

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2020년 5월 22일 (22.05.2020)



(10) 국제공개번호

WO 2020/101327 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 5/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2019/015349

(22) 국제출원일:

2019년 11월 12일 (12.11.2019)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2018-0139190 2018년 11월 13일 (13.11.2018) KR

(71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34114 대전시 유성구 가경로 141, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 강선웅 (KANG, Sun Woong); 34087 대전시 유성구 노은서로142번길 67, Daejeon (KR). 심혜은 (SHIM, Hye Eun); 34074 대전시 유성구 지족로190번길 36, 105동 1602호, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08380 서울시 구로구 디지털로 31길 20, 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

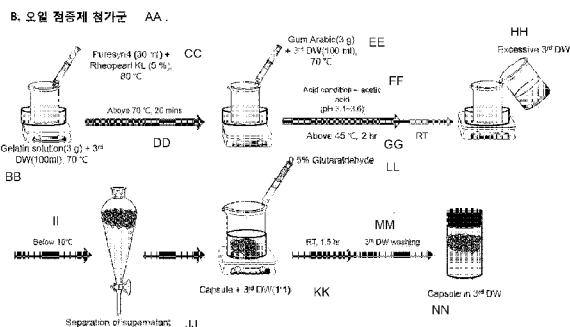
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS,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

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(54) Title: MICROCAPSULES CONTAINING NATURAL OIL AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 천연 오일을 함유하는 미세캡슐 및 이의 제조방법



AA ... Oil thickener-added group
BB ... Gelatin solution (3 g) + 3rd DW (100 ml), 70 °C
CC ... Puresyn4 (30 ml) + Rheoppearl KL (5%), 80 °C
DD ... Above 70 °C, 20 mins
EE ... Gum Arabic (3 g) + 3rd DW (100 ml), 70 °C
FF ... Acid condition - acetic acid (pH 3.1-3.6)
GG ... Above 45 °C, 2 hr
HH ... Excessive 3rd DW
II ... Below 10 °C
JJ ... Separation of supernatant
KK ... Capsule + 3rd DW (1:1)
LL ... 0.5% Glutaraldehyde
MM ... 3rd DW washing
NN ... Capsule in 3rd DW ...

(57) Abstract: The present invention relates to microcapsules containing natural oil and, more specifically, to microcapsules which contain gelatin, natural polymers, oil, and an oil thickener and have enhanced mechanical properties, and a preparation method therefor. The microcapsules containing natural oil according to the present invention have remarkably enhanced mechanical properties and retention properties, and when co-cultured with cells, the microcapsules provide the effect of inducing maturation of the cells, and thus can be used in various fields of microcarriers, cell cultures, and co-culture systems.

(57) 요약서: 본 발명은 천연 오일을 함유하는 미세캡슐에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하며, 기계적 물성이 향상된 미세캡슐 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 천연 오일을 함유하는 미세캡슐은 기계적 물성 및 유지도가 현저히 증가된 것이며, 세포와 공배양하는 경우 세포의 성숙화를 유도하는 효과를 가지고 있는바, 마이크로 캐리어, 세포배양체 및 공배양 시스템 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.



WO 2020/101327 A1

명세서

발명의 명칭: 천연 오일을 함유하는 미세캡슐 및 이의 제조방법 기술분야

- [1] 본 발명은 천연 오일을 함유하는 미세캡슐에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하며, 기계적 물성이 향상된 미세캡슐 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 젤라틴은 자연적으로 존재하지 않지만, 생물의 조직에 존재하는 단백질인 콜라겐을 가수분해시킴으로써 얻어지는 물질이다. 무색에 가까우며 맛이나 향이 거의 없고, 각종 식품첨가제로 다양하게 쓰인다. 분자량은 35,000~40,000 정도이며 글리신, 프롤린, 하이드록시프롤린, 글루탐산 등이 주성분이다. 생체적합성이 뛰어난 바이오 소재로 독성이 없고, 체내에서 생분해되며, 항체유도가 잘 안 되는 천연 고분자이다. 인공피부, 콘택트렌즈, 약물전달체 등 다양한 목적으로 쓰이고 있으며 그 밖의 다양한 분야에 응용이 가능한 재료이다. 또한 젤라틴은 대표적인 열 가역성 겔로 특정 온도 이상에서는 졸 상태로 존재하나 그 이하에서는 겔 형태가 된다. 특별한 가교제 없이도 물리적 겔을 형성할 수 있으나 일반적인 하이드로 겔과 마찬가지로 강도가 약한 것이 문제이다. 저온에 의해서 형성된 젤라틴 겔은 물리적 겔로, 약한 결합에 의해 만들어진 것이다. 강도를 보완하기 위해서, 가교제를 이용하는데 젤라틴의 화학적 가교에는 단백질의 아민 그룹이 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [3] 한편, 미세캡슐은 그 크기가 수 μm 내지 수백 μm 이며, 내부(core)를 형성하는 액체상 또는 고체상의 물질을 외부(wall)를 형성하는 고분자 물질 등으로 둘러싼 초 미세입자를 의미한다. 이러한 미세캡슐은, 외부의 환경(예를 들어, 산소 또는 수분)에 대하여 코어 물질의 변성을 방지하거나, 서방형 약물 또는 방향제와 같이 물질의 전달 속도를 일정하게 유지하거나, 코어로 사용하는 재료를 액체 형태에서 고체 형태로 변환하는 데에 활용될 수 있다. 미세캡슐은 의약품, 도료, 전자산업 및 화장품 등 다양한 분야에서 사용되는 기반기술로서, 특히 의약품 및 화장품에 사용될 경우에는 약물의 초기 역가를 유지하는 가장 좋은 도구로서 사용되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [4] 이에 본 발명자들은 기계적 물성이 현저히 향상된 천연 오일을 함유하는 미세캡슐을 개발하고, 이의 용도를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [5] 따라서 본 발명의 목적은, 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 미세캡슐 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[6] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 미세캡슐을 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 젤라틴, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 젤라틴 용액을 제조하는 단계, 천연 고분자 용액을 제조하는 단계, 상기 젤라틴 용액 및 천연 고분자 용액을 혼합하는 단계, 상기 혼합물의 pH를 조절하는 단계 및 pH가 조절된 혼합물을 냉각시키는 단계를 포함하는, 미세캡슐의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[8] 본 발명에 따른 천연 오일을 함유하는 미세캡슐은 기계적 물성 및 유지도가 현저히 증가된 것이며, 세포와 공배양하는 경우 세포의 성숙화를 유도하는 효과를 가지고 있는바, 마이크로 캐리어, 세포배양체 및 공배양 시스템 분야에서 다양하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[9] 도 1은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 제조방법을 도식화한 것이다 (A: 오일 점증제 무첨가시, B: 오일 점증제 첨가시).

[10] 도 2는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수 측정 결과를 나타낸 것이다.

[11] 도 3 및 4는 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양하고, 배양된 세포를 광학현미경, 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.

[12] 도 5는 생존/사멸 분석을 통해 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 공배양된 심근세포의 세포생존율을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

[13] 도 6은 종래 방법으로 심근세포를 배양한 결과를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

[14] 도 7은 본 발명에 따른 젤라틴 오일 캡슐과 심근세포를 공배양한 결과를 투과전자 현미경(TEM) 및 형광 현미경으로 관찰한 결과를 나타내는 도이다.

[15] 도 8은 오일 점증제 첨가 여부에 따른 본 발명의 젤라틴 오일 캡슐의 유지도를 비교한 결과를 나타내는 도이다.

발명의 실시를 위한 형태

[16] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[17] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐을 제공한다.

[18] 본 발명에 있어서, “천연 고분자”는 천연에 존재하거나 생물에 의하여 생산되는 고분자 물질을 의미하며 미세캡슐 내 오일의 산화방지 및 안정화시키는 역할을 한다.

[19] 상기 천연 고분자의 예로는, 아라비아 검, 히알루론산, 구아검, 펙틴, 잔탄검, 로커스트빈 검, 타마린드 검, 트라가칸트 검, 가티 검, 메뚜기콩 검, 곤약 검, 아가,

카라기난, 펙셀라란 및 젤란 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[20] 본 발명의 일 구체예에서, 젤라틴 및 천연 고분자는 1:0.1 내지 1의 중량비로 혼합되는 것이 바람직하다.

