaCl, KCl, $CaCl_2$를 활용하여 다양한 salt기를 가진 HA 제조 조건 확립

❍ Salt별 HA의 물리적 특성 확인

- 해리도, 용해성, 열적 특성, 분해성 등

❍ 최적 HA-PDRN complex 형성 조건 확립

- Salt별 HA-PDRN complex 형성 확인
- Complex 반응을 형성시키기 위한 pH 범위 확인

❍ HA-PDRN complex의 구조변화 및 물성 변화 확인

- FT-IR 분석 등을 통한 구조 확인
- 물리적 특성 확인(안정성, 열적 특성, 분해성, 기계적 특성)

(2) HA-PDRN complex의 항노화 관련 효능 관련 기능성 확인

○ HA의 분자량별 피부 기능성 확인

- 다양한 피부 외용제로의 활용을 위한 용도별 최적 분자량 확인

○ PDRN이 도입된 HA-PDRN complex의 차별화된 기능성 확인

- HA-PDRN complex의 항노화 관련 안전성 및 피부 기능성 확인

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 이론적, 실험적 접근방법, 연구내용, 연구결과

Ⅰ. (주관) 히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발

※ 1차년도

1. 최적 HA-salt 확인과 최적 HA 분자량 설정

가. 최적 HA-salt 대량생산 조건 확립

(1) HA 균주 배양 및 생산

(가) 실험방법

- 당사 보유 3개의 균주를 사용하여 배양 (KCCM 11360P, KFCC 11860P, KFCC 11861P)
- 균주별로 동물성 배지와 식물성 배지 등을 사용하여 확인된 최적 배지 조성에서 고농도의 HA 생산 균주 배양

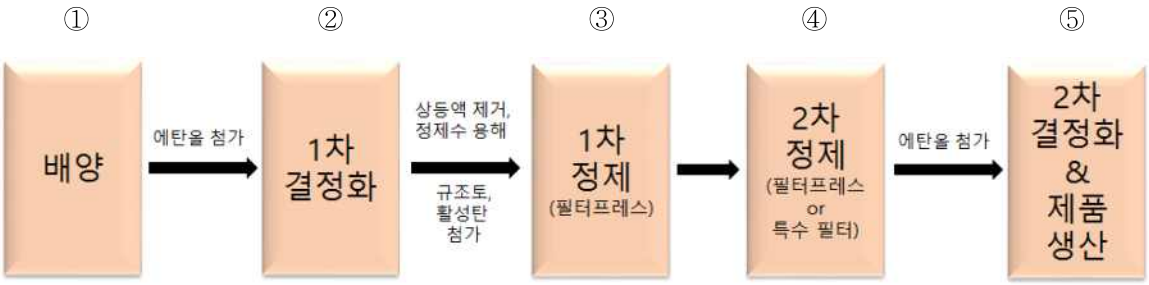


그림 3. HA 생산 도식도

(나) 실험결과

- 3단계 1차 정제 중 열처리 정도와 5단계 2차 결정화 후 열처리 유무를 통해 최종적으로 다양한 분자량의 HA를 고농도로 생산하는 기술 확보
- 분자량 HA (5종) : 10k대, 0.1MDa대, 0.8MDa대, 1.2MDa대, 2.0MDa 이상
- 배양기 5t에서 1회 50kg 이상 생산 가능한 대량생산 기술 확보
- 제조공정서(SOP)와 배치 레코더 구비 완료

표 1. 제조된 HA 성분 분석 결과

항목	결과치
Hyaluronic acid 함량(%)	>95.0
Protein (%)	≤0.1
Bacteria count (*cfu*)	≤10.0

(2) Salt 처리에 의한 다양한 HA-salt 제조

(가) 실험방법

① 그림 3과 같이 HA 균주를 사용하여 배양 완료 후 생산된 HA를 2~3의 단계에서 정제수에 0.3~0.5% 내외로 용해 후 정제 진행

② 이때 다양한 salt기 도입을 위해 5의 단계 직전에 HA와 salt(NaCl, KCl, $CaCl_2$)간의 무게비를 1:3(분말 기준)의 비율로 하여 HA 정제액에 첨가하여 용해
③ 에탄올을 적가하면서 강하게 교반
④ 세척 후, 상등액을 제거하고 침전물을 회수하여 drying oven에서 40℃로 건조 시킴

(나)실험결과
- 다양한 염(Na, K, Ca)을 가진 HA 생산 확인
- Soduim hyaluronate, potassium hyaluronate, calcium hyaluronate
- Salt 첨가 시 HA 중량 대비 1~3배수 이상 투입 시 최적 결정화를 통한 스펙 인 확인

나. 최적 분자량 설정
(1) 피부외용제로의 활용을 위한 최적 분자량 설정
(가) 실험방법
① Viscometer를 이용한 점도 측정
- 각 분자량별 HA를 농도별(0.1~1%)로 제조하여 시료 용액 40㎖을 실온에서 spindle(#5)로 각각 12rpm과 200rpm에서 측정

(나) 실험결과
- 분자량 10kDa은 1~2%, 0.8MDa은 0.3~0.5%, 1.2MDa은 0.1% 이하 농도로 제형화 시 세럼과 크림 형태의 피부외용제로 최적화 확인(100~1,000cPs)
- 10kDa대의 경우, 0.3~1%의 농도로 미스트 형태로 활용 시 최적화 확인(5~20cPs)
- 2.0MDa 이상의 경우, 높은 점도로 인해 고농도 함유한 제품 개발이 어려움
  - 0.1% 이내로 사용 가능

다. HA에 PDRN 도입 비율 결정
(가) 실험방법
① 화장품용 제형화를 위해 crude PDRN(DNA 유사체, DNA-Na) 사용
② 각 농도별로 제조된 HA용액에 DNA-Na를 0.1~2.0%의 농도(분말 기준)로 첨가
③ 실온에서 300rpm으로 교반
④ 제조된 용액의 관능평가(색 변화, 냄새 확인)

(나) 실험결과
- 투명한 HA용액에 DNA-Na를 0.1% 이상 가할때 갈색으로 변하는 것과 약간의 DNA-Na 특유의 비릿한 냄새가 발생
- 따라서 제품화를 위해 DNA-Na의 첨가비율을 0.1% 이내로 설정

※ 2차년도

1. HA-PDRN complex 대량생산 조건 확립과 HA-PDRN complex를 함유한 시제품 제작

가. HA-PDRN complex 대량생산 조건 확립

(1) 최종 선정 분자량대의 HA 생산 조건 확립

(가) 실험방법

① HA 미생물 배양

- 당사가 보유한 균주들로 보유한 배양 기술(한국 특허 10-2013-0019670, 10-2014-0107835)을 활용하여 배양

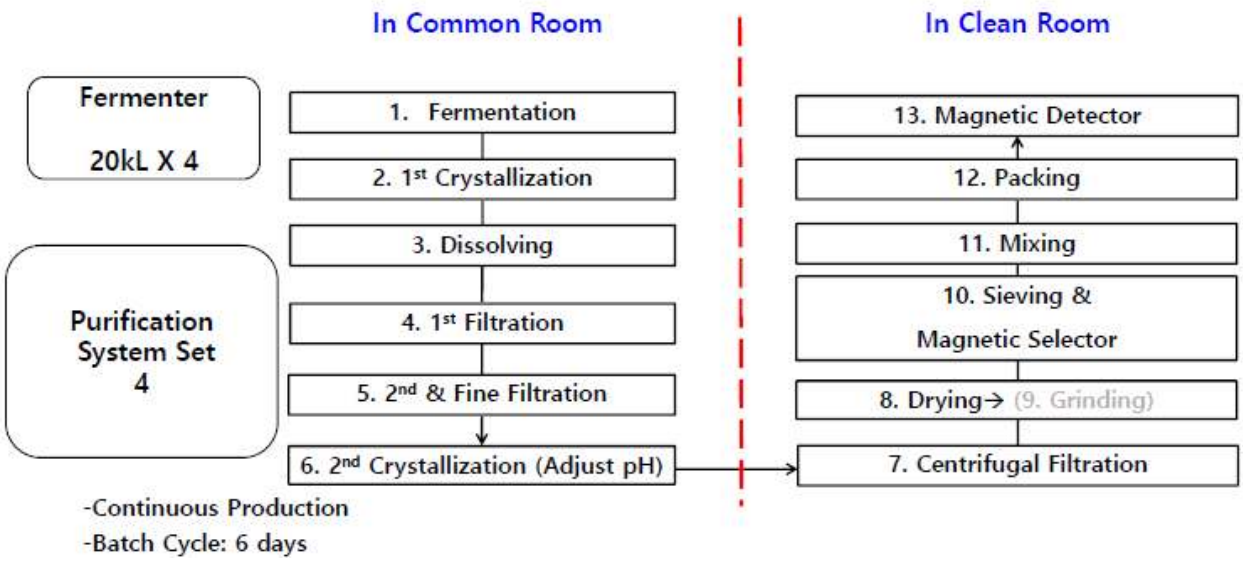


그림 4. HA 대량생산 상세 도식도

(나) 실험결과

- 대량생산 확인: 배양 기준 발효기 (20t), 배양 생산 (L당 10g 이상)
- 그림 3의 3 단계의 정제 시 정제 HA 용액 (HA 농도 0.3% 내외)의 열처리에 의한 점도 조정에 의한 다양한 분자량대 (>1.2MDa, 0.5~0.8MDa, <0.1MDa)의 HA 생산 기술 확보
- 추가적으로 분자량 10kDa대의 HA 경우에는 2차 결정화 직전에 산처리 공정에 의해 대량생산 공정 확보
- 배치 당 200kg 대량생산 공정 확보

(2) 다양한 salt를 함유한 HA 대량생산 조건 확립

(가) 실험방법

① 대량생산된 HA를 정제수에 0.3~0.5% 내외로 재용해

② 다양한 salt기 도입을 위해 HA와 salt(NaCl, KCl, $CaCl_2$)를 분말 기준 1:3의 비율로 HA용액에 salt를 각각 첨가

③ 에탄올을 적가하면서 강하게 교반
④ 세척 후, 상등액을 제거하고 침전물을 회수하여 drying oven에서 40℃로 건조시킴

(나) 실험결과

- 그림 4의 5단계 완료 후 salt 별로 즉, NaCl, KCl, $CaCl_2$를 각각 정제 용액에 포함된 HA 대비 1~3배수를 가한 후 결정화 진행

- 다양한 salt를 가진 HA-Na, HA-K, HA-Ca를 제조

- 최종적으로 제조된 HA의 분석결과를 바탕으로 유럽 약전 상 규격을 확인한 결과에 모두 적합함

표 2. 대량생산된 HA-salt의 분석 결과

Test Items	Specification
Appearance	White powder
Identification	confirm
Glucuronic Acid (%)	≥46.0
HA content (%)	≥95.0
Clarity (0.1% Sol.)	≤0.01
pH (0.1% Sol.)	6.0-7.5
Molecular weight (MDa)	≥2.0, ≥1.2, 0.5-1.0, <0.1, ≤0.01
Protein (%)	<0.1
Loss of Drying (%)	≤10.0
Residue on Ignition (%)	≤20
Heavy Metal (ppm)	<20
Arsenic (ppm)	<2
Other Mucopolysaccharide	Negative
Bacteria Count (cful/g)	<100
Molds & Yeast (cfu/g)	<10
E. Coli	Negative
Staphylococcus aureus	Negative
Pseudomonas aeruginosa	Negative
Hemolysis	Negative
Viable Hemolytic Streptococci	Negative

(3) HA-PDRN complex의 대량생산 조건 확립

(가) 생산 방법

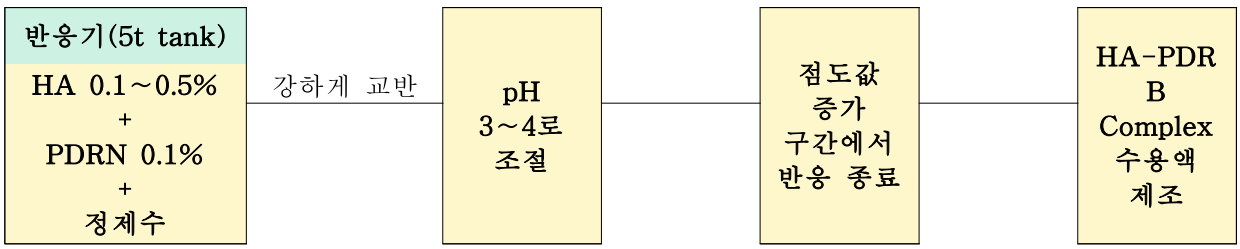


그림 5. HA-PDRN complex 제조용 반응기

나. HA-PDRN complex 시제품 제조 및 이를 통한 원가 파악

- 피부 외용제(화장품과 경피용 필름) 시제품은 ㈜바이오에스텍을 통해 생산 진행

(1) 화장품 시제품: 3종(미스트, 세럼, 크림)

- 용도별 HA 분자량 설정

용도별	HA(분자량)	농도
미스트	10kDa대	0.1～1.0%
세럼	0.8MDa	0.5～1.0%
크림	1.2MDa	

※ 1차년도 연구결과에 따라 PDRN은 1%로 사용

- Salt기 설정

- 각 salt별 HA-PDRN complex 형성 결과를 확인한 결과, 세 가지 salt(Na, K, Ca) 모두 HA-PDRN complex가 잘 형성되어 화장품용과 식품용으로 가장 일반화된 Sodium HA를 사용

- 원가파악

- 용기(50mL 프라스틱 기준) (개당 700원)와 포장용 케이스 제작 등 포함하여 2,000개 기준 제조원가 (미스트/세럼/크림)는 개당 1,300원 이내로 확인
- 원가 파악으로 본 연구 결과물의 사업화 가능성 확인

반응기	충진기

그림 6. 화장품 시제품 제조 설비

(2) 경피용 필름 시제품

(가) 제조공정 확인

• HA 필름 제조 조건

- 표 3 와 같이, HA 분자량별 패치 제조 가능 조건을 확인

표 3. HA 분자량별 필름 형성 조건

HA 분자량	50kDa	0.5MDa	1.2MDa	2.0MDa
필름형성 가능한 HA 수용액 농도 (%)	>10.0	>1.5	>1.0	>0.5

- 초저분자는 필름 형성에 필요한 점도에 미달하여 제조할 수 없고, 일반적으로 화장품용으로 사용되는 중·고분자의 HA를 사용하여 필름을 제조

표 4. HA-PDRN 패치 제조 조건 (PDRN 0.1%(분말 기준) 첨가)

HA 종류	농도(%)	필름화
초저분자((10kDa대)	-	×
저분자(50kDa대)	10	○
중·고분자	0.5~1.5	○

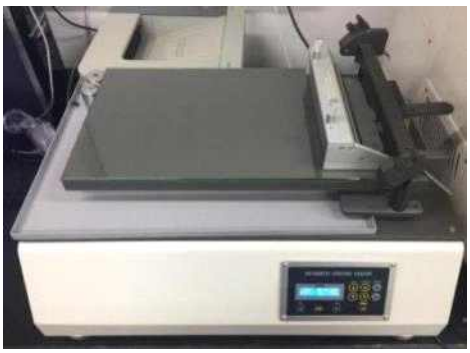


그림 7. 패치 제조 조건 확인용 자동 도포기

(나) 최종 대량생산 공정 확립

- 생산 조건

- 시생산 규모: HA 수용액 100L
- 필름화 벨트 이동 속도: 0.8~2.0m/min
- 건조 온도: 40~60℃
- Casting 두께: 1,000㎛

- 원가 파악

- 1일 기준, 폭 1m × 길이 300m 제조 가능
- HA 필름의 크기: A4 기준
- HA 원가 50원 + 필름 제작공임비 등 100원 → 총 150원 정도로 확인

그림 8. 필름화 대량생산 설비

그림 9. 최종 시제품(화장품 3종 및 경피용 필름) 사진

Ⅱ. (협동) 히알루론산과 PDRN 복합체의 제조 및 이화학적 특성 연구

※ 1차년도

1. HA-PDRN complex 제조 조건 확보

가. HA-salt 도입에 따른 HA의 구조적 특성변화 확인과 PDRN의 화학적 특성변화

(1) 다양한 분자량의 따른 HA 구조 확인

(가) 실험방법

- 본 연구에서는 DNA 유사체(crude PDRN, DNA-Na)를 사용
- 시료 제조

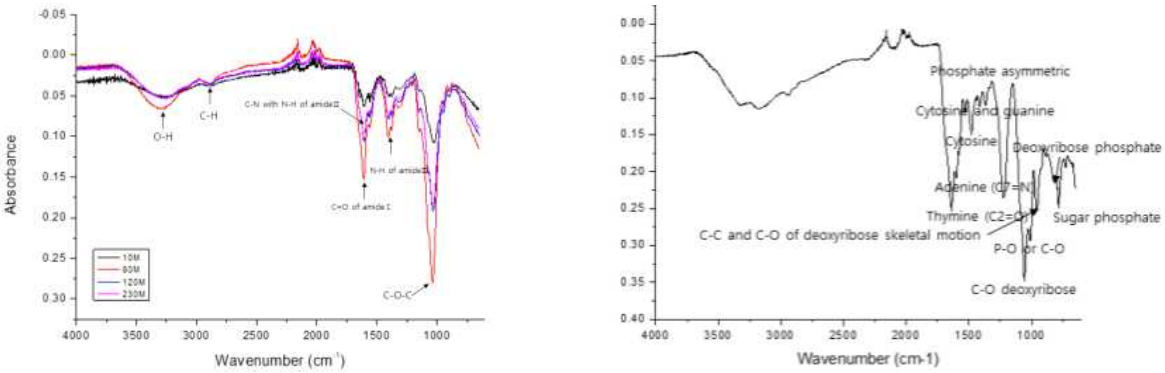
- 일정 농도의 HA 용액 → salt(NaCl, KCl, $CaCl_2$) 처리 → 에탄올 적가하며 강하게 교반 → 세척 → 침전 → 침전물 회수 → 건조

