(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0094667
(43) 공개일자 2023년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5169 (2013.01)
A61K 9/5115 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0184010
(22) 출원일자 2021년12월21일
심사청구일자 2021년12월21일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최준식
대전광역시 유성구 엑스포로123번길 65-38, 203동 1102호(도룡동, 스마트시티)
김민주
부산광역시 해운대구 중동2로34번길 29, 102동 1203호(중동, 롯데캐슬마린아파트)
(74) 대리인
최규환

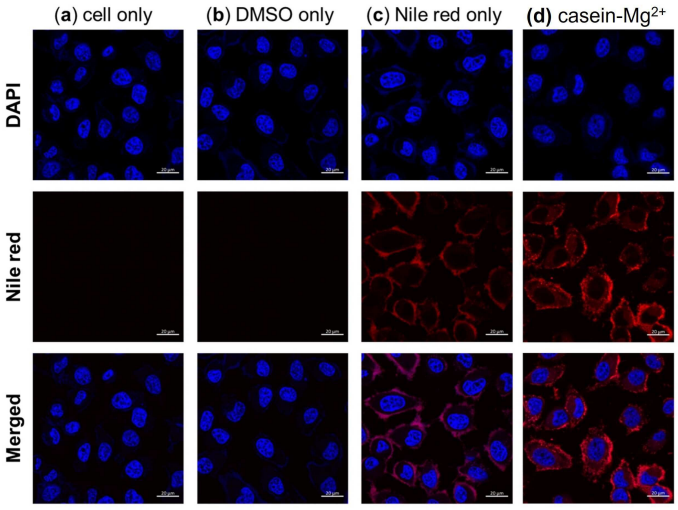
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **카제인-금속 나노입자의 제조방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 카제인-금속 나노입자의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법으로 제조된 카제인-마그네슘 나노입자가 평균직경 110~130nm의 크기이고, 환경 변화에도 입자가 붕괴되지 않고 안정하게 유지될 뿐만 아니라, 세포 독성이 없이 효과적으로 세포 내로 유입되므로, 약물전달체로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61K 9/5192 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 카제인 용액 및 금속염 용액을 혼합하는 단계; 및

(2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 카제인-금속 나노입자의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 금속염 용액은 $MgCl_2$ 용액인 것을 특징으로 하는 카제인-금속 나노입자의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 카제인 용액 및 금속염 용액은 2%(w/v) 카제인 용액과 10mM의 금속염 용액을 0.1~20:1의 부피비로 혼합하는 것을 특징으로 하는 카제인-금속 나노입자의 제조방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 하는 제조방법으로 제조된 카제인-금속 나노입자.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 카제인-금속 나노입자는 평균직경이 100~140nm인 것을 특징으로 하는 카제인-금속 나노입자.

청구항 6

제4항 또는 제5항의 카제인-금속 나노입자를 포함하는 약물전달체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카제인-금속 나노입자의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 인구의 증가에 따른 다양한 사회적 환경은 암, 박테리아 감염, 유전병 등의 여러 질병들을 발생시켰고, 이를 치료하기 위한 약물 개발도 활발히 이루어지고 있다. 천연물에서 추출한 약물에서 합성 의약품까지 다양한 약물들이 개발되고 있고, 약물들의 물에 대한 난용성 및 비특이적인 전달로 인한 정상 세포의 손상을 극복하기 위해 약물 전달 기술이 많이 연구되었다. 그 중 나노입자를 이용한 약물 전달 시스템(Drug delivery system)은 합성 고분자(polymer), 단백질(protein), 마이셀(micelle), 리포좀(liposome) 등이 있다. 각각의 구성 물질의 특성에 따라 물리·화학적 성질이 다르기 때문에 용도에 따라 다양한 구성이 가능하다. 이는 약물의 특성을 고려하여 선택적으로 디자인이 가능하다는 장점을 갖고 있다. 특히, 단백질을 이용한 나노입자는 생체 적합성 물질로서 독성이 낮고 인체 내 면역 반응을 거의 일으키지 않는다. 약물전달체로 쓰이는 단백질은 젤라틴(gelatin), 콜라겐(collagen), 알부민(albumin), 카제인(casein) 등이 존재하는데, 카제인은 포유류의 우유에 함유되어 있는 단백질로 생체 적합성과 생분해성이 우수하고 식이 단백질이기 때문에 제약, 의료산업, 기능식품 등 다양한 분야에서 적용될 수 있다. 카제인은 αS1-카제인, αS2-카제인, β-카제인 및 κ-카제인 4개의 성분으로 구성되며, 양친매성인 α-카제인 및 β-카제인은 상대적으로 소수성으로 내부에 존재하고, κ-카제인은 글리코실화된 친수성 부분으로 표면에 존재한다. 입자 표면이 인산화되어 음전하를 띠기 때문에 인산과 칼슘, 프롤린(proline)과