[21] 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면 상기 천연 고분자는 아라비아 검인 것이 바람직하고, 아라비아 검 및 히알루론산의 혼합물인 것이 더 바람직하며, 상기 아라비아 검 및 히알루론산의 혼합물은 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합되는 것이 더욱 바람직하다.

[22] 본 발명에 있어서, 오일은 올리브유, 동백유, 피마자유, 야자유, 호호바유, 아몬드 오일, 포도씨오일, 허브 오일, 장미 오일, 코코넛 오일, 모링가 오일, 쌀겨 오일, 살구씨 오일, 해바라기 오일, 메도폼시드 오일, 아비시니안 오일 및 스쿠알란으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 오일은 스쿠알란인 것이 바람직하다. 상기 스쿠알란은 식물성 스쿠알란일 수 있다.

[23] 본 발명에 있어서, “식물성 스쿠알란”은 동물성 스쿠알란을 대신하는 천연 스쿠알란으로, 식물성 유지에서 추출된 스쿠알란에 수소를 첨가하여 제조된다. 식물성 스쿠알란은 수분의 증발을 방지하는 기능이 있으며, 이를 첨가하여 제조된 미세캡슐은 캡슐의 수분이 오랫동안 유지되는 장점을 가진다.

[24] 본 발명에 있어서, “점증제”는 용액의 점도를 증가시키는 물질로서, 점증제 또는 증점 안정제라고 불린다. 또한, 용액에 점증제를 첨가한 경우 끈적거리는 것으로 보이므로, 마치 농축된 것과 같아서 농화제라 표기하는 경우도 있다. 본 발명에서는 상기 점증제를 미세캡슐 내부에 포함된 오일의 점도를 향상시키기 위하여 사용하였다.

[25] 본 발명의 구체예에서, 오일 점증제는 벤톤 겔(Bentone gel), 하이드로제네이티드폴리이소부텐(Hydrogenated Polyisobutene), 텍스트린 팔미테이트/에틸헥사노에이트 및 텍스트린 팔미테이트(dextrin palmitate)로부터 선택된 1종 이상일 수 있으며, 보다 바람직하게는 텍스트린 팔미테이트인 것이 바람직하다. 상기 오일 점증제는 시판중인 벤톤 겔, 버사겔 ME750(Versagel ME750), 레오펔 TT(Rheoparl TT) 및 레오펔 KL(Rheoparl KL)로부터 선택된 1종 이상일 수도 있다.

[26] 본 발명에 있어서 상기 오일 점증제는 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 10 중량%로 포함될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4 내지 6 중량%, 가장 바람직하게는 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[27] 본 발명의 천연 오일을 함유하는 미세캡슐은 종래 방법으로 제조된 미세캡슐보다 기계적 물성이 현저히 증가된 것으로, 세포와 공배양할 시 세포가 구체를 형성하고, 배양된 세포를 성숙화시키는 효과가 있다.

[28]

[29] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 젤라틴, 오일 및 오일 점증제를

함유하는 젤라틴 용액을 제조하는 단계; (b) 천연 고분자 용액을 제조하는 단계; (c) 상기 젤라틴 용액 및 천연 고분자 용액을 혼합하는 단계; (d) 단계 (c)에서 제조된 혼합물의 pH를 조절하는 단계; 및 (e) 단계 (d)의 pH가 조절된 혼합물을 냉각시키는 단계를 포함하는 천연 오일을 함유하는 미세캡슐 제조방법을 제공한다.

[30] 구체적으로, 본 발명의 미세캡슐 제조방법은 도 1에 나타내었다.

[31] 상기 단계 (a)의 오일 점증제는 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 2 내지 10 중량%로 포함될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 4 내지 6 중량%, 가장 바람직하게는 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[32] 상기 단계 (b)의 천연 고분자 용액은 아라비아 검 및 히알루론산이 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합된 혼합물인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[33] 상기 단계 (d)에서 젤라틴 용액 및 천연 고분자 용액 혼합물의 pH를 3.1 내지 3.6으로 조절하는 것이 바람직하다.

[34] 또한 상기 단계 (e)는 pH가 조절된 혼합물에 대하여 3 내지 5배에 달하는 증류수를 첨가한 후 교반하여 5 내지 15°C가 되도록 냉각시키는 것이 바람직하다.

[35]

[36] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[37]

[38] **실시예 1. 젤라틴 오일 캡슐 제조**

[39] **1-1. 실험군 1**

[40] 도 1에 나타낸 바와 같은 방법으로, 젤라틴, 천연고분자 및 오일을 포함하는 미세캡슐을 제조하였다.

[41] 구체적으로, 젤라틴 용액은 젤라틴(pig, 300bloom, type A) 1.5g 및 3차 증류수 50ml를 혼합한 후 상기 혼합물을 70°C로 가열하여 젤라틴을 완전히 용해시켜 제조하였다. 천연 고분자 용액은 아라비아 검 1.5g 및 3차 증류수 50ml을 혼합한 후, 상기 혼합물을 70°C로 유지하여 아라비아 검을 완전히 용해시켜 제조하였다. 상기 젤라틴 용액에 오일로서 스쿠알란(hydrogenated poly 1-decen, puresyn4) 24g을 첨가하고, 교반기를 이용하여 40°C 이상에서 100 내지 150rpm으로 5분 동안 교반하였다. 교반된 젤라틴 용액에 상기 천연 고분자 용액을 첨가한 후 산용액(아세트산 또는 염산)으로 pH3.1 내지 3.6으로 조절하였다. 즉, 젤라틴 및 아라비아 검은 1:1 중량비로 혼합하였다. pH가 조절된 용액은 35°C 이상에서 1시간 동안 교반하였으며, 그 후 천천히 온도를 낮추어 25°C가 되도록 냉각시켰다. 추가적으로, 냉각된 용액의 4배에 달하는 양의 물을 첨가한 후

교반하여 10°C 이하로 냉각시켰다. 냉각된 용액을 분별깔대기로 옮긴 후 상층의 젤라틴 오일 캡슐을 분리하였다. 분리된 젤라틴 오일 캡슐에 0.5% 글루타알데하이드 수용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. 젤라틴 오일 캡슐이 포함된 교반물을 분별깔대기로 옮긴 후 3차 증류수로 6회 세척하였다. 완성된 젤라틴 오일 캡슐(젤라틴:아라비아검:히알루론산= 1 : 1 : 0, 실험군 1)은 3차 증류수에 넣어서 보관하였다.

[42]

[43] **1-2. 실험군 2 내지 4**

[44] 젤라틴, 아라비아 검 및 히알루론산을 혼합하여 젤라틴 오일 캡슐을 제조하였다. 보다 상세하게는, 실험군 2 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐은 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 제조하되, 아라비아 검 및 히알루론산을 표 1의 중량비로 혼합하여 제조한 천연 고분자 용액을 사용하였다.

[45] [표1]

	실험군 1	실험군 2	실험군 3	실험군 4
젤라틴	1	1	1	1
아라비아 검	1	0.9	0.5	0.1
히알루론산	0	0.1	0.5	0.9

[46] **1-3. 실험군 5 내지 11**

[47] 오일 점증제를 첨가하여 젤라틴 오일 캡슐을 제조하였으며, 오일 점증제의 종류 및 농도는 표 2에 나타내었다.

[48] [표2]

	오일 점증제의 종류	농도(%)	온도(°C)
실험군 5	벤톤 겔(Bentone gel)	10	80
실험군 6	버사겔 ME750(Versagel ME750)	10	80
실험군 7	레오펠 TT(Rheopearl TT)	10	80
실험군 8	레오펠 KL(Rheopearl KL)	10	80
실험군 9		7	80
실험군 10		5	80
실험군 11		2	80

[49] 구체적으로, 젤라틴 용액은 젤라틴(pig, 300bloom, type A) 3g 및 3차 증류수 100ml를 혼합한 후 상기 혼합물을 70°C로 가열하여 젤라틴을 완전히 용해시켜 제조하였다. 천연 고분자 용액은 아라비아 검 3g 및 3차 증류수 100ml을 혼합한 후, 상기 혼합물을 70°C로 유지하여 아라비아 검을 완전히 용해시켜 제조하였다.