- FT-IR 측정

- Attenuated Total Reflectance(ATR) Accessory Spectroscopy
- 600~4000nm에서 측정

(나) 실험결과

- 시료에 따라 수분함량의 차이로 인해 흡광도의 세기는 다소 차이가 있으나, HA의 구조를 나타내는 peak(O-H, C-H, C=0, C-N, N-H, C-O-C)가 모두 나타내어 분자량과 관계없이 동일한 화학구조인 것을 확인함
- PDRN(b)의 인산기에 기인한 peak와 당 및 핵산기에 기인한 peak가 각각 잘 나타남



(a) (b)

그림 10. 분자량별 HA(a)와 crude PDRN(b)의 FT-IR spectra

(2) 다양한 salt의 따른 HA 구조 확인

(가) 실험방법

- 시료 제조

- 일정 농도의 HA 용액 → salt(NaCl, KCl, $CaCl_2$) 처리 → 에탄올 적가하며 강하게 교반 → 세척 → 침전 → 침전물 회수 → 건조

- FT-IR 측정

- Attenuated Total Reflectance(ATR) Accessory Spectroscopy

- 600～4000nm에서 측정

(나) 실험결과

- Control과 다양한 salt를 도입시킨 모든 HA의 구조를 나타내는 각 peak(O-H, C-H, C=O, C-N, N-H, C-O-C)가 확인된 것으로 보아 모든 HA 시료들이 동일한 화학구조임을 확인함

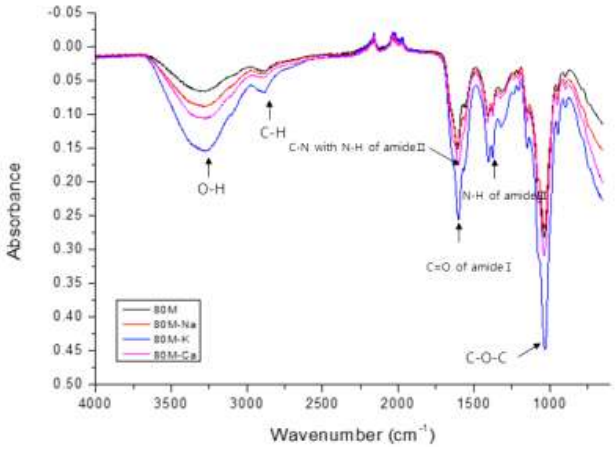


그림 11. Salt기가 도입된 HA의 FT-IR spectra

- 흡광도의 세기가 차이가 있는 것은 HA를 용해시켜 salt로 처리하여 분말 상태로 시료를 회수하는 과정에서 발생된 수분함량의 차에 의해 기인된 것으로 보이며, complex 제조에 있어 salt 처리에 의한 HA의 화학적 구조변화가 없을 것으로 예상됨

나. 다양한 salt 변화에 따른 HA의 물리적 특성변화 확인과 PDRN의 물리적 특성변화 확인

(1) 다양한 salt의 따른 HA 열적 특성변화 확인

(가) 실험방법

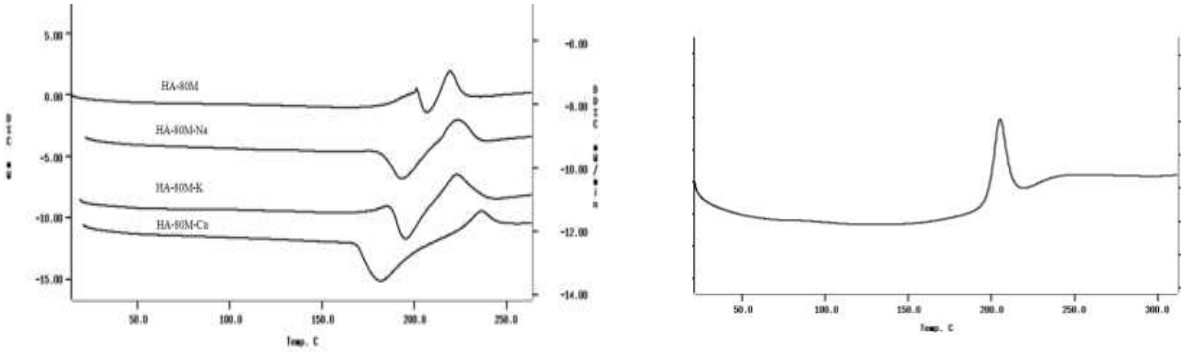
- 분말 시료를 DSC pan에 넣어 밀봉한 후 아래와 같은 분석조건에서 측정

- Flow gas: N_2
- Heating rate: 10℃/min
- Differential Scanning Calorimeter (Seiko)
- 측정 온도 범위: 실온～300℃

(나) 실험결과

- HA-salt(Na, K, Ca)로 처리된 HA 시료들의 용융온도(T_o)와 최종온도(T_c)는 공통적으로 salt가 처리되지 않은 control (acid type)보다 낮아지는 경향을 보임
- Salt로 처리된 HA 시료들의 경우, 엔탈피(△H) 값이 control보다 높아져 결정성이 증가한 것으로 보임
- 특히, HA-Ca는 가장 낮은 T_o와 가장 높은 T_c를 나타내면서 엔탈피(△H)값이 가장 큰 것으로 나타남

- Crude PDRN은 분해로 추정되는 exotherm 형태의 peak가 200℃ 부근에서 관찰됨 (그림 12, b)



(a) (b)

그림 12. Native HA, HA-salt(a), PDRN(b)의 thermogram

표 5. Native HA와 HA-salt의 열적 특성 분석

	T_o(℃)	T_p(℃)	T_c(℃)	△H (J/g)
80M	202.2	207.3	211.6	30.8
80M-Na	180.8	193.6	203.8	69.0
80M-K	188.3	195.6	203.8	59.4
80M-Ca	169.7	181.6	196.6	115.2

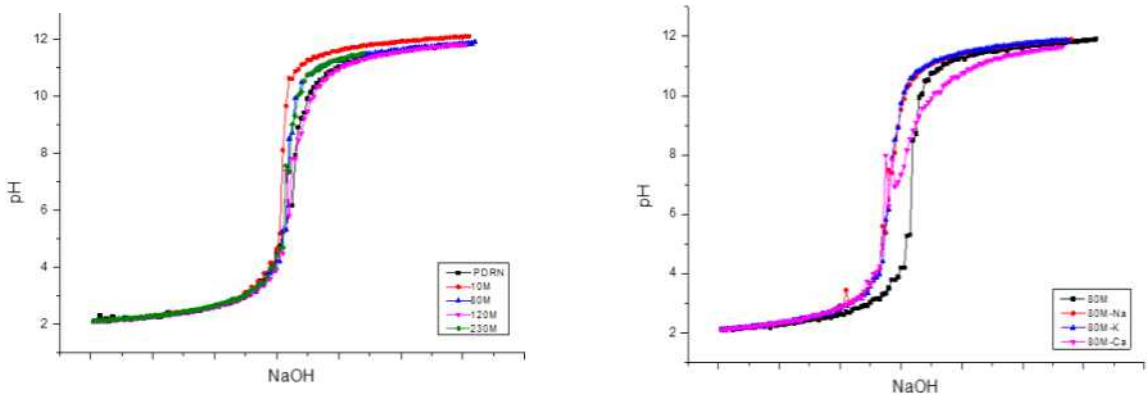
(2) 분자량별, salt별 HA와 PDRN의 해리도 확인

(가) 실험방법

- 준비된 HA 용액에 0.1N HCl을 적가하여 pH를 낮춘 용액에 0.1N NaOH를 일정량씩 적가하면서 나타나는 pH의 변화 측정
- pH 2~12로 pH가 증가하는 동안의 NaOH 소비량에 통해 potentiometric curve 작성

(나) 실험결과

- 분자량과 관계없이 모든 HA 시료와 PDRN가 비슷한 유형으로 확인됨
- HA와 PDRN의 pK_a값은 각각 pH 3~4 사이로 나타남
- Salt에 따른 HA의 해리도 차이를 확인한 결과, HA-salts 간의 차이가 없는 것으로 확인됨
- Native HA(control)와 HA-salt 시료들의 pKa값은 control이 더 낮음



(a) (b)

그림 13. 분자량별 HA, crude PDRN(a)와 HA-salt(b)의 Potentiometric curve

(3) 다양한 salt 도입에 따른 HA 점도 변화 확인

(가) 실험방법

- 준비된 HA 용액을 viscometer(Brookfild, DVT2)를 사용하여 아래의 조건으로 점도를 측정

- Spindle: #5, #7
- Speed: 12rpm, 120rpm, 200rpm
- 각 시료 용액 40㎖을 시험관에 넣어 spindle을 이용하여 속도를 달리하여 점도를 측정

(나) 실험결과

- salt 처리와 관계없이 시료 간의 측정된 점도 값이 유사한 것으로 확인됨
- HA-Ca는 분자량 0.8MDa과 1.2MDa에서 모두 다른 salt로 처리된 HA 시료들보다 점도가 낮게 나타남

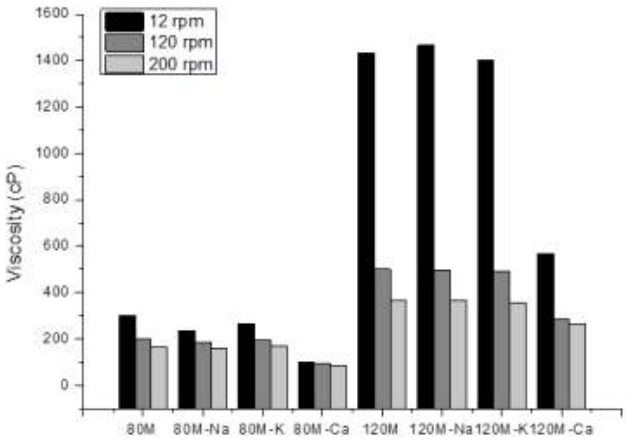


그림 14. 분자량을 달리하여 salt를 도입한 HA 용액의 점도 측정 결과

2. HA-PDRN complex 형성 확인

가. Salt별 HA와 PDRN의 특성 확인을 통한 HA-PDRN complex 형성 확인

(1) HA-PDRN complex 제조를 위한 최적 분자량 설정

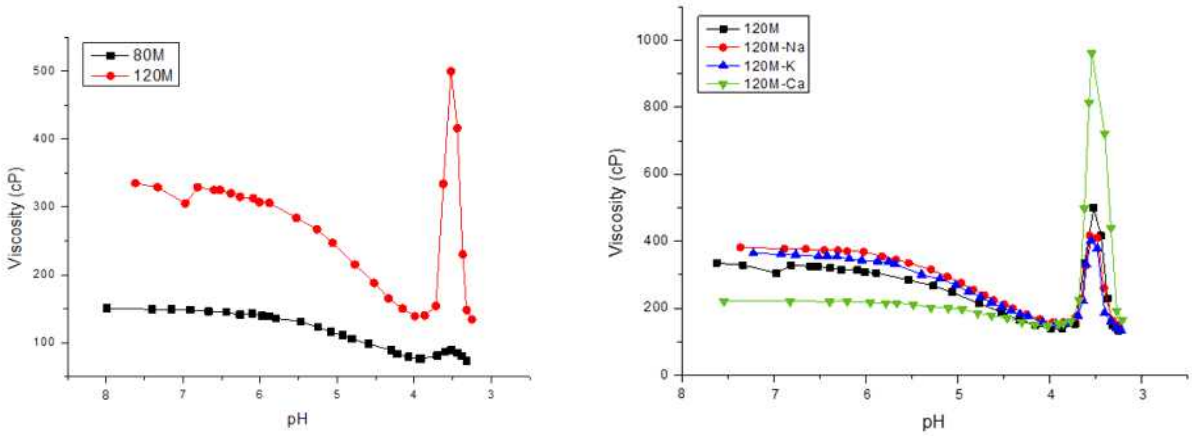
(가) 실험방법

- HA-PDRN 혼합액과 HA-salt-PDRN 혼합액에 각각 0.1N HCl을 적가하여 pH에 따른 점도의 변화를 viscometer로 측정

- Spindle: #5
- Speed: 12rpm

(나) 실험결과

- HA(0.8MDa, 1.2MDa)와 PDRN 혼합액에 HCl을 적가했을 때 pKa값 부근인 pH 3~4에서 점도가 급격히 증가함
- 80MDa에서 보다 120MDa의 HA에서 pH에 따른 점도 증가를 뚜렷하게 확인할 수 있음
- 이는 pKa값인 pH 3~4에서 physical entrapment로 인해 점도가 증가한 것으로 사료됨
- 따라서 HA-PDRN complex 제조를 위한 최적 분자량은 1.2MDa임



(a) (b)

그림 15. HA-PDRN 혼합액(a) 및 HA-salt-PDRN 혼합액(b)의 pH에 따른 점도 변화 결과

- 위의 결과(b)를 통해, HA(1.2MDa)와 다양한 salt기를 도입한 HA-salt에 PDRN 용액을 혼합하여 사용된 salt 중 complex 형성에 가장 효과적인 salt를 확인함
- 모든 시료는 pH 3~4에서 점도가 상승하였으며, 다른 salts에 비해 Ca이 도입된 시료가 약 1,000 cPs의 점도로 가장 높음
- Na와 K이 도입된 시료는 control보다도 낮은 점도를 보임
- Ca로 처리된 시료가 physical entrapment를 통해 PDRN과 보다 효과적으로 결합할 것으로 사료됨

(2) HA-PDRN 혼합액과 HA-PDRN complex와의 구조적 차이 확인

(가) 실험방법

- 시료 제조(HA-PDRN complex)

- HA-salt용액에 5% PDRN 용액을 천천히 넣어주면서 교반 → pH 3~4될 때까지 0.1N HCl을 천천히 적가 → HA-PDRN 용액에 에탄올을 넣어 침전시킴 → 침전물 회수 → 에탄올

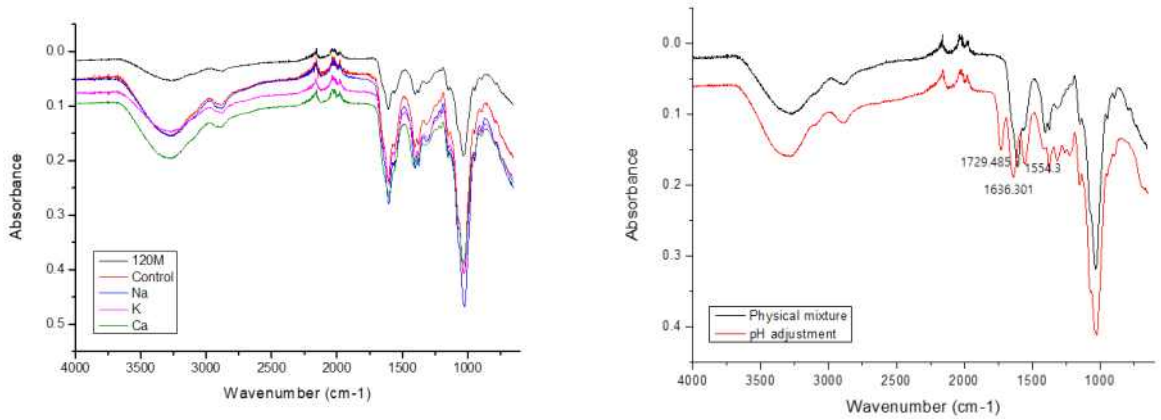
세척 → 동결건조

- FT-IR 측정

- Attenuated Total Reflectance(ATR) Accessory Spectroscopy
- 600～4000nm에서 측정

(나) 실험결과

- HA-PDRN 혼합액(a)은 salt기에 따른 시료 간의 구조적 차이가 없음



(a) (b)

그림 16. HA-PDRN 혼합액(a)과 HA-PDRN complex(b)의 FT-IR spectra

- HA-PDRN 혼합액과 달리 HA-PDRN complex에서 하단의 그림에서 표기된 3개의 peak(amide group)가 상이함을 확인
- 이는 HA-PDRN complex가 성공적으로 형성된 것이 확인됨
- HA-PDRN complex는 salt와 관계없이 모두 형성되었음을 확인함

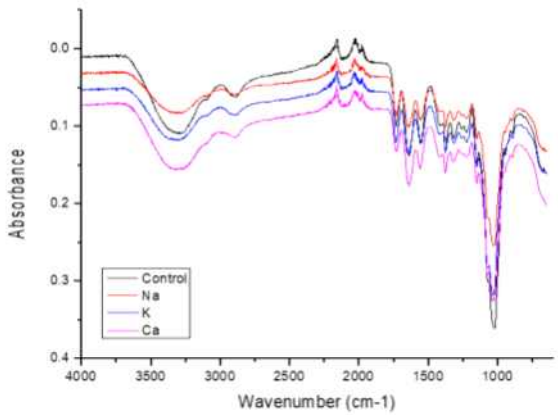


그림 17. Salt별 HA-PDRN complex의 FT-IR spectra

※ 2차년도

1. HA-PDRN complex의 특성 확인

가. HA-PDRN complex의 물리적 특성 확인

(1) HA-PDRN 필름 제조를 통한 기계적 강도 측정에 따른 안정성

(가) 실험방법

- 필름 시료 제작

- HA(1.2MDa)을 1.0~1.5% 용액 제조 → 균질화 (3,000rpm) → 탈포 → Film Casting (1000um) → 항온 항습기에서 건조(40℃, RH 60%)
- PDRN은 0.1wt% 첨가

- 기계적 강도 측정

- Texture Analyzer (TA-XT2i), ASTM 표준법 D882-02 사용
- 필름을 직사각형(2cm×8cm) 형태로 잘라 Tensile Strength와 Elongation at break(%) 측정
- 계산법

$$\text{Tensile Strength (MPa)} = \frac{\text{Max. Force (N)}}{\text{Thickness (㎜)} \times \text{Width (㎜)}}$$

$$\text{Elongation at break (\%)} = \frac{L - L_0}{L_0} \times 100$$

*L_0: 필름 크기, L: 파괴된 필름의 길이

(나) 실험결과

- 각 필름 시료의 기계적 강도를 측정한 결과, HA에 PDRN이 도입된 Complex의 경우 순수 HA에 비해 인장 강도가 증가됨을 확인할 수 있었으며 이에 반해 HA와 PDRN이 단순 혼합된 Mixture의 경우 인장 강도가 순수 HA 에 비해 약간 감소함을 알 수 있었다. 이를 통해 HA와 PDRN 간에 complex 형성이 이루어짐에 따라 기계적 물성이 증가함을 알 수 있었다.