글루탐산(glutamate) 잔기와의 결합을 통해서 50-300nm 크기의 마이셀을 형성할 수 있다. 인산 칼슘과 결합하여 자가 조립을 통해 열역학적으로 안정한 마이셀을 형성하는데 칼슘 이온은 카제인의 포스포세릴 잔기와 강한 이온 결합을 하면서 구조가 안정화된다. 이러한 성질을 이용하여 카제인의 내부에 소수성 약물을 봉합하여 암세포를 수동적 표적 지향하여 전달할 수 있다.

[0003] 한편, 한국공개특허 제2008-0111033호에는 '카제인 나노입자'에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제2211287호에는 '비타민 D 또는 이의 유도체를 포함하는 안정성이 개선된 액상 제제'에 대해 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 '카제인-금속 나노입자의 제조방법 및 이의 용도'에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 카제인-금속 나노입자의 제조방법을 제공하고, 상기 제조방법으로 카제인-마그네슘 나노입자가 제조되는 것을 확인하였고, 제조된 카제인-마그네슘 나노입자가 평균직경 100~140nm의 크기이고, 환경 변화에도 입자가 붕괴되지 않고 안정하게 유지될 뿐만 아니라, 세포 독성이 없이 효과적으로 세포 내로 유입되는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0005] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 (1) 카제인 용액 및 금속염 용액을 혼합하는 단계; 및 (2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 카제인-금속 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0006] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 카제인-금속 나노입자를 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 카제인-금속 나노입자를 포함하는 약물전달체를 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 카제인-금속 나노입자의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법으로 제조된 카제인-마그네슘 나노입자가 평균직경 100~140nm의 크기이고, 환경 변화에도 입자가 붕괴되지 않고 안정하게 유지될 뿐만 아니라, 세포 독성이 없이 효과적으로 세포 내로 유입되므로, 약물전달체로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 카제인을 다양한 농도의 $MgCl_2$ 용액(A) 또는 KCl 용액(B)과 혼합하여 제조한 카제인-금속 나노입자의 크기를 측정한 결과이다.

도 2는 카제인-마그네슘 나노입자를 DPBS(dulbecco's phosphate buffered saline), FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함한 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 및 FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지에 24시간 노출시킨 후 입자 크기를 측정한 결과이다.

도 3은 카제인-마그네슘 나노입자(casein-Mg^{2+})의 세포 독성을 확인한 결과이다. 카제인(casein) 및 PEI(polyethylenimine, 25kDa)는 대조군으로 사용하였다.

도 4는 나일 레드(nile red)를 봉합한 카제인-마그네슘 나노입자(casein-Mg^{2+})의 세포 내 유입 여부를 확인한 결과이다. (a): 아무것도 처리하지 않는 군, (b): DMSO(Dimethyl Sulfoxide)만을 처리한 군, (c): 나일 레드를 처리한 군, (d): 나일 레드를 봉합한 카제인-마그네슘 나노입자를 처리한 군, 스케일 바(Scale bar)=20㎛.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 카제인 용액 및 금속염 용액을 혼합하는 단계; 및 (2) 상기 (1) 단계의 혼합물을 원심분리하여 상등액을 수득하는 단계;를 포함하는 카제인-금속 나노입자의 제조방법을 제공한다.