상기 젤라틴 용액에 오일로서 스쿠알란(hydrogenated poly 1-decene, puresyn4) 24.54g과 함께 각 실험군에 해당하는 오일 점증제를 표 2에 개시된 중량%(농도)의 양으로 첨가하고, 교반기를 이용하여 45°C 이상에서 100 내지 150rpm으로 5분 동안 교반하였다. 교반된 젤라틴 용액에 상기 천연 고분자 용액을 첨가한 후 산 용액(아세트산 또는 염산)으로 pH3.1 내지 3.6으로 조절하였다. pH가 조절된 용액은 35°C 이상에서 1시간 동안 교반하였으며, 그 후 천천히 온도를 낮추어 25°C가 되도록 냉각시켰다. 추가적으로, 냉각된 용액의 4배에 달하는 양의 물을 첨가한 후 교반하여 10°C 이하로 냉각시켰다. 냉각된 용액을 분별깔대기로 옮긴 후 상층의 젤라틴 오일 캡슐을 분리하였다. 분리된 젤라틴 오일 캡슐에 0.5% 글루타알데하이드 수용액을 첨가하여 1시간 동안 교반하였다. 젤라틴 오일 캡슐이 포함된 교반물을 분별깔대기로 옮긴 후 3차 증류수로 6회 세척하였다. 완성된 젤라틴 오일 캡슐은 3차 증류수에 넣어서 보관하였다.

[50] 실시예 2. 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수 측정

[51] 실험군 1 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수를 측정하였다. 구체적으로, 젤라틴 오일 캡슐을 1000 μ m의 간격을 두고 반경 20mm의 두 평판 사이에 배치하였다. 상기 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수는 상온에서 스트레인(strain)을 0.01로 고정하였으며, 0.01 - 5Hz 범위에서 rotating theometer(TA Instruments. AR 1500ex)를 이용하여 분석하였다. 젤라틴 오일 캡슐의 탄성계수를 특정한 결과는 도 2에 나타내었다.

[52] 도 2에 나타낸 바와 같이, 젤라틴 오일 캡슐 제조 시, 아라비아 검의 일부를 히알루론산으로 대체하는 경우 젤라틴 오일 캡슐의 탄성이 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 아라비아 검 및 히알루론산을 1:1 중량비로 혼합한 실험군 3 및 1:9 중량비로 혼합한 실험군 4의 탄성이 현저히 증가하는 것을 확인하였다.

[53]

[54] 실시예 3. 젤라틴 오일 캡슐 및 심근세포 공배양

[55] 실시예 1에서 제조된 실험군 4의 젤라틴 오일 캡슐과 사람유래 심근세포(iCell Cardiomyocytes, CMC-100-010-001, USA, Cellular Dynamics International)를 공배양하였다. 구체적으로, 젤라틴 오일 캡슐을 세포배양체로 사용하기 위하여, 상기 캡슐을 PBS에 담근 후 5분 동안 교반하였다. 교반을 종료한 후 PBS를 교체하여 추가 교반하였으며, 이 과정을 2 내지 3회 반복하였다. 교반 종료 후 PBS를 제거한 후 플레이팅 배지(Plating Medium: Plating Medium 50%, FBS(Hyclone, SH30919.03, USA) 10%)에 젤라틴 오일 캡슐을 옮겨 24시간 동안 4°C에서 저장하였다.

[56] 공배양을 위하여, 심근세포를 트립신으로 처리하여 단일세포로 부유시켰다. 혈청이 함유된 배지로 트립신을 불활성화 시킨 후 원심분리하여 심근세포를 수득하였다. 수득한 세포는 새 배지를 첨가하여 재부유시킨 후 계수하였다. 계수된 세포는 200 μ l의 배지에 고농도로 포함되도록 준비하였다. 15ml 코니칼

튜브에 세포배양체인 젤라틴 오일 캡슐을 옮기고, 세포배양체를 적실 정도의 배양배지를 첨가하였다. 세포배양체 및 배지가 함유된 코니칼 튜브에 준비된 심근세포를 접종한 후 배양하였다. 상기 배양은 온도 37°C 및 5% CO₂가 유지되는 배양기에서 하룻밤(overnight) 동안 수행하였으며, 가라앉은 세포가 다시 부유될 수 있도록 15 내지 30분 간격으로 수차례 툇톡 두들겨(tap) 주었다. 배양이 완료된 심근세포-세포배양체를 세포 부착력이 낮은 배양 용기에 옮겨 광학현미경, 주사전자현미경(SEM) 및 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였다. 실험군 2 내지 4의 젤라틴 오일 캡슐도 상기와 같은 방법으로 심근세포-세포배양체를 관찰하였다. 심근세포-세포배양체 관찰 결과는 도 3 및 4에 나타내었다.

[57] 도 3에 나타낸 바와 같이, 실험군 1 내지 4의 세포배양체인 젤라틴 오일 캡슐을 중심으로 심근세포가 밀집되는 것을 확인하였다. 반면에, 세포배양체를 사용하지 않은 대조군은 세포가 플레이트에 산재해있는 것을 관찰하였다.

[58] 도 4에 나타낸 바와 같이, 실험군 1 내지 4의 세포배양체에 심근세포가 부착되었으며, 배양된 세포가 구체(sphere)를 형성한 것을 확인하였다. 특히, 세포배양체 제조 시 젤라틴, 아라비아 검 및 히알루론산을 사용한 실험군 2 내지 4의 심근세포가 성숙근세포와 유사한 형태를 나타낸다는 것을 확인하였다.

[59]

[60] 실시예 4. 공배양된 심근세포의 세포생존률 분석

[61] 실시예 1에서 제조된 실험군 4를 이용하여 공배양된 심근세포의 생존율을 확인하기 위해 배양 4일 차부터 일주일 간격으로 최대 42일 차까지 배양한 후 생존/사멸 분석(Live-dead assay)(abcam, ab65470)을 통해 확인하였다. 생존/사멸 분석은 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[62] 도 5에 나타낸 바와 같이, 초록색 형광은 살아있는 세포, 붉은색 형광은 죽은 세포를 의미하는데, 점종 세포 수 또는 배양 기간에 상관없이 대부분의 세포가 살아있음을 확인하였다.

[63]

[64] 실시예 5. 투과전자현미경을 이용한 공배양된 심근세포 관찰

[65] 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 실시예 1에서 제조된 실험군 4로 공배양된 심근세포를 관찰하였다. 구체적으로, 실험군은 실시예 3-1와 동일한 방법으로 심근세포를 공배양하여 준비하였으며, 대조군은 종래 알려진 방법으로 심근세포를 배양하였다. 배양된 심근세포를 투과전자현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 도 6 및 7에 나타내었다.

[66] 도 6 및 7에 나타낸 바와 같이, 대조군은 미성숙 심근세포가 다수 관찰되었다. 반면에 실험군은 성숙근 세포가 다수 관찰되었으며, 배양된 세포가 구체(sphere)를 형성하는 것을 확인하였다. 상기 결과로부터 젤라틴 오일 캡슐을 세포배양체로 이용하는 것이 구체를 형성하는 것뿐만 아니라, 심근세포가 성숙되는 것을 확인하였는바, 구형의 심근세포는 인공 심근 구조체로 이용될 수

있다.

[67]

[68] 다음으로 공배양된 심근세포의 세포내 소기관의 성숙 정도를 확인하기 위하여, 투과전자현미경으로 관찰하였다. 구체적으로, 2.5 % 글루타르알데히드(in PBS)를 사용하여 4°C의 저온환경에서 고정하였다. 고정된 세포는 0.1M 인산염 완충액(pH7.4)으로 10~20분 수세하였다. 후고정으로 1% OsO₄ (osmic acid)로 약 1시간 동안 반응을 진행하고, 다시 0.1M 인산염 완충액(pH7.4)으로 수세하였다. 샘플 내의 수분을 제거하기 위해 50%, 70%, 80%, 95% 100%의 에틸알코올을 저농도에서 고농도로 5분 이내로 탈수를 진행하였다. 초박절편기(Ultra Microtome)를 이용하여 1 μm로 자른 후, 슬라이드 글라스에 옮겨 핫 플레이트(80°C)에서 신전시키면서 부착 및 고정시켰다. 전자염색을 거친 후 관찰하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[69]

도 7에 나타낸 바와 같이, 배양 후 2주에서는 약간의 근원섬유(myofibriles)와 미토콘드리아가 관찰되었고, 5주차부터 2주차와 비교하여 성숙한 미토콘드리아 및 근원 섬유가 관찰되었다. 또한, 성숙한 심근세포에서 볼 수 있는 다핵세포와 견고한 정선(Junction)이 형성됨을 확인하였다.