표 6. 필름의 기계적 강도 측정 결과

Samples	Tensile strength (MPa)	Elongation at break (%)
HA	452.0	30.61
HA-PDRN Mixture	390.7	39.01
HA-PDRN complex	520.8	28.98

나. HA-PDRN complex의 구조적 특성 확인

(1) 실험방법

- FT-IR 측정

- Attenuated Total Reflectance(ATR) Accessory Spectroscopy
- 600~4000nm에서 측정

(2) 실험결과

- HA-PDRN 혼합물의 결과와는 달리, HA와 PDRN의 복합체 형성반응에서 기인한 amide기가 HA-PDRN complex의 spectrum 상 1550cm^{-1} 부근에 나타나는 것을 확인함

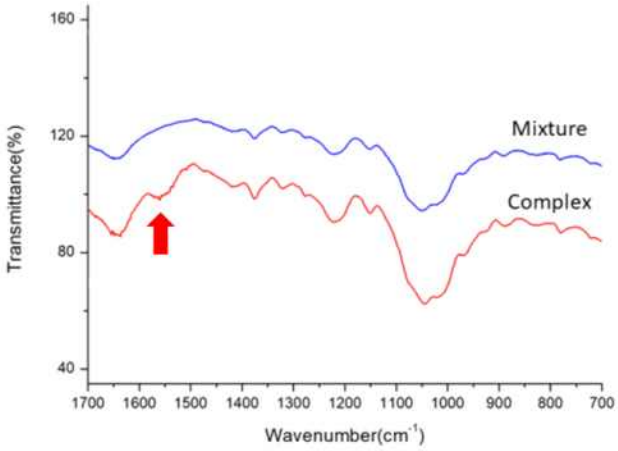


그림 18. HA-PDRN 혼합물과 HA-PDRN complex의 FT-IR spectra 비교

다. HA-PDRN complex의 열적 특성 확인

(1) HA-PDRN 혼합물과 complex의 비교

(가) 실험방법

- 분말 시료를 DSC pan에 넣어 밀봉한 후 아래와 같은 분석조건에서 측정

- Flow gas: N_2
- Heating rate: 10℃/min
- Differential Scanning Calorimeter (Seiko)
- 측정온도범위: 실온~300℃

(나) 실험결과

- HA-PDRN 혼합물은 native HA와 유사한 thermogram을 나타냄
- HA-PDRN 혼합물과는 달리 HA-PDRN complex의 경우 용융 peak는 사라지고 분해 peak만 관찰됨
- HA간의 결합으로 나타나는 native HA의 용융 peak가 HA-PDRN complex가 형성되면서 물리적 entrapment가 증가하여 HA-PDRN interaction의 증가되면서 용융 peak가 감소하는 것으로 보임

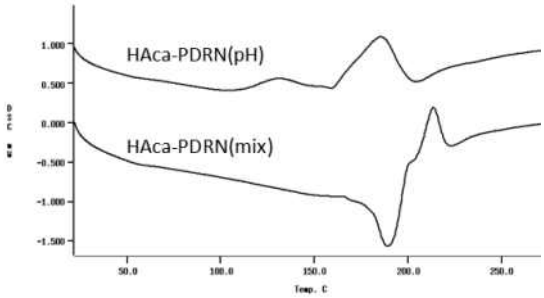


그림 19. HA-PDRN 혼합물과 HA-PDRN complex의 DSC thermogram 비교

표 7. 각 시료의 분해 온도 결과

Sample	Decomposition temperature (℃)
HA	209.4
HA-PDRN Mixture	186.1
HA-PDRN complex	203.8

라. HA-PDRN complex의 안정성 파악

(1) HA-PDRN의 효소분해 안정성

(가) 실험방법

① 유리 시험관에 0.1% 수용액 시료 600㎕와 phosphate buffer 200㎕을 넣고 37℃, 10분 배양

② Hyaluronidase 1㎖ (1㎎/㎖l)를 넣고 시간별로 1~6시간까지 반응시킴

③ 시간마다 alkaline borate solution 200㎕ 첨가한 후 5분간 가열하여 효소를 불활성화시킴

④ 얼음으로 냉각한 후 DMAB solution 3㎖ 첨가하고 37℃에서 30분간 배양

⑤ 흡광도 측정(586nm)

(나) 실험결과

- HA 분해 효소인 hyaluronidase를 이용하여 HA-PDRN 혼합물과 complex 간의 분해 안정성을 확인함
- 시간별 분해도를 보면, 1시간 경과 후 native HA와 HA-PDRN 혼합물은 각각 58%, 62%로 초기에 빠른 속도로 분해됨
- 그러나 HA-PDRN complex는 초기 분해가 40% 미만으로 나타난 것을 확인함
- 결론적으로 HA에 PDRN이 도입됨에 따라 효소 분해에 대한 분해 저항성이 증가됨을 확인함

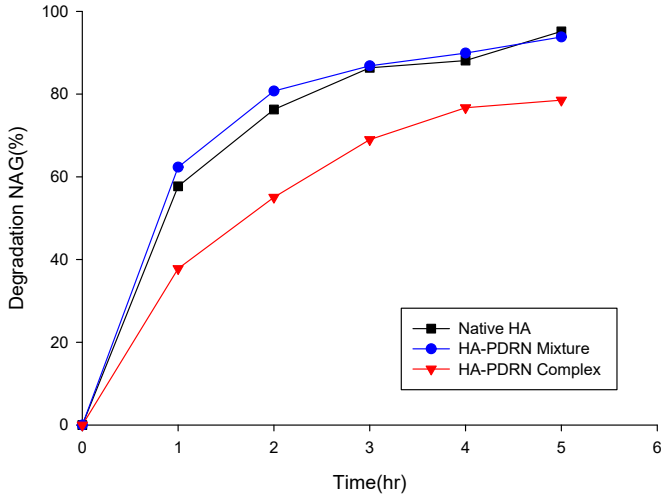


그림 20. 시료별 효소분해 안정성 비교

표 8. 효소 반응시간에 따른 시료들의 분해 정도

분해시간 (h)	Native HA (%)	HA-PDRN 혼합물 (%)	HA-PDRN complex (%)
0	0	0	0
1	58	62	38
2	76	81	55
3	86	87	69
4	88	90	77
5	95	94	79

(위탁) 히알루론산과 PDRN 복합체의 기능성 연구

※ 1차년도

1. HA-PDRN complex 기능성 확인

가. 피부 기능성 평가 시스템 구축 *(in vitro)*

- 배양 세포주 선정 및 피부 항노화 기전 탐색
- 인간섬유아세포인 CCD-986sk를 한국 세포주은행에서 분양받아 계획된 실험을 진행
- 피부 기능성을 평가하기 위하여, 주름 개선 효능 개선 기전 및 실험법을 조사하고 실험 수행

① 안전성 평가 (MTT assay)
② Collagenase 활성 저해 효능 평가
③ Elastase 활성 저해 효능 평가
④ MMP1 생합성 저해 효능 평가
⑤ 미토콘드리아 생합성 효능 평가: 양성 대조군으로 비타민 C를 선정함

- 주관기관인 "(주)진우바이오"로부터 실험 시료 공여 받음

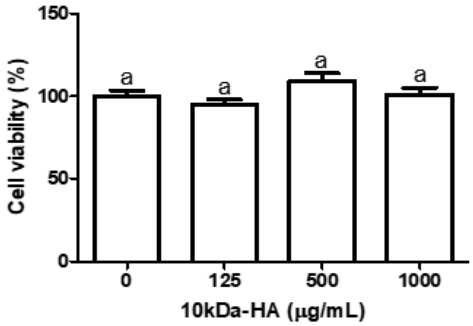
- HA 분자량별 4종 (10, 800, 1200, 2300 kDa), PDRN 1종

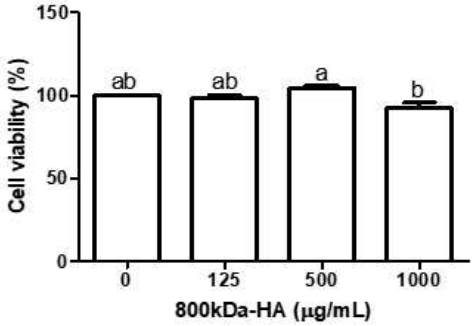
(1) HA 분자량별, PDRN 안전성 평가

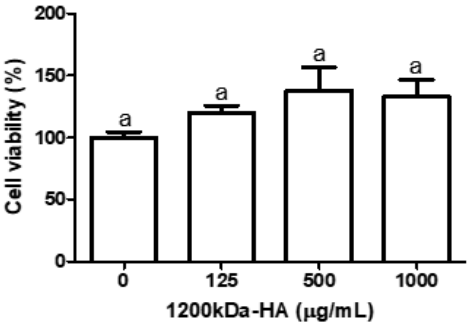
1) HA 분자량별 (10, 800, 1200, 2300 kDa), PDRN의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 진행함.

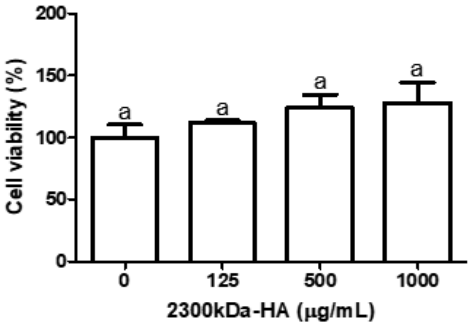
[HA의 안전성 평가]

○ CCD-986sk 세포에 HA 분자량별 10, 800, 1200, 2300 kDa을 각각 125, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리하여 MTT assay를 수행하였음. 그 결과, HA 모든 처리군에서 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 이는 세포 내 HA 처리는 세포에 독성이 없음을 확인함.



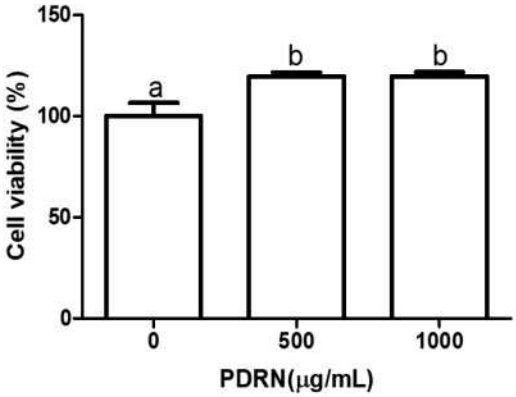






[PDRN의 안전성 평가]

○ CCD-986sk 세포에 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리하여 MTT assay를 수행하였음. 그 결과, PDRN 처리군에서 대조군 대비 세포 증식이 유의적으로 증가되는 것을 확인하였음. 따라서 세포 내 PDRN 처리는 독성이 없는 것으로 확인되었으며, 이 결과는 PDRN 처리가 CCD-986sk 세포 증식을 촉진 시켜 세포 성장을 증가시키는 것으로 사료됨.



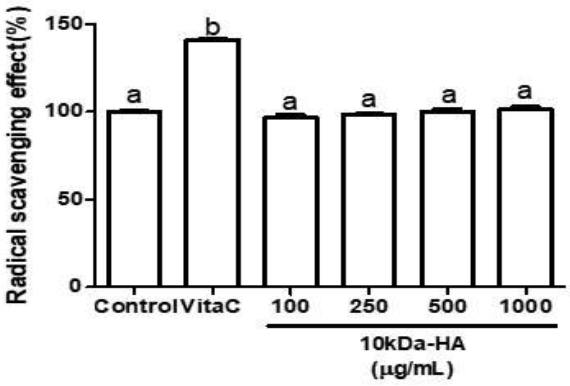
(2) HA 분자량별, PDRN 피부 기능성 평가

1) 항산화 효능 평가 (ROS 제거능) - DPPH radical scavenging activity

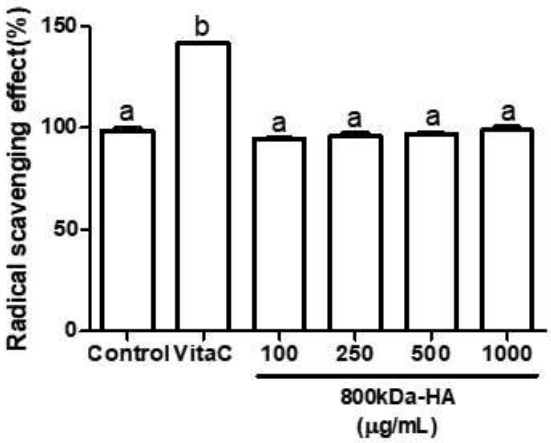
- 피부 노화의 원인인 자유라디칼을 소거하는 효능을 평가하기 위해 DPPH radical scavenging activity를 진행함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 50 μg/mL로 진행함.

[HA의 항산화 효능 평가]

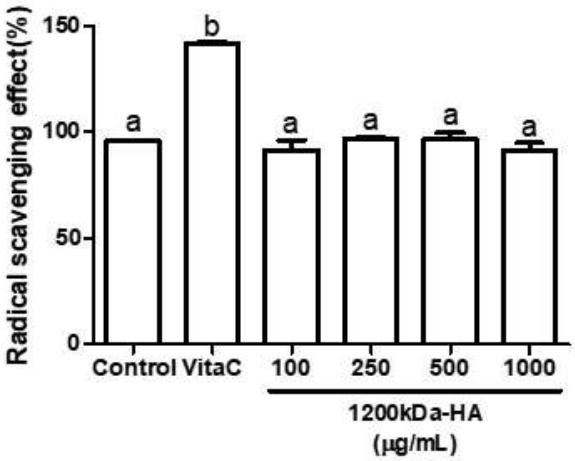
- HA 분자량별 10, 800, 1200, 2300 kDa을 100, 250, 500, 1000 μg/mL 농도로 처리했을 때 항산화 효능을 DPPH assay로 평가함.
- HA 10 kDa을 100, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 10 kDa HA은 항산화 효능이 없음을 확인함.



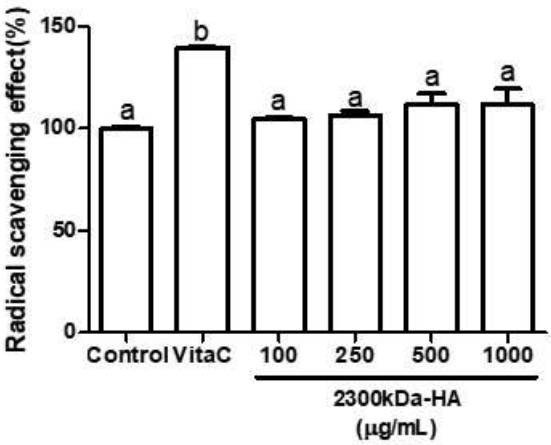
- HA 800 kDa을 100, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 800 kDa HA은 항산화 효능이 없음을 확인함.



