(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0124148
(43) 공개일자 2023년08월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/107 (2006.01) *A61K 47/06* (2017.01)
A61K 47/14 (2017.01) *A61K 47/24* (2017.01)
A61K 47/26 (2017.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/1075 (2013.01)
A61K 47/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0020846
(22) 출원일자 2022년02월17일
심사청구일자 2023년02월16일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
인제대학교 산학협력단
경남 김해시 인제로 197, 내 (어방동, 인제대학교)
(72) 발명자
지준필
광주광역시 남구 효사랑길 14, 109동 905호(봉선동, 포스코더샵아파트)
아싸두자만 엠디
광주광역시 동구 백서로166번길 15-3, 103호(서석동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

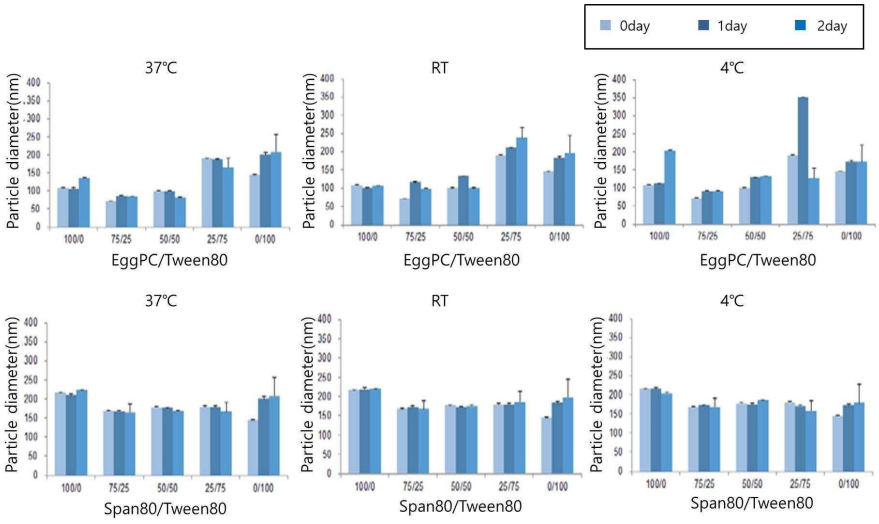
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **퍼플루오로카본을 포함하는 산소전달 나노에멀젼의 지방축적 억제용도**

(57) 요 약

본 발명은 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼을 이용한 지방축적 억제용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함함으로써, 효과적으로 세포, 조직 또는 체내로 퍼플루오로카본을 전달할 수 있고, 지방축적 억제 효능을 나타낼 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 47/14 (2013.01)
A61K 47/24 (2013.01)
A61K 47/26 (2013.01)
A61K 9/0026 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/06 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)

(72) 발명자
먼덜 히만스
광주광역시 동구 장동로54번길 16-2, 103호(서석동)
김성태
경상남도 김해시 활천로 233(어방동, 더블리안)
정다영
경상남도 김해시 삼안로 207(삼방동, 동성아파트)
이시영
경상남도 김해시 활천로267번길 37-16, 406호(삼방동,JM하우스)
김은지
경상남도 창원시 진해구 안청남로 13, 106동 1205호(청안동, 부영아파트(1차))

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345261832
과제번호	2015R1D1A3A01019628
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)
연구과제명	치료세포의 생존능 향상 및 생체내 거동 평가를 위한 다기능 나노시스템 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2018.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제(surfactant) 및 보조 계면활성제(co-surfactant)를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 퍼플루오로카본은 퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide)인, 약학 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 계면활성제는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 또는 소르비탄 모노올레이트(sorbitan monooleate) 중 적어도 하나인, 약학 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 보조 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트(Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate)인, 약학 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 퍼플루오로카본은 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 10 내지 60%(w/v) 포함된 것인, 약학 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제는 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 2.5 내지 10%(w/v) 포함된 것인, 약학 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 계면활성제와 상기 보조 계면활성제의 중량비가 1:3 내지 3:1인, 약학 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 상기 퍼플루오로카본 30 내지 60%(w/v), 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제 2.5 내지 10%(w/v), 및 물 37.5 내지 62.5%(w/v) 포함되고, 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제의 중량비가 1:1 내지 3:1인, 약학 조성물.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 나노에멀젼 입자의 평균직경은 10 내지 300㎚인, 약학 조성물.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 주사제인, 약학 조성물.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 지방간, 동맥경화, 제2형당뇨 및 이상지질혈증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 약학 조성물.

청구항 12

연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 식품 조성물.

청구항 13

연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 화장료 조성물.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피하 지방의 축적을 억제하는, 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방축적 억제용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 비만은 잘못된 식생활과 무절제한 생활, 과도한 스트레스, 운동 결핍 등으로 기초대사량이 저하되어 있는 경우 쉽게 나타난다. 비만을 치료하고 예방하는 방법은 여러 나라에서 활발하게 다각적인 측면에서 연구되고 있으나, 비만개선 및 예방을 위해서는 식품의 섭취를 줄이고 에너지 소비를 늘림으로써 지방의 체내축적을 억제하는 것이 중요하다. 특히 에너지 소비를 증가시키기 위해 운동이 가장 효과적인 것으로 알려져 있으나, 교통통신의 발달로 인해 운동량이 감소되고 현대 생활에 있어 매일 규칙적으로 운동을 하기 쉽지 않다. 또한 잦은 외식과 고열량 인스턴트 식품의 범람으로 인해 식이조절을 통한 비만개선도 용이하지 않은 형편이다. 다른 치료방법으로 약물요법과 수술요법이 있지만 두 방법 모두 안전과 경제적 측면에서 시행하기에 어려운 점이 많다. 이에, 최근 안전성 및 수행 용이성이 보다 우수한 슬리밍 외용제 및 슬리밍 식품에 대한 관심도가 지속적으로 증가하는 상황이다.

[0004] 한편, 세포내 지방의 과도한 축적은 지질대사에 문제를 일으킬 수 있고, 비만, 당뇨, 인슐린 저항성, 지방간, 이상지혈증, 동맥경화 또는 이들의 합병증 등의 대사성 질환의 원인이 되기도 한다. 특히 간세포에서 과도한 지방의 축적은 간세포에서의 지방대사에 문제를 일으킬 수 있고, 특히 산소공급의 저하를 초래하게 되어 지방이 추가로 축적되고, 지방축적에 의해 유발될 수 있는 다양한 질환이 발생할 수 있다. 최근 한국뿐만 아니라 미국, 서유럽 국가들에서도 대사성 질환의 발병률이 급증하고 있으며, 이에 지질대사 개선효과, 지방축적 억제효과, 콜레스테롤인 HDL을 상승시키는 효과를 가지는 물질의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1993483호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 지방축적 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 대사성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 지방축적 억제용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 지방축적 억제용 화장료 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 1. 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제(surfactant) 및 보조 계면활성제(co-surfactant)를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물.