[70]

[71] 실시예 6. 오일 점증제 첨가에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 특성 비교

[72]

실험군 5 내지 11의 젤라틴 오일 캡슐의 점성, 형태 및 에멀전 형성 여부를 비교하였으며, 그 결과를 표 3에 나타내었다.

[73]

[표3]

	점성(상온에서)	형태	에멀전형성	기타
실험군 5	낮음	입자형성 되고, 뿌연 갈색	-	점성이 매우 낮음
실험군 6	낮음	투명함	-	
실험군 7	높음	뿌옇고, 요변성(thixotropic)의 젤 형성	-	
실험군 8	매우 높음	뿌옇고 단단한 젤 형성	-	점성이 너무 높음
실험군 9	높음	뿌옇고 단단한 젤 형성	무	에멀전 형성 효율 낮음.
실험군 10	높음	뿌옇고 단단한 젤 형성	유	적절함
실험군 11	낮음	뿌옇고 단단한 젤 형성	유	점성 증진 효과 낮음

[74] 표 3에 나타낸 바와 같이, 오일 점증제의 첨가에 따라 젤라틴 오일 캡슐의 특성이 변화한 것을 알 수 있다. 특히, 5% 농도의 레오폴 KL(텍스트란 팔미테이트)를 오일점증제로 이용한 실험군 10의 젤라틴 오일캡슐이 상온에서 점성이 높으며, 뿌옇고 단단한 젤을 형성할 뿐만 아니라, 에멀전을 형성하는 것을 알 수 있다.

[75]

[76] 실시예 7. 오일 점증제 첨가 여부에 따른 젤라틴 오일 캡슐의 유지도 비교

[77] 물리적 조건 하에서 오일 점증제를 첨가하지 않은 실험군 4와 오일 점증제를 첨가한 실험군 10의 유지도를 비교하였다. 구체적으로, 상기 각각의 젤라틴 오일 캡슐에 바늘을 이용하여 부분적인 압력을 가하였다. 압력이 가해진 젤라틴 오일 캡슐의 유지 정도를 관찰하였다. 젤라틴 오일 캡슐의 유지도 비교 결과는 도 8에 나타내었다.

[78] 도 8에 나타낸 바와 같이, 오일 점증제를 첨가한 실험군 10은 부분적인 압력을 가하였음에도, 부드러운 상태를 유지하며 터지지 않는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 지속적인 자극으로 터진 후에도 젤라틴 오일 캡슐 내부의 오일이 퍼지지 않고, 그 모양을 유지하는 것을 확인하였다. 반면에, 오일 점증제를 첨가하지 않은 실험군 4는 가해진 압력으로 인해 터지는 것을 알 수 있으며, 젤라틴 오일 캡슐 내부의 오일이 유출되어 퍼지는 것을 확인하였다. 상기 결과는 젤라틴 오일

캡슐 제조 시 오일 점증제를 첨가하는 것이 제조된 캡슐의 유지도를 향상시킨다는 것을 의미한다. 또한, 오일 점증제를 첨가한 젤라틴 오일 캡슐은 캡슐이 터진 후에도 내부의 오일이 그 형태를 유지하는바, 이를 이용하여 세포를 배양하는 경우 젤라틴 오일 캡슐이 손상되더라도, 배양중인 세포에 산소가 지속적으로 공급될 수 있다는 것을 알 수 있다.

[79]

[80] 종합적으로 본 발명자들은 젤라틴 오일 캡슐을 개발하였으며, 상기 젤라틴 오일 캡슐 제조 시 젤라틴, 아라비아 검, 히알루론산 및 오일 점증제를 혼합하여 제조하는 경우 기계적 물성 및 유지도가 현저히 향상된다는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명의 젤라틴 오일 캡슐은 마이크로 캐리어, 세포배양체 및 공배양 시스템 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

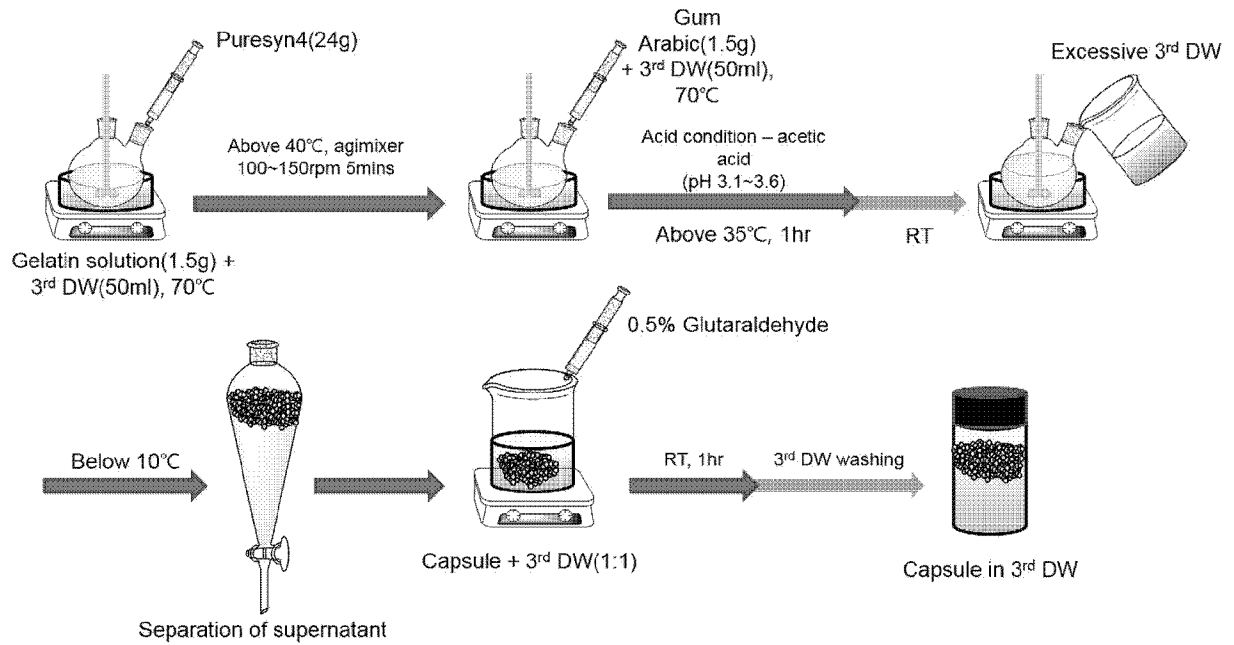
청구범위

- [청구항 1] 젤라틴, 천연 고분자, 오일 및 오일 점증제를 함유하는, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 젤라틴 및 천연 고분자는 1:0.1 내지 1의 중량비로 혼합되는 것인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 천연 고분자는 아라비아 검, 히알루론산, 구아검, 펙틴, 잔탄검, 로커스트빈 검, 타마린드 검, 트라가칸트 검, 가티 검, 메뚜기콩 검, 곤약 검, 아가, 카라기난, 펄셀라란 및 젤란으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 천연 고분자는 아라비아 검 및 히알루론산을 혼합한 것인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 아라비아 검 및 히알루론산은 1:9 내지 9:1의 중량비로 혼합되는 것인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 오일은 올리브유, 동백유, 피마자유, 야자유, 호호바유, 아몬드 오일, 포도씨오일, 허브 오일, 장미 오일, 코코넛 오일, 모링가 오일, 쌀겨 오일, 살구씨 오일, 해바라기 오일, 메도폼시드 오일, 아비시니안 오일 및 스쿠알란으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 오일 점증제는 벤톤 겔(Bentone gel),
하이드로제네이티드폴리이소부텐(Hydrogenated Polyisobutene), 텍스트린 팔미테이트/에틸헥사노에이트 및 텍스트린 팔미테이트(dextrin palmitate)로 이루어진 군으로부터 선택되는 1 이상인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
상기 오일 점증제는 상기 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로 포함되는 것인, 천연 오일을 함유하는 미세캡슐.
- [청구항 9] (a) 젤라틴, 오일 및 오일 점증제를 함유하는 젤라틴 용액을 제조하는 단계;
(b) 천연 고분자 용액을 제조하는 단계;
(c) 상기 단계 (a)의 젤라틴 용액 및 상기 단계 (b)의 천연 고분자 용액을 혼합하는 단계;

