(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0124430
(43) 공개일자 2023년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/70 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/02* (2006.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/7007 (2013.01)
A61K 31/05 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-0021758
(22) 출원일자 2022년02월18일
심사청구일자 2022년02월18일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
(72) 발명자
박지훈
서울특별시 서대문구 이화여대길 52, 이화여자대학교 교육관A동 504호 (대현동)
김슬비
충청남도 공주시 신금2길 47-1, 103동 1003호(신관동, 대아곰나루아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

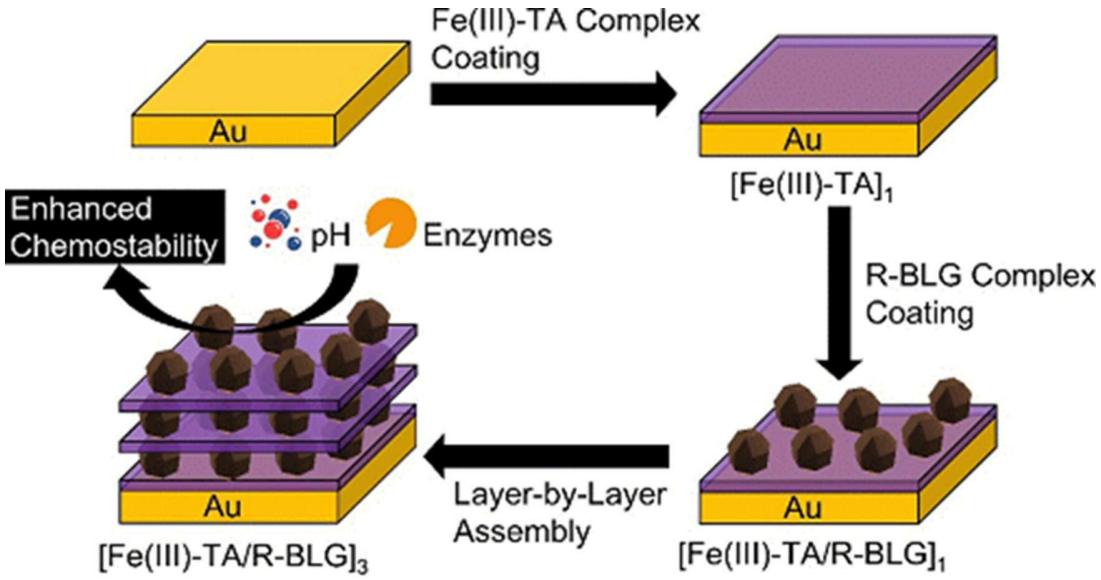
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **난용성 약물을 담지한 수분산 유단백질복합체를 포함하는 난용성 약물의 전달용 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 안정성이 높고, 코팅 반복 횟수에 따라 약물 함량을 조절할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/02 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 9/0014 (2013.01)
A61K 9/0053 (2013.01)
(72) 발명자
진성규
경기도 안양시 동안구 시민대로159번길 62, 제204동 1304호(비산동, 은하수벽산아파트)

조연서
서울특별시 영등포구 가마산로 312 신동아아파트

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711142220
과제번호	2020R1F1A1049212
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	천연 다당류 폴루란 다핵착물을 이용한 표면 개질법 및 이의 응용
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2021.03.01~2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 난용성 약물은 레스베라트롤, 비타민 D, 퀘세틴, 레티놀, 엽산, 오메가3-지방산, 도코사헥사노익산 (DHA), 아세트아미노펜, 케토프로펜, 아시클로버 및 코엔자임 Q10으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 금속 이온은 철 이온, 알루미늄 이온 (Al(III)), 지르코늄 이온 (Zr(IV)), 루테늄 이온 (Ru(III)), 로듐 이온 (Rh(III)), 아연 이온 (Zn(II)), 바나듐 이온 (V(III)), 크롬 이온 (Cr(III)), 망가니즈 이온 (Mn (II)), 코발트 이온 (Co(II)), 니켈 이온 (Ni(II)), 구리 이온 (Cu(II)), 몰리브덴 이온 (Mo(II)), 카드뮴 이온 (Cd(II)), 유로퓸 이온 (Eu(III)), 가돌리늄 이온 (Gd(III)), 테르비움 이온 (Tb(III)) 및 세륨 이온 (Ce(III))으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온은

(a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름; 및

(b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름

의 형태로 포함되는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 (a) 나노필름과 (b) 나노필름은 순서와 무관하게 서로 번갈아 가면서 쌓여 있는 형태로 포함되는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 (a) 나노필름 및 (b) 나노필름은 순서와 무관하게 서로 번갈아 각각 1개 내지 100개의 층으로 포함되는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 (a) 나노필름 및 (b) 나노필름의 층 개수에 따라, 조성물의 두께가 조절되는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 8

기질 (substrate); 및

상기 기질 표면을 코팅하는 코팅층을 포함하고,

상기 코팅층은 (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름 및 (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름이 순서와 무관하게 적층된 것인,

난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 코팅층은 2개 이상 형성된 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 경구 투여 또는 경피투여의 방식으로 투여되는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물.

청구항 11

(1) 기질 (substrate)에 금속 이온 용액 및 탄닌산 용액을 첨가하여, 상기 기질 표면에 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층을 형성하는 단계; 및

(2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 기질을 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 용액에 첨가하여, 상기 기질 표면의 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층 상에 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 나노필름 코팅층을 형성하는 단계

를 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 난용성 약물은 레스베라트롤, 비타민 D, 퀘세틴, 레티놀, 엽산, 오메가3-지방산, 도코사헥사노익산 (DHA), 아세 트아미노펜, 케토프로펜, 아시클로버 및 코엔자임 Q10으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 금속 이온은 철 이온, 알루미늄 이온 (Al(III)), 지르코늄 이온 (Zr(IV)), 루테늄 이온 (Ru(III)), 로듐 이온 (Rh(III)), 아연 이온 (Zn(II)), 바나듐 이온 (V(III)), 크롬 이온 (Cr(III)), 망가니즈 이온 (Mn (II)), 코발트 이온 (Co(II)), 니켈 이온 (Ni(II)), 구리 이온 (Cu(II)), 몰리브덴 이온 (Mo(II)), 카드뮴 이온 (Cd(II)), 유로퓸 이온 (Eu(III)), 가돌리늄 이온 (Gd(III)), 테르비움 이온 (Tb(III)) 및 세륨 이온 (Ce(III))으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 기질은 금판, 유리, 폴리스티렌, 세균 및 진균으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 (1) 내지 (3) 단계를 1회 내지 10회 반복 진행하는 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 (1) 내지 (3) 단계의 반복 진행 횟수에 따라 조성물의 두께를 조절하는 것을 특징으로 하는, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조 방법.

청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 경구 투여 또는 경피투여를 위한 것인, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 명세서는 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난용성 약물은 물에 대해 낮은 용해도를 보이는 약물로, 아세트아미노펜, 케토프로펜, 아시클로버 등이 이에 속한다. 난용성 약물은 물에 대한 용해도가 낮아서 그에 따라 낮은 흡수율 및 생리활성 저하를 야기한다.

[0003] 베타락토글로불린 (beta-lactoglobulin; β-lactoglobulin)은 유청 단백질의 주요 구성성분으로 리포칼린 계열 단백질의 구성원으로 분류된다. 난용성 약물을 포함한 소수성 화합물에 대한 특성 친화력은 마이크로 캡슐화 기술을 통한 소수성 약물 전달 시스템 개발을 촉진했다. 이와 관련하여, 베타락토글로불린을 이용하여 레스베라트롤과 복합체를 생성함으로써 레스베라트롤의 수용성을 향상시킨 연구가 진행되어 왔다.

[0004] 그러나, 상기 진행된 연구는 복합체 형성을 통해 레스베라트롤의 수용해도를 향상시켰지만, 단백질의 특성상 주변 자극에 민감하여 쉽게 변형된다는 문제점과 용액 상태로 존재하여 제어가 불가능하다는 점을 비롯한 제한된 응용성을 나타냈다.

[0005] 나노코팅은 표면 위에 100 nm 이하의 얇은 박막을 형성하여 표면 성질을 개질하는 방법으로, 다양한 기능을 제어된 방식으로 결합할 수 있다. 코팅용 물질로서, 탄닌산 (Tannic acid)은 갈로일기 (1,2,3-트리하이드록시페닐기)를 포함하는 폴리페놀 물질로 금속 양이온 (Fe(III), Fe(II), Al(III), Zr(IV), Ru(III), Rh(III), Zn(Ⅱ), V(III), Cr(III), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Mo(II), Cd(II), Eu(III), Gd(III), Tb(III), 및 Ce(III))과 빠르게 착물을 형성하여 재료 표면 성질에 무관하게 두께 조절이 가능한 나노코팅을 수행한다. 또한 갈로일기는 수소결합, π-π 상호작용과 같은 다양한 비공유성 상호작용을 통해 전형적인 접착 모티프의 기능을 수행함으로써 다른 물질과의 접착 용이성을 갖는다.