[0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 퍼플루오로카본은 퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide, PFOB)인, 약학 조성물.

[0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 계면활성제는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine) 또는 소르비탄 모노올레이트(sorbitan monooleate) 중 적어도 하나인, 약학 조성물.

[0015] 4. 위 1에 있어서, 상기 보조 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트(Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate)인, 약학 조성물.

[0016] 5. 위 1에 있어서, 상기 퍼플루오로카본은 상기 나노에멀젼에 전체 대하여 10 내지 60%(w/v) 포함된, 약학 조성물.

[0017] 6. 위 1에 있어서, 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제는 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 2.5 내지 10%(w/v) 포함된, 약학 조성물.

[0018] 7. 위 1에 있어서, 상기 계면활성제와 상기 보조 계면활성제의 중량비가 1:3 내지 3:1인, 약학 조성물.

[0019] 8. 위 1에 있어서, 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 상기 퍼플루오로카본 30 내지 60%(w/v), 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제 2.5 내지 10%(w/v), 및 물 37.5 내지 62.5%(w/v) 포함되고, 상기 계면활성제 및 상기 보조 계면활성제의 중량비가 1:1 내지 3:1인, 약학 조성물.

[0020] 9. 위 1에 있어서, 상기 나노에멀젼 입자의 평균직경은 10 내지 300nm인, 약학 조성물.

[0021] 10. 위 1에 있어서, 상기 약학 조성물은 주사제인, 약학 조성물.

[0022] 11. 위 1에 있어서, 상기 대사성 질환은 비만, 지방간, 동맥경화, 제2형당뇨 및 이상지질혈증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나인, 약학 조성물.

[0023] 12. 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 식품 조성물.

[0024] 13. 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 화장료 조성물.

[0025] 14. 위 13에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피하 지방의 축적을 억제하는, 화장료 조성물.

발명의 효과

[0027] 본 발명의 나노에멀젼은 퍼플루오로카본과 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함함으로써 산소를 고함량으로 함유하고 이를 세포, 조직 또는 체내에 효과적으로 전달할 수 있다.

[0028] 본 발명의 나노에멀젼은 체내에서 지방축적을 억제할 수 있고, 이에 비만, 지방간, 동맥경화, 제2형당뇨 및 이상지질혈증 등의 대사성 질환을 예방하거나 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0029] 본 발명의 나노에멀젼은 평균직경이 나노사이즈이며 외부 환경에서 안정성을 가지는바 주사제로 활용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 나노에멀젼은 효과적으로 피하 지방축적을 억제할 수 있어, 비만 개선 또는 예방을 위한 외용제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 계면활성제 및 보조 계면활성제의 종류나 이들의 함량비와 외부 환경 조건에 따른 나노에멀젼의 입자크기를 나타낸다.

도 2는 계면활성제 및 보조 계면활성제의 종류나 이들의 함량비와 외부 환경 조건에 따른 나노에멀젼의 입자크기를 나타낸다.

도 3은 본 발명의 나노에멀젼 내에 포함된 퍼플루오로옥틸브로마이드 농도에 따른 산소 봉입률 평가 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 나노에멀젼 내에 포함된 퍼플루오로옥틸브로마이드 농도에 따른 산소 방출도 평가 결과를 나타낸다.

도 5는 Oil Red O 염색을 통해 본 발명의 나노에멀젼의 지방축적 억제 효능을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 형광이미지를 통해 본 발명의 나노에멀젼의 지방축적 억제 효능을 확인한 결과를 나타낸다.

도 7은 트리글리세라이드 분석 키트를 이용해 트리글리세라이드를 정량하여 본 발명의 나노에멀젼의 지방축적 억제 효능을 확인한 결과를 나타낸다.

도 8은 실시간 중합효소 연쇄반응을 통해 아디포즈 트리글리세라이드 리파아제의 발현량을 측정하여 본 발명의 나노에멀젼의 지방축적 억제효능을 확인한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명은 퍼플루오로카본(perfluorocarbon), 계면활성제(surfactant), 보조 계면활성제(co-surfactant)를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 조성물을 제공한다.

[0034] 용어 “지방축적 억제”는 지방축적을 차단, 억제, 저해 또는 감소시키는 것을 의미한다.

[0035] 용어 "에멀젼(emulsion)"은 전형적으로 상(phases)으로 나타내어지는 서로 혼화할 수 없거나, 제한적인 양으로만 혼화하는 2종의 액체를 포함하는 비균질 시스템(heterogenous systems)을 의미한다. 에멀젼에서 2종의 액체 중 하나가 미세한 입자의 형태로 다른 액체에 분산된다. 2종의 액체가 물 및 오일이고, 오일 방울이 물에 미세하게 분산되는 경우 에멀젼은 수중유형 에멀젼 (oil-inwater(O/W) emulsion)이다. 유중수형 에멀젼(water-in-oil(W/O) emulsion)인 경우 반대 원칙이 적용된다.

[0036] 나노에멀젼은 연속상(Continuous phase)과 상기 연속상에 분산되어 있는 분산상(Dispersed phase)을 포함한다.

[0037] 본 발명의 나노에멀젼은 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제, 및 보조 계면활성제를 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 나노에멀젼은 퍼플루오로카본을 포함하는 분산상을 포함할 수 있고, 상기 분산상은 친수성 연속상에 분산된 형태일 수 잇다. 상기 분산상은 유상일 수 있다.

[0039] 퍼플루오로카본은 소수성 물질로서 체액을 포함한 수용액과 혼합되지 않는 특성을 갖는바, 퍼플루오로카본 자체는 세포, 조직, 또는 체내에서 흡수되지 않고, 기능을 하기 어려운 문제가 있다. 본 발명자들은 계면활성제와 보조 계면활성제를 이용하여 퍼플루오로카본을 나노에멀젼 형태로 제조함으로써, 퍼플루오로카본의 용해도를 높여 체내, 조직, 세포 내로의 흡수를 용이하게 할 수 있었고, 피부 내 투과도를 높일 수 있었다.

[0040] 본 발명의 나노에멀젼은 물을 더 포함할 수 있다. 본 발명의 나노에멀젼은 수중유형 에멀젼일 수 있다.

[0041] 본 발명의 나노에멀젼은 퍼플루오로카본과 물의 계면 장력에 의해 형성된 것이다.

[0042] 퍼플루오로카본은 산소를 용해할 수 있는 성질을 가진다. 이에 본 발명의 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼은 고함량의 산소를 봉입할 수 있고, 봉입된 산소를 보다 효과적으로 세포, 조직, 또는 체내로 전달할 수 있다. 또한, 본 발명의 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼은 봉입된 산소를 보다 효과적으로 세포, 조직, 또는 체내로 전달하여, 세포, 조직, 또는 체내에서 지방축적 억제 효과를 나타낼 수 있다.