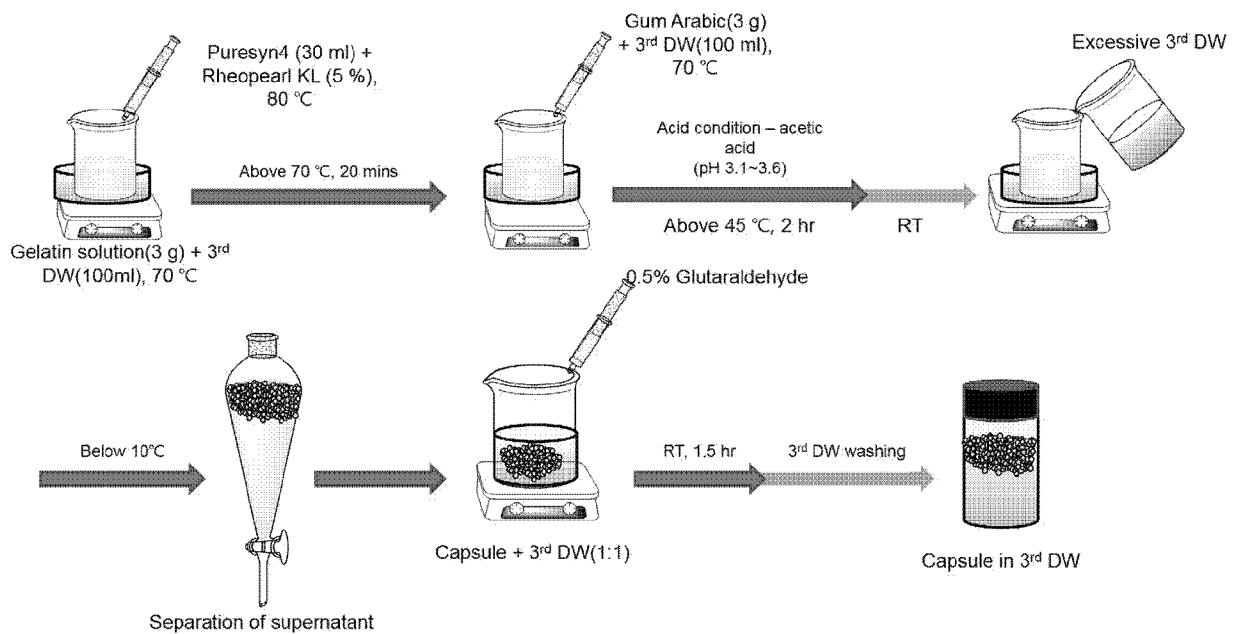
(d) 상기 단계 (c)에서 제조된 혼합물의 pH를 조절하는 단계; 및
(e) 상기 단계 (d)의 pH가 조절된 혼합물을 냉각시키는 단계를 포함하는,
미세캡슐의 제조방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
상기 단계 (a)의 오일 점증제는 오일의 중량에 대하여 1 내지 15 중량%로
포함되는 것인, 미세캡슐의 제조방법.
- [청구항 11] 제9항에 있어서,
상기 단계 (b)의 천연 고분자 용액은 아라비아 검 및 히알루론산이 1:9
내지 9:1의 중량비로 혼합된 것인, 미세캡슐의 제조방법.

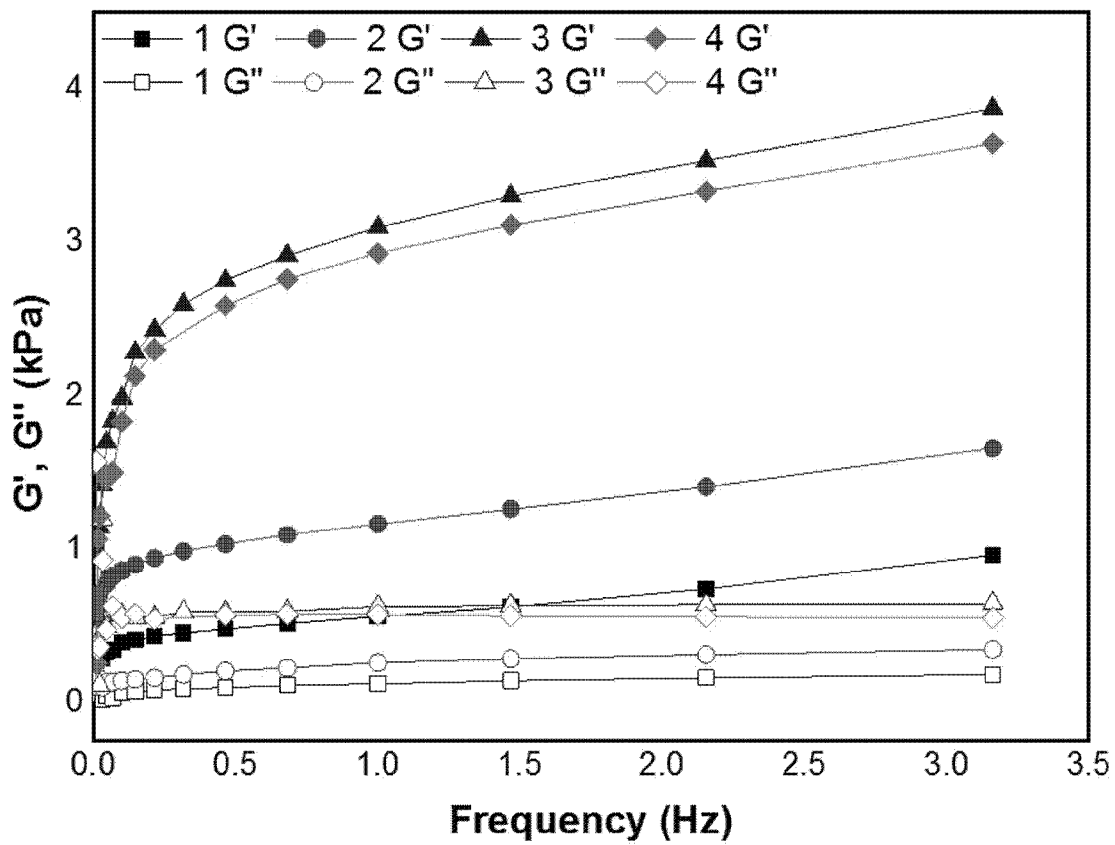
[도 1a]

A. 오일 점증제 무첨가군

[도 1b]