- HA 1200 kDa을 100, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 1200 kDa HA은 항산화효능이 없음을 확인함.



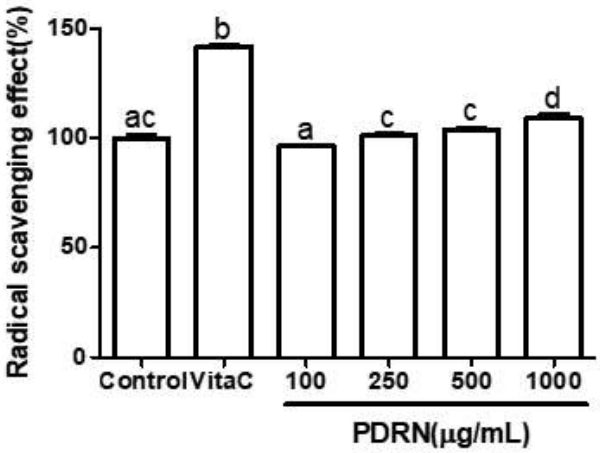
- HA 2300 kDa을 100, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 2300 kDa HA은 항산화 효능이 없음을 확인함.



결론적으로, HA의 모든 분자량에서 DPPH radical을 소거하는 효능을 보이지 않음. 따라서 HA의 처리로 항산화 효능을 기대할 수 없음.

[PDRN의 항산화 효능 평가]

- PDRN을 100, 250, 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리했을 때 대조군 대비 항산화 효능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군에 비해 항산화 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음. 따라서 PDRN은 항산화 효능이 우수한 것으로 사료됨.

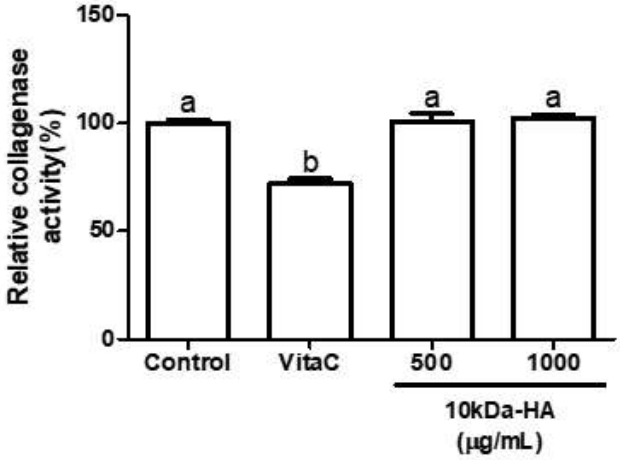


2) collagenase 활성 저해 효능 평가

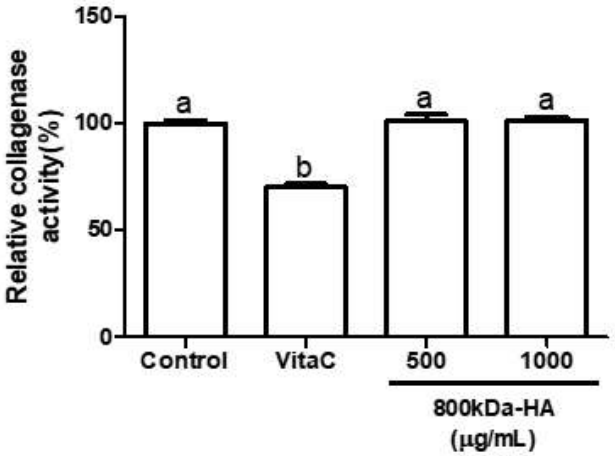
○피부 노화의 원인인 콜라겐 분해에 대한 작용을 평가하기 위해 collagenase 활성 저해 효능을 평가함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 진행함.

[HA의 collagenase 활성 저해 효능 평가]

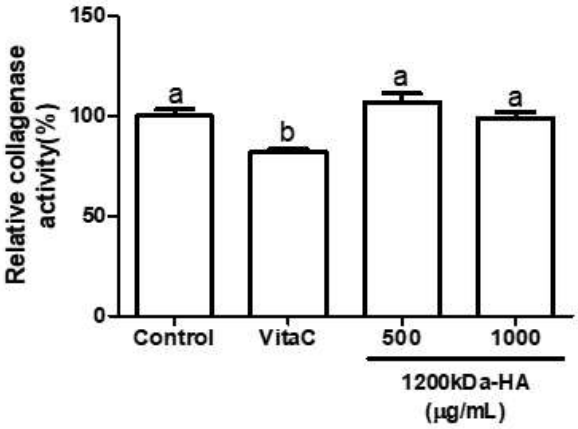
- HA 10 kDa을 500, 1000 μg/mL 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 이는 collagenase 활성 저해 효능이 없는 것을 확인함.



- HA 800 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 이는 collagenase 활성 저해 효능이 없는 것을 확인함.

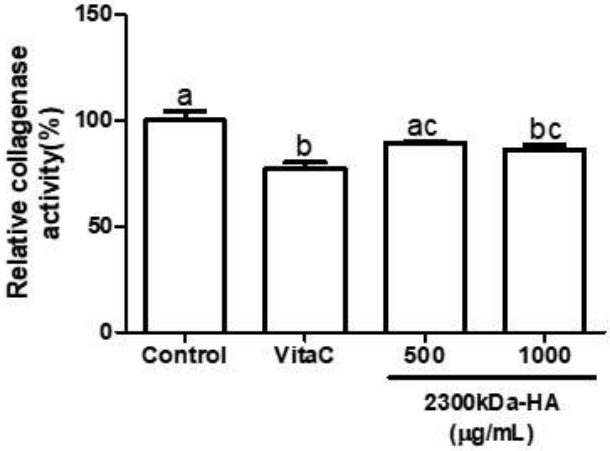


- HA 1200 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이 없음. 이는 collagenase 활성 저해 효능이 없는 것을 확인함.



- HA 2300 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 collagenase 활성이 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군에 비해 collagenase 활성이 유의한 수준으로 낮았음. 이는 2300 kDa은 collagenase 활성 저해 효능이 있음을 확인

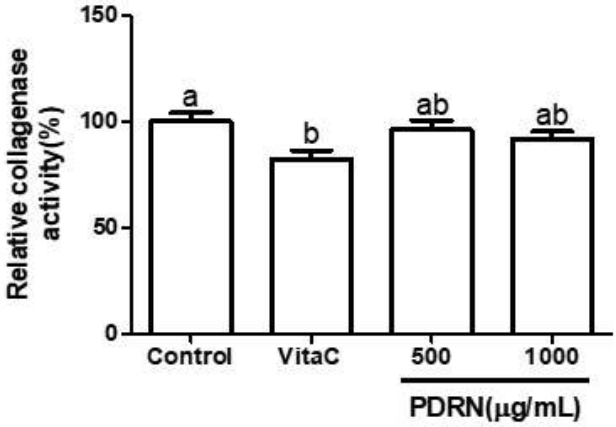
함.



결론적으로, HA 10, 800, 1200 kDa에서 collagenase 활성 저해 효능을 보이지 않고, HA 2300 kDa의 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 collagenase 활성 저해 효능을 보임. 따라서 HA 2300 kDa의 고농도 처리는 피부 노화 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

[PDRN의 collagenase 활성 저해 효능 평가]

- PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 collagenase 활성이 감소하는 경향을 보임. PDRN 처리군은 대조군 대비 유의적인 차이가 없었지만, 양성 대조군인 비타민 C과 비교하였을 때도 유의적인 차이 없었음. 따라서 PDRN은 collagenase 활성을 저해하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.



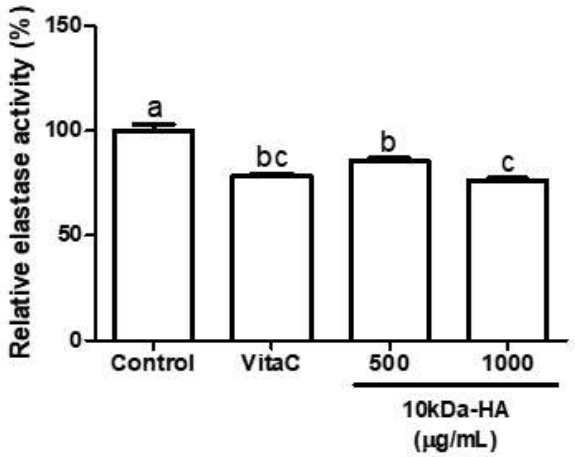
3) Elastase 활성 저해 효능 평가

- 피부 노화의 원인인 엘라스틴 분해에 대한 작용을 평가하기 위해, elastase 활성 저해 효능을 평가함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 진행함.

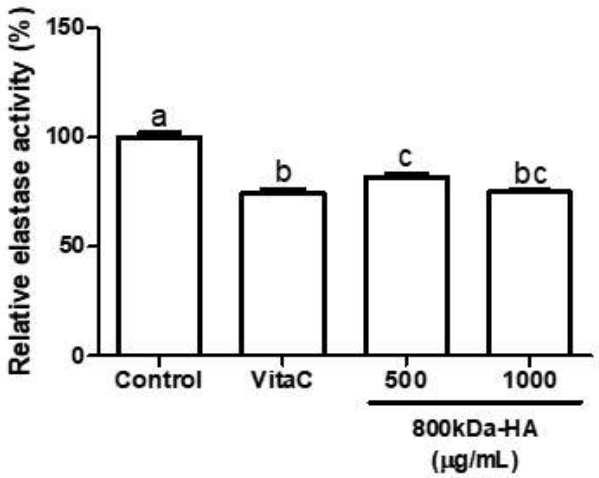
[HA의 elastase 활성 저해 효능 평가]

- HA 10 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음. 이는 10 kDa 분자량의 HA는 elastase 활성 저해 효능이 있는 것으로

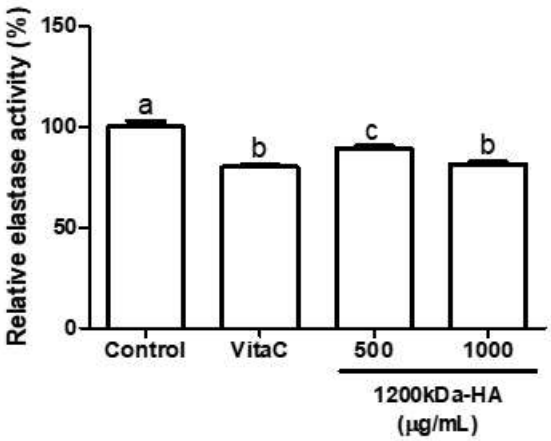
사료됨.



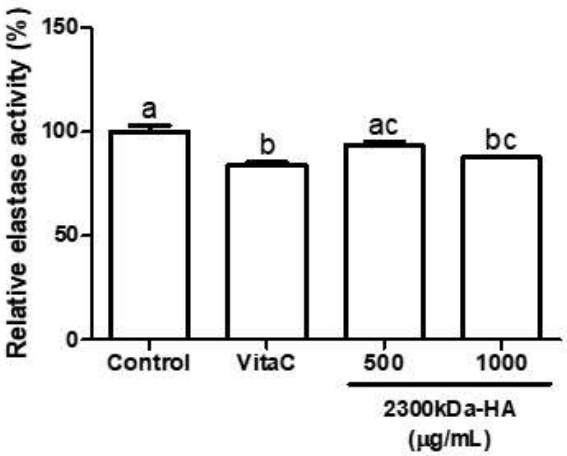
- HA 800 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음. 이는 800 kDa 분자량의 HA는 elastase 활성 저해 효능이 있는 것으로 사료됨.



- HA 1200 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음. 이는 1200 kDa 분자량의 HA는 elastase 활성 저해 효능이 있는 것으로 사료됨.



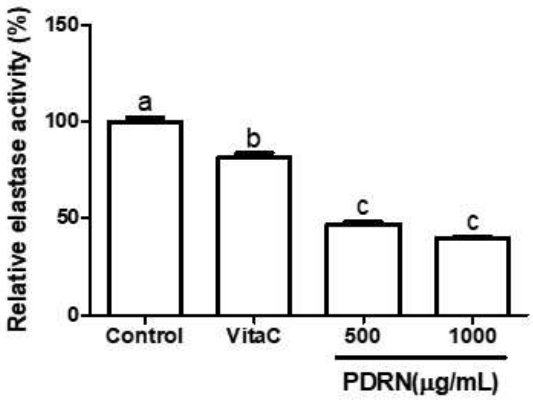
- HA 2300 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음. 이는 2300 kDa 분자량의 HA는 elastase 활성 저해 효능이 있는 것으로 사료됨.



결론적으로, HA의 모든 분자량에서 농도 의존적으로 elastase 활성을 저해하는 효능을 보임. 따라서 HA의 처리는 피부 노화 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

[PDRN의 elastase 활성 저해 효능 평가]

- PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 농도 의존적으로 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였으며, 이는 양성 대조군인 비타민C보다 elastase 활성 저해 효능이 우수한 것으로 나타남. 따라서 PDRN은 강력한 elastase 활성 저해 효능으로 피부 노화에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료됨.

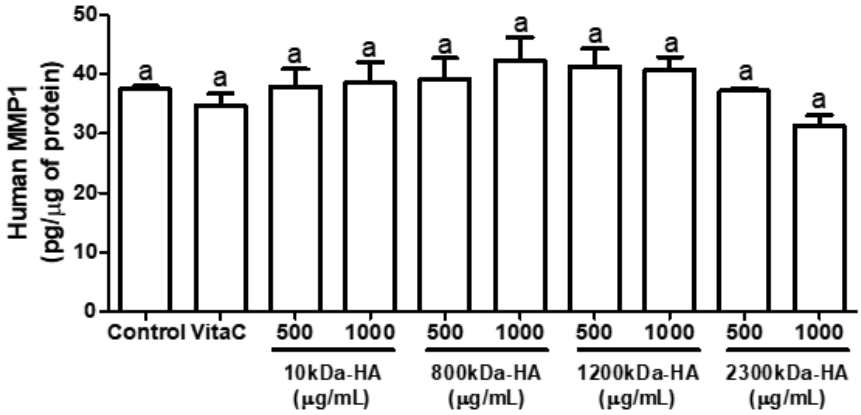


4) Type 1 collagenase (MMP-1) 생합성 저해 효능 평가

- Matrix metalloproteinase (MMPs)는 피부의 콜라겐을 분해하는 효소임. 이 실험에서는 피부의 총 콜라겐의 80%를 차지하는 type 1 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP1의 생합성 저해 효능을 평가하여 HA와 PDRN의 피부의 노화 억제 작용을 확인하였음. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 실험에 사용되었음.

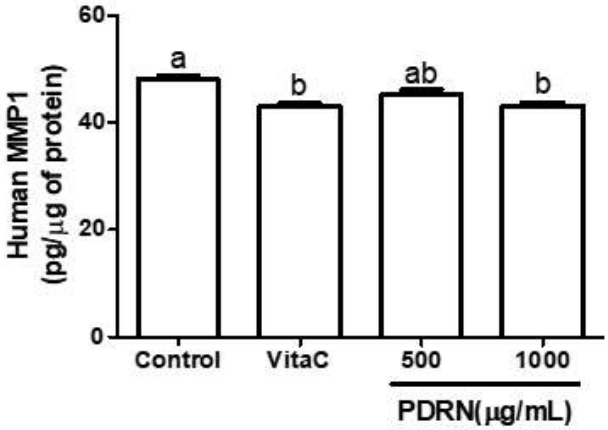
[HA의 MMP1 생합성 저해 효능 평가]

- HA 분자량별 10, 800, 1200, 2300 kDa을 CCD-986sk 세포에 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리한 뒤 MMP1 저해 효능을 확인하였음. ANOVA 분석에서 대조군 대비 HA 분자량별 유의적인 MMP1 생합성 저해 효능은 확인할 수 없었음. 하지만 HA 2300 kDa의 1000 μg/mL 처리군과 대조군의 t-test 분석에서 P=0.024로 유의적인 MMP1 저해 효능을 확인함. 이는 collagenase 활성 저해 효능 평가 실험 결과와 동일한 결과임.



[PDRN의 MMP1 생합성 저해 효능 평가]

- PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 MMP1 생합성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군 대비 MMP1 생합성이 유의한 수준으로 감소함. 이는 PDRN은 MMP1 생합성 저해 효능이 있음을 확인함.