[0043] 퍼플루오로카본은 퍼플루오로트리부틸아민(perfluorotributylamine(FC47)),퍼플루오로데칼린(perfluorodecalin(PP5)), 퍼플루오로메틸데칼린(perfluoromethyldecalin(PP9)),퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide), 퍼플루오로테트라하이드로퓨란(perfluorotetrahydrofuran(FC80)), 퍼플루오로에테르(perfluoroether(PID))[$(CF_3)_2CFOCF_2(CF_2)_2CF_2OCF(CF_3)_2$],퍼플루오로에테르(perfluoroether(PⅡD))[$(CF_3)_2CFOCF_2(CF_2)_6CF_2OCF(CF_3)_2$], 퍼플루오로에테르폴리머(perfluoroetherpolymer(Fomblin Y/01)), 퍼플루오로데칸(perfluorododecane), 퍼플루오로바이사이클로[4.3.0]노난(perfluorobicyclo[4.3.0]nonane),퍼플루오로트리트리메틸바이사이클로헥산(perfluorotritrimethylbicyclohexane), 퍼플루오로트리프로필아민(perfluorotripropylamine), 퍼플루오로이소프로필사이클로헥산(perfluoroisopropylcyclohexane),퍼플루오로엔도테트라하이드로다이사이클로펜타디엔(perfluoroendotetrahydrodicyclopentadiene), 퍼플루오로아다만탄(perfluoroadamantane), 퍼플루오로엑소테트라하이드로다이사이클로펜타디엔(perfluoroexotetrahydrodicyclopentadiene), 퍼플루오로바이사이클로[5.3.0]데칸(perfluorbicyclo[5.3.0]decane), 퍼플루오로테트라메틸사이클로헥산(perfluorotetramethylcyclohexane),퍼플루오로-1-메틸-4-이소프로필사이클로헥산(perfluoro-1-methyl-4-isopropylcyclohexane), 퍼플루오로-n-부틸사이클로헥산(perfluoro-n-butylcyclohexane),퍼플루오로디메틸바이사이클로[3.3.1.]노난(perfluorodimethylbicyclo[3.3.1.]nonane), 퍼플루오로-1-메틸 아다만탄(perfluoro-1-methyl adamantane), 퍼플루오로-1-메틸-4-t-부틸사이클로헥산(perfluoro-1-methyl-4-t butylcyclohexane), 퍼플루오로데카하이드로아센압탄(perfluorodecahydroacenapthane),퍼플루오로트리메틸바이사이클로[3.3.1]노난(perfluorotrimethylbicyclo[3.3.1]nonane), 퍼플루오로-1-메틸 아다만탄(perfluoro-1-methyl adamantane), 퍼플루오로-1-메틸-4-t-부틸사이클로헥센(perfluoro-1-methyl-4-t-butylcyclohexene),퍼플루오로데카하이드로아센압텐(perfluorodecahydroacenaphthene),퍼플루오로트리메틸바이사이클로[3.3.1.]노난(perfluorotrimethylbicyclo[3.3.1.]nonane), 퍼플루오로-눈데칸(perfluoro-nundecane), 퍼플루오로테트라데카하이드로페난트렌(perfluorotetradecahydrophenanthrene), 퍼플루오로-1,3,5,7-테트라메틸아다만탄(perfluoro-1,3,5,7-tetramethyladamantane),퍼플루오로도데카하이드로플루오렌(perfluorododecahydrofluorene), 퍼플루오로-1-3-다이메틸아다만탄(perfluoro-1-3-dimethyladamantane), 퍼플루오로-n-옥틸사이클로헥산(perfluoro-noctylcyclohexane),퍼플루오로-7-메틸 바이사이클로[4.3.0]노난(perfluoro-7-methyl bicyclo[4.3.0]nonane), 퍼플루오로-p-다이이소프로필사이클로헥산(perfluoro-p-diisopropylcyclohexane), 퍼플루오로-m-다이이소프로필사이클로헥산(perfluoro-m-diisopropylcyclohexane), 퍼플루오로-4-메틸옥타하이드로퀴놀리다이진(perfluoro-4-methyloctahydroquinolidizine), 퍼플루오로-N-메틸데카하이드로퀴놀린(perfluoro-Nmethyldecahydroquinoline),F-메틸-1-옥사데칼린(F-methyl-1-oxadecalin),퍼플루오로옥타하이드로퀴놀리다이진(perfluorooctahydroquinolidizine),퍼플루오로 5,6-다이하이드로-5-데센(perfluoro 5,6-dihydro-5-decene),퍼플루오로-4,5-다이하이드로-4-옥텐(perfluoro-4,5-dihydro-4-octene),퍼플루오로다이클로로옥탄(perfluorodichlorooctane), 퍼플루오로비스클로로옥탄 에테르(perfluorobischlorobutyl ether), 퍼플루오로옥탄(perfluorooctane), 퍼플루오로다이클로로옥탄(perfluorodichlorooctane), 퍼플루오로-n-옥틸 브로마이드(perfluoro-n-octyl bromide), 퍼플루오로헵탄(perfluoroheptane), 퍼플루오로데칸(perfluorodecane),퍼플루오로사이클로헥산(perfluorocyclohexane),퍼플루오로모르폴린(perfluoromorpholine), 퍼플루오로트리프로필아민(perfluorotripropylamine),퍼플루오로트리부틸아민(perfluortributylamine),퍼플루오로다이메틸사이클로헥산(perfluorodimethylcyclohexane),퍼플루오로트리메틸사이클로헥산(perfluorotrimethylcyclohexane), 퍼플루오로다이사이클로헥실 에테르(perfluorodicyclohexyl ether), 퍼플루오로-n-부틸테트라하이드로퓨란(perfluoro-

n-butyltetrahydrofuran), 및 퍼플루오로-15-크라운-5에테르로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 퍼플루오로카본은 퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide)일 수 있다.

[0044] 퍼플루오로카본은 나노에멀젼 전체에 대하여 5%(w/v) 이상, 10%(w/v) 이상, 20%(w/v) 이상, 30%(w/v) 이상, 40%(w/v) 이상, 50%(w/v) 이상 또는 60%(w/v) 이상 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 나노에멀젼은 퍼플루오로카본을 고함량으로 함유할 수 있고, 고농도로 산소를 용해시켜 전달할 수 있다.

[0045] 퍼플루오로카본은 나노에멀젼 전체에 대하여 10 내지 60%(w/v), 15 내지 60%(w/v), 20 내지 60%(w/v), 25 내지 60%(w/v) 또는 30 내지 60%(w/v) 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 나노에멀젼은 물성이 상이한 계면활성제와 보조 계면활성제를 포함한다. 예컨대, 계면활성제는 소수성이고 보조계면활성제는 친수성일 수 있다.

[0047] 보다 안정한 나노에멀젼을 제조하기 위해 계면활성제와 보조 계면활성제를 적절하게 선택하는 것이 중요하다.