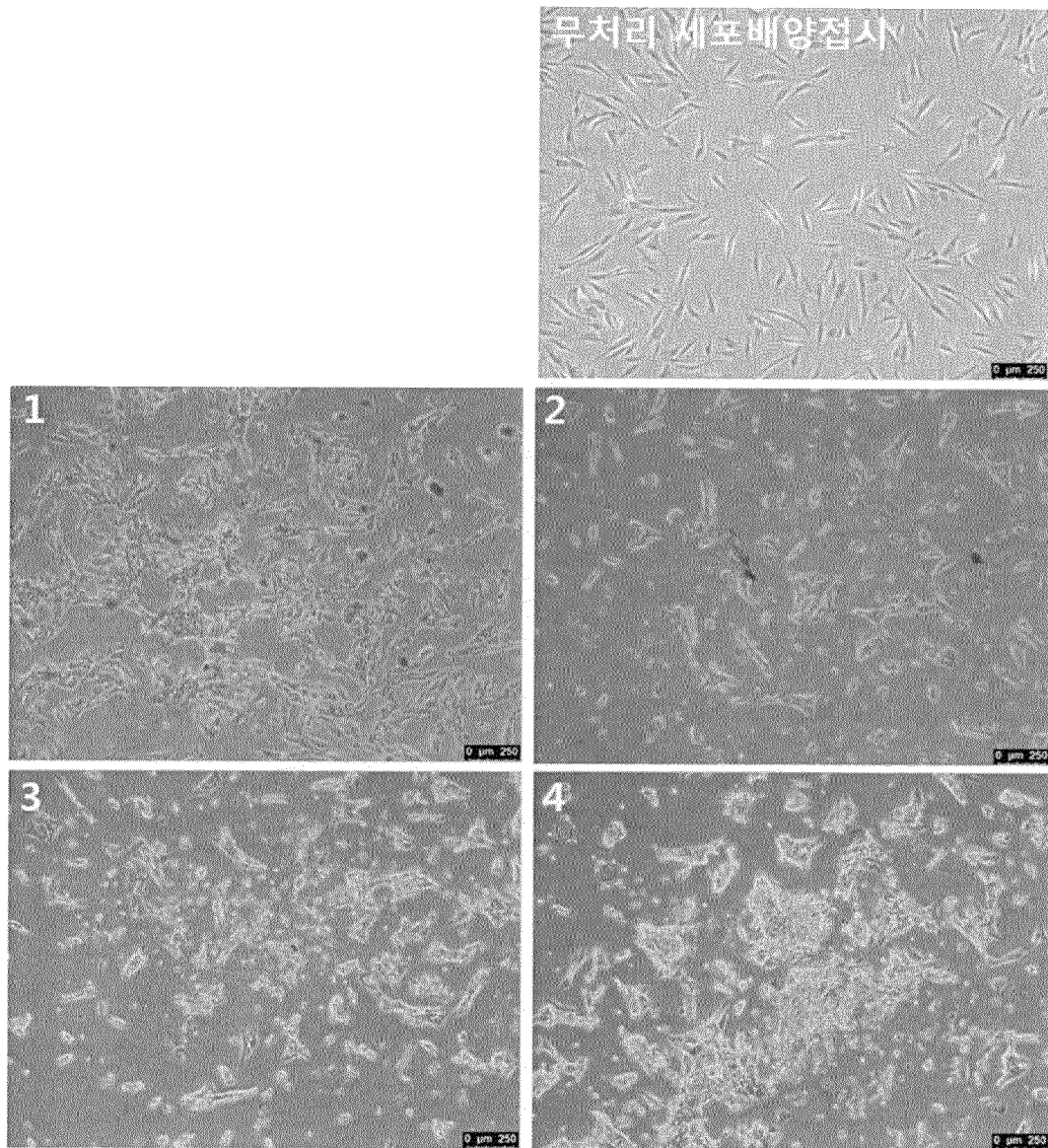
B. 오일 점증제 첨가군

[도2]

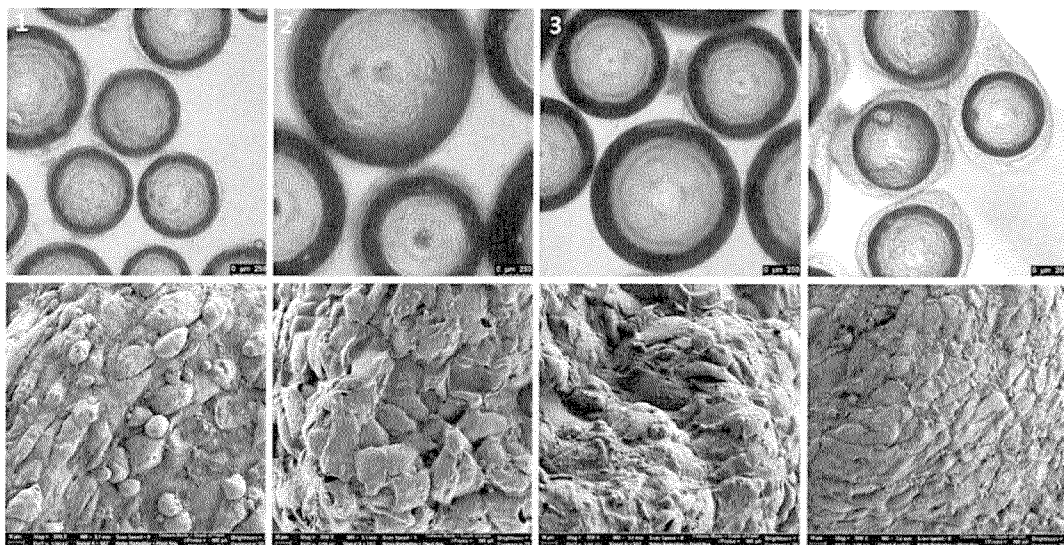


Mechanical properties. Frequency of 0.01 to 5 Hz,
Strain of 0.01% at 24°C

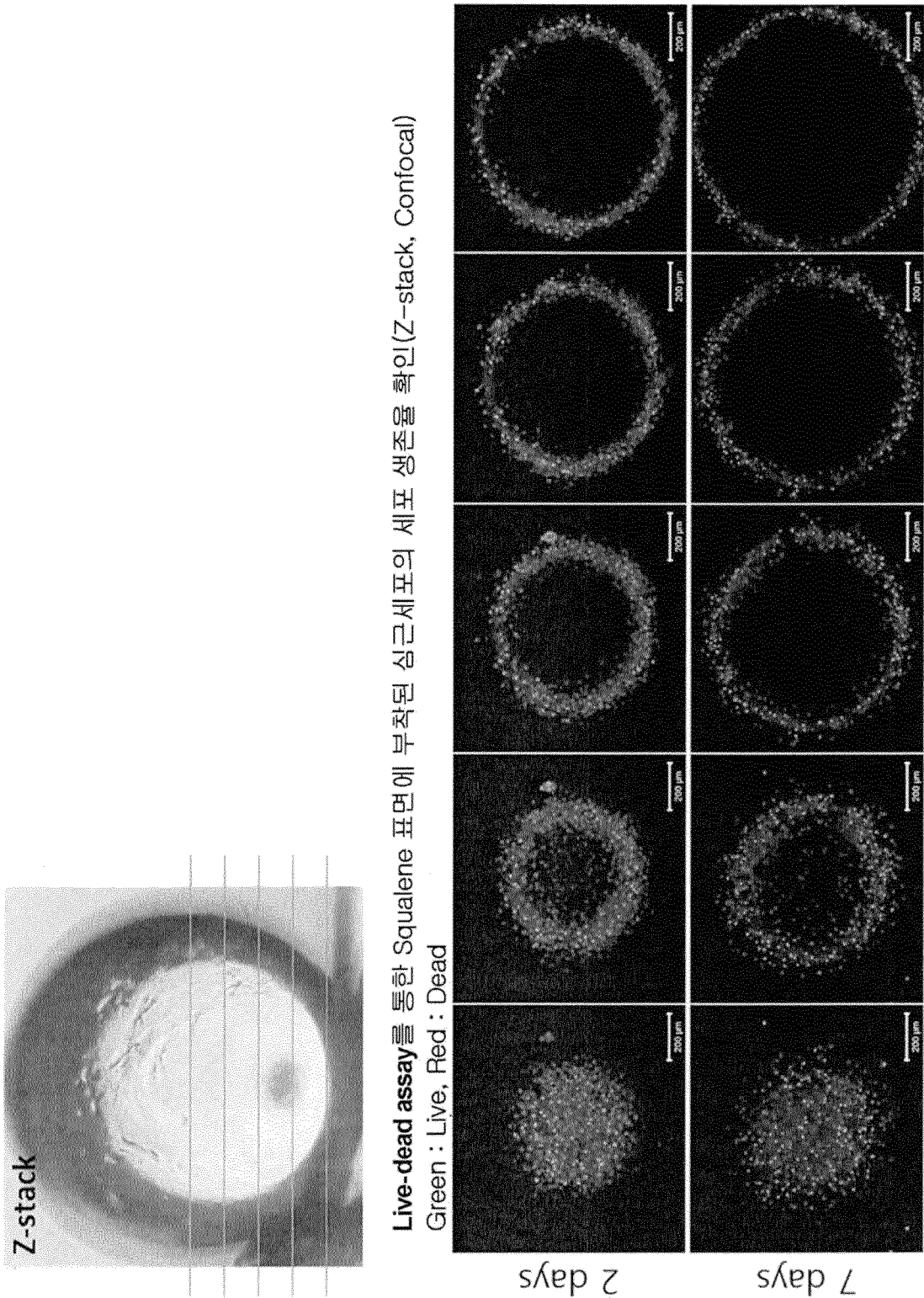
[도 3]