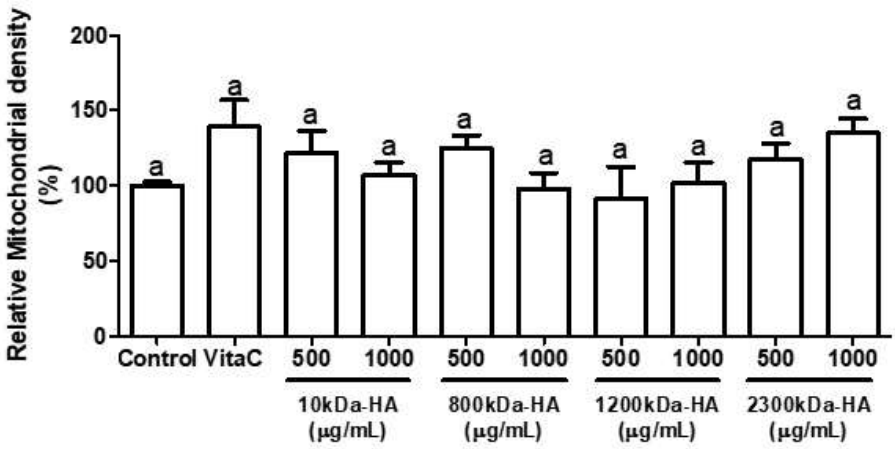


5) 미토콘드리아 생합성능 평가

- 미토콘드리아 생합성 효능을 평가하기 위해 MitoTracker assay를 통하여 HA와 PDRN의 미토콘드리아 density 증가 효능을 평가하였음.

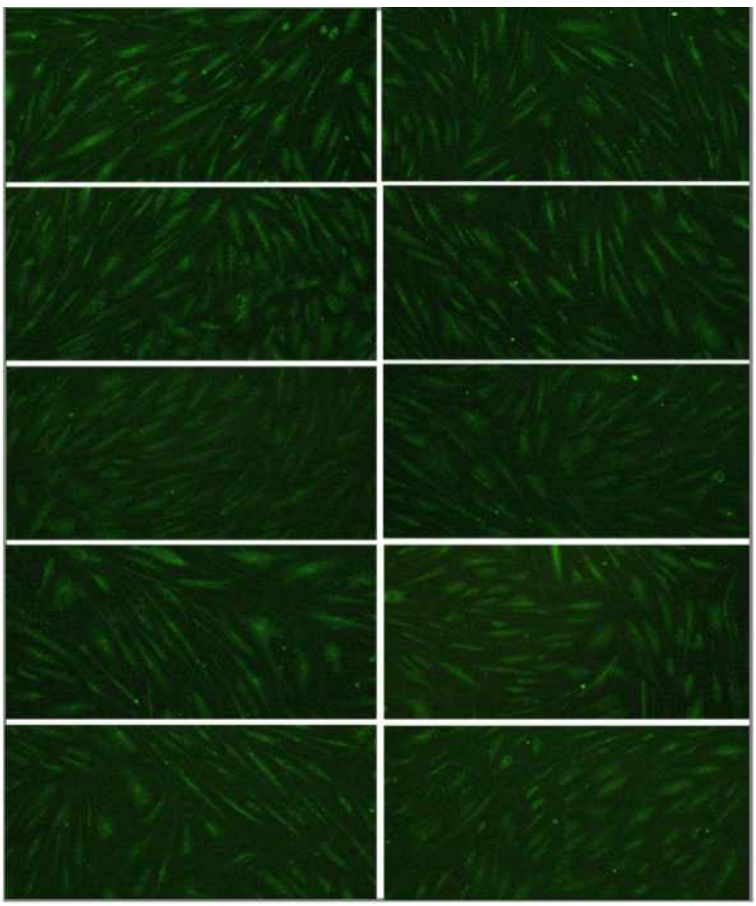
[HA의 미토콘드리아 생합성 효능 평가]

- CCD-986sk 세포에 HA 분자량별 10, 800, 1200, 2300 kDa을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리하여 MitoTracker 형광 신호를 분석하였음. 그 결과, HA 처리군에서 대조군 대비 유의적인 차이 없었음.



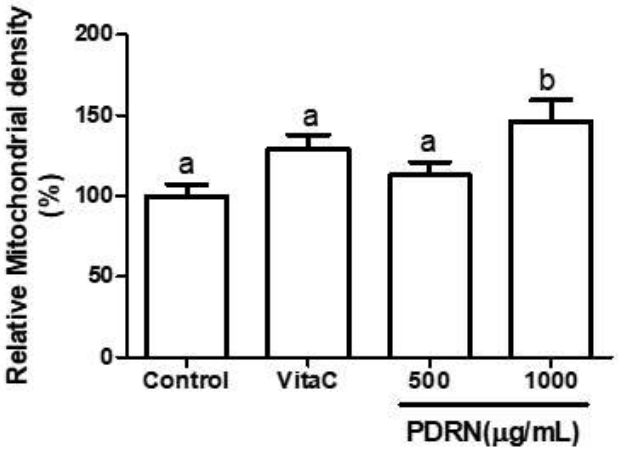
- 현미경을 이용하여 얻은 이미지에서도 HA 처리군과 대조군의 녹색 형광의 발현이 비슷하게 나타났음. 이는 HA는 미토콘드리아 생합성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

Control	Vitamin C 200 μg/mL
HA 10kDa 500 μg/mL	HA 10kDa 1000 μg/mL
HA 800kDa 500 μg/mL	HA 800kDa 1000 μg/mL
HA 1200kDa 500 μg/mL	HA 1200kDa 1000 μg/mL
HA 2300kDa 500 μg/mL	HA 2300kDa 1000 μg/mL



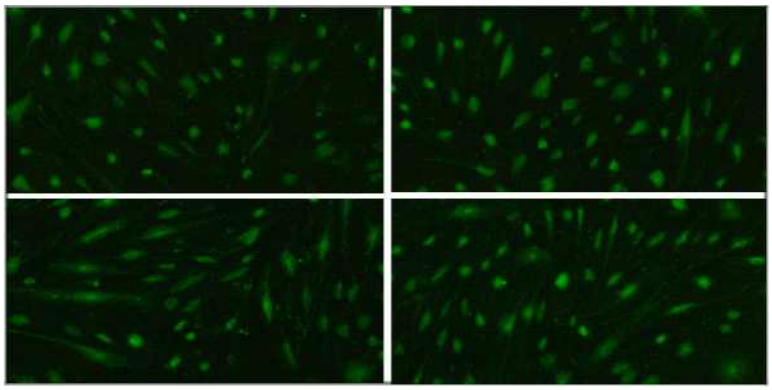
[PDRN의 미토콘드리아 생합성 효능 평가]

- CCD-986sk 세포에 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 미토콘드리아 density가 증가하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군 대비 미토콘드리아 density가 유의한 수준으로 증가함.



- 현미경 이미지에서도 PDRN 고농도 처리군에서 미토콘드리아 density가 증가한 것을 확인함. 이는 PDRN 처리가 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 효능이 있는 것으로 사료됨.

Control	Vitamin C 200 μg/mL
PDRN 500 μg/mL	PDRN 1000 μg/mL



※ 2차년도

2. HA-PDRN complex 차별화된 기능성 확인

가. HA-PDRN complex의 피부 기능성 평가 시스템 구축 (*in vitro/vivo*)

- 배양 세포주 선정 및 피부 항노화 기전 탐색
- 인간섬유아세포인 CCD-986sk를 한국 세포주은행에서 분양받아 계획된 실험을 진행
- 피부 기능성을 평가하기 위하여, 주름 개선 효능 개선 기전 및 실험법을 조사하고 실험 수행

① 안전성 평가 (MTT assay)
② Collagenase 활성 저해 효능 평가
③ Elastase 활성 저해 효능 평가
④ MMP1 생합성 저해 효능 평가
⑤ 미토콘드리아 생합성 효능 평가: 양성 대조군으로 비타민 C를 선정함

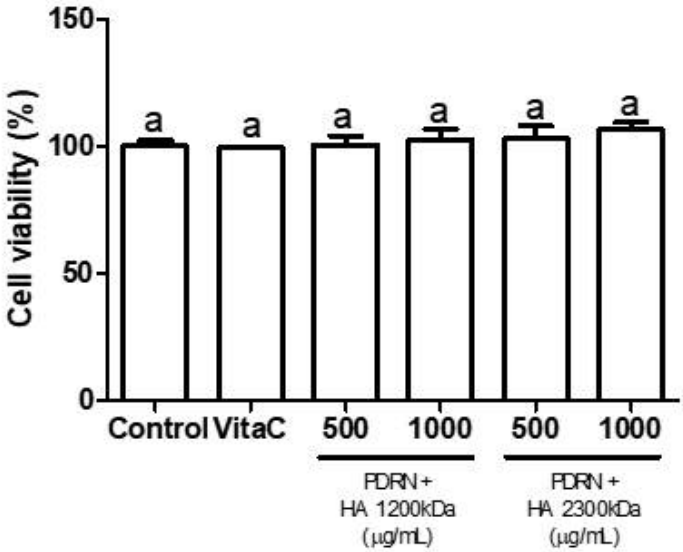
- 주관기관인 "(주)진우바이오"로부터 실험 시료 공여 받음

- HA 분자량별 4종 (10, 800, 1200, 2300 kDa), PDRN 1종

나. HA-PDRN complex 안전성 평가

- PDRN과 HA 분자량 1200, 2300 kDa complex의 세포독성을 알아보기 위해 MTT assay를 진행함.

- CCD-986sk 세포에 PDRN과 HA 분자량 1200, 2300 kDa의 complex을 각각 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리하여 MTT assay를 수행하였음. 그 결과, HA-PDRN complex 모든 처리군에서 대조군 대비 유의적인 차이 없었음. 이는 세포 내 HA-PDRN complex의 처리는 세포에 독성이 없음을 확인함.

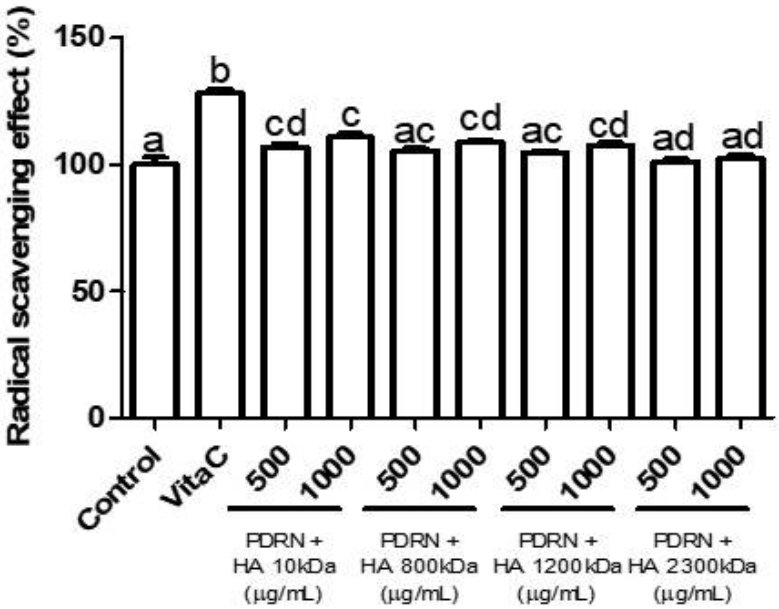


다. HA-PDRN complex 피부 기능성 평가

1) HA-PDRN complex의 항산화 효능 평가 - DPPH radical scavenging activity

- 피부 노화의 원인인 자유라디칼을 소거하는 효능을 평가하기 위해 HA-PDRN complex의 DPPH radical scavenging activity assay를 수행함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 50 μg/mL로 진행함.

- PDRN과 HA 분자량별 10, 800, 1200, 2300 kDa complex를 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리했을 때 항산화 효능을 DPPH assay로 평가함.

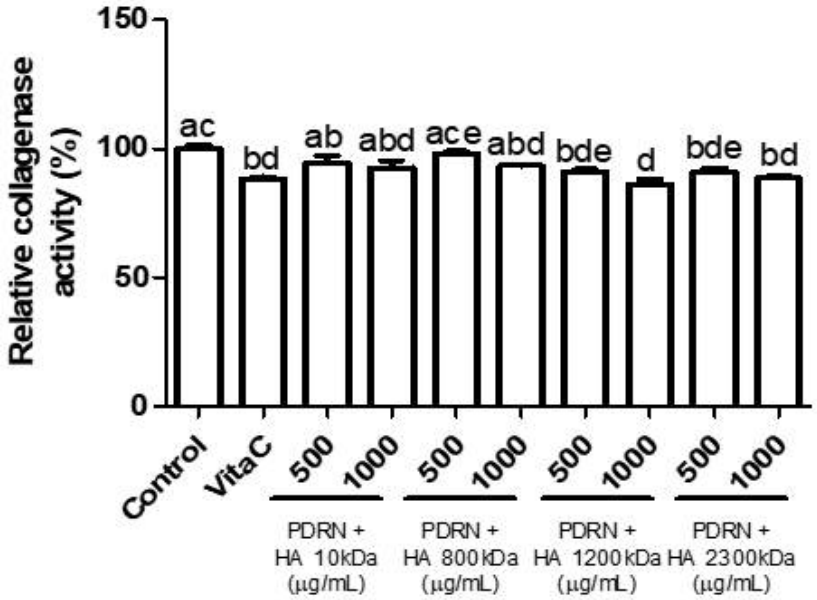


- PDRN과 HA 10 kDa complex를 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 항산화 효능이 대조군 대비 유의적 차이를 보이며 농도 의존적으로 증가함.
- PDRN과 HA 800 kDa complex를 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 항산화 효능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군 대비 항산화 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음.
- PDRN과 HA 1200 kDa complex를 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 항산화 효능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군에 비해 항산화 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음.
- PDRN과 HA 2300 kDa complex를 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이는 없었지만, 항산화 효능이 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보임.

결론적으로, HA-PDRN complex는 DPPH radical을 소거하는 효능을 보임. 따라서 HA-PDRN complex는 항산화 효능을 기대할 수 있음.

2) HA-PDRN complex의 collagenase 활성 저해 효능 평가

- 피부 노화의 원인인 콜라겐 분해에 대한 작용을 평가하기 위해 collagenase 활성 저해 효능을 평가함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 진행함.

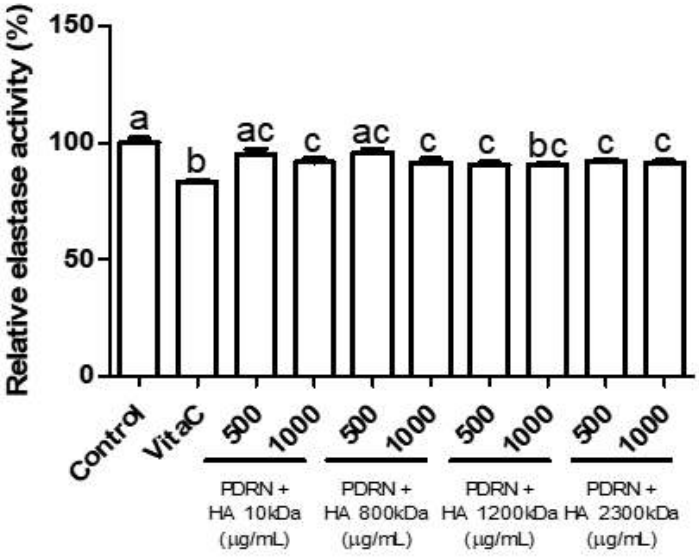


- PDRN과 HA 10 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이는 없었지만, collagenase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임.
- PDRN과 HA 800 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이는 없었지만, collagenase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임.
- PDRN과 HA 1200 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 collagenase 활성이 유의한 수준으로 감소함.
- PDRN과 HA 2300 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 collagenase 활성이 유의한 수준으로 감소함.

결론적으로, 1200, 2300 kDa HA과 PDRN complex에서 collagenase 활성 저해 효능을 확인하였음. 따라서 1200, 2300 kDa HA과 PDRN complex 처리는 collagenase 활성을 저해시켜 피부 노화 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.

3) HA-PDRN complex의 elastase 활성 저해 효능 평가

- 피부 노화의 원인인 엘라스틴 분해에 대한 작용을 평가하기 위해 elastase 활성 저해 효능을 평가함. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 진행함.

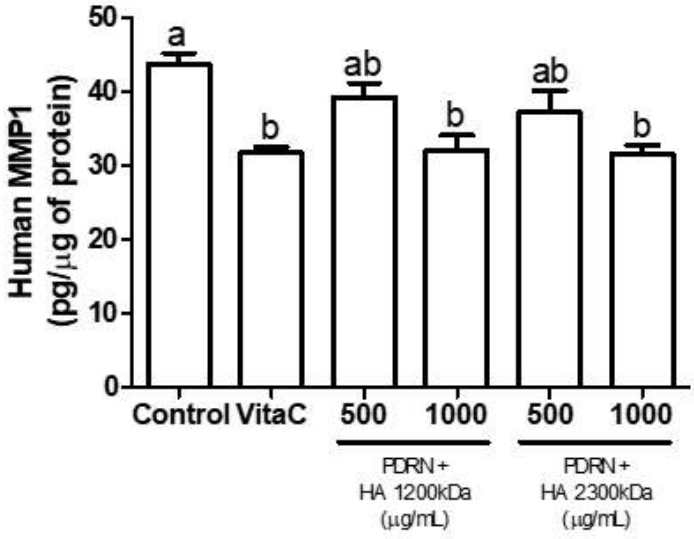


- PDRN과 HA 10 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군에 비해 elastase 저해 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음.
- PDRN과 HA 800 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군에 비해 elastase 저해 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음.
- PDRN과 HA 1200 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음.
- PDRN과 HA 2300 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음.