[0048] 계면활성제는 포스포리피드일 수 있고, 예를 들어 포스파티딜콜린(Phosphatidylcholine), 포스파티딜에탄올아민(Phosphatidylethanolamine) 또는 포스파티딜글리세롤(Phophatidylglycerol)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 계면활성제는 소르비탄계 계면활성제일 수 있고, 예컨대 소르비탄 모노올레이트계 물질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0049] 일 실시예에 따르면, 계면활성제는 계란 유래 포스파티딜콜린(egg phosphatidylcholine), 대두 유래 포스파티딜콜린(soy phosphatidylcholine) 또는 소르비탄 모노올레이트(sorbitan monooleate, Span 80) 중 적어도 하나일 수 있다.

[0050] 보조 계면활성제는 폴록사머 또는 폴리옥시에틸렌 계열(예컨대 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르(트윈)) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 일 실시예에 따르면, 보조 계면활성제는 폴록사머 188 또는 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트(Tween 80)일 수 있고, 구체적으로는 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트일 수 있다.

[0052] 폴록사머를 보조 계면활성제로 이용하는 경우 제조된 나노에멀젼 입자가 커지고 다양한 외부 조건에서 불안정한 나노에멀젼이 제조될 수 있다. 계면활성제나 보조 계면활성제의 종류가 달라지면 나노에멀젼의 제형 안정성이 달라질 수 있다.

[0053] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 나노에멀젼은 계면활성제로 포스파티딜콜린 또는 소르비탄 모노올레이트를 이용하고, 보조 계면활성제로 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트를 이용함으로써 온도나 시간 변화 조건에서도 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[0054] 계면활성제 및 보조 계면활성제는 상기 나노에멀젼 전체에 대하여 1 내지 10%(w/v), 2 내지 10%(w/v) 또는 2.5 내지 10%(w/v) 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 계면활성제와 보조 계면활성제의 함량비는 1:5 내지 5:1, 1:4 내지 4:1, 1:3 내지 3:1, 1:1 내지 3:1, 2:1 내지 3:1 또는 3:1 일 수 있다.

[0056] 본 발명의 나노에멀젼은 물을 더 포함할 수 있다. 물의 함량은 나노에멀젼 상의 다른 성분들의 함량에 따라 달라질 수 있다.

[0057] 나노에멀젼은 나노에멀젼 전체에 대하여 퍼플루오로카본 30 내지 60%(w/v), 계면활성제 및 보조 계면활성제 2.5 내지 10%(w/v), 및 물 37.5 내지 62.5%(w/v) 포함하는 것일 수 있다. 이 때 상기 계면활성제 및 보조 계면활성제의 중량비는 1:1 내지 3:1일 수 있다.

[0058] 나노에멀젼 입자의 평균직경은 1000nm 미만, 500nm 이하, 10 내지 500nm, 10 내지 400nm, 10 내지 300nm, 20 내지 300nm, 100 내지 300nm, 100 내지 290nm, 100 내지 280nm, 100 내지 270nm 또는 100 내지 260nm 일 수 있다. 일 구현예에 따르면, 본 발명의 나노에멀젼 입자의 평균 직경은 10 내지 300nm일 수 있다. 입자의 평균직경이 너무 큰 경우 나노에멀젼의 안정성이 우수하지 않다.

[0059] 일 실시예에 따르면, 본 발명의 나노에멀젼은 계면활성제로 포스파티딜콜린 또는 소르비탄 모노올레이트를 이용하고, 보조 계면활성제로 폴리옥시에틸렌 20 소르비탄 모노올레이트를 이용함으로써 입자의 크기가 1000nm를 초과하지 않고 높은 안정성을 나타낼 수 있다.

[0060] 본 발명의 나노에멀젼은 피부에 균일하게 분포될 수 있고, 우수한 피부 침투 능력을 나타낼 수 있다. 이에, 본

발명의 나노에멀젼을 외용제로 사용할 수 있다.

[0061] 본 발명의 나노에멀젼은 통상의 제조방법으로 제조될 수 있고, 예컨대 초고압분쇄기법으로 제조될 수 있다.

[0062] 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 지방축적을 저해할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 지방 생성 억제 또는 지방 분해 촉진 효과를 나타낼 수 있다.

[0063] 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 트리글리세라이드(triglyceride, TG), 혈중 중성지방 또는 혈중 콜레스테롤을 감소시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 지방간 및 내장지방 생성을 효과적으로 억제할 수 있다. 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 피하지방 생성 또는 축적을 억제하거나 피하지방의 분해를 촉진할 수 있다.

[0064] 용어 "트리글리세라이드"는 지질의 한 종류로, "중성지방"과 혼용될 수 있다. 체내의에너지 중 사용되지 않는 것은 피하지방으로 축적되는데 그 대부분이 중성지방으로 축적되고, 이는 콜레스테롤과 함께 동맥경화, 당뇨, 비만 등의 주요 원인으로 작용할 수 있다.

[0065] 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 대사성 질환의 치료 또는 예방 효과를 나타낼 수 있다.

[0066] 대사성 질환은 지방축적에 관련된 질환일 수 있고, 예컨대, 비만, 지방간, 동맥경화, 제2형당뇨 및 이상지질혈증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0067] 비만은 내장지방의 축적과 관련된 복부비만을 포함할 수 있다. 상기 내장지방은 인체 내 지방세포로 이루어진 조직으로 백색지방(white adipose tissue)라고도 한다. 백색지방조직은 피하 및 후복강 등에 분포하며, 지방세포의 80% 이상을 차지하는 중성지방의 형태로 에너지를 저장하는 조직이다.

[0068] 지방간은 간 내 과도한 지방, 주로 중성지방이 쌓여 지방함량이 증가하여 나타나는 가역적 질병으로, 고지혈증 등의 질환과 동반하여 나타나기도 한다. 지방간은 비알콜성 지방간일 수 있다.

[0069] 이상지질혈증(dyslipidemia)은 혈중 지질이 정상보다 증가하거나 감소한 상태, 보다 상세하게는 혈중에 총콜레스테롤, LDL콜레스테롤, 중성지방이 증가된 상태거나 HDL콜레스테롤이 감소된 상태로, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤혈증 또는 고지혈증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 고중성지방혈증은 혈중에 중성지방이 증가된 상태를 말하고, 고콜레스테롤혈증은 혈중에 콜레스테롤이 증가된 상태로 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤이 높게 나타난다. 또한, 고지혈증란 혈중에 콜레스테롤과 중성지방을 포함한 지질이 증가된 상태로, 이에 의해 동맥경화나 심근경색과 같은 관상동맥질환의 위험을 증가시킬 수가 있다.

[0070] 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 조성물은 간 세포로 이동할 수 있다.

[0071] 본 발명의 나노에멀젼은 우수한 제형 안정성을 나타낼 수 있고, 동시에 산소를 고함량으로 봉입하고 세포, 조직 또는 체내로 전달하여 효과적으로 체내 지방축적을 저해할 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명은 퍼플루오로카본, 계면활성제, 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 대사성 질환의 치료 또는 예방용 약학 조성물을 제공한다.