[0011] 상기 단계 (1)의 금속염 용액은 $MgCl_2$ 용액인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0012] 상기 단계 (1)의 카제인 용액 및 금속염 용액은 2%(w/v) 카제인 용액과 10mM의 금속염 용액을 0.1~20:1의 부피비로 혼합하는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 상기 단계 (1)의 카제인 용액 및 금속염 용액은 2%(w/v) 카제인 용액과 10mM의 금속염 용액을 1~8:1의 부피비로 혼합하는 것이지만, 이에 한정하지 않는다. 상기 카제인 용액과 금속염 용액의 농도를 당업계에서 사용되는 적절한 범위로 조절하는 것이 가능하며, 이에 따라 부피비도 얼마든지 조절할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 카제인-금속 나노입자를 제공한다.

[0014] 상기 카제인-금속 나노입자는 평균직경이 100~140nm인 것이 바람직하지고, 더 바람직하게는 평균직경이 115~135nm인 것이지만, 이에 한정하지 않는다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 카제인-금속 나노입자를 포함하는 약물전달체를 제공한다.

[0016] 상기 약물전달체는 난용성 약물용인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다.

[0017] 본 발명의 약물전달체는 상기 카제인-금속 나노입자 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0018] 본 발명의 약물전달체의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0019] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0020] **재료 및 방법**

[0021] **1. 시약 및 재료**

[0022] 본 발명에서 사용된 NaCas(sodium caseinate), 나일 레드(nile red), MeOH(methanol) 및 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, $MgCl_2$(Magnesium chloride hexahydrate)는 (주)덕산약품공업사(Ansan, South Korea)에서 구매하였다. DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium), DPBS(dulbecco's phosphate buffered saline) 및 FBS(fetal bovine serum)는 Welgene사(Gyeongsan, South Korea)에서 구매하였고, EDTA(Trypsin-ethylenediaminetetraacetic acid) 용액 및 항균 및 항진균(antibiotic-antimycotic 100X)는 Gibco사(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. WST-8 세포 생존율 분석 키트는 Biomax사(Seoul, South Korea)에서 구입하였고, DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)는 Thermo fisher scientific사(Waltham, MA USA)에서 구매하였다.

[0023] **2. 마그네슘 이온을 포함한 카제인 나노입자 합성**

[0024] NaCas(sodium caseinate)를 증류수에 녹여 2% 카제인 용액으로 준비한 후, 2%(w/v) 카제인 용액 3㎖과 Mg^{2+} 이온 수용액을 마그네슘 이온의 최종 농도가 5mM, 7.5mM, 10mM, 12.5mM, 15mM 및 20mM이 되도록 0.5㎖을 각각 첨가하고(총 3.5㎖), 15분 동안 교반한 다음, 2000rpm에서 2분 동안 원심분리하여 상층액만 수득하였다. 수득한 상층액을 액체질소 또는 냉동고에 얼린 후, 동결건조기에서 건조 후 냉동고에 장기간 보관하였다. 상기 수득한 마그네슘 이온을 포함한 카제인 나노입자(이하 '카제인-마그네슘 나노입자'라 함)의 크기는 동적광산란 측정기(DLS), ELSZ-2000S(Photal, Otsuka Electronics, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정하였고, 표면 전하는 Zetasizer Nano ZS(Malvern, London, UK)로 측정하였다.

[0025] **3. 배지 내 안정성**

[0026] DPBS(dulbecco's phosphate buffered saline), FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함한 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 및 FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지에 카제인-마그네슘 나노입자를 24시간 동안 노출시킨 후, DLS(Dynamic light scattering)로 입자의 크기 변화를 측정하였다.