결론적으로, HA-PDRN complex은 농도 의존적으로 elastase 활성을 저해하는 효능을 보이며, HA 분자량이 높아질수록 PDRN과의 complex에서 elastase 활성 저해 효능이 뛰어남. 따라서 고분자량의 HA과 PDRN complex의 처리는 elastase 활성을 저해시켜 피부 노화 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.

4) HA-PDRN complex의 MMP1 생합성 저해 효능 평가

- Matrix metalloproteinase (MMPs)는 피부의 콜라겐을 분해하는 효소로, 피부의 총 콜라겐의 80%를 차지하는 type 1 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP1의 생합성 저해 효능을 평가하여 HA-PDRN complex의 피부의 노화 억제 작용을 확인하였음. 양성 대조군으로 비타민 C를 사용하였고, 농도는 200 μg/mL로 진행함.



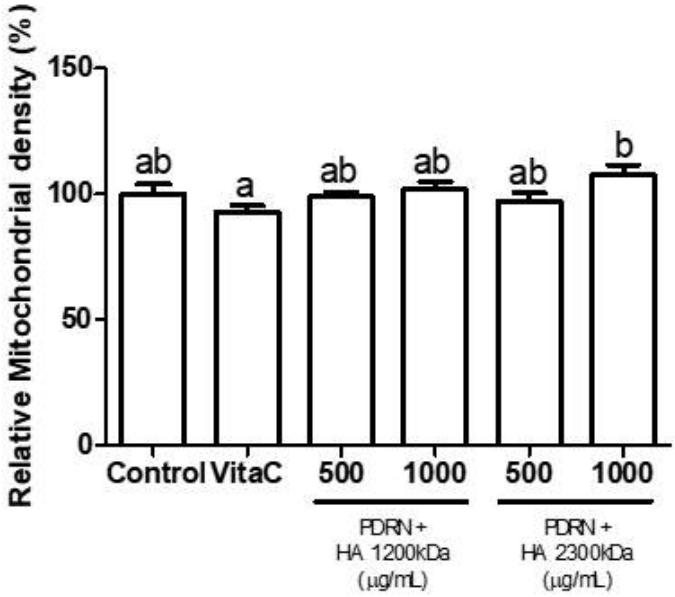
- PDRN과 HA 1200 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 MMP1 생합성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군 대비 MMP1 생합성이 유의한 수준으로 감소함.
- PDRN과 HA 1200 kDa complex을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 MMP1 생합성이 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보임. 특히 고농도 처리군인 1000 μg/mL에서 대조군 대비 MMP1 생합성이 유의한 수준으로 감소함.

결론적으로, 1200, 2300 kDa HA과 PDRN complex은 농도 의존적으로 MMP1 생합성을 저해하는 효능을 보임. 따라서 1200, 2300 kDa HA과 PDRN complex 처리는 MMP1 생합성을 저해하여 피부 노화 예방에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대됨.

5) HA-PDRN complex의 미토콘드리아 생합성 효능 평가

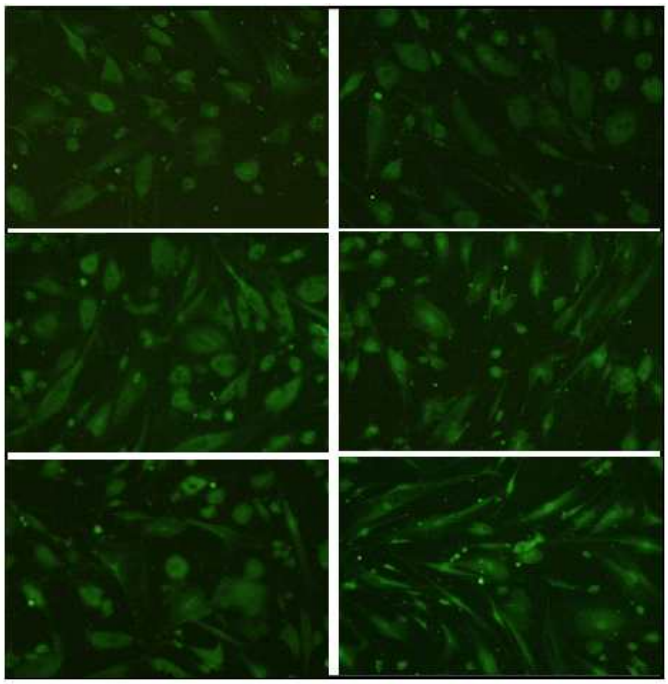
- 미토콘드리아 생합성 효능을 평가하기 위해 MitoTracker assay를 통하여 HA- PDRN complex의 미토콘드리아 density 증가 효능을 평가하였음.

- CCD-986sk 세포에 PDRN과 HA 분자량 1200, 2300 kDa의 complex을 각각 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리하여 MitoTracker를 수행하였음. 그 결과, HA-PDRN complex 모든 처리군에서 MitoTracker 형광 신호가 대조군 대비 유의적인 차이 없었음.



- 현미경을 이용하여 얻은 이미지에서도 HA-PDRN complex와 대조군의 녹색 형광의 발현이 비슷하게 나타났음. 이는 HA-PDRN complex는 미토콘드리아 생합성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨.

Control	Vitamin C
PDRN + HA 1200kDa 500 μg/mL	PDRN + HA 1200kDa 1000 μg/mL
PDRN + HA 2300kDa 500 μg/mL	PDRN + HA 2300kDa 1000 μg/mL



※ (추가 수행) Crude PDRN과 의약용 PDRN의 피부 기능성 효능 비교

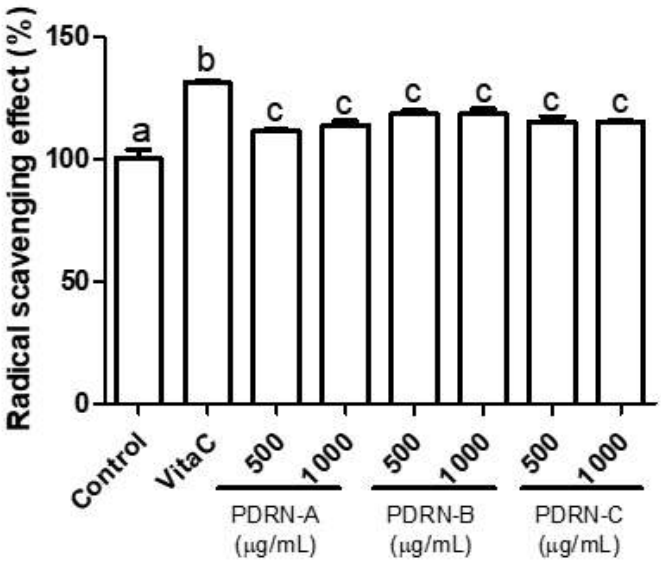
○ 본 과제에서 사용한 식품/화장품용 crude PDRN과 시중 판매되고 있는 고가 의약용 PDRN의 피부 기능성 효능 비교 연구를 추가적으로 진행함

- 의약용 PDRN(2종): PLACENTEX®와 ㈜파마리서치프로덕트사(PR-PRODUCT)의 PDRN제품을 사용, ㈜진우바이오에서 공여 받음
- crude PDRN(1종): DNA-Na(Maruha Nihichiro Corp.)

  * 관련 문헌: Kawarazaki et. al., 2008, Mitarai et al., 2008, Mitarai et. al., 2008, Hsu et. al., 2009

1) 식품용 PDRN과 의약용 PDRN의 항산화 효능 평가 - DPPH radical scavenging activity

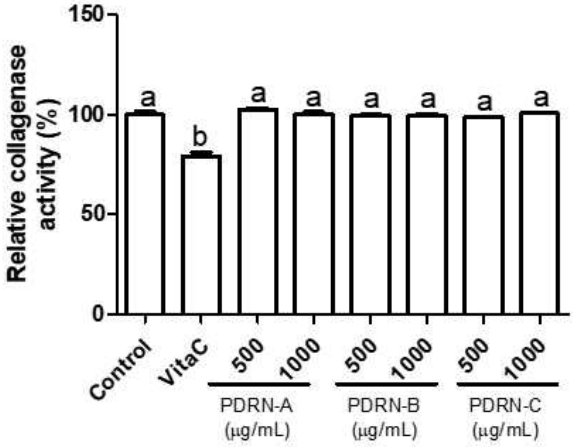
- 식품용과 의약용 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리했을 때 각각 대조군 대비 항산화 효능이 유의한 수준으로 높게 나타났음. 따라서 식품용과 의약용 PDRN은 모두 항산화 효능이 우수한 것으로 사료됨.



* PDRN-A: crude PDRN, PDRN-B: PLACENTEX , PDRN-C: PR-PRODUCT

2) 식품용 PDRN과 의약용 PDRN의 collagenase 활성 저해 효능 평가

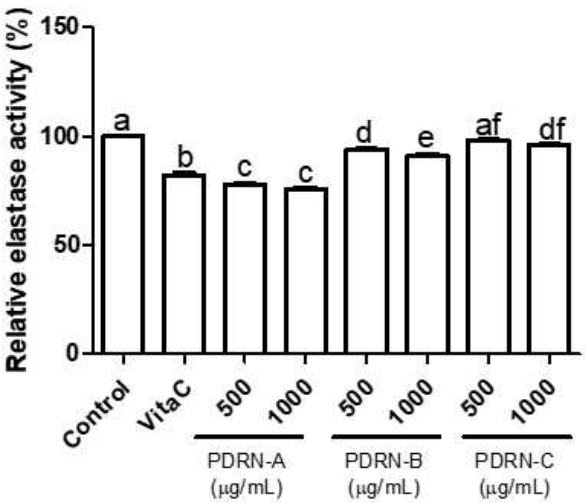
- 식품용과 의약용 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 유의적인 차이가 없음. 이는 식품용과 의약용 PDRN은 collagenase 활성 저해 효능이 없는 것을 확인함.



* PDRN-A: crude PDRN, PDRN-B: PLACENTEX , PDRN-C: PR-PRODUCT

3) 식품용 PDRN과 의약용 PDRN의 elastase 활성 저해 효능 평가

- 식품용 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 농도 의존적으로 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였으며, 이는 양성 대조군인 비타민C보다 elastase 활성 저해 효능이 우수한 것으로 나타남.
- 의약용 PDRN을 500, 1000 μg/mL의 농도로 처리 시 대조군 대비 농도 의존적으로 elastase 활성이 유의한 수준으로 감소하였음.
- 따라서 식품용 PDRN은 의약용 PDRN보다 강력한 elastase 활성 저해 효능으로 피부 노화 예방에 도움 줄 수 있을 것으로 사료됨.



* PDRN-A: crude PDRN, PDRN-B: PLACENTEX , PDRN-C: PR-PRODUCT

▣ 연구개발 추진전략 및 방법

가. 추진 전략

1. HA-PDRN complex 제조와 이를 통한 제품화 달성을 위해
- 주관기관이 기 보유한 HA 관련 연구와 생산 관련 역량 활용
- 세부기관이 보유한 다당체 등의 물리적 구조적 특성 파악 역량 활용
- 위탁기관이 보유한 효능 관련 기능성 연구 관련 역량 활용

나. 세부 추진 전략

1. HA 원료 관련 생산기지는 중국 구비 완료
- 주관기관인 ㈜진우바이오는 HA 관련 화장품용, 의약용 원료 생산은 기술이전을 통해 중국에 생산기지 구비
- 최고의 가격과 품질 경쟁력을 갖춘 원료 생산과 판매 진행 중
2. HA 활용한 완제품 생산기지는 한국 내 자가 생산 설비 구비 예정
- 전문의약품이 아닌 HA 활용 의료기기 제품 생산을 위한 생산기지를 국내에 준비 중
- 2018년 국내 생산기지 준비 후 이곳을 활용하여 제품화 예정
3. 중국에서 생산된 HA 원료를 국내에서 제품화하여 중국 내 등록 통해 수출 진행 예정
- 원료는 원가로 수입하여 2차 제품화한 후 고가에 중국 내 수출 진행 예정
4. 본 과제를 위한 최적 제조 조건과 기능성 자료 확보를 위해 참여기관 필요
- 세부기관: 다당체 관련 합성과 물성 파악 전문
- 위탁기관: 차별화된 기능성 *in vitro* & *in vivo* 수행 전문
5. 전문 인력 확보 관련
- 성공적 과제 수행 후 제품화 시 참여연구팀 내 담당자를 채용하여 즉시 활용 가능

다. 상세 실험 방법

1. 1차년도

1) 주관기관((주)진우바이오)
- HA Salt 대량생산 조건 확립
- 미생물 발효 후 결정화 → 1차 정제 → 2차 정제 → 3차 정제 후 salt (NaCl, KCl, $CaCl_2$, $MgCl_2$, $ZnCl_2$ 등)로 결정화하여 HA-salt를 제조하는 조건 확립

2) 세부기관(고려대학교 식품생물화학소재연구실)

① HA 분자량별 특성 파악
- 해리도

② 다양한 Salt 도입에 따른 HA 물리적 특성 변화 확인
- 점도: viscometer
- 열적 특성: DSC를 통한 onset, peak, final temperature 측정
- 구조 확인: FT-IR, NMR

③ 최종 HA-PDRN complex 제조에 사용할 최적화 salt 결정

④ pH 등 조건 변화에 따른 최적 HA-PDRN complex 특성 확인

- 점도: viscometer
- 열적 특성: DSC를 통한 onset, peak, final temperature 측정
- 구조 확인: FT-IR, NMR

3) 위탁기관(고려대학교 식품생의학연구실)

<HA 및 PDRN의 피부 기능성 확인>

① HA 및 PDRN의 안전성 평가

- MTT 방법: 분자량별 HA의 세포독성을 알아보기 위하여 배양세포주를 이용하여 MTT (3-[4.5-dimethlythiawol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 분석을 수행함. 이후 세포 독성이 없는 농도를 선정하여 실험에 사용함.

② HA 및 PDRN의 주름 개선 효능 평가

○ 항산화 효능 검증 (ROS 제거능)

○ Elastase inhibitory assay : 나이, 자외선과 같은 내·외적 스트레스로 인하여 탄력성, 윤택성이 감소하고 과다 발현된 elastase에 의하여 elastin의 그물망 구조가 깨지 면 피부가 처지고 주름이 생길 수 있음. 따라서 피부 노화의 주원인 중 하나인 엘라스틴 분해효소 elastase의 활성을 저해시킴으로써 피부 노화를 억제할 수 있음. HA 및 PDRN의 elastase 저해 활성을 측정하기 위해 Tris-HCl 용액 (0.2 M)에 시료를 가한 뒤 기질 N-succinyl-$(Ala)_3$-p-nitroanilide를 첨가하여 complex를 25℃에서 배양한 후 405 nm에서 흡광도를 측정함.

○ Collagen 합성 촉진 효능 측정 : 피부의 주름개선 효과를 검정하는 collagen 합성 효능을 알아보기 위해 사람 섬유아세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well씩 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 24시간 배양시킨 다음 시료를 처리 한 뒤 Procollagen Type I C-peptide EIA kit(Takara Bio Inc. MK101)를 이용하여 콜라겐 양을 측정함. 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 표준 농도곡선을 작성하여 콜라겐 양을 산정함.

○ Type 1 collagenase(MMP-1) 생합성 억제 효능 평가 : MMP-1가 과발현 되면 피부 구조 단백질들이 분해가 되어 피부 주름이 생성이 많아짐. 사람 섬유아세포를 96 well plate에 1×10^4 cells/well씩 분주하여 10% FBS/DMEM 배지로 24시간 배양시킨 다음 시료를 처리 한 뒤 ELISA 방법을 사용하여 생성된 MMP-1 양을 정량함.