[0006] 상기 나노코팅을 이용한 난용성 약물-단백질 복합체 고정화 과정을 상기 언급한 제어 불가능한 단점을 보완하기 위해 연구를 진행하였고, 다층 나노필름에 약물을 통합하는 것은 혁신적인 약물 전달시스템을 개발하는 데 사용될 수 있을 것으로 기대한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 탄닌산-금속 이온 나노코팅과 다양한 분자간 상호작용을 기반으로 난용성 약물-베타락토글로불린 복합체 나노코팅 법을 발견하여, 다양한 pH 조건, 다양한 효소에 대해 안정성을 가지는 난용성 약물 전달용 조성물을 개발하였다.

[0009] 코팅을 반복하는 횟수에 따라 두께를 나노미터 수준으로 정교하게 조절할 수 있어 난용성 약물의 함량을 조절하는 약물전달체로서 응용 가능하다. 코팅 재료 형태 및 표면 성질에 제한되지 않는 탄닌산-금속 이온 나노코팅에 접목함으로써 원하는 재료 표면에 쉽게 난용성 약물-베타락토글로불린 복합체를 도입할 수 있었고, 더 나아가 재료 크기, 모양에 관계없이 대면적화가 가능하다. 제조 과정이 온화한 조건 (상온, 중성 pH, 수용액상)에서 이루어지기 때문에 산도 및 온도에 민감한 재료 표면에 난용성 약물-베타락토글로불린 복합체 나노필름 형성이 가능하고, 사용된 물질은 주변에서 저렴한 가격으로 쉽게 구하는 물질이며, 제조 과정에 있어 특수한 장비를 필요로 하지 않으므로 비용적 효율성을 갖는다. 또한, 다양한 pH 범위와 체내 소화효소에 대해 안정성을 갖는다.

[0010] 상기 복합체 나노코팅은 구조적 차원에 관계없이 다양한 기질에서 수행 가능하여, 입자 형태의 약물담지체에 코팅을 수행하여 약물전달 시스템으로 활용될 수 있다. 설계된 순차적 층상 구조는 형광/방사성 마커 단백질 또는 특정 질환에 대한 표적 마커 단백질을 포함할 수 있어 지능형 진단 물질 (intelligent theranostic agents)로서 기능할 수 있고, 난용성 약물-단백질 나노코팅법 및 디자인은 차세대 의약품 전달 플랫폼 개발에 응용될 수 있다.

[0011] 본 명세서의 일 예는 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물을 제공한다.

[0012] 다른 예는 기질 (substrate); 및

[0013] 상기 기질 표면을 코팅하는 코팅층을 포함하고,

[0014] 상기 코팅층은 (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름 및 (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름이 순서와 무관하게 적층된 것인,

[0015] 난용성 약물의 전달용 조성물을 제공한다.

[0016] 다른 예는 상기 난용성 약물의 전달방법을 제공한다.

[0017] 다른 예는 (1) 기질(substrate)에 금속 이온 용액 및 탄닌산 용액을 첨가하여, 상기 기질 표면에 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층을 형성하는 단계; 및

[0018] (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 기질을 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 용액에 첨가하여, 상기 기질 표면의 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층 상에 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 나노필름 코팅층을 형성하는 단계

[0019] 를 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0020] 본 명세서의 일 예는 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물을 제공한다.

[0021] 다른 예는 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는 난용성 약물의 전달용 조성물을 투여 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 난용성 약물의 전달방법을 제공한다.

[0022] 상기 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온은

[0023] (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름; 및

[0024] (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름

[0025] 의 형태로 포함될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 상기 (a) 나노필름과 (b) 나노필름은 순서와 무관하게 서로 번갈아 가면서 쌓여 있는 형태로 포함될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0027] 상기 (a) 나노필름 및 (b) 나노필름은 순서와 무관하게 서로 번갈아 각각 1개 내지 100개, 1개 내지 50개, 1개 내지 20개, 1개 내지 17개, 1개 내지 15개, 1개 내지 12개, 1개 내지 10개, 1개 내지 8개, 1개 내지 6개, 3개 내지 100개, 3개 내지 50개, 3개 내지 20개, 3개 내지 17개, 3개 내지 15개, 3개 내지 12개, 3개 내지 10개, 3개 내지 8개, 3개 내지 6개, 5개 내지 100개, 5개 내지 50개, 5개 내지 20개, 5개 내지 17개, 5개 내지 15개, 5개 내지 12개, 5개 내지 10개, 5개 내지 8개 또는 5개 내지 6개의 층으로, 예컨대 5개의 층으로 포함될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 다른 예에서, 상기 (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름의 층 수를 조절하여 난용성 약물의 함량을 제어할 수 있고 (예컨대, 층 수가 많을수록 난용성 약물의 함량이 증가한다), 상기 (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름의 층 수를 조절하면 약물 방출 시기를 제어할 수 있다 (예컨대, 층 수가 많을수록 약물의 방출 시기가 지연되거나 층 수가 많을수록 약물의 방출 시간이 길어진다).

[0029] 상기 (a) 나노필름 및 (b) 나노필름의 층 개수에 따라, 조성물의 두께가 조절될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 다른 예는 기질 (substrate); 및

[0031] 상기 기질 표면을 코팅하는 코팅층을 포함하고,

[0032] 상기 코팅층은 (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름 및 (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름이 순서와 무관하게 적층된 것인,

[0033] 난용성 약물의 전달용 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 (a) 나노필름은 0.1 내지 10nm, 0.1 내지 7nm, 0.1 내지 4nm, 0.1 내지 3nm, 0.1 내지 2nm, 0.1 내지 1.8nm, 0.5 내지 10nm, 0.5 내지 7nm, 0.5 내지 4nm, 0.5 내지 3nm, 0.5 내지 2nm, 0.5 내지 1.8nm, 1 내지 10nm, 1 내지 7nm, 1 내지 4nm, 1 내지 3nm, 1 내지 2nm, 1 내지 1.8nm, 1.5 내지 10nm, 1.5 내지 7nm, 1.5 내지 4nm, 1.5 내지 3nm, 1.5 내지 2nm, 1.5 내지 1.8nm, 1.7 내지 10nm, 1.7 내지 7nm, 1.7 내지 4nm, 1.7 내지 3nm, 1.7 내지 2nm, 또는 1.7 내지 1.8nm의 두께를 가질 수 있고, 예컨대, 1.75nm의 두께를 가질 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 (b) 나노필름은 0.1 내지 10nm, 0.1 내지 8nm, 0.1 내지 6nm, 0.1 내지 4nm, 0.1 내지 3nm, 0.1 내지 2.8nm, 1 내지 10nm, 1 내지 8nm, 1 내지 6nm, 1 내지 4nm, 1 내지 3nm, 1 내지 2.8nm, 2 내지 10nm, 2 내지 8nm, 2 내지 6nm, 2 내지 4nm, 2 내지 3nm, 2 내지 2.8nm, 2.5 내지 10nm, 2.5 내지 8nm, 2.5 내지 6nm, 2.5 내지 4nm, 2.5 내지 3nm, 2.5 내지 2.8nm, 2.7 내지 10nm, 2.7 내지 8nm, 2.7 내지 6nm, 2.7 내지 4nm, 2.7 내지 3nm, 또는 2.7 내지 2.8nm의 두께를 가질 수 있고, 예컨대, 2.78nm의 두께를 가질 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 다른 예는 기질 (substrate); 및

[0037] 상기 기질 표면을 코팅하는 코팅층을 포함하고,

[0038] 상기 코팅층은 (a) 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체를 포함하는 나노필름 및 (b) 탄닌산-금속 이온을 포함하는 나노필름이 순서와 무관하게 적층된 난용성 약물의 전달용 조성물을 투여 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 난용성 약물의 전달방법을 제공한다.

[0039] 상기 코팅층은 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상 형성될 수 있고, 100개 이하, 50개 이하 형성될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 다른 예는

[0041] (1) 기질 (substrate)에 금속 이온 용액 및 탄닌산 용액을 첨가하여, 상기 기질 표면에 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층을 형성하는 단계; 및

[0042] (2) 상기 (1) 단계에서 얻어진 기질을 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 용액에 첨가하여, 상기 기질 표면의 탄닌산-금속 이온 나노필름 코팅층 상에 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체 나노필름 코팅층을 형성하는 단계

[0043] 를 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물의 제조방법.