[0027] **4. 카제인-마그네슘 나노입자의 세포 독성 평가**

[0028] 세포주는 HeLa(human epithelial ovary carcinoma)를 사용하였으며, 10% FBS(Fetal Bovine Serum) 및 1% 항생제를 포함한 DMEM 배지에 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 세포 내 독성을 평가하기 위해 WST-1 분석 방법을 수행했다. 96-웰 플레이트에 웰당 1.0×10^4의 세포를 37℃, 5% CO_2에서 24시간 배양 후에 마그네슘 이온을 포함한 카

제인 나노입자를 0.125mg/mℓ, 0.25mg/mℓ, 0.5mg/mℓ, 1mg/mℓ 및 2mg/mℓ의 농도로 준비하여 10㎕씩 처리하였다. 대조군으로는 PEI(polyethylenimine, 25kDa)를 처리하고, 24시간 후에 Ez-cytox 시약을 각 웰에 10㎕씩 처리한 다음, VersaMax ELISA 마이크로플레이트 리더(Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0029] **5. 카제인-마그네슘 나노입자에 나일 레드 봉합**

[0030] 나일 레드(nile red)를 메탄올에 1mg/mℓ의 농도로 녹이고, 유리 바이알에 100㎕를 정량하였다. 이후, 질소 가스로 용매를 증발시켜 필름 상태로 만든 후 카제인-마그네슘 나노입자를 넣고 1시간 동안 초음파에서 균질화시켰다. 이후, 18시간 동안 4℃에서 교반하고 18시간 후, 3000rpm에서 2분간 원심분리하여 상층액만 수득하였다. UV-Vis spectrophotometer(Optizen POP, Mecasys Co., Ltd Korea)로 555nm 파장에서 흡광도를 측정하여 나일 레드의 봉합률(encapsulation efficiency)을 계산하였다.

[0031] **6. 세포 내 유입 여부**

[0032] HeLa 세포주를 8-웰 플레이트에 웰당 2.0×10^4의 세포를 분주하고, 24시간 배양하였다. 나일 레드가 봉합된 카제인-마그네슘 나노입자(casein-Mg^{2+})를 1㎍/mℓ 처리하였고, 카제인-마그네슘 나노입자의 나일 레드의 최종 농도가 1㎍/mℓ이 되도록 처리하였다. 대조군으로는 나일 레드를 0.1% DMSO(Dimethyl Sulfoxide)에 녹여 동일한 농도로 처리하였다. 24시간 후 Hoechst 33258로 핵을 염색하고 공초점 현미경 Zeiss LSM 880(Zeiss, Oberkochen, Germany)으로 관찰하였다.

[0033] **실시예 1. 카제인-마그네슘 나노입자 형성 확인**

[0034] 카제인에 마그네슘 이온의 유무와 농도 변화에 따른 나노입자 형성을 확인하기 위해 DLS(Dynamic light scattering) 측정을 진행하였다. 그 결과, 하기 표 1 및 도 1에 개시한 바와 같이, 금속 이온을 첨가하지 않은 카제인의 평균 크기는 350-400nm임을 확인하였고, 카제인 용액에 $MgCl_2$ 용액을 첨가하여 제조한 카제인-마그네슘 나노입자(casein-Mg^{2})는 140nm 이하의 더 조밀한 입자로 만들어지는 것을 확인하였다. 카제인-마그네슘 나노입자는 마그네슘 이온의 최종 농도가 10mM일 때 129.3±1.6으로 크기가 가장 작은 반면, 1가 양이온인 KCl의 경우 금속이온을 첨가하지 않은 카제인과 입자크기가 큰 차이가 없다는 것을 확인하였다. 이를 통해, 마그네슘 이온은 안정적으로 카제인과 상호작용하여 나노입자를 형성함을 확인하였고, 칼륨 이온의 경우 나노입자 형성이 어렵고 응집되는 현상을 확인할 수 있었다. 이후, 나일 레드(Nile red)를 카제인-마그네슘 나노입자 내에 봉합하였고, UV-Vis 측정을 통해 봉합률(Encapsulation Efficiency)이 28.7%임을 확인하였다(표 2).