○ 미토콘드리아 생합성능 평가 : 피부 기능성에 최적 효능을 나타내는 HA 분자량을 1-2종 선정하여 미토콘드리아 생합성 효능을 평가함.(관련 유전자 및 단백질 발현 분석, 미토콘드리아 밀도 측정)

2. 2차년도

1) 주관 기관((주)진우바이오)

○ 최종 선정 분자량대의 HA 생산 조건 확립

- 최종 결정화 전에 액상에 열처리 통해 분자량 설정

○ HA-PDRN complex의 대량생산 조건 확립

○ 미생물 배양 후 1차 정제 → 2차 정제 → 3차 정제 → Salt 처리 후 결정화 → 에탄올 용매

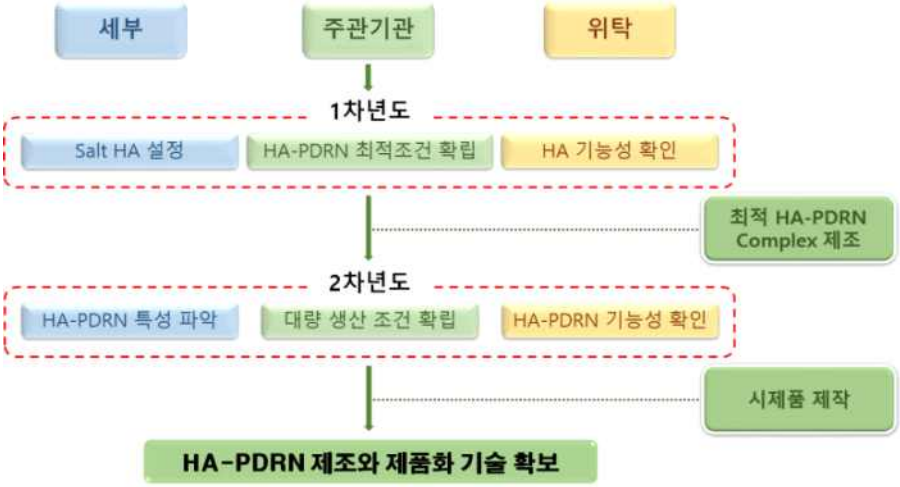
완전 제거(건조) → 1~2% 농도로 재용해 → pH 조절 → PDRN 투입에 의해 최적 HA-PDRN complex 제조 조건 확립

2) 세부기관(고려대학교 식품생물소재화학연구실)
- 기존 HA 대비 HA-PDRN complex의 물성 확인
- 물리적 특성(점도, 열적 특성 등)
- 효소 분해 안정성 측정

3) 위탁기관(고려대학교 식품생의학연구실)
<HA-PDRN 복합체의 피부 기능성 평가>

① HA-PDRN 복합체의 안전성 평가 : MTT 방법으로 HA-PDRN 복합체의 세포독성 평가
② HA-PDRN 복합체의 피부 기능성 평가
○ 항산화 효능 검증(ROS 제거능)
○ Elastase inhibitory assay
○ Collagen 합성 촉진 효능 측정
○ Type 1 collagenase(MMP-1) 생합성 억제 효능 평가
○ 미토콘드리아 생합성능 평가
③ HA-PDRN 복합체의 피부 기능성 평가(*in vivo*)
○ UVB 조사 : 광노화를 자극시키기 위하여 UVB를 주 3회 무모 마우스의 등 부분에 조사하며 자외선의 조사량은 처음 1주간은 30 mJ/cm^2, 2주는 60 mJ/cm^2, 3주는 90 mJ/cm^2, 4주는 120 mJ/cm^2, 5주부터 10주까지는 150 mJ/cm^{2}로 10주 동안 조사함.
○ 조직학적 관찰 : 에 HA-PDRN 복합체 도포액을 10주 동안 1일 1회씩 등 부위에 도포처치함. 실험 종료 후, 대조군과 HA-PDRN 복합체 처치군 마우스를 에테르로 마취한 후 피부 조직을 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정하여 조직학적 관찰에 이용함.
○ 조직 콜라겐 염색 : 적출한 피부 조직을 포르말린 용액에 하루 동안 고정한 후 sucrose에 담궈 하루 동안 당침시켜 냉동절편기를 이용하여 10 μM 두께로 자른 다음 Trichrome stain kit로 염색하여 관찰함.

▣ 연구개발 추진체계



연구개발과제		총 참 여 연 구 원
과제명	히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술 개발	주관연구책임자 (권동건)외 총 3명

기 관 별 참 여 현 황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
중소기업	1	
대 학	2	

(주관) ㈜진우바이오
히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술 개발
연구책임자명 권동건 외 2명
담당기술개발내용
1. HA-PDRN 대량생산 조건 확립 2. HA-PDRN 화장품/외용제 시제품 제조 및 이를 통한 원가파악

(위탁)고려대
히알루론산과 PDRN 복합체의 기능성 연구
연구책임자명 이성준 외 2명
담당기술개발내용
1. HA-PDRN complex의 피부 기능성 평가 시스템 구축 2. HA-PDRN complex의 안전성 평가 3. HA-PDRN complex의 피부 기능성 평가(*in vitro, in vivo*)

(세부)고려대
히알루론산과 PDRN 복합체의 제조와 이화학적 특성 연구
연구책임자명 임승택 외 4명
담당기술개발내용
1. HA-PDRN complex의 물리적 특성 확인 2. HA-PDRN complex의 구조적 특성 확인 3. HA-PDRN complex의 열적 특성 확인 4. HA-PDRN complex의 안정성 파악

▣ 연구개발 추진일정

1차년도															
일련번호	연구내용	월별 추진 일정												연구개발비(단위: 천원)	책임자(소속기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	계획 재확인													2,000	권동건 (진우바이오)
2	최적 HA Salt 확인													30,000 30,000	권동건 (진우바이오) 임숭택 (고려대)
3	HA 분자량별 효능 파악													16,000	이성준 (고려대)
4	최적 HA 분자량 설정													18,000 20,000 4,000	권동건 임승택 이성준
5	HA-PDRN complex 제조 조건 확립													50,000 30,000	권동건 임승택
2차년도															
1	HA-PDRN 대량생산 조건 확립													90,000	권동건
2	Complex 특성 파악													80,000	임승택
3	Complex 차별화된 기능성 파악													20,000	이성준
4	시제품 제작													10,000	권동건

2-2. 연구 개발 성과

가. 논문게재 성과

게재연도	논문명	저자명	학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
2018	감마선을 이용한 고기능성 히알루론산/연어 추출물 제형개발	하만, 권동건	J. the Korean Society of Radiology	12(1)	국내	×
2019	Quantification of Hypopigmentation Activity In Vitro	이성준, 김연지, 권동건	JoVE	Video Article (IN-PRESS)	국외	○

나. 특허성과

(1) 출원

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2017	용매 캐스팅에 의한 히알루론산염 필름의 제조방법 및 이로부터 제조된 히알루론산염 필름	㈜진우바이오	대한민국	10-2017-0029094
2018	자동 도포기에 의한 구강건조 개선용 가식성 히알루론산염 필름의 제조방법 및 이로부터 제조된 구강건조 개선용 가식성 히알루론산염 필름	㈜진우바이오	대한민국	10-2018-0000182
2018	히알루론산염 필름의 제조방법 및 이로부터 제조된 히알루론산염 필름	㈜진우바이오	대한민국	10-2018-0027063
2018	히알루론산-폴리데옥시리보뉴클레오타이드 복합체와 이를 활용한 필름 및 이의 제조방법	㈜진우바이오	대한민국	10-2018-0140876
2018	히알루론산염 필름의 제조방법 및 이로부터 제조된 히알루론산염 필름	㈜진우바이오	해외	PCT/KR2018/002727

(2) 등록

등록연도	특허명	등록인	등록번호
2019	용매 캐스팅에 의한 히알루론산염 필름의 제조방법 및 이로부터 제조된 히알루론산염 필름	㈜진우바이오	10-1937681

다. 보고서 원문

등록연도	보고서 구분
2018	중간보고서 제출
2019	최종보고서 제출

라. 기타

(1) 학술발표

발표일시	발표제목	발표자	장소, 국명
2017.11.09	Preparation of functional skin external agent by complex formation between hyaluronic acid and polydeoxyribonucleotide	김슬기 외 5명	HICO(경주), 한국
	Anti-aging activities of polydepoxyribonucleotide in CCD-986sk human	김연지 외 3명	
2018.06.28	Effect of molecular weight and plasticizer on hyaluronic acid used for oral film	김슬기, 임승택, 권동건	BEXCO(부산), 한국
	PDRN induces hypopigmentation and mitochondrial biogenesis in cultured skin cell	김민정, 김연지, 이성준	

(2) 고용창출 및 연구인력양성

연도	구분	이름	소속	비고
2017	고용창출	하만	㈜진우바이오	신규채용
2017	인력양성	최소망	고려대학교산학협력단	석사
2018	인력양성	김슬기	고려대학교산학협력단	석사
2018	인력양성	김민정	고려대학교산학협력단	석사

(2) 전시회 참석

연도	유형	행사명칭	전시품목	장소
2017	전시회	FI KOREA 2017	HA, PDRN	서울aT센터

2-3. 연구결과

가. 기술적 성과

(1) HA의 기능성 증대

- 수분 보유력에 기인한 항노화 효과 우수
- 실제적인 항산화, 콜라겐 생성과 엘라스틴 생성 및 미토콘드리아 생성 능력 등의 효과는 미미하거나 안정성이 낮음

- 조직 재생 능력과 콜라겐 생선과 미토콘드리아 생성 능력 및 항산화 효능이 뛰어난 PDRN 도입을 통해 HA의 기능성 증대는 물론 안정성 증대 확인

(2) PDRN 활용 가능성 증대

- 화장품용으로 사용하기엔 너무 고가인 기존 의약용 PDRN과 본 과제에서 사용한 일반 화장품용/식품용 PDRN의 기능성 비교
  - 항산화 효능, 콜라겐 생성능은 의약용 PDRN과 동일
  - 그러나, 엘라스틴 생성 능력은 의약용 PDRN 대비 본 과제에서 활용한 화장품용/식품용 PDRN이 더욱 우수함을 입증

(3) HA-PDRN complex의 피부외용제 제품화 기술 확보

○ 일반 화장품 제형 (미스트와 앰플) 형태의 시제품 제작 완료를 통해 시장 진입 준비 완료
  - 특히 PDRN 첨가에 의해 기능성이 증대할 것으로 기대됨

(4) HA-PDRN complex 필름의 경피용 필름 제품화 기술 확보

○ 경피용 필름 (마스크 팩 또는 패치)의 제품화 기술 확보
  - PDRN 도입에 따라 기계적 물성과 증가와 안정성이 증가됨을 확인
  - 이를 통해 HA 필름화 시 제품화가 용이

(5) 국내 HA와 PDRN이 고농도로 함유된 피부외용제 제품 전무

○ 본 과제 수행을 통해 확보된 효능 자료를 활용하여 시장 진입이 용이할 것으로 추정됨

나. 경제적 성과

(1) 매출 관련

○ 본 과제 수행을 통해 얻은 HA와 PDRN 및 HA-PDRN complex의 항노화 효능 자료를 활용하여 신규 업체에 론칭 성공 / 제품화 완료

○ 추가적으로 현재 국내외 화장품 전문업체 기술이전 진행 중
  - 국내: K사, I사 등
  - 해외: [일본] R사, K사 등, [프랑스] S사 등

한국 콜마 측 기술이전 진행 확인서	
비밀유지계약서 (주)진우바이오(이하 "갑"이라 한다)와(과) 한국콜마(주) (이하 "을"이라 한다)은(는) 다음과 같이 비밀유지계약을 체결한다. **제1조 (계약의 목적)** 본 계약은 갑·을이 상호 자신의 비밀정보를 제공함에 있어 계약 당사자의 관련 비밀정보를 보호하기 위함을 목적으로 한다. **제2조 (비밀의 내용)** 본 계약상 비밀정보란 갑·을간의 업무진행 과정에서 본 계약의 일방 당사자가 상대방에게 제공하거나 상대방 혹은 그 직원으로부터 지득 혹은 취득하는 상대방의 일체의 영업 혹은 기술상의 정보 및 이와 같은 영업 혹은 기술상의 정보에 근거하여 자사가 개발하거나 도출하는 일체의 영업 혹은 기술상의 정보(이하 "비밀정보"라 한다)를 말한다. 이와 같은 비밀정보는 서면, 구두 혹은 기타 방법으로 제공되는 모든 노하우, 공정, 도면, 설계, 실험결과, 샘플, 스펙, 데이타, 공식, 방법, 프로그램, 가격표, 거래명세서, 정산 포스트, 선전상의 아이디어, 사업정보 등을 모두 포함한다. **제3조 (비밀의 표시)** 갑·을은 상대방에게 서면이나 서류 형태로 비밀정보를 제공하는 경우 서류상에 비밀임을 알리는 문구("비밀")를 명확히 표시해야 하며 서면이나 서류 이외의 형태 즉 구두나 영상 또는 당사자의 사실, 장비 샘플 기타 동목들을 관찰하거나 조사함으로써 비밀정보를 제공할 경우에는 공개 시 상대방에게 본 정보가 비밀에 속한다는 것을 알리고 또한 공개일로부터 (10)일 이내에 서면으로 비밀임을 알리는 문구를 표시하여 상대방에게 확인시켜야 한다. **제4조 (정보의 사용 범도 제한)** 본 계약의 당사자는 상대방으로부터 제공받은 비밀정보를 관련 계약서에 명시된 본래의 목적에만 사용하여야 하며, 계약의 수행을 위하여 상대방에 관련된 비밀정보를 상대방의 승인없이 제3자에게 제공할 수 없으며, 승인 후 제공할 경우에도 당해 제3자와 별도의 비밀유지계약을 체결하여야 한다. **제5조 (정보취급자)** 본 계약의 당사자는 상대방으로부터 제공받은 비밀정보를 자사 조직 내 목적상 부합하는 직원들에 한하여 이용하도록 조치하여야 하며 직원 각자에게 비밀유지의무를 주지시켜야 한다. 또한 상대방이 요구하는 경우 자사의 관계직원들에 대하여 당해 직원이 본 계약상의 비밀유지의무를 이행하겠다는 내용의 각서를 징구하는 등	**제10조 (계약의 분리가능성)** 본 계약 중 어느 규정이 법률에 의하여 불법, 무효 또는 집행불가능하다고 선언될 경우, 이는 본 계약의 나머지 규정의 유효성에 영향을 미치지 아니한다. **제11조 (계약의 수정)** 본 계약의 수정이나 변경은 양 당사자의 정당한 대표자가 서명한 서면합의로만 이루어질 수 있다. **제12조 (손해배상 등)** ① 본 계약을 위반한 당사자는 비밀유지의무 위반행위로 인하여 상대방이 입은 모든 손해를 배상한다. **제13조 (계약기간)** 본 계약은 본 계약 체결일로부터 (5)년간 그 효력을 가진다. **제14조 (분쟁의 해결)** 본 계약과 관련하여 분쟁이 발생한 경우 당사자의 상호 협의에 의한 해결을 모색하되, 분쟁에 관한 합의가 이루어지지 아니한 경우에는 서울중앙지방법원을 합의관할로 하여 소송을 통해 분쟁을 해결하기로 한다. 본 계약의 체결사실 및 계약내용을 증명하기 위하여 본 계약서를 2통 작성하여 계약 당사자가 각각 서명 또는 날인한 후 각 1통씩 보관한다. 2019년 1월 15일 (갑) 위진우바이오 주소: 서울 성북구 화랑로 14 길, 5, 한국과학기술연구원 (KIST) H-1 동 903AE 호 상호: (주)진우바이오 성명: 대표 권 동 근 (인) (을) 한국콜마(주) 주소: 서울특별시 서초구 사임당로 18 상호: 한국콜마(주) 성명: 개발본부 본부장 최동재

(2) 관련 사업 기여도

○ 일반 화장품이 아닌 피부과 또는 성형외과 등의 전문 병원용 제품으로 사업화 통해 고가의 피부외용제 수입품 등 대체 예정

○ 현재 강남 O병원, K 병원 등과 제품화 협의 진행 중

2-4. 결론

○ 주관기관

- HA-PDRN complex 대량생산 기술 확보와 제품화 성공적 수행
- 관련 제품 자체적으로 시장 진입 완료
- 추가적으로 한국과 일본의 주요 업체를 상대로 기술이전 진행 중

○ 세부 기관

- HA-PDRN complex의 물리화학적 구조 확인 성공적 수행
- HA에 PDRN 도입에 따른 구조 변화 확인과 안정성 증가 확인

○ 위탁 기관

- HA와 PDRN 및 HA-PDRN complex의 항노화 관련 효능 자료 확보 성공적 수행
- 항산화능, 콜라겐 생성능, 엘라스틴 생성능, 미토콘드리아 증대 관련 효능 자료 확보

▶ 최종적으로 연구 성과와 사업 성과 모두 성공적으로 수행 완료

(5) 사업화 현황

○ HA-PDRN complex 매출 발생

○ 시장 점유율 화장품 완제품 시장 기준

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.5억원
			향후 3년간 매출 예상	20억원
		관련제품	개발후 현재까지	20억원
			향후 3년간 매출	100억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 0% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 20% 국외 : 0%
			향후 3년간 매출	국내 : 50% 국외 : 10%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위 (원료 기준)		3위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위 (원료 기준)		1위

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

코드번호	C-13-01

구분	내용
최종목표	**1. 정성적 목표** 1) HA-PDRN complex 제조 기술 확보 2) PDRN 도입에 따른 HA 물리적 특성 변화와 기능성 증대 자료 확보 3) 제품화 기술 확보: 화장품 또는 조직수복용 시제품 제조 **2. 정량적 목표** 1) 국내 특허 출원 2건 2) 제품화 1건 3) 고용 창출 1명 4) SCI 논문 1건 / 비 SCI 논문 1건 5) 학술 발표 2건

3-2. 목표 달성여부

구분	내용	달성 여부
정성적	1. HA-PDRN complex 제조 기술 확보 2. PDRN 도입에 따른 HA 물리적 특성 변화와 기능성 증대 자료 확보 3. 제품화 기술 확보: 화장품 또는 조직수복용 시제품 제조	○
정량적	1. 특허 출원 4건, 등록 1건, PCT 출원 1건 2. 제품화 1건 3. 고용 창출 1건 4. 투자 유치 2.2억 이상 (3.67억) 5. SCI 논문 1건, 비SCI 논문 1건 6. 학술 발표 4건	○