[도 4]

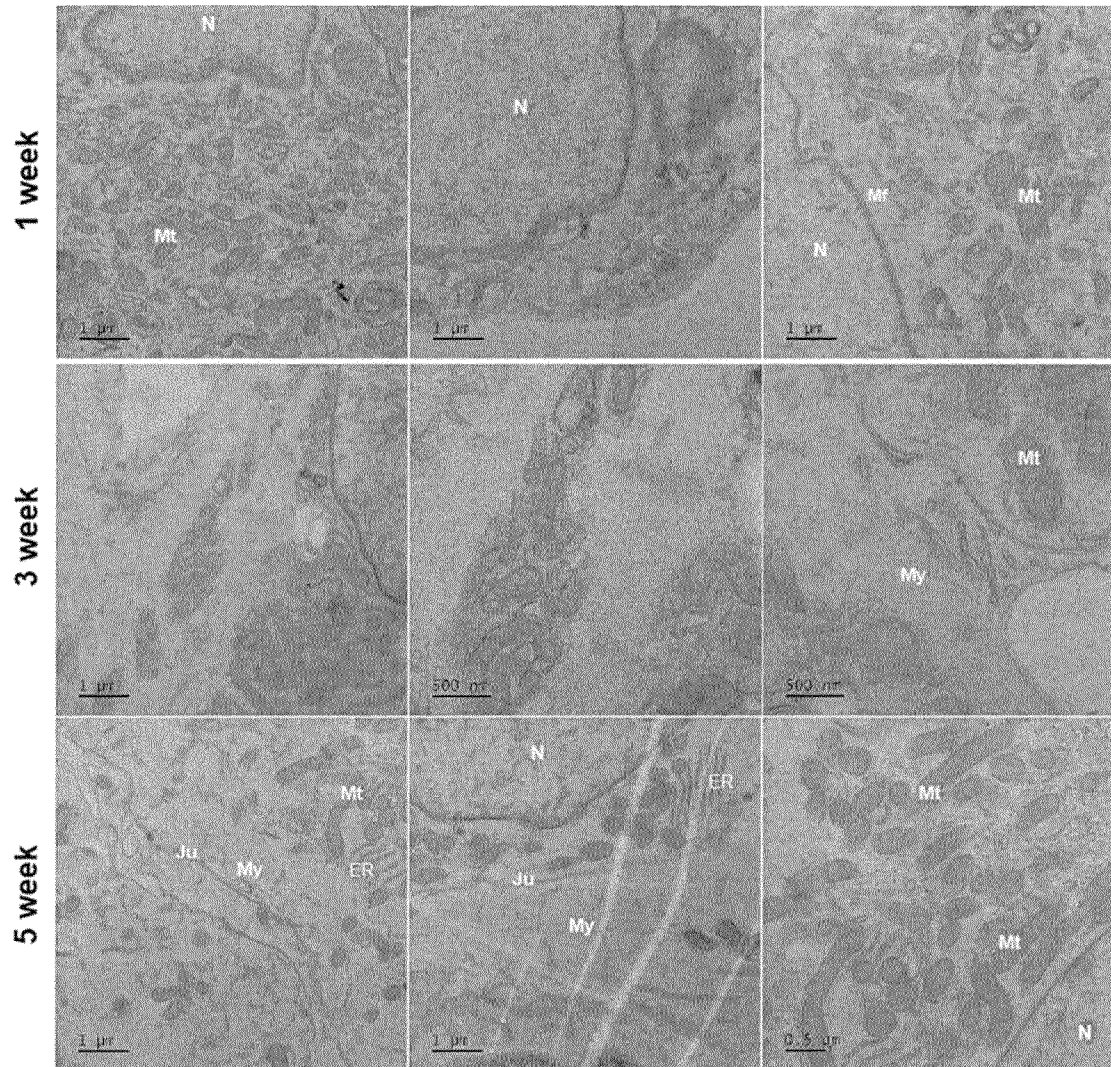


[도 5]

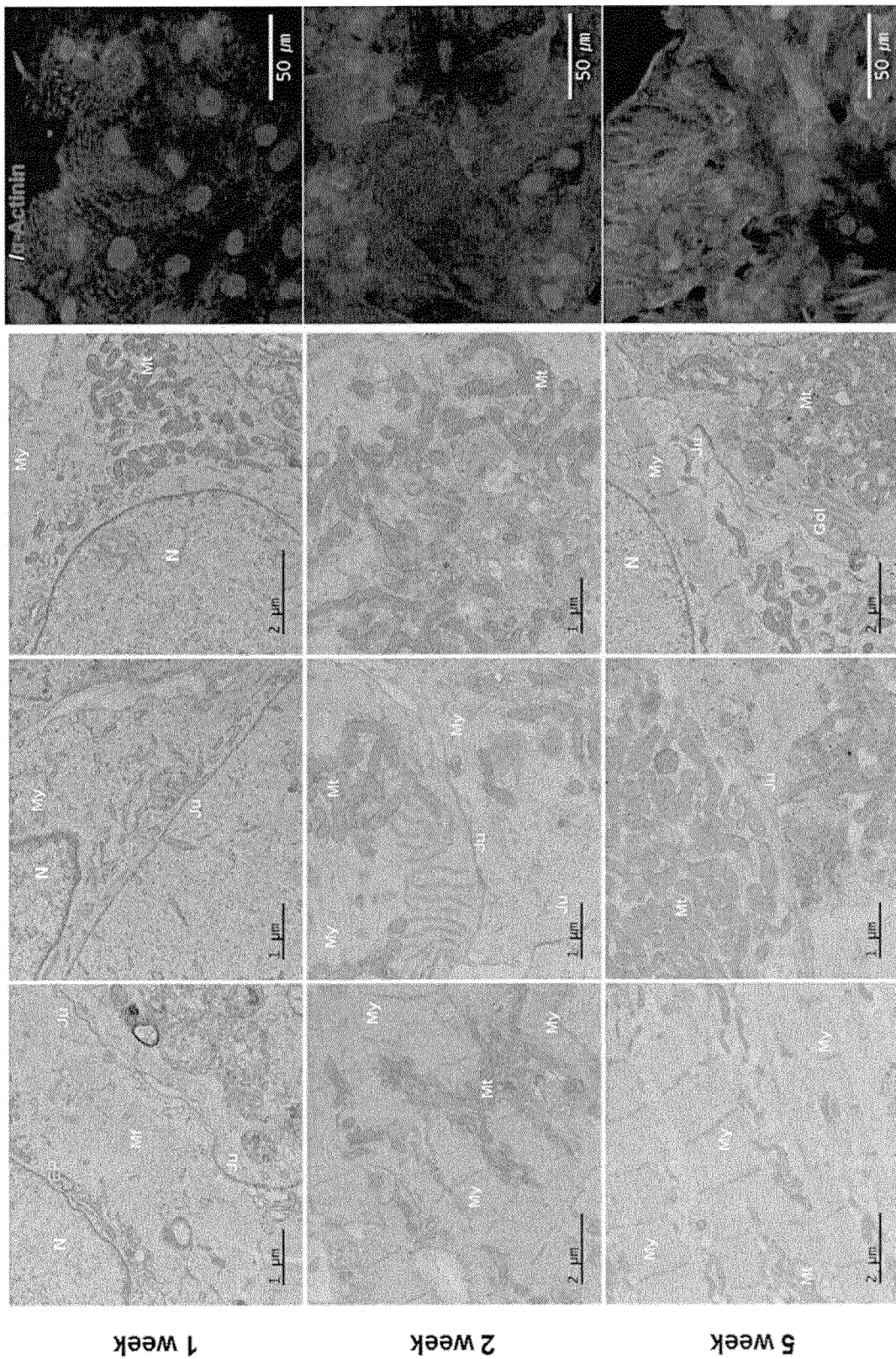


[도 6]