[0074] 퍼플루오로카본, 계면활성제, 보조 계면활성제, 나노에멀젼 및 대사성 질환에 대해서는 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.

[0075] 용어 “치료”는 대상 질환의 증상을 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0076] 용어 “예방”은 대상 질환의 증상의 발생을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 재발을 예방하거나 방지하기 위해 상기 질병에 차도가 있는 대상의 치료를 포함한다.

[0077] 본 발명의 나노에멀젼을 포함하는 약학 조성물은 정제, 과립제, 시럽 등의 경구형 제형, 연고, 크림 등의 외용제, 좌제 및 주사제 등 약학적 제제에 적합한 어떠한 형태로든 사용될 수 있다.

[0078] 정맥 주사의 경우 안전하고 효과적인 전달을 위해 주사제에 포함된 입자의 크기가 500㎚ 이하여야 하는데, 본 발명의 나노에멀젼 입자는 평균직경이 500㎚ 이하인 균일하게 분포된 형태인 바 주사제로 활용되기 적절하다.

[0080] 또한, 본 발명은 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 식품 조성물을 제공한다.

[0081] 본 발명은 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 식품 조성물을 제공한다.

[0082] 용어 “억제”는 본 발명의 조성물을 처리하지 않은 경우에 비하여 본 발명의 조성물을 처리한 경우 지방축적이 감소하는 것을 의미한다.

[0083] 퍼플루오로카본, 계면활성제, 보조 계면활성제, 나노에멀젼에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0084] 상기 식품 조성물은 체내 지방축적을 억제할 수 있다.

[0085] 상기 식품은 비만, 지방간, 동맥경화, 제2형당뇨 및 이상지질혈증으로 이루어진 군에서 선택된 적어도 하나의 예방 또는 개선용일 수 있다.

[0086] 용어 “개선”은 대상 질환에 의한 증상이 완화, 감소, 또는 소멸시키는 등 그 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든행위를 의미한다.

[0088] 또한, 본 발명은 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 화장료 조성물을 제공한다.

[0089] 본 발명은 연속상에 분산된 퍼플루오로카본, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 포함하는 나노에멀젼을 포함하는 지방축적 억제용 화장료 조성물을 제공한다.

[0090] 퍼플루오로카본, 계면활성제, 보조 계면활성제, 나노에멀젼에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[0091] 본 발명의 화장료 조성물은 피하 지방의 축적을 억제할 수 있다.

[0092] 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 당업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제 등을 추가적으로 함유할 수 있다.

[0093] 화장료 조성물은 비누, 목욕제, 스킨, 로션, 크림, 에센스, 토너, 유액, 젤, 분무제, 바디클렌져, 팩, 마사지제, 오일로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 제형일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0094] 본 발명의 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼은 수용액과 균일하게 혼합 가능하여 화장료 조성물에 포함되는 다른 성분들과 안정적으로 혼합될 수 있다. 본 발명의 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼은 퍼플루오로카본 단독 대비 피부 세포 투과도가 우수하다.

[0096] 이하, 실시예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0098] **1. 나노에멀젼 제조**

[0099] **(1)퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼 조성 개발**

[0100] 퍼플루오로카본을 포함하는 나노에멀젼을 제조하기 위한 최적의 조성을 선정하기 위해 계면활성제 및 보조 계면활성제의 종류와 함량비를 변경하여 다양한 종류의 에멀젼을 제조하였다.

[0101] Inner phase로서 퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide)를 10%(w/v), 계면활성제와 보조 계면활성제의 혼합물을 5%(w/v)로 고정하고, 계면활성제 및 보조 계면활성제의 종류와 계면활성제와 보조 계면활성제의 함량비를 변경한 다양한 조성을 제조하였고, 이들을 이용해 고속혼합기법, 초고압분쇄기법 또는 초음파기법으로

다양한 에멀젼을 제조하였다. 에멀젼을 제조하기 위한 다양한 조성과 각 성분의 함량을 아래 표 1에 기재하였다. 표 1에서 PFOB는 퍼플루오로옥틸브로마이드이고, EggPC는 계란포스파티딜콜린(Egg phosphatidylcholine)이다.

[0102] 구체적으로, 계면활성제 및 보조 계면활성제를 취하여 PBS(pH7.4)에 용해시키고 3시간 동안 자력교반기를 이용하여 완전하게 용해시켰다. 이때 필요에 따라 가온할 수 있다. 퍼플루오로카본과 계면활성제 및 보조 계면활성제 용액을 혼합한 후 고속 균질화기(HG-15A; 대한과학, 원주, 대한민국)에서 8100 rpm에서 30 초 동안 균질화하여 1차 에멀젼을 제조하였다. 1차 에멀젼을 초고속분쇄기 (high speed homogenizer)를 이용하여 10,000 rpm이상의 회전속도에서 1분간 분쇄하거나, 초고압분쇄기 (microfluidizer: Microfluidics, 웨스트우드, 매사추세츠주, 미국)를 이용하여 5,000 - 20,000 psi의 작동 압력에서 1-10회의 작동횟수를 반복하여 분쇄하거나, 초음파기를 이용하여 분쇄하여 나노에멀젼으로 균질화하였다. 다음으로, 상기 나노에멀젼에 산소를 1 mL/min의 속도로 버블링시켜 산소기체를 포함하는 나노에멀젼을 제조하였다.

표 1

[0103]