[0044] 상기 (1) 내지 (3) 단계를 1회 내지 10회, 1회 내지 8회, 1회 내지 6회, 3회 내지 10회, 3회 내지 8회, 3회 내지 6회, 5회 내지 10회, 5회 내지 8회, 또는 5회 내지 6회 반복 진행, 예컨대 5회 반복 진행할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 상기 (1) 내지 (3) 단계의 반복 진행 횟수에 따라 조성물의 두께를 조절할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 상기 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체는 난용성 약물 및 베타락토글로불린 각각을 10:1, 8:1, 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 또는 1:10의 몰농도 비율로 포함할 수 있고, 10:1 내지 1:10, 10:1 내지 1:8, 10:1 내지 1:6, 10:1 내지 1:4, 10:1 내지 1:2, 8:1 내지 1:10, 8:1 내지 1:8, 8:1 내지 1:6, 8:1 내지 1:4, 8:1 내지 1:2, 6:1 내지 1:10, 6:1 내지 1:8, 6:1 내지 1:6, 6:1 내지 1:4, 6:1 내지 1:2, 4:1 내지 1:10, 4:1 내지 1:8, 4:1 내지 1:6, 4:1 내지 1:4, 4:1 내지 1:2, 2:1 내지 1:10, 2:1 내지 1:8, 2:1 내지 1:6, 2:1 내지 1:4, 또는 2:1 내지 1:2의 몰농도 비율로 포함할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 상기 난용성 약물 및 베타락토글로불린 복합체는 난용성 약물에 비해 수용성이 향상된 것을 특징으로 할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 상기 기질은 금판, 폴리스티렌, 금속, 금속산화물, 세라믹, 광물, 폴리머, 생체적합성 폴리머 (예컨대, 폴리아크릴산 (Polyacrylic acid), 폴리비닐피롤리돈 (Polyvinyl Pyrrolidone), 히드록시알킬 셀룰로오스 (Hydroxyalkyl cellulose), 카보머 (Carbomer), 폴리비닐알코올 (Polyvinyl alcohol), 키토산 (Chitosan), 알지네이트류 (Alginate), 카르복시메틸 셀룰로오스 (Carboxymethyl Cellulose), 폴리헥사메틸렌비구아니드 (Poly(hexamethylenebiguanide)), 카라기난 (Carrageenan), 폴리에틸렌옥사이드 (Polyethylene oxide), 폴리사카라이드 (polysaccharide), 콜라겐 (Collagen), 젤라틴 (Gelatin), 히알루론산 (Hyaluronic acid), 잔탄 고무 (Xanthan gum), 아카시아 고무 (Acacia gum), 아르긴산 (Alginic acid), 한천 (Agar), 아라비아 고무 (Gum arabic), 트라가칸트 (Tragacanth), 카라야 고무 (Karaya gum), 펙틴 (Pectin), 만니톨 (mannitol), 폴록사머 (poloxamer), 구아검 (guar gum), 폴리에틸렌글리콜 (polyethylene glycol; PEG) (예컨대, 폴리에틸렌글리콜 6000), 덱스트란 (dextran), 하이드록시프로필셀룰로오스 (hydroxypropyl cellulose) 또는 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 (hydroxypropyl methylcellulose)), 유리, 및/또는 목재 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고 (무생물체군), 상기 기질은 균류 (예를 들어, 세균, 진균 등), 식물, 동물 등으로 이루어진 군에

서 선택된 1종 이상일 수 있고 (생물체군), 상기 무생물체군과 생물체가 결합된 형태일 수 있다. 상기 세균은 프로바이오틱스일 수 있고, 상기 프로바이오틱스는 락토바실러스 브레비스 (Lactobacillus brevis), 락토바실러스 플란터룸 (Lactobacillus plantarum), 락토바실러스 아시도필루스 (Lactobacillus acidophilus), 락토바실러스 람노서스 (Lacticaseibacillus rhamnosus), 락토바실러스 카제이 (Lactobacillus casei), 락토바실러스 불가리쿠스 (Lactobacillus bulgaricus), 락토바실러스 퍼멘텀 (Lactobacillus fermentum) 및 락토바실러스 살리바리우스 (Lactobacillus salivarius)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 기질이 식물 또는 동물인 경우, 식물 또는 동물 그 자체, 또는 그로부터 분리된 기관 또는 세포일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 난용성 약물은 레스베라트롤, 소수성 비타민, 폴리페놀, 및/또는 지방산 계열 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 구체적으로, 비타민 D, 퀘세틴, 레티놀, 엽산, 오메가3-지방산, 도코사헥사노익산 (docosahexaenoic acid; DHA), 아세트아미노펜, 케토프로펜, 아시클로버 및/또는 코엔자임 Q10으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 금속 이온은 철 이온, 알루미늄 이온 (Al(III)), 지르코늄 이온 (Zr(IV)), 루테늄 이온 (Ru(III)), 로듐 이온 (Rh(III)), 아연 이온 (Zn(II)), 바나듐 이온 (V(III)), 크롬 이온 (Cr(III)), 망가니즈 이온 (Mn (II)), 코발트 이온 (Co(II)), 니켈 이온 (Ni(II)), 구리 이온 (Cu(II)), 몰리브덴 이온 (Mo(II)), 카드뮴 이온 (Cd(II)), 유로퓸 이온 (Eu(III)), 가돌리늄 이온 (Gd(III)), 테르비움 이온 (Tb(III)) 및 세륨 이온 (Ce(III))으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 난용성 약물의 전달용 조성물은 경구 투여 및/또는 경피투여의 방식으로 투여될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 상기 투여 대상은 인간, 소, 말, 양, 돼지, 고양이, 개, 마우스, 랫드, 래빗, 기니피그, 원숭이 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0054] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.

[0056] 본 명세서에서 “난용성 약물”은 물이나 그 밖의 용매에 잘 녹지 않은 성질을 가지고 있는 약물을 의미한다.

[0057] 상기 “난용성”은 수용해도가 20 mg/mL 미만, 18 mg/mL 미만, 16 mg/mL 미만, 14 mg/mL 미만, 12 mg/mL 미만, 10 mg/mL 미만, 8 mg/mL 미만, 6 mg/mL 미만 일 때, 또는 4 mg/mL 미만인 경우를 의미할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 명세서의 “레스베라트롤”은 미국 약전에 수록되어있는 용해도 분류표에 따른 수용해도가 0.3 g/L일 수 있고, “Very slightly soluble”에 속할 수 있다.

[0059] 본 명세서에서 “난용성 약물의 전달용 조성물”은 특정 기질을 코팅하고 있는 코팅층에 난용성 약물이 포함되어 상기 난용성 약물을 전달할 수 있고, 상기 코팅층은 1개 이상의 층으로 쌓여있는 형태로 구성될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 명세서에서 “베타락토글로불린 (beta-lactoglobulin; β-lactoglobulin)”은 일반적인 우유의 성분 가운데 가장 많은 비율을 차지하는 글로불린으로 소나 양의 젖에 들어 있는 유청 단백질의 주성분이다.

[0061] 본 명세서에서 “탄닌산 (tannic acid)”은 폴리페놀의 일종인 탄닌의 특정 형태로, 오배자 또는 몰식자의 생성물을 용매 추출하여 얻어진 칼로타닌 (gallotannins)으로 구성되어 있으며 식품에 청징제, 향미료, 향미조정제 등으로 사용된다.

[0062] 본 명세서에서 “레스베라트롤”은 폴리페놀의 일종으로 오디, 땅콩, 포도, 라스베리, 크렌베리 등의 베리류 등을 포함한 많은 식물에서 발견된다. 항암 및 강력한 항산화 작용을 하며 혈청 콜레스테롤을 낮춰 주는 역할을 한다.