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

4-1. 활용분야 및 활용방안

(1) 피부외용제

○ 최근 병원 또는 약국 기반의 화장품 제형 인기

○ HA와 PDRN의 항노화 효과와 피부 재생 능력을 강조한 화장품 제형으로 특화된 제품군 개발

○ 피부과/성형외과 시술 후 치료를 돕는 전문화장품으로 활용 예정

○ HA는 ICID에 이미 등재되어있고, PDRN은 의약품이므로 화장품에는 사용이 불가함

- 당사는 ICID에 등재된 DNA-Na 추출물 형태로 인정받아 사용 가능
- 신규 물질인 HA-PDRN complex를 활용한 제품 개발에 따른 원료명 표기 시, 신규로 ICID에 등재가 필요하나 오랜 시간이 소요됨
- 당사가 개발한 HA-PDRN complex는 pH 조절에 의해 complex 형성 및 해리를 조절할 수 있기 때문에, 본 과제를 통해 개발된 피부외용제 제형에는 HA와 DNA-Na의 혼합물 형태로 제품 표시가 가능하여 빠른 제품화가 가능함
- 추후 고가의 의약외품 등으로의 용도 확대 시 HA-PDRN complex의 안전성에 관련된 자료를 확보하여 신규 물질로 등록할 예정

(2) 경피용 필름 관련

○ 가격 경쟁이 치열한 기존 마스크 팩을 대체하는 특허권이 확보가 가능하여 고부가가치 제품화가 가능한 HA와 PDRN만으로 이루어진 패치 또는 마스크 팩으로 제품화 예정

4-2. 추가 연구의 필요성

○ 피부 기능성과 염증 억제 및 조직 재생 기능 자료 확보를 통한 의약외품 개발 진행 예정

4-3. 타 연구에의 응용

○ 당사가 원천 기술개발 후 제품화 진행하고 있는 의약과 의료기기용 100% HA 실과 필름의 기능성 개선 제품 개발에 활용 예정

○ 성형 관련 안면 삽입용 HA 실의 경우 PDRN 도입에 의해 조직 재생 효능 부여와 인체 내 지속 능력 증대를 통한 제품 가치 업그레이드 진행 예정

○ 유착 방지제용으로 활용 예정인 HA 필름의 경우 PDRN 도입에 의해 조직 재생 능력과 인체 내 흡수 정도 증대를 통하여 제품 가치 업그레이드 진행 예정

4-4. 기업화 추진 방안

○ 현재 HA 실과 필름을 활용한 의약/의료기기 제품 시장 진입을 위한 생산 공장 구비를 위한 투자 작업 진행 중

- 투자 진행 규모: 50~80억
- 투자 완료 시기: 2019년 6월 내
- 공장 구비 완료 시기: 2019년 12월 내

4-5. 기술이전

○ 피부외용제 및 화장품 분야는 전문업체에 기술이전 통해 진행 예정

- 한국: K사, I 사 등
- 일본: R사, K사 등

붙임. 참고문헌

저자	제목	저널명	Vol.(No.) & pages	연도
L.Lapcik, Jr. et. al.	Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications	Chemical Reviews	98(8), 2663-2684	1998
J. Kolar et. al.	Hyaluronic acid(hyaluronan): a reivew	Veterinarni Medicina	53(8), 397-411	2008
Frederic Bonte et. al.,	Skin hydration: a review on its molecular mechanisms	J. Cosmetic Dermatology	6, 75-82	2007
G. Karakiulakis et al.	Hyaluronic acid A key molecule in skin aging	Dermato-Endocrinology	4(3), 253-258	2012
L. C. Becker et. al.	Final Report of the Safety Assessment of Hyaluronic Acid, Potassium Hyaluronate, and Sodium Hyaluronate	Int. J. Toxicology	28(4S), 5-67	2009
M. Farwick et. al.	Efficacy of Cream-Based Nolvel Formations of Hyaluronic Acid of Different Molecular Weights in Anti-Wrinkle Treatment	J. Drugs in Dermatology	10(9), 990-1000	2011
O. Piot et. al.	Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy	Skin Research and Technology	22, 55-62	2016
A. Balbi et. al.	Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent	J. Pharm. and Biomed. Anal.	14. 1555-1560	1996
Tonello et. al.	Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent	J Pharm Biomed Anal.	14(11), 1555-1560	1996
D. Altavilla et. al.	Polydeoxyribonucleotide improvesangiogenesis and wound healing in experimental thermal injury	Crit. Care Med.	36(5), 1594-1602	2008
Bianchini et al.	Pharmacological data on polydeoxyribonucleotide of human placenta	Int J Tissue React.	3(3-4), 151-154	1981
Galeano et. al.	Polydeoxyribonucleotide stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse	Wound Repair Regen.	16(2), 208-217	2008
M. Kawarazaki et. al.	Effect of Taking DNA-Na from Chum Salmon Milt on Ethanol Metabolism	Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	55(12), 632-636	2008
M. Mitarai et. al.	Effect of Dietary DNA from Chum Salmon Milt on Memory and Age-related Changes in Senescence-accelerated Mice	Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	55(10), 461-467	2008
M. Mitarai et. al.	Effect of Dietary DNA from Chum Salmon Milt on Endurance Running Capacity of Mice	Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi	55(10), 510-514	2008

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td rowspan="2">과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발</td></tr>
<tr><td colspan="5">(영문) Preparation of highly functrional skin external agent formulation and development of its commercialization technology</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">㈜진우바이오</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속) ㈜진우바이오</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">-</td><td colspan="2">(성명) 권동건</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비
(400,000천원)</td><td>계</td><td>400,000원</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2016.12.05.~2018.12.04.(2년)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>300,000천원</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>11</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>100,000천원</td><td>내부인원</td><td>11</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td>-</td><td>외부인원</td><td>11</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 성과

1. HA-PDRN complex 제조 기술 확보: 특허 출원 4건, 등록 1건, PCT 출원 1건
2. PDRN 도입에 따른 HA 물리적 특성 변화와 기능성 증대 자료 확보: SCI 논문 1건, 비SCI 논문 1건, 학술 발표 4건
3. 제품화 기술 확보: 화장품/조직수복용 시제품 제조(피부외용제 3종, 패치 1종)

○ 연구내용 및 결과

1. 히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발
 (1) HA-PDRN complex 대량생산 조건 확립
  - HA 관련 5t과 20t 규모의 대량생산 조건 확립
  - HA-PDRN complex의 5t 규모의 대량생산 조건 확립
 (2) 제품화
  - 피부외용제용 제품화 완료 (미스트와 세럼 형태)
  - 경피용 패치용 대량생산 기술 확보

2. 히알루론산과 PDRN 복합체의 제조 및 이화학적 특성 연구
 (1) HA-PDRN complex 생성 조건 확립
  - HA와 PDRN 해리도 측정을 통한 complex 생성 조건 확립
 (2) HA-PDRN complex의 물리, 화학적 특성 분석
  - 기계적 특성 확인
  - FT-IR과 DSC 등 측정을 통한 구조 확인과 열적 특성변화 등 확인
  - 효소 분해 안정성 향상 확인

3. 히알루론산과 PDRN 복합체의 기능성 연구
❍ HA와 PDRN의 항노화 효과 확인
❍ HA-PDRN complex의 항노화 효과 확인
❍ MTT Assay에 의한 안정성 확인/DPPH 측정에 의한 항산화능 확인/콜라겐과 엘라스틴 및 미토콘드리아 합성능 증대 확인

4. 최종 PDRN 도입에 의한 HA의 피부의 기능성 증대 확인

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 제품화 관련

1) 생체 적합성이 있고 항노화 효과가 우수한 히알루론산 (HA)의 추가 기능성 향상과 안정성 증대를 위해 조직 재생 능력이 우수한 Poly(deoxynucleotide) (PDRN)를 사용하여 이온 결합에 의한 HA-PDRN complex 제조 공정 확립

2) HA-PDRN complex의 대량 생산 공정 확보를 통한 다양한 형태의 피부 외용제로 활용한 시제품 생산을 통한 원가 파악

- 화장품과 피부 외용제 또는 조직수복용 의료기기

3) 제품화를 위한 차별화된 기능성 자료 확보

4) 관련 기술 특허 출원 완료

5) 2019년도 당사가 구비할 의약, 의료기기, 의약외품 관련 GMP 생산 기지에서 생산 판매 진행/화장품/피부외용제를 전문으로 하는 제약 기반 전문업체에 기술이전 예정

2. 판로 확보 계획

(1) 수출 관련

- 중국 내 업체인 C사, H사, S 사 등 통해 중국 내 등록 통해 판매 진행 예정

(2) 국내 판매 관련

- 국내 화장품과 제약 또는 의약외품, 의료기기 전문업체와 제휴/기술이전으로 판매 진행
- 병원 기반업체에 기술이전을 통해 제품화 예정

3. 기대 효과

(1) HA-PDRN complex 제조 기술 확보 통해 기존 HA 응용 분야와 PDRN 응용 분야에 모두 진입 가능

(2) 가격 경쟁이 심한 화장품 또는 피부외용제용 HA와 PDRN 원료 시장에 차별화된 HA-PDRN complex 제조 기술 확보를 통해 고부가가치 제품화 가능

(3) HA는 당사 원료 OEM 생산 기지인 중국 (B사)에서 생산/활용하고, PDRN의 경우는 당사 전략적 파트너사인 일본 (M사)에서 원료를 입수/활용하여 이를 한국 내에서 HA-PDRN complex 제형을 개발하여 이를 고부가가치 완제품화 가능

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		116159-02	
사업구분	농생명산업기술개발사업				
연구분야	농림식품융복합/농생명신소재·시스템/기능성소재			과제구분	단위
사 업 명	농식품창업·벤처지원 R&D바우처시범사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과 제 명	히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발			과제유형	(기초,응용,개발)
연구기관	㈜진우바이오			연구책임자	권동건
연구기간 연 구 비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2016.12.05.-2017.12.04	150,000	50,000	200,000
	2차연도	2017.12.05.-2018.12.04	150,000	50,000	200,000
	계		300,000	100,000	400,000
참여기업	-				
상 대 국	-		상대국연구기관	-	

2. 평가일 : 2019년 1월 15일

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
㈜진우바이오	대표	권동건

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확 약	권 동 건

Ⅰ. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제는 이전에 연구된 바 없는 국내외 모두 전무하며, 그 결과물의 효능이 연구수행으로 확인됨

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

HA의 단점을 보완하기 위해 PDRN을 도입하여 항노화, 미용 관련 시장에 제품화함으로써 신규 소재의 고부가가치에 기여할 것으로 예상됨

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

결과물인 HA-PDRN complex의 시제품 생산 및 매출 발생

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

연구 목표 달성을 위해 주관기관, 협동기관, 위탁기관의 연구자들이 매우 성실히 수행하였음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

계획된 목표인 국내 특허 출원을 하였고 기 출원된 특허의 등록 완료 뿐만 아니라 추가로 PCT 출원 2건의 성과를 이뤘으며, SCI 논문 1편과 비 SCI 논문 1편의 저널 게재를 통해 연구의 질을 높였음

Ⅱ. 과제 기한 내 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
특허 출원	20	200	총 4건, PCT해외출원 1건 추가 달성
특허 등록	20	100	[과제 종료 후 목표] 2차년도 수행 중에 미리 달성
제품화	-	100	과제 수행 결과물에 대한 매출 발생, 추가 기술이전 진행 중
고용 창출	20	100	신규 인력 1인 채용
투자 유치	20	100	2.98억 투자 유치
학술 발표	20	200	총 4건
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 당초 목표로 하였던 HA 기능성 향상을 위한 PDRN 도입 성공적 수행
- 이에 따른 항노화 기능성 향상 자료 확보
- 대량생산 공정 확보를 통한 제품화 성공

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 당사는 항노화 미용 관련 바이오 소재 개발과 이를 활용한 신규 의약, 의료기기 완제품 개발 전문 기업임
- 전문화된 의약, 의료기기 분야 이외의 식품, 화장품 등의 분야 관련 개발된 기술은 과감히 기술이전을 통해 사업화 추진하는 것이 기본 방향임
- 현재 한국과 일본, 프랑스 기업과 기술이전을 진행 중이나 업체별로 요구사항이 달라 최적의 기술이전 조건을 제시하는 업체를 선정하여 진행할 예정
- 따라서 기술이전과 관련된 성과는 2019년도 내에 완료할 예정

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 본 과제 수행을 통해 확립된 기술을 활용하여 피부외용제 뿐만 아니라 의약/의료기기 제품화 관련 연구 개발 진행 중 - 현재 당사가 확보한 의약/의료기기용 HA 실과 필름의 제품에 추가 적용하여 제품화 진행 예정

Ⅳ. 보안성 검토

1. 연구책임자의 의견

특허권 출원되어 기술권 확보하였으므로 공개해도 무방하나 PCT 출원과 등록 완료를 위해 가능하다면 3년 정도 보안 유지 요청

2. 연구기관 자체의 검토결과

특허권 출원되어 기술권 확보하였으므로 공개해도 무방하나 PCT 출원과 등록 완료를 위해 가능하다면 3년 정도 보안 유지 요청

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

<table>
<tr><td>사업추진형태</td><td colspan="2">☑자유응모과제 □지정공모과제</td><td>분 야</td><td colspan="2">농림식품융복합/농생명신소재·시스템/기능성소재</td></tr>
<tr><td>연 구 과 제 명</td><td colspan="5">히알루론산을 활용한 고기능성 피부외용제의 제조 및 제품화 기술개발</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">㈜진우바이오</td><td colspan="2">주관연구책임자</td><td>권동건</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 개 발 비</td><td>정부출연
연구개발비</td><td>기업부담금</td><td colspan="2">연구기관부담금</td><td>총연구개발비</td></tr>
<tr><td>300,000,000원</td><td>100,000,000원</td><td colspan="2">-</td><td>400,000,000원</td></tr>
<tr><td>연구개발기간</td><td colspan="5">2016.12.05.~2018.12.04.</td></tr>
<tr><td>주요활용유형</td><td colspan="5">☑ 산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( )
□미활용 (사유:)</td></tr>
</table>

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 히알루론산에 PDRN도입을 통한 HA-PDRN complex 대량생산 조건 확보	1) 분자량별 HA 대량생산 조건 확보 2) Salt별 HA 대량생산 조건 확보 3) HA-PDRN complex 대량생산 조건 확보
② PDRN 도입에 따른 HA의 특성과 구조 변화 확인 (기계적·열적 특성, 안정성, 분해성 등 측정)	1) FT-IR 측정을 통한 구조적 변화 확인 2) DSC 측정을 통한 열적 특성 변화 확인 3) 효소 저항성 측정을 통한 안정성 증대 확인
③ PDRN 도입에 HA의 기능성 향상 확인 - 항노화 (콜라겐 생성, 피부 세포 재생능력)	1) 세포 독성에 대한 안전성 확인 2) 콜라겐, 엘라스틴, 미토콘드리아 생성능 증대 확인
④ HA-PDRN 제품화 기술 확보 (특허 및 시제품 제조)	1) 피부외용제로 제품화 기술 확보 2) 경피용 필름 제품화 기술 확보

3. 연구목표 대비 성과

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식재산권			기술실시(이전)		사업화					기술인증	학술성과				교육지도	인력양성	정책활용·홍보		기타(타연구활용등)
												논문		논문평균IF	학술발표					
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		SCI	비SCI					정책활용	홍보전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명	건	건	
가중치	20	20							20	20					20					
최종목표	2					1			1			1			2					
연구기간 내 달성실적	4	1				1	31		1	298		1	1		4		3			
달성율(%)	200					100			100			100			200					

4. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	화장품용 PDRN의 피부 기능성 자료
②	HA-PDRN complex 대량생산 기술
③	HA-PDRN complex의 피부 기능성 자료 및 안정성 자료

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계최초	국내최초	외국기술복제	외국기술소화흡수	외국기술개선개량	특허출원	산업체이전(상품화)	현장애로해결	정책자료	기타
①		✓				✓				
②	✓	✓				✓	✓			
③	✓	✓				✓	✓			

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
화장품용 PDRN의 피부 기능성 자료	• 저가의 화장품용 PDRN 원료와 고가의 의약용 PDRN 원료의 항노화 기능 유사 확인 • 당사가 유통 중인 화장품용 PDRN 원료 확대 판매에 활용
HA-PDRN complex 대량생산 기술	• 화장품 전문업체에 기술이전 통한 시장 확대 예정
HA-PDRN complex의 피부 기능성 자료 및 안정성 자료	• 기술이전 자료로 활용 예정

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표											연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
												논문		논문 평균 IF	학술 발표					
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자 유치		SCI	비SCI					정책 활용	홍보 전시	
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건		건		명			
가중치	20	20							20	20					20					
최종목표	2	2				1	14,500	12,500	4	1	1	2			2					
연구기간 내 달성실적	4	1				1			1	367		1	1		4		3			
연구종료 후 성과창출 계획		1					14,500	12,500	3		1	1								

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

- 해당사항 없음

<뒷면지>

주 의
1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다. 2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농생명산업기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다. 3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.