구분	퍼플루오로카본	계면활성제	보조 계면활성제	물	계면활성제 및 보조 계면활성제의 함량비
조성1	PFOB 10%(w/v)	EggPC 5%(w/v)	Poloxamer188 0%(w/v)	물 85%(w/v)	100:0
조성2	PFOB 10%(w/v)	EggPC 3.75%(w/v)	Poloxamer188 1.25%(w/v)	물 85%(w/v)	75:25
조성3	PFOB 10%(w/v)	EggPC 2.5%(w/v)	Poloxamer1882.5%(w/v)	물 85%(w/v)	50:50
조성4	PFOB 10%(w/v)	EggPC 1.25%(w/v)	Poloxamer1883.75%(w/v)	물 85%(w/v)	25:75
조성5	PFOB 10%(w/v)	EggPC 0%(w/v)	Poloxamer188 5%(w/v)	물 85%(w/v)	0:100
조성6	PFOB 10%(w/v)	EggPC 5%(w/v)	Tween80 0%(w/v)	물 85%(w/v)	100:0
조성7	PFOB 10%(w/v)	EggPC 3.75%(w/v)	Tween80 1.25%(w/v)	물 85%(w/v)	75:25
조성8	PFOB 10%(w/v)	EggPC 2.5%(w/v)	Tween802.5%(w/v)	물 85%(w/v)	50:50
조성9	PFOB 10%(w/v)	EggPC 1.25%(w/v)	Tween803.75%(w/v)	물 85%(w/v)	25:75
조성10	PFOB 10%(w/v)	EggPC 0%(w/v)	Tween80 5%(w/v)	물 85%(w/v)	0:100
조성11	PFOB 10%(w/v)	Span80 5%(w/v)	Poloxamer188 0%(w/v)	물 85%(w/v)	100:0
조성12	PFOB 10%(w/v)	Span80 3.75%(w/v)	Poloxamer188 1.25%(w/v)	물 85%(w/v)	75:25
조성13	PFOB 10%(w/v)	Span80 2.5%(w/v)	Poloxamer1882.5%(w/v)	물 85%(w/v)	50:50
조성14	PFOB 10%(w/v)	Span80 1.25%(w/v)	Poloxamer1883.75%(w/v)	물 85%(w/v)	25:75
조성15	PFOB 10%(w/v)	Span80 0%(w/v)	Poloxamer188 5%(w/v)	물 85%(w/v)	0:100
조성16	PFOB 10%(w/v)	Span80 5%(w/v)	Tween80 0%(w/v)	물 85%(w/v)	100:0
조성17	PFOB 10%(w/v)	Span80 3.75%(w/v)	Tween80 1.25%(w/v)	물 85%(w/v)	75:25
조성18	PFOB 10%(w/v)	Span80 2.5%(w/v)	Tween802.5%(w/v)	물 85%(w/v)	50:50
조성19	PFOB 10%(w/v)	Span80 1.25%(w/v)	Tween803.75%(w/v)	물 85%(w/v)	25:75
조성20	PFOB 10%(w/v)	Span80 0%(w/v)	Tween80 5%(w/v)	물 85%(w/v)	0:100

[0104] 상기 표 1의 조성들로 에멀젼을 형성한 후 온도 변화(37℃, RT, 4℃ 조건) 또는 시간 변화(에멀젼 형성 시점을 기준으로 0day, 1day, 2day 경과한 시점)에 따른 에멀젼 입자의 평균직경을 측정하였다. 구체적으로, 제조한 나노에멀젼의 입자크기 평가는 제타전위/입자크기 분석기(ELSZ-2000 series, Otsuka Electronics, Japan)를 이용하여 측정하였다. 측정은 평가용 나노에멀젼 시료를 인산완충생리식염수(Phosphate BufferedSaline, PBS; Corning, USA)를 이용하여 희석 후 분석기에 투입하여 측정하였다. 그 결과, 계면활성제로 EggPC 또는 Span80과

보조 계면활성제로 Tween80을 사용한 조성을 이용한 경우 입자의 크기가 작고 안정한 에멀젼이 제조되는 것으로 평가되었다. 특히, EggPC와 Tween80을 75:25 또는 50:50의함량비로 사용한 조성, Span80과 Tween80을 75:25, 50:50 또는 25:75의 함량비로 사용한 조성을 이용한 경우 입자의 크기가 100 내지 200nm 정도로 작은 에멀젼이 제조되었고, 세포배양온도인 37℃, RT및 4℃에서 안정성을 나타내었다(도 1 참조).

[0105] 한편, 보조 계면활성제로서 Poloxamer188을 포함하는 경우 에멀젼의 입자 크기를 감소시키거나 균질화하는데 역효과를 나타내는 것으로 평가되었다. 구체적으로, Poloxamer188을 포함하는 일부 조성의 경우 입자의 평균직경이 1000nm를 넘는 에멀젼이 제조되었고(조성 3, 13), Poloxamer188을 포함하는 다른 일부 조성의 경우 온도 변화 또는 시간 변화에 따라 에멀젼의 입자의 크기가 변화하였다(조성 1, 4, 5, 14, 15 등). 외부 환경이나 시간의 흐름에 따라 에멀젼의 입자크기가 변화하는 것은 에멀젼의 보관 안정성이 우수하지 않다는 것을 의미한다(도 2 참조, 도 2에서 그래프 표시가 없는 부분은 입자의 평균직경이 1000nm를 초과하는 것임).

[0106] 상기 결과를 종합하여 본 발명자들은 보조 계면활성제로 Poloxamer188을 사용하는 것을 제외하였고, 계면활성제와 보조 계면활성제의 함량비를 3:1 내지 1:3 의 범위로 조절하여 후속 연구를 수행하였다.

[0108] **(2) 퍼플루오로카본 고함량 나노에멀젼 제조**

[0109] Inner phase로서 퍼플루오로옥틸브로마이드(perfluorooctylbromide), 계면활성제로서 Span80 또는 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine), 보조 계면활성제로서 Tween80을 포함하는 조성으로 에멀젼을 제조하였다. 제조된 에멀젼(제조예 1-15)의 구체적인 조성을 아래 표 2에 기재하였다. 표2에서 PFOB는 퍼플루오로옥틸브로마이드이고, SoyPC는 대두 포스파티딜콜린(Soy phosphatidylcholine)이다.

표 2

[0110]

구분	퍼플루오로카본	계면활성제	보조 계면활성제	물	계면활성제 및 보조 계면활성제의 함량비
제조예1	PFOB 40%(w/v)	Span80 1.88%(w/v)	Tween80 0.63%(w/v)	물 57.49%(w/v)	75:25
제조예2	PFOB 40%(w/v)	Span80 3.75%(w/v)	Tween80 1.25%(w/v)	물 55%(w/v)	75:25
제조예3	PFOB 40%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 57.49%(w/v)	75:25
제조예4	PFOB 40%(w/v)	SoyPC 3.75%(w/v)	Poloxamer1881.25%(w/v)	물 55%(w/v)	75:25
제조예5	PFOB 50%(w/v)	Span80 1.88%(w/v)	Tween80 0.63%(w/v)	물 47.49%(w/v)	75:25
제조예6	PFOB 50%(w/v)	Span80 3.75%(w/v)	Tween80 1.25%(w/v)	물 45%(w/v)	75:25
제조예7	PFOB 50%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 47.49%(w/v)	75:25
제조예8	PFOB 50%(w/v)	SoyPC 3.75%(w/v)	Poloxamer1881.25%(w/v)	물 45%(w/v)	75:25
제조예9	PFOB 60%(w/v)	Span80 1.88%(w/v)	Tween80 0.63%(w/v)	물 37.49%(w/v)	75:25
제조예10	PFOB 60%(w/v)	Span80 3.75%(w/v)	Tween80 1.25%(w/v)	물 35%(w/v)	75:25
제조예11	PFOB 60%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 37.49%(w/v)	75:25
제조예12	PFOB 60%(w/v)	SoyPC 3.75%(w/v)	Poloxamer1881.25%(w/v)	물 35%(w/v)	75:25
제조예 13	PFOB 30%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 67.49%(w/v)	75:25
제조예 14	PFOB 15%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 82.49%(w/v)	75:25
제조예 15	PFOB 7.5%(w/v)	SoyPC 1.88%(w/v)	Tween800.63%(w/v)	물 89.99%(w/v)	75:25

[0111] **2. 나노에멀젼의 산소 봉입률 및 산소 방출 평가**

[0112] 제조예 11과 제조예 13-15(PFOB 30%, 15%, 7.5%) 나노에멀젼의 산소 봉입률을 평가하였다. 나노에멀젼 내 산소

농도는 Fospor-R oxygen sensor (Ocean Optics, USA)를 이용하여 평가하였다. 나노에멀젼 용액이 담긴 용기에 Fospor-R oxygen sensor probe를 넣어 실시간으로 산소 농도를 측정하였다.