[0063] 본 명세서에서 “기질 (substrate)”는 본 명세서의 조성물 제조 과정에서 코팅 시에 코팅 대상이 되는 물질일 수 있고, 당업계에서 일반적으로 사용되는 의미로 사용될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 나노필름 또는 나노코팅의 대상이 되는 개체 또는 객체를 의미할 수 있고, 질량과 부피를 갖는 것이라면 종류에 관계없이

이용될 수 있다. 예를 들어, 상기 코팅 대상은 금속, 금속산화물, 세라믹, 광물, 폴리머, 유리, 및/또는 목재 등과 같은 무생물체들 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 구체적으로, 상기 코팅 대상은 균류 (예를 들어, 세균, 진균 등), 식물, 동물 등과 같은 생물체들 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 무생물체와 생물체가 결합된 물체일 수 있다. 상기 코팅 대상이 식물 또는 동물인 경우, 식물 또는 동물 그 자체, 또는 그로부터 분리된 기관 또는 세포일 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 “복합체 용액”은 복합체의 각 구성의 가루 (분말), 용액 등의 형태가 혼합되어, 용액 형태로 존재하는 것을 의미하고, 상기 각 구성의 형태가 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 난용성 약물의 전달용 조성물에서 코팅층은 코팅 횟수에 따라 코팅층의 두께가 선형으로 증가할 수 있고, 코팅 횟수에 따라 나노미터 수준으로 두께를 정교하게 조절할 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 조성물은 약학적 조성물, 화장료 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 또는 의약외품 조성물일 수 있으며, 이들은 용액, 연고, 외용연고, 크림, 에센스, 폼, 화장수, 영양화장수, 유연수, 유연화장수, 팩, 유액, 메이크업 베이스, 비누, 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 파운데이션, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가질 수 있다.

[0067] 상기 조성물은 경구투여 또는 비경구투여 제제의 제형일 수 있고, 경구 투여를 위한 것인 경우 (예컨대, 약학적 조성물(경구) 또는 식품 조성물), 상기 조성물은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등으로 제형화된 것일 수 있다.

[0068] 상기 조성물은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 랫드 (rat), 토끼 등의 설치류, 이외의 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 염소 등을 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위 등을 포함하는 조류, 뱀, 도마뱀, 거북, 악어 등을 포함하는 파충류, 양서류, 및 어류 등의 척추동물에서 선택된 대상에 다양한 경로로 투여될 수 있다.

[0069] 상기 조성물의 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 투여, 또는 정맥투여, 근육투여, 피하투여, 복강내 (Intraperitoneal; 복막내) 투여, 병변 부위의 국소 투여, 경피투여, 직장투여 또는 복강 주사 같은 비경구 투여의 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 또는 비경구 투여 (경피투여, 복강내, 직장, 정맥, 근육 또는 피하 주사)에 의해 투여될 수 있다. 이때, 비경구 경로는 경피 투여가 바람직하며, 그 중에서도 국소 도포가 가장 바람직할 수 있다. 본 발명에 따른 미백용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해 서 본 발명에 따른 미백용 약학 조성물은 0.1 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0070] 상기 조성물은 약학적 유효량으로 투여될 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 간격, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 투여 용량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정 시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0071] 예컨대, 상기 조성물의 1회 또는 1일 투여량은 유효성분 (난용성 약물)의 고형분 중량 기준으로 0.001 내지 10000mg/kg, 구체적으로, 0.01 내지 10000mg/kg, 0.01 내지 5000mg/kg, 0.01 내지 3000mg/kg, 0.01 내지 2500mg/kg, 0.01 내지 2000mg/kg, 0.01 내지 1800mg/kg, 0.1 내지 10000mg/kg, 0.1 내지 5000mg/kg, 0.1 내지 3000mg/kg, 0.1 내지 2500mg/kg, 0.1 내지 2000mg/kg, 0.1 내지 1800mg/kg, 1 내지 10000mg/kg, 1 내지 5000mg/kg, 1 내지 3000mg/kg, 1 내지 2500mg/kg, 1 내지 2000mg/kg, 1 내지 1800mg/kg, 10 내지 10000mg/kg, 10 내지 5000mg/kg, 10 내지 3000mg/kg, 10 내지 2500mg/kg, 10 내지 2000mg/kg, 10 내지 1800mg/kg, 100 내지 10000mg/kg, 100 내지 5000mg/kg, 100 내지 3000mg/kg, 100 내지 2500mg/kg, 100 내지 2000mg/kg, 또는 100 내지 1800mg/kg 범위일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 1회 또는 1일 투여량은 단위 용량 형태로 하나의 제제로 제제화되거나, 적절하게 분량하여 제제화되거나, 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 상기한 투여량은 평균적인 경우를 예시한 것으로서 개인적인 차이에 따라 그 투여량이 높거나 낮을 수 있다.

[0072] 상기 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0073] 상기 조성물은 앞서 설명한 유효성분 이외에도, 일반적으로 투여방식과 표준 약학적 관행 (Standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및 희석제

등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조제와 혼합되어 투여될 수 있다. 예컨대, 상기 약학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 약학 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 담체일 수 있다.

[0074] 상기 약학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 희석제 및/또는 부형제는 약학 조성물의 적절한 제제화에 통상적으로 사용되는 모든 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 윤활제, 계면활성제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 예컨대, 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제 등의 경구투여를 위한 고형 제제의 경우, 상기 부형제는 이러한 고형 제제의 제제화를 위한 적어도 1종 이상의 물질, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이외에도, 마그네슘 스티레이트 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 또한, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 경구투여를 위한 액상제제의 제제화의 경우, 통상적으로 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있고, 이외에, 통상적으로 사용되는 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0075] 예컨대, 상기 조성물은 전분 또는 락토오즈를 함유하는 정제 형태로, 또는 적절한 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강내 또는 혀밑 투여될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제 (예를 들면, 메틸셀룰로오즈, 위텝솔 (Witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유 (Apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0076] 본 발명은 난용성 약물, 베타락토글로불린 및 탄닌산-금속 이온을 포함하는, 난용성 약물의 전달용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 코팅을 반복하는 횟수에 따라 두께를 나노미터 수준으로 정교하게 조절할 수 있고 이는 난용성 약물의 함량을 조절하는 약물전달체로서 응용 가능하다. 제조 과정이 온화한 조건 (상온, 중성 pH, 수용액상)에서 이루어지기 때문에 산도 및 온도에 민감한 재료 표면에 나노필름 형성이 가능하다. 또한, 다양한 pH 범위와 체내 소화효소에 대해 안정성을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1a 및 1b는 각각 베타락토글로불린 추출을 위해 사용된 분리 유청 단백질과 상기 단백질에서 추출된 베타락토글로불린을 나타내는 사진이다.

도 2는 분리 유청 단백질로부터 추출한 베타락토글로불린의 분자량을 측정하기 위해 실시한 MALDI-TOF MS 분석 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3은 제조된 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 용액을 나타내는 사진이다.

도 4는 탄닌산-철이온 나노필름과 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 나노필름의 나노코팅 과정의 모식도를 나타내는 그림이다.

도 5는 나노코팅의 횟수에 따라 생기는 나노코팅층 수에 따른 두께를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 6은 제조된 Fe(III)-TA 나노필름 및 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름의 표면 분석 (구성성분 분석)을 위해 수행한 X-선 광전자분광법의 분석결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 제조된 Fe(III)-TA 나노필름 및 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름의 물접촉각 측정을 위해 물방울을 떨어뜨려 생성된 표면을 나타내는 사진이다.

도 8은 폴리스티렌 파티클에 생성된 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅층을 보여주는 사진이다.

도 9는 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 표면전하를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 10은 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 pH에 따른 안정성을 확인을 위해 두께 변화를 측정한 결과를 나

타내는 그래프이다.

도 11은 도 10은 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 효소 종류에 따른 안정성을 확인을 위해 두께 변화를 측정한 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 본 발명을 아래 실시예를 통해 상세히 설명한다. 아래 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명이 아래 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0080] **실시예 1. 레스베라트롤 및 베타락토글로불린 복합체 제조**

[0081] 실시예 1-1. 베타락토글로불린 추출

[0082] 베타락토글로불린 (beta-lactoglobulin; β-lactoglobulin)을 얻기 위해 분리 유청 단백질로부터 분리, 정제 단계를 거쳐 추출하였고, 상기 분리 유청 단백질은 시중에서 구입하였다.

[0083] 구체적으로, 상기 분리 유청 단백질 2.5g에 40mL의 증류수를 넣고 냉장고에서 12시간 이상 정치하여 팽윤시켰다. 이후 1M HCl을 이용하여 분리 유청 단백질 용액이 pH 4.6이 되도록 조정한 후, 전체 부피가 50mL가 되도록 증류수를 채워주고 1시간동안 실온에서 정치하였다. 상기 정치한 용액을 8000g로 30분간 원심분리하여 가라앉은 카제인 (casein)을 제거하고 상층액만을 얻었다.

[0084] 상기 얻은 상층액 전체 부피의 7%(w/v)에 상당하는 NaCl을 넣어준 뒤 녹을 때까지 교반시켰다. 이후 1M HCl을 이용하여 pH 2가 되도록 조정한 후 20분 동안 정치하였다. 상기 정치한 용액은 8000g로 30분간 원심분리하여 알파락타알부민 (α-lactalbumin), 면역글로불린 (immunoglobulins), 소 혈청 알부민 (bovine serum albumin)을 제거하고 상층액만을 얻었다.