표 1

[0035] 카제인-마그네슘 나노입자의 물성 특성

	Mean Diameter(nm)	Polydispersity index(PDI)	Zeta potential(mV)
카제인	356.4±6.9	0.25	-13.6±2.33
카제인-Mg^{2+} 10mM	129.3±1.6	0.22	-6.75±0.81
카제인-KCl 10mM	351.3±8.6	0.29	-0.31±0.15

표 2

[0036] 나일 레드를 봉합한 카제인-마그네슘 나노입자의 특성

	Loading Amount (㎍/mℓ)	Encapsulation Efficiency(%)	Mean Diameter(nm)	Polydispersity index(PDI)
Mg^{2+}-카제인 10mM	9.28	28.76	169.23	0.17

[0037] **실시예 2. 카제인-마그네슘 나노입자의 안정성 확인**

[0038] 카제인-마그네슘 나노입자의 환경 변화에 따른 입자의 안정성을 평가하기 위해, DPBS(dulbecco's phosphate buffered saline), FBS(Fetal Bovine Serum)를 포함한 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium) 및 FBS를

포함하지 않는 DMEM 배지에 카제인-마그네슘 나노입자를 24시간 노출시킨 후 입자 크기를 측정하였다.

[0039] 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 카제인-마그네슘 나노입자는 DPBS 및 FBS를 포함한 DMEM 배지에서는 직경이 약 10nm가 증가되었고, FBS를 포함하지 않는 DMEM 배지에서는 직경이 약 50nm 정도 증가한 것을 확인하였다. 이를 통해 다양한 환경에 노출되더라도 200nm 이하로 직경이 나타나 나노입자가 붕괴되지 않고 배지 내에서 안정하게 유지되는 것을 알 수 있었다.

[0040] **실시예 3. 카제인-마그네슘 나노입자의 세포 독성 확인**

[0041] 카제인-마그네슘 나노입자의 세포 독성을 확인하기 위해, HeLa 세포주를 대상으로 WST-1 분석을 수행하였다. 대조군으로는 카제인 및 PEI(polyethylenimine 25kDa)을 사용하였고, 카제인-마그네슘 나노입자는 최종 농도가 각각 0.0125mg/mℓ, 0.025mg/mℓ, 0.05mg/ml, 0.1mg/mℓ 및 0.2mg/mℓ가 되도록 세포에 처리하였다.

[0042] 그 결과, 카제인-마그네슘 나노입자가 모든 농도에서 80% 이상의 높은 생존율을 나타내었으며(도 3), 이를 통해 마그네슘 이온을 이용하여 제조한 카제인-마그네슘 나노입자가 인체 내 독성이 없는 안전한 약물전달체로 사용될 수 있다는 것을 확인하였다.