[0113] 그 결과 모든 농도의 나노에멀젼(PFOB 7.5%, 15%, 30%, 60%)에서 산소가 30ppm 이상 봉입되었다(도 3 참조, 도 3의 PFOB 7.5%: 제조예 15, 15%: 제조예 14, 30%: 제조예 13, 60%: 제조예 11).

[0114] 또한, 제조예 11(PFOB 60%)과 제조예 13-15(PFOB 30%, 15%, 7.5%) 나노에멀젼에서의 산소 방출도를 평가하였다. 나노에멀젼 내 산소 농도는 Fospor-R oxygen sensor (Ocean Optics, USA)를 이용하여 평가하였다. 나노에멀젼 용액이 담긴 용기에 Fospor-R oxygen sensor probe를 넣어 실시간으로 산소 농도를 측정하였다.

[0115] 그 결과 60%(w/v) PFOB 나노에멀젼에서 용존 산소량(8ppm)보다 높은 산소농도를 50시간동안 유지하는 것을 확인하였다(도 4 참조,도 4의 PFOB 7.5%: 제조예 15, 15%: 제조예 14, 30%: 제조예 13, 60%: 제조예 11).

[0117] **3. 지방구 축적이 유도된 간세포에 산소전달 수송체로서의 나노에멀젼의 효능 평가**

[0118] **(1) 현미경 관찰을 통한 지방축적 평가**

[0119] 간세포(HepG2, 2×10^5 cells/well)를 1mM 올레인산(oleic acid, OA)을 포함하는 배양액(1% BSA, 1% 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 Low Dulbecco Modified Eagle Medium)에서 24시간 배양하였다. 이 후 1mM 올레인산과 1% Bovine serum albumin이 포함된 조건에서 i) 산소가 포집된 산소전달 수송체(제조예 11)를 다양한 농도로 처리하거나(실시예 1, 2, 3), ii) 산소가 포집되지 않은 산소전달 수송체(제조예 11)를 다양한 농도(0.025%(비교예2), 0.05%(비교예3), 0.1%(비교예4))로 처리하여 20시간 추가 배양하여 실시예 1 내지 3 및 비교예 1 내지 4를 얻었다. 대조군으로 1mM 올레인산과 산소전달 수송체를 처리하지 않은 세포를 이용하였다(아래 표 3 참조).

표 3

[0120]

구분	올레인산 처리 유무	산소가 포집된 산소전달 수송체 처리 유무	산소가 포집되지 않은 산소전달 수송체 처리 유무
대조군	X (OA(-))	X (nanoparticle(-))	X
실시예1	O (OA(+))	0.025% 농도 처리 (O_2 NP(0.025%))	X
실시예2	O (OA(+))	0.05% 농도 처리 (O_2 NP(0.05%))	X
실시예3	O (OA(+))	0.1% 농도 처리 (O_2 NP(0.1%))	X
비교예1	O (OA(+))	X (nanoparticle(-))	X
비교예2	O (OA(+))	X (nanoparticle(-))	0.025% 농도 처리 (vehicle only(0.025%))
비교예3	O (OA(+))	X (nanoparticle(-))	0.05% 농도 처리 (vehicle only(0.05%))
비교예4	O (OA(+))	X (nanoparticle(-))	0.1% 농도 처리 (vehicle only(0.1%))

[0121] 위 표 3의 대조군, 실시예 및 비교예를 이용해오일 레드오(Oil Red O) 염색과 형광이미지 분석을 수행하여배양된 세포의 지방축적을 평가하였다.그 결과 올레인산 처리에 의해 지방구가 축적(lipid droplet accumulation)되었고, 산소전달 수송체의 농도가 증가함에 따라 지방구의 축적이 감소하였다(도 5 및 6 참조). 도 5는 오일레드 O(Oil Red O) 염색을 통한 세포 이미징 결과를 나타낸다(Cell imaging multi-mode reader, BioTek, Cytation5, USA). 도 6은 형광 이미징 결과를 나타낸다(Confocal microscopic image, Carl zeiss, Germany). 도 5 및 6에서 vehicle only는 산소를 포접하지 않은 산소전달 수송체를 의미한다.

[0123] **(2) 트리글리세라이드 정량**

[0124] 위 3.(1)과 동일한 조건에서 올레인산 및/또는 산소전달 수송체가 처리된 후 배양된 표 3의 대조군, 실시예 및 비교예에서 트리글리세라이드(Tryglyceride, TG)를 정량하였다. 구체적으로 Tryglyceride Assay kit(Tryglyceride Assay, Sciencell, USA)를 이용하여 540nm에서 정량하였다. 그 결과 산소가 포집된 산소전달 수송체가 처리된 실시예들 경우 농도 의존적으로 트리글리세라이드의 양이 유의하게 감소하였고, 산소전달 수송체가 0.1% 농도 처리된 실시예3의 경우 올레인산만 처리된 비교예1의 TG 농도 대비 23.61±1.39% 감소하였다(도