[0085] 그 후, 미생물을 제거하기 위해서 기공의 크기가 0.45μm인 시린지 필터를 이용하여 여과를 해주었다. 여과를 해준 용액을 ultrafiltration (10,000 MWCO)을 통해 염을 제거하고 베타락토글로불린을 농축시켰다. 상기 농축된 베타락토글로불린을 3일간 동결건조하여 최종적으로 파우더 형태의 베타락토글로불린을 얻었다. 상기 분리 유청 단백질은 도 1a에, 상기 과정을 통해 얻은 베타락토글로불린은 도 1b에 나타내었다.

[0086] 실시예 1-2. 베타락토글로불린의 분자량 분석

[0087] 분리 유청 단백질로부터 추출한 베타락토글로불린의 분자량을 측정하기 위해 MALDI-TOF MS 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. MALDI-TOF MS 분석 결과, 고유한 m/z 피크가 18348.6에서 나왔으며 이는 단량체 형태의 베타락토글로불린 분자량과 상응하는 값으로 추출한 물질이 베타락토글로불린임을 확인하였다.

[0088] 실시예 1-3. 레스베라트롤 및 베타락토글로불린 복합체 제조

[0089] 레스베라트롤 (Tokyo Chemistry Industry (TCI), 일본, 순도: > 99.0%)의 농도가 4mM이 되도록 계량하여 75% 에탄올을 이용하여 녹였다. 단백질 구조에 영향을 주지 않기 위해 최종 에탄올의 농도가 7% 이상이 되지 않도록 10mM pH 7.4 인산완충용액 (phosphate buffer)을 이용하여 레스베라트롤의 농도가 400μM가 되도록 희석하였다.

[0090] 또한, 상기 실시예 1-1에서 얻은 베타락토글로불린 파우더를 10mM pH 7.4 인산완충용액을 이용하여, 베타락토글로불린 용액 농도가 400μM이 되도록 준비하였다.

[0091] 상기 준비한 레스베라트롤 용액과 베타락토글로불린 용액을 각각 몰 농도 1:1 비율로 혼합한 후 2시간동안 정치하여 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 (R-BLG)를 제조하였고, 제조된 복합체 용액을 도 3에 나타내었다.

[0093] **실시예 2. 나노코팅 진행**

[0094] 실시예 2-1. 탄닌산-철이온 나노코팅 형성

[0095] 탄닌산-철이온 나노코팅을 제조하기 위해, 금판 (나노종합기술원에서 공정 제작, 4 인치 (inch)의 실리콘 웨이퍼에 티타늄 (Ti) 5nm, 금 (Au) 100nm를 순차적으로 증착하여 제작됨), 탄닌산 (Sigma-Aldrich사, 미국) 및 철이온 (Sigma-Aldrich사, 미국)을 준비하였다. 상기 준비한 탄닌산의 농도가 40mg/mL가 되도록, 상기 준비한 철이온 ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$)의 농도가 10mg/mL가 되도록 증류수를 이용하여 각각의 용액을 제조하였다. 또한, 상기 준

비한 금판을 세척하고, 세척한 금판을 페트리디쉬에 넣고 증류수 4900㎕를 첨가한다.

[0096] 상기 금판에 철이온 용액 50㎕를 첨가하고 10초 후에 탄닌산 용액을 50㎕를 첨가하여 1분 동안 궤도진탕기(orbital shaker)를 이용하여 흔들어 주었다.

[0097] 그 후, 상기 용액이 첨가된 금판을 20mM pH 7.4 Tris-HCl 완충용액 5mL에 3분 동안 넣어준 후 증류수로 세척 과정을 3번 반복하고 에어 블로우 건을 통해 질소 가스 (N_2)로 블로잉하여 남아있는 증류수를 제거하였다. 상기 코팅단계를 원하는 코팅층의 수만큼 반복하였다.

[0098] 실시예 2-2. 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 나노코팅 형성

[0099] 상기 실시예 2-1에서 탄닌산-철이온 나노코팅을 수행한 금판을 샬레에 넣고, 상기 실시예 1-3에서 제조한 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 용액을 5mL 첨가하여 15분동안 궤도진탕기 (orbital shaker)를 이용하여 흔들었다.

[0100] 상기 궤도진탕기를 이용하여 흔든 후, 증류수로 세척 과정을 3번 반복한 후 에어 블로우 건을 통해 질소 가스 (N_2)로 블로잉하여 남아있는 증류수를 제거하였다. 상기 코팅단계를 원하는 코팅층의 수만큼 반복하였고, 해당 나노코팅의 과정의 모식도를 도 4에 나타내었다.

[0101] 상기 과정을 통해 형성된 탄닌산-철이온 나노필름은 Fe(III)-TA, 레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 나노필름은 R-BLG (레스베리트롤 (**R**esveratrol) - 베타락토글로불린 (**B**eta-**L**acto**g**lobulin)), 탄닌산-철이온/레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 나노필름은 Fe(III)-TA/R-BLG로 지칭한다.

[0103] **실시예 3. 탄닌산-철이온/레스베라트롤-베타락토글로불린 복합체 (Fe(III)-TA/R-BLG) 나노코팅 분석**

[0104] 실시예 3-1. 나노코팅 나노필름의 두께 측정

[0105] 상기 실시예 2에서 코팅단계를 1회 내지 10회 반복하여, 1층 내지 10층의 코팅층을 가지는 나노코팅 Fe(III)-TA/R-BLG의 두께를 측정하기 위해, 분광타원계측기 (spectroscopic ellipsometer, J. A. Woolam Co., USA)를 이용하여 Cauchy 모델로 측정하였고, 그 결과를 표 1 및 도 5에 나타내었다.

표 1

[0106]

코팅층 수	두께 (nm)
1	4.04±0.05
2	9.96±0.23
3	14.95±0.39
4	21.87±0.12
5	25.86±0.25
6	31.3±0.26
7	34.51±0.25
8	38.43±0.28
9	41.19±0.25
10	45.1±0.29

[0107] 그 결과, Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름은 약 4.31nm, 각 층의 Fe(III)-TA 나노필름은 약 2.78nm, R-BLG 나노필름은 약 1.75nm 정도 형성되었으며, Fe(III)-TA/R-BLG의 두께가 선형으로 증가하였다. 이를 통해, Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름을 코팅 횟수에 따라 나노미터 수준으로 두께를 정교하게 조절하여 제조할 수 있다.

[0108] 실시예 3-2. 나노코팅 나노필름 표면 분석

[0109] 상기 실시예 2에서 제조한 Fe(III)-TA 나노필름 및 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름의 표면 분석을 위해 X-선 광전자 분광법 (XPS)을 진행하였고, 분석 결과를 도 6 및 표 2에 나타내었고, 하기 표 2는 표면 원소의 비율을 나타낸 결과이다.

표 2

[0110]

	C (탄소) 1s	O (산소) 1s	N (질소) 1s	Fe (철) 2p
$[Fe(III)-TA]_1$	61.56%	34.04%	2.35%	2.15%
$[Fe(III)-TA/R-BLG]_1$	56.47%	27.26%	14.06%	2.20%

[0111] 그 결과, 질소 (N) 비율을 비교했을 때 Fe(III)-TA 나노필름은 2.35%이고, Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름은 14.06%로 R-BLG에 의해 질소 함량이 증가하였다. 이를 통해, R-BLG의 다양한 아미노산과 펩타이드 결합에 존재하는 질소에 의한 증가로, R-BLG 코팅이 형성되는 것을 확인하였다.

[0112] 실시예 3-2. 나노코팅 나노필름의 물 접촉각 측정

[0113] 상기 실시예 2에서 제조한 Fe(III)-TA 나노필름 및 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름의 물 접촉각을 나노필름 위에 물방울 7μL를 떨어뜨려 생성되는 표면-액적 사이의 각을 SmartDrop Plus (FEMTOBIOMED Inc., Republic of Korea) 사의 각도기를 사용하여 측정하여 구하였고, 분석 결과를 도 7 및 표 3에 나타내었다.

표 3

[0114]

	물 접촉 각 (°)
$[Fe(III)-TA]_1$	25.0±0.2
$[Fe(III)-TA/R-BLG]_1$	48.8±0.4

[0115] 그 결과, Fe(III)-TA 나노필름의 경우 25±0.2° , Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름의 경우 49±0.4° 로 측정되었다. 이를 통해, Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름이 Fe(III)-TA 나노필름에 비해 친수성이 작아, R-BLG 층이 나노미터 수준으로 형성되더라도 나노필름 표면의 성질이 급변한다는 것을 확인하였다.