[0043] **실시예 4. 나일 레드를 봉합한 카제인-마그네슘 나노입자의 세포 내 유입 확인**

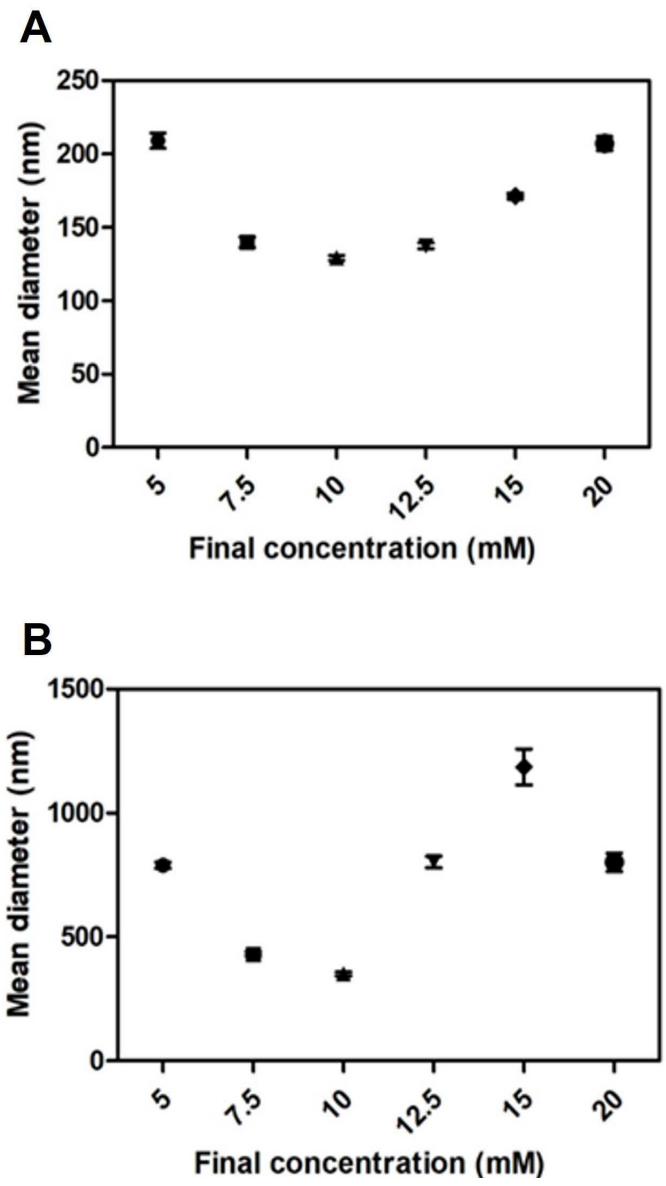
[0044] 카제인-마그네슘 나노입자의 세포 내 전달 여부를 확인하기 위해, HeLa 세포주에서 나일 레드를 봉합한 카제인-마그네슘 나노입자를 처리하고 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0045] 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 대조군(c)의 경우, 대부분이 세포질에 레드 시그널이 나타났으며, 이는 나일 레드가 핵까지 전달되지 못하고 세포질에 존재한다는 것을 알 수 있었다. 카제인-마그네슘 나노입자(d)의 경우, 대조군(c)과 비교하였을 때, 세포질과 내부에도 높은 레드 시그널이 확인되었다(도 4).

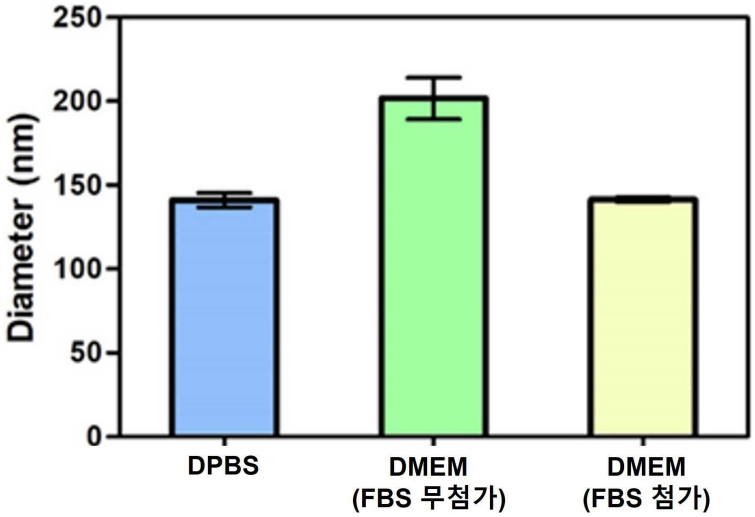
[0046] 이러한 결과를 통해, 카제인-마그네슘 나노입자가 성공적으로 나일 레드를 세포 내로 전달한다는 것을 알 수 있었으며, 본 발명의 카제인-마그네슘 나노입자가 소수성 약물을 봉합하는 약물전달체로도 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