2D culture

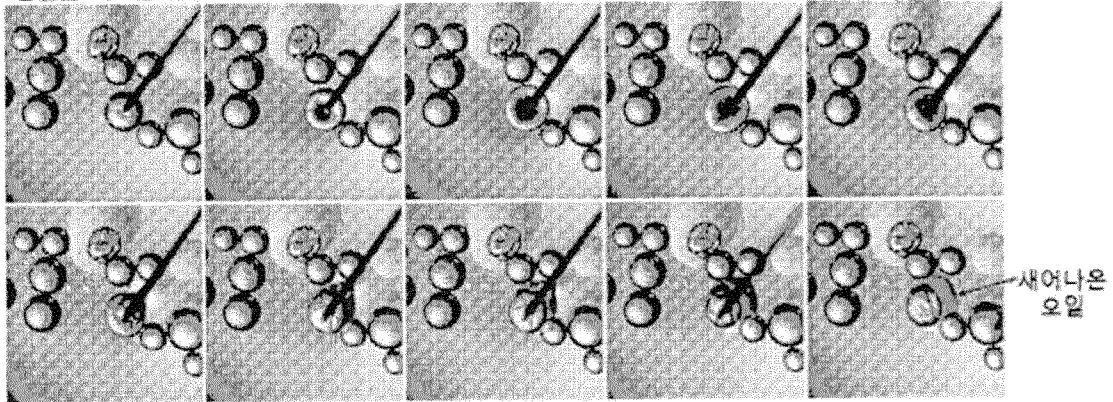


[도 7]

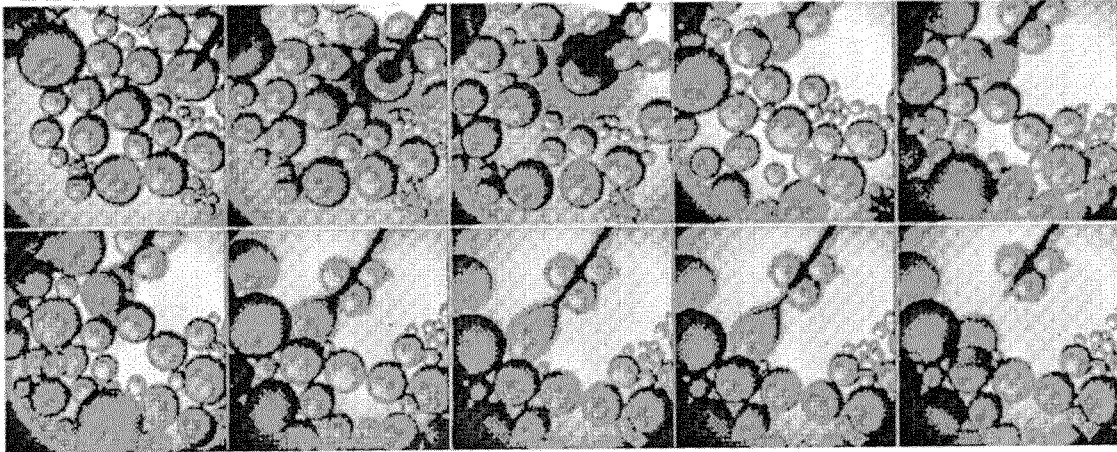


[도 8]

실험군 4(오일 점중제 무처리)



실험군 10(오일 점중제 처리)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015349**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12N 5/00(2006.01)i***

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/00; A61K 47/36; A61K 8/04; A61K 8/11; A61K 8/72; A61K 8/84; A61K 8/89; A61K 9/48; B01J 13/08; C09K 3/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

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

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: microcapsule, natural oil, gelatin, viscolid, Arabic Gum, hyaluronic acid

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2013-0138240 A (LIPOTEC, S.A.) 18 December 2013 See paragraphs [0025], [0028], [0046], [0114], [0117]; claims 1-6.	1-11
Y	KR 10-2012-0089329 A (DOW CORNING TORAY CO., LTD.) 09 August 2012 See paragraphs [0243], [0305], [0353]-[0354].	1-11
Y	KR 10-2016-0077757 A (LG HOUSEHOLD & HEALTH CARE LTD.) 04 July 2016 See claims 1, 2, 7-8, 16.	1-11
Y	KR 10-2016-0137780 A (KOLMAR KOREA CO., LTD.) 01 December 2016 See paragraphs [0028], [0033], [0037]-[0038], [0041], [0046]; claims 1-10.	1-11
Y	KR 10-2014-0126972 A (KIM, Ho-shik) 03 November 2014 See claims 1-11.	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 FEBRUARY 2020 (24.02.2020)

Date of mailing of the international search report

25 FEBRUARY 2020 (25.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015349

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2013-0138240 A	18/12/2013	EP 2618926 A2	31/07/2013
		EP 2618926 B1	08/05/2019
		ES 2386177 A1	10/08/2012
		ES 2386177 B1	23/09/2013
		JP 2013-537206 A	30/09/2013
		JP 6087282 B2	01/03/2017
		KR 10-1979462 B1	16/05/2019
		US 2013-0216596 A1	22/08/2013
		WO 2012-038061 A2	29/03/2012
		WO 2012-038061 A3	07/06/2012
KR 10-2012-0089329 A	09/08/2012	CN 102648264 A	22/08/2012
		CN 102648264 B	19/08/2015
		EP 2492333 A1	29/08/2012
		EP 2492333 B1	30/04/2014
		JP 5878760 B2	08/03/2016
		US 2012-0269748 A1	25/10/2012
		US 9580600 B2	28/02/2017
		WO 2011-049247 A1	28/04/2011
KR 10-2016-0077757 A	04/07/2016	None	
KR 10-2016-0137780 A	01/12/2016	KR 10-1965883 B1	05/04/2019
KR 10-2014-0126972 A	03/11/2014	None	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/00; A61K 47/36; A61K 8/04; A61K 8/11; A61K 8/72; A61K 8/84; A61K 8/89; A61K 9/48; B01J 13/08; C09K 3/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

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

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

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미세캡슐(microcapsule), 천연 오일(natural oil), 젤라틴(gelatin), 오일점증제(viscolid), 아라비아검(Arabic Gum), 히알루론산(hyaluronic acid)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2013-0138240 A (리포텍 에스.에이.) 2013.12.18 단락 [0025], [0028], [0046], [0114], [0117]; 청구항 1-6	1-11
Y	KR 10-2012-0089329 A (다우 코닝 도레이 캄파니 리미티드) 2012.08.09 단락 [0243], [0305], [0353]-[0354]	1-11
Y	KR 10-2016-0077757 A (주식회사 엘지생활건강) 2016.07.04 청구항 1, 2, 7-8, 16	1-11
Y	KR 10-2016-0137780 A (한국콜마주식회사) 2016.12.01 단락 [0028], [0033], [0037]-[0038], [0041], [0046]; 청구항 1-10	1-11
Y	KR 10-2014-0126972 A (김호식) 2014.11.03 청구항 1-11	1-11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가진 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

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

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

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

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2020년 02월 24일 (24.02.2020)

국제조사보고서 발송일

2020년 02월 25일 (25.02.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



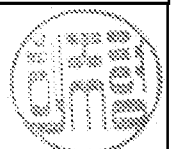
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2013-0138240 A	2013/12/18	EP 2618926 A2 EP 2618926 B1 ES 2386177 A1 ES 2386177 B1 JP 2013-537206 A JP 6087282 B2 KR 10-1979462 B1 US 2013-0216596 A1 WO 2012-038061 A2 WO 2012-038061 A3	2013/07/31 2019/05/08 2012/08/10 2013/09/23 2013/09/30 2017/03/01 2019/05/16 2013/08/22 2012/03/29 2012/06/07
KR 10-2012-0089329 A	2012/08/09	CN 102648264 A CN 102648264 B EP 2492333 A1 EP 2492333 B1 JP 5878760 B2 US 2012-0269748 A1 US 9580600 B2 WO 2011-049247 A1	2012/08/22 2015/08/19 2012/08/29 2014/04/30 2016/03/08 2012/10/25 2017/02/28 2011/04/28
KR 10-2016-0077757 A	2016/07/04	없음	
KR 10-2016-0137780 A	2016/12/01	KR 10-1965883 B1	2019/04/05
KR 10-2014-0126972 A	2014/11/03	없음	