[0117] **실시예 4. 폴리스티렌 파티클에 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 후 분석**

[0118] 실시예 4-1. 폴리스티렌 파티클에 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅

[0119] Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 적용을 확인하기 위해, 3μm 직경을 갖는 입자가 사용된 폴리스티렌 파티클 (Sigma-Aldrich, 미국)을 준비하였다. 2mL 마이크로 튜브에 상기 준비한 폴리스티렌 파티클이 전체 코팅 용액의 1 (v/v)%가 되도록 첨가하였다. 구체적으로, 전체 코팅 용액 500μL의 1 (v/v)%가 되도록 10 (v/v)% 폴리스티렌 파티클 분산액 50μL와 증류수 440μL를 첨가하였다.

[0120] 상기 실시예 2-1에서 준비한 40mg/mL의 탄닌산과 10mg/mL의 철이온을 각각 10초 간격으로 5μL씩 첨가한다. 궤도진탕기 (obital shaker)를 이용하여 1분간 흔들어준 후, 20mM pH 7 MOPS 완충용액 500μL을 첨가하고 3분간 섞었다. 원심분리기를 이용하여 3분 동안 6000rpm으로 분리하여 상층의 코팅 잔여액을 제거하고, 증류수 1mL를 첨가해서 분산시킨 후 다시 원심분리하는 과정을 거치는 세척단계를 수행하였다. Fe(III)-TA 코팅된 폴리스티렌 파티클을 상기 실시예 1-3에서 제조한 200μM R-BLG 복합체 용액 1mL에 분산시킨 후 15분동안 궤도진탕기에서 흔들었다.

[0121] 그 후, 상기 원심분리 및 세척 단계를 동일하게 수행하여 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅된 폴리스티렌 파티클을 얻었다. 상기 과정을 반복하여 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 층을 조절하였다.

[0122] 실시예 4-2. 폴리스티렌 파티클에 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 여부 확인

[0123] 상기 실시예 4-1에서 진행한 나노코팅의 코팅 여부를 확인하기 위해서, 상기 실시예 4-1의 과정을 5번 진행한 Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅된 파티클을 준비하였고 주사전자현미경 (Scanning Electron Microscope; SEM)으로 확인하였고, 그 결과를 도 8에 나타내었다. 구체적으로, 나노코팅 전과 후로 나누어 관찰하였고, 각각 10,000 배율 및 50,000 배율로 측정하였다.

[0124] 그 결과, 코팅 전에는 매끈한 표면을 보이는 반면, 코팅 후에는 표면에 작은 입자들로 덮여 있음을 확인하였다. 이를 통해, 평면뿐만 아니라 파티클에서도 나노필름이 잘 형성되는 것을 확인하였다.

[0125] 실시예 4-3. Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 표면전하 측정

[0126] 상기 실시예 4-1의 나노코팅 나노필름의 표면전하를 측정하였다. 구체적으로, 상기 실시예 4-1의 나노코팅된 폴리스티렌 파티클을 1mg/mL가 되도록 수분산하여 측정 셀에 넣고, 해당 셀에 전압을 걸어 입자의 산란 상태와 표면전하를 Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK)를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 도 9 및 표 4에 나타내었다.

표 4

[0127]

	Bare PS	Fe(III)-TA	R-BLG	Fe(III)-TA	R-BLG
Zeta potential(mV)	-17.5±0.5	-71.9±2.0	-63.8±1.1	-66.4±1.0	-55.4±1.0

[0128] 그 결과, 각 층의 나노필름은 음전하를 띠며, 코팅 형성 과정에서 음전하로 유지되어 폴리스티렌 파티클끼리 서로 응집되지 않고 수용액에 잘 분산된 것을 확인하였다.

[0130] **실시예 5. Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 안정성 확인**

[0131] 실시예 5-1. pH 안정성 확인

[0132] Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 pH 안정성 시험을 위해 50mM pH 4.0 소듐 아세테이트 (sodium acetate) 완충용액, 10mM pH 7.4 Tris-HCl 완충용액, 100mM pH 9.5 카보네이트/바이카보네이트 (carbonate/bicarbonate) 완충용액을 준비하였다.

[0133] 금 기판 (나노종합기술원에서 공정 제작, 자세하게는, 4 인치 (inch)의 실리콘 웨이퍼에 티타늄 (Ti) 5nm, 금 (Au) 100nm를 순차적으로 증착하여 제작됨)에 상기 실시예 2의 코팅단계를 5번 진행하여 5 코팅층을 가지는 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름이 코팅된 금 기판을 준비하였다. 다양한 pH 범위에서의 안정성 시험을 하기 위하여 상기 제조한 50mM pH 4.0 소듐 아세테이트 (sodium acetate) 완충용액, 10mM pH 7.4 Tris-HCl 완충용액 및 100mM pH 9.5 카보네이트/바이카보네이트 (carbonate/bicarbonate) 완충용액 각각에 상기 준비한 금 기판을 넣은 이후 일정 시간이 지나면 기판을 꺼내고 증류수로 세척하고 에어 블로우 건을 통해 질소 가스 (N_2)로 블로잉하여 건조시켰다. 안정성은 분광타원계측기 (spectroscopic ellipsometer, J. A. Woolam Co., USA)를 이용하여 가시광선 영역 (300-700nm)의 빛이 나노필름 표면에 반사 및 굴절된 후 검출된 결과를 바탕으로, Cauchy 방정식을 이용한 모델에 적용하는 방식을 통해 반응 시간 (1시간, 6시간, 12시간, 1일, 3일, 7일)에 따른 나노필름의 두께 변화를 측정하여 잔존율을 분석하였고, 그 결과를 도 10 및 표 5에 나타내었다. 잔존율은 하기 수학식 1로 계산하였다. 하기 표 5의 단위는 %이다.

[0134] [수학식 1]

[0135] 잔존율 (%) = 100 X (반응 후 나노필름 두께/반응 전 나노필름 두께)

표 5

[0136]

	1시간	6시간	12시간	1일	3일	7일
pH 4	95.96±2.82	98.89±0.61	99.80±3.03	99.35±1.68	100.82±2.77	99.78±1.25
pH 7.4	99.60±4.96	99.19±0.77	99.76±0.79	99.52±1.14	97.63±1.14	99.89±2.69
pH 9.5	98.20±5.64	96.55±4.43	100.23±2.39	100.16±1.83	96.30±6.26	95.49±6.55

[0137] 그 결과, 시간이 지남에 따른 두께 변화가 거의 나타나지 않았고, 다양한 pH 범위에서 안정하다는 것을 확인하였다.

[0138] 실시예 5-2. 소화효소에 대한 안정성 확인

[0139] Fe(III)-TA/R-BLG 나노코팅 나노필름의 소화효소에 대한 안정성 시험을 위해 10mM HCl 전체 부피의 0.2%(w/v)에 상당하는 NaCl을 녹인 용액에 펩신 (pepsin)의 농도가 1 mg/mL인 pH 2 펩신 용액을 준비했다. 10mM pH 5.5 인산완충용액에 알파-아밀레이즈 (alpha-amylase)의 농도가 0.5 mg/mL가 되도록, 10mM pH 7.4 인산완충용액에 트립신 (trypsin)의 농도가 0.1 mg/mL인 용액을 제조한다.

[0140] 금 기판 (나노종합기술원에서 공정 및 제작, 자세하게는, 4 인치 (inch)의 실리콘 웨이퍼에 티타늄 (Ti) 5nm,

금 (Au) 100nm를 순차적으로 증착하여 제작됨)에 상기 실시예 2의 코팅단계를 5번 진행하여 5 코팅층을 가지는 Fe(III)-TA/R-BLG 나노필름이 코팅된 금 기판을 준비하였다. 다양한 효소에서의 안정성 시험을 위하여 상기 제조한 펩신 용액, 알파-아밀레이즈 용액, 트립신 용액 각각에 상기 준비한 금 기판을 넣은 이후 일정 시간이 지나면 기판을 꺼내고 증류수로 세척하고 질소 가스(N_2)로 건조시켰다. 안정성은 반응 시간 (1시간, 6시간, 12시간, 1일, 3일, 7일)에 따른 나노필름의 두께 변화를 상기 실시예 5-1과 실질적으로 동일한 방법으로 측정하여 잔존율을 분석하였고, 그 결과를 도 11 및 표 6에 나타내었다. 잔존율은 상기 수학식 1로 계산하였다. 하기 표 6의 단위는 %이다.