도면

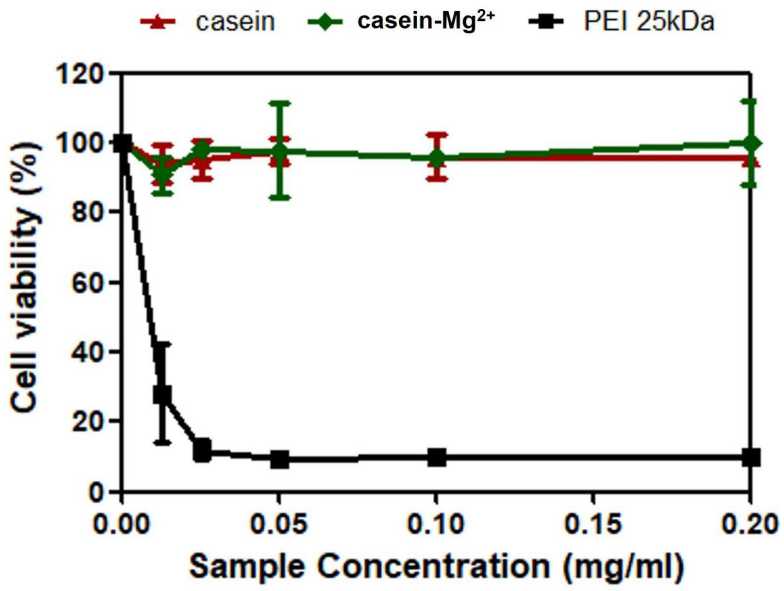
도면1


A
Mean diameter (nm)
250
200
150
100
50
0
5
7.5
10
12.5
15
20
Final concentration (mM)
B
Mean diameter (nm)
1500
1000
500
0
5
7.5
10
12.5
15
20
Final concentration (mM)

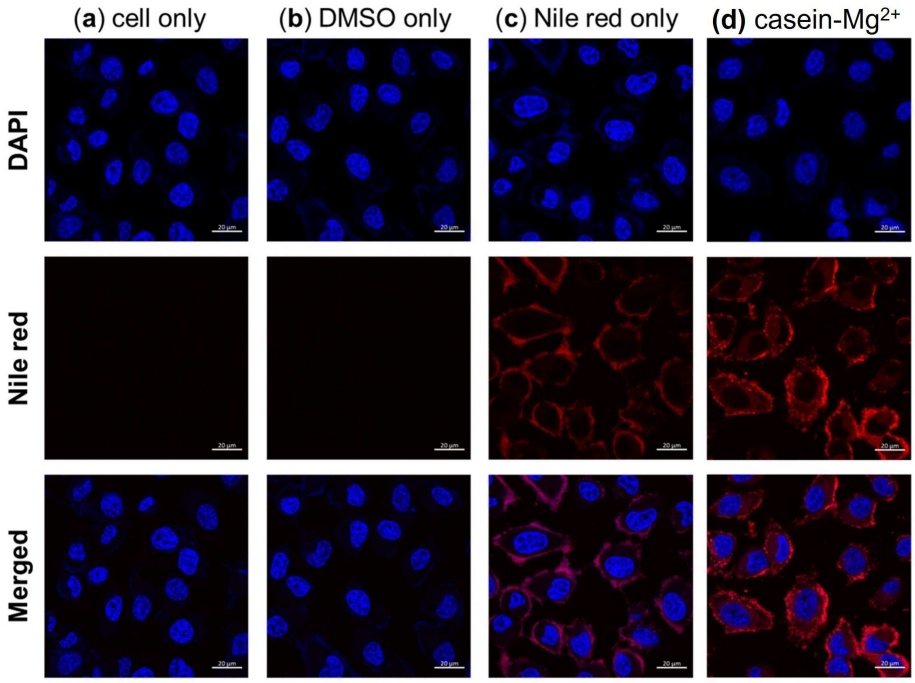
도면2


250
200
150
100
50
0
Diameter (nm)
DPBS
DMEM
(FBS 무첨가)
DMEM
(FBS 첨가)

도면3


casein
casein-Mg2+
PEI 25kDa
120
100
80
60
40
20
0
Cell viability (%)
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
Sample Concentration (mg/ml)

도면4


(a) cell only
(b) DMSO only
(c) Nile red only
(d) casein-Mg2+
DAPI
Nile red
Merged