표 6

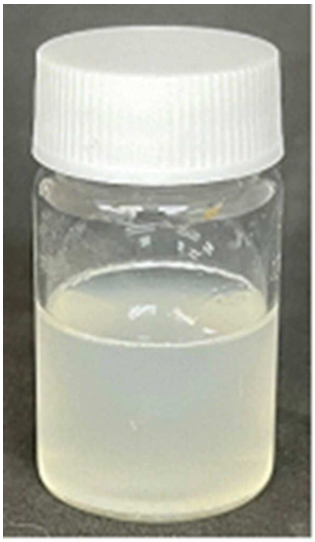
[0141]

	1시간	6시간	12시간	1일	3일	7일
Pepsin	104.64±2.10	103.51±0.60	99.74±1.06	100.3±0.50	101.76±0.42	98.85±1.29
α-amylase	99.30±0.50	100.15±0.99	94.27±4.06	97.76±1.49	101.89±3.59	106.11±4.73
trypsin	103.19±0.30	97.94±1.21	96.65±1.01	98.96±1.57	102.43±0.51	100.51±0.41

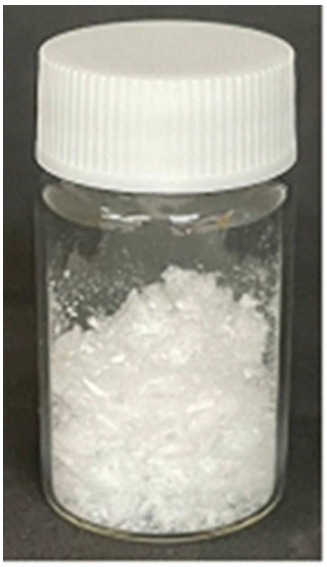
[0142] 그 결과, 시간이 지남에 따른 두께 변화가 거의 나타나지 않았고, 다양한 소화효소에 대해 안정하다는 것을 확인하였다.

도면

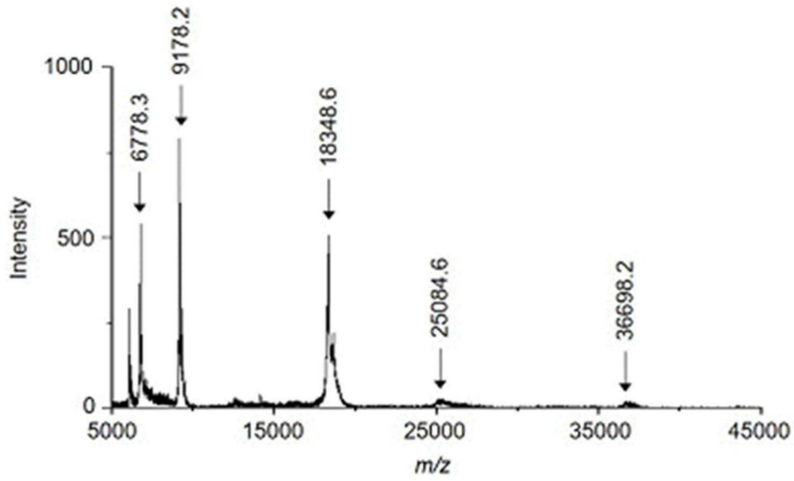
도면1a



도면1b



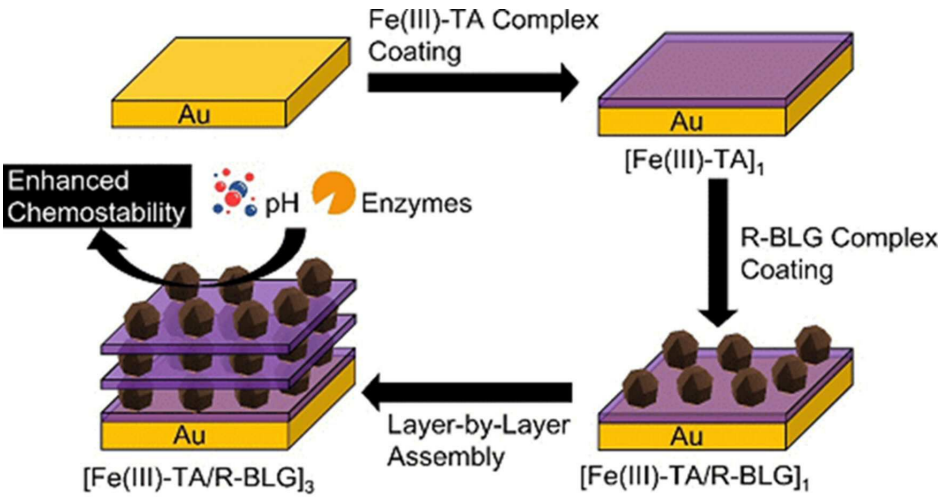
도면2


1000
500
0
Intensity
6778.3
9178.2
18348.6
25084.6
36698.2
5000
15000
25000
35000
45000
m/z

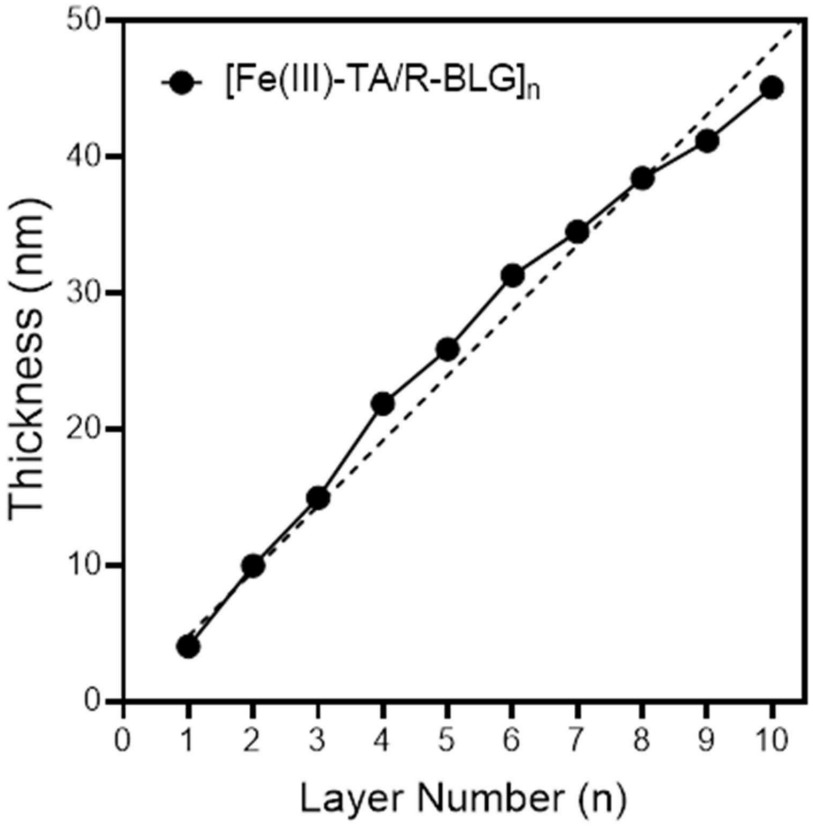
도면3



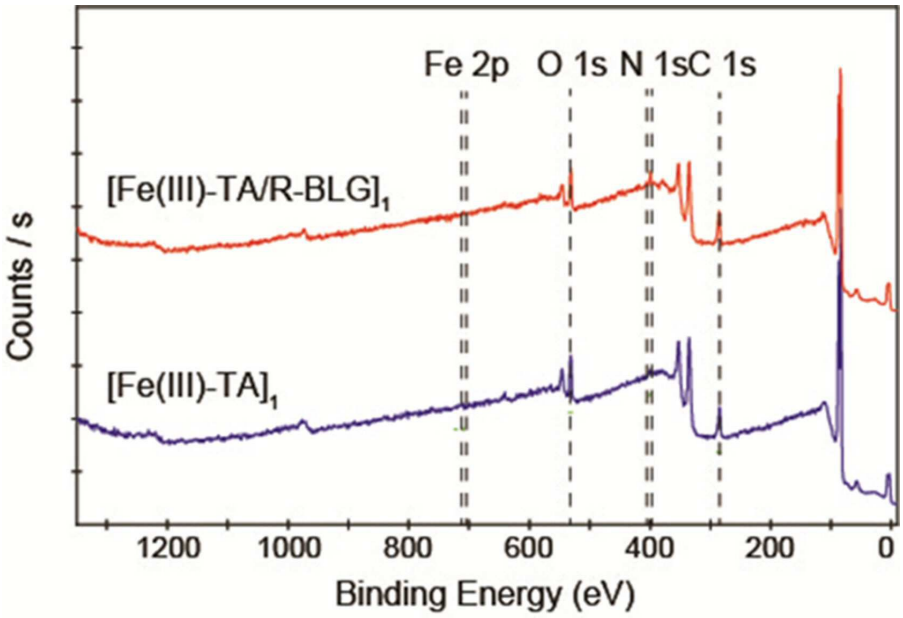
도면4


Fe(III)-TA Complex
Coating
Au
Au
[Fe(III)-TA]1
Enhanced
Chemostability
pH
Enzymes
R-BLG Complex
Coating
Au
Au
[Fe(III)-TA/R-BLG]3
Layer-by-Layer
Assembly
[Fe(III)-TA/R-BLG]1

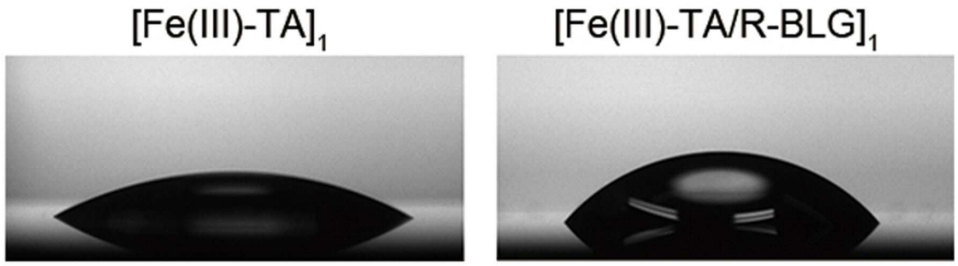
도면5


[Fe(III)-TA/R-BLG]n
Thickness (nm)
Layer Number (n)
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

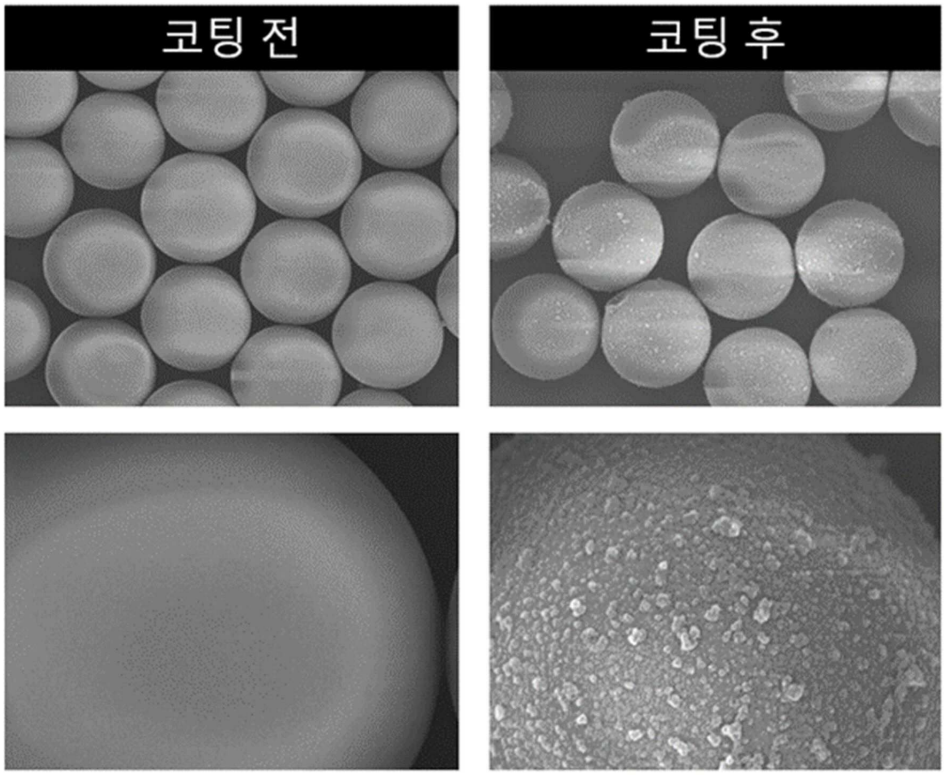
도면6


Fe 2p
O 1s
N 1s
C 1s
[Fe(III)-TA/R-BLG]1
[Fe(III)-TA]1
Counts / s
1200
1000
800
600
400
200
0
Binding Energy (eV)

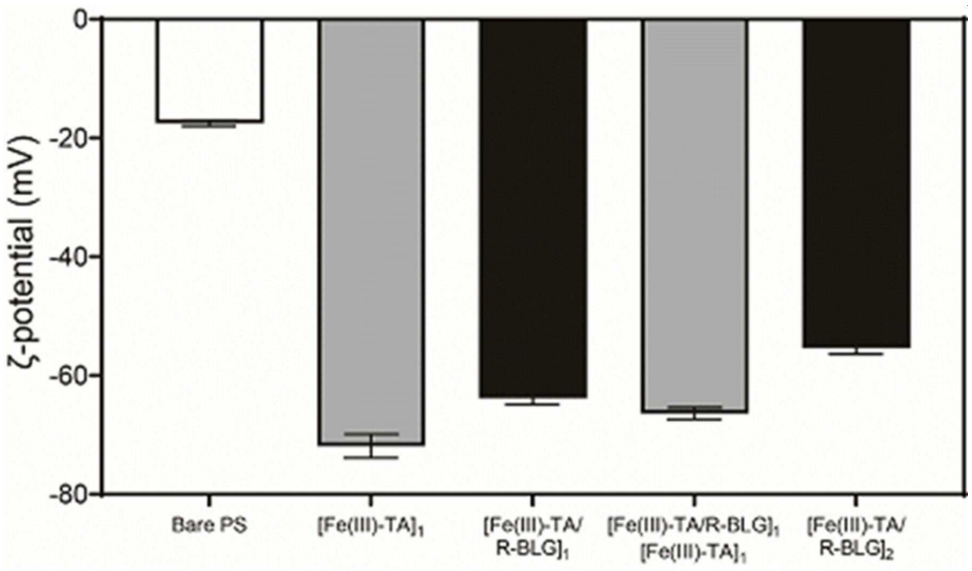
도면7


[Fe(III)-TA]1
[Fe(III)-TA/R-BLG]1

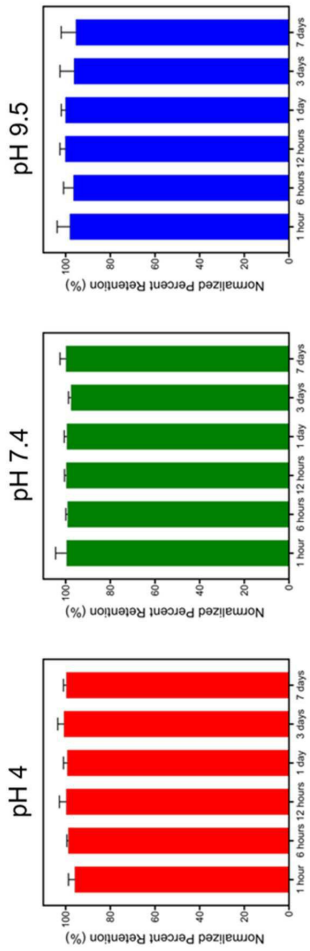
도면8


코팅 전
코팅 후

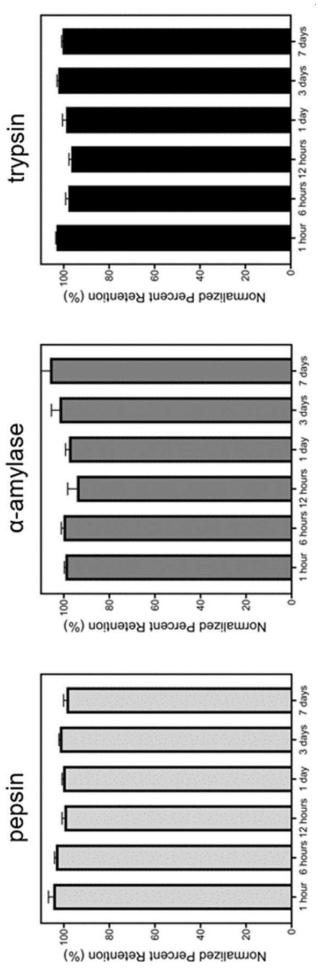
도면9


0
-20
-40
-60
-80
ζ-potential (mV)
Bare PS
[Fe(III)-TA]1
[Fe(III)-TA/ R-BLG]1
[Fe(III)-TA/R-BLG]1 [Fe(III)-TA]1
[Fe(III)-TA/ R-BLG]2

도면10


pH 9.5
pH 7.4
pH 4
Normalized Percent Retention (%)
0
20
40
60
80
100
1 hour
6 hours
12 hours
1 day
3 days
7 days

도면11


trypsin
α-amylase
pepsin
Normalized Percent Retention (%)
0
20
40
60
80
100
1 hour
6 hours
12 hours
1 day
3 days
7 days