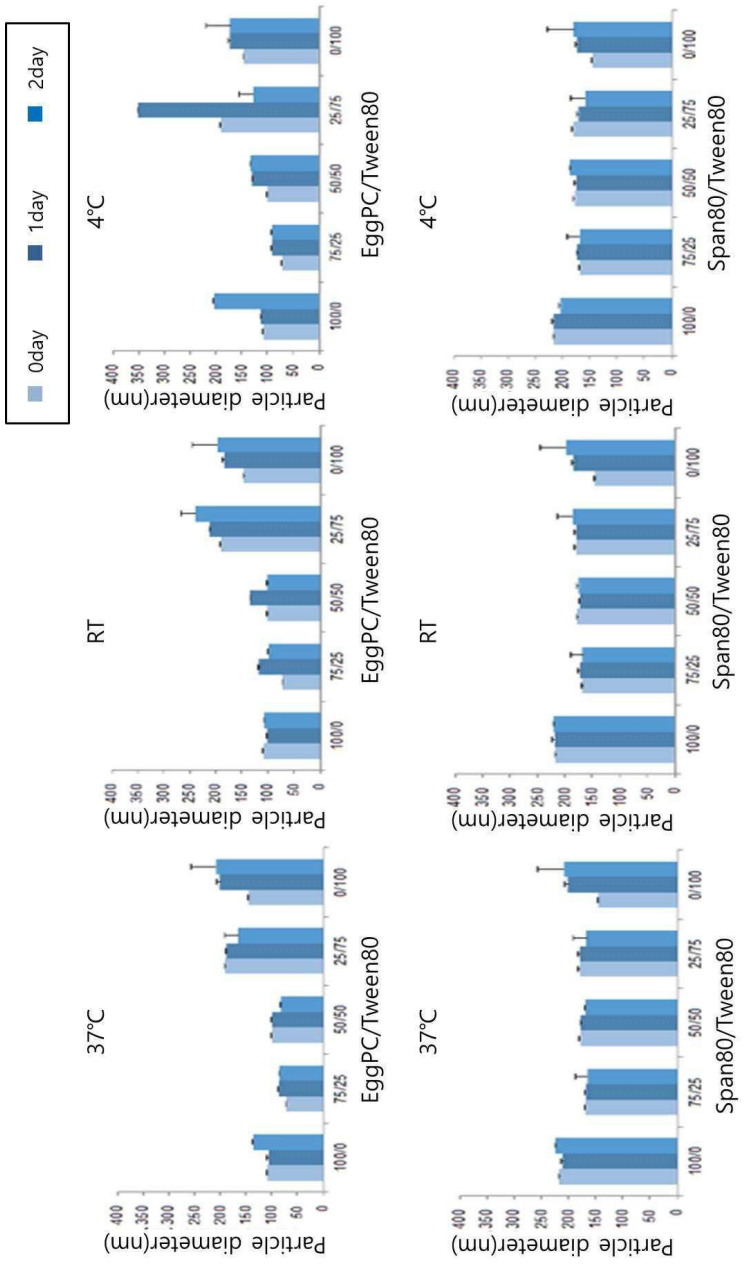
7 참조). 도 7에서 vehicle only는 산소를 포접하지 않은 산소전달 수송체를 의미하고, O_2 NP는 산소가 포접된 산소전달 수송체를 의미한다. 또한, Control은 올레인산은 처리되었으나 산소전달 수송체가 처리되지 않은 비교예1을 의미한다.

[0126] **(3) 아디포즈 트리글리세라이드 리파아제(Adipose triglyceride lipase, ATGL)의 발현량 측정**

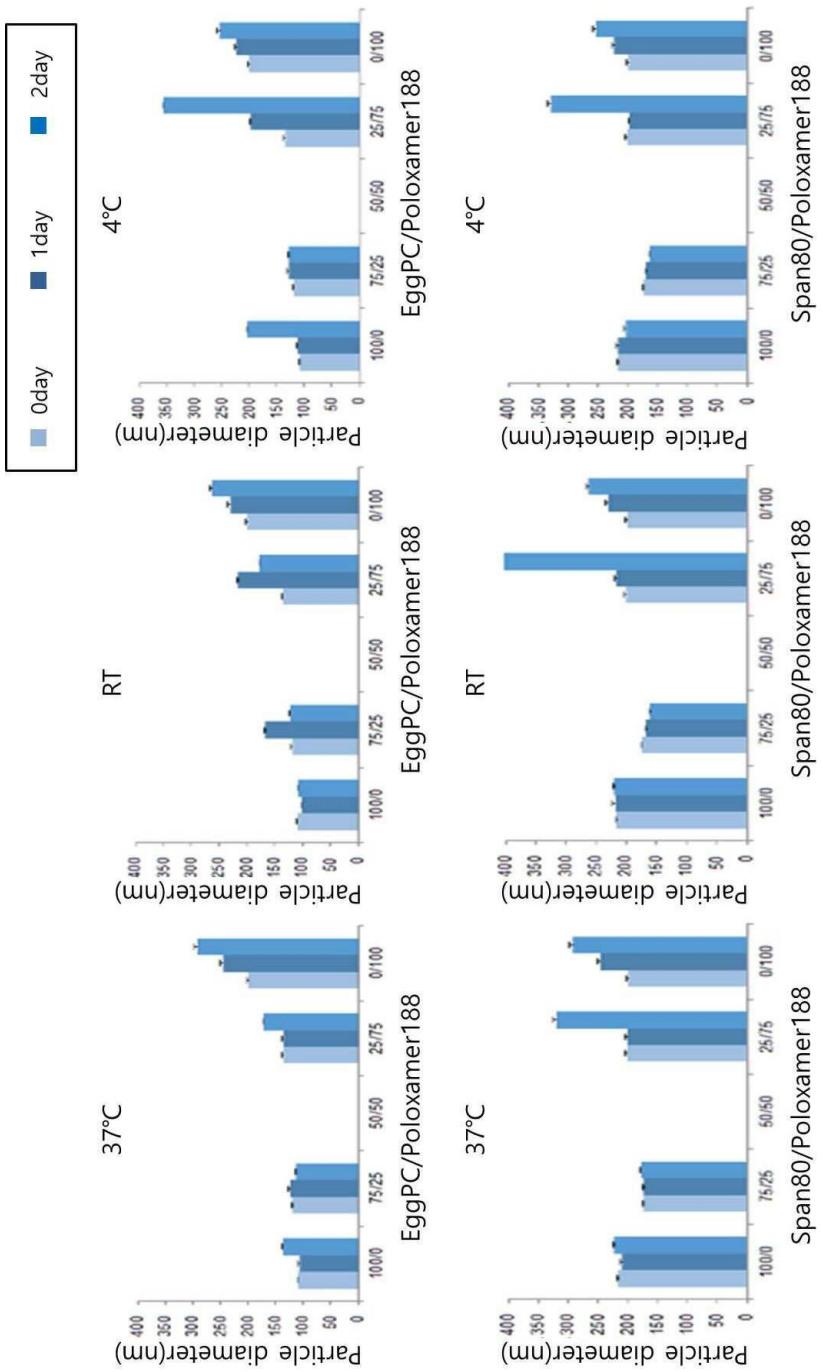
[0127] 위 3.(1)과 동일한 조건에서 올레인산 및/또는 산소전달 수송체가 처리된 후 배양된 표 3의 대조군, 실시예 및 비교예 세포를 수확하여 세포내 RNA를 분리(RNAiso Plus, Takara Biochemical Inc. Japan)한 후, 분리한 RNA를 SuPrimeScript RT premix(GetNet Bio, Korea)를 사용하여 cDNA를 합성하였다(일반유전자증폭기, Blue-ray 바이오텍, TCST-9620, Taiwan). 그 후, Taqman Probe를 이용하여 실시간 중합효소 연쇄반응(실시간 유전자 증폭기, Agilent technologies, G8830A-010, USA)을 수행하여 지방분해인자인 아디포즈 트리글리세라이드 리파아제(Adipose triglyceride lipase, ATGL)의 발현양상을 분석하였다. 그 결과 올레인산 단독 처리구인 비교예1에 비해 산소가 포집된 산소전달 수송체가 0.1% 농도 처리된 실시예3의 경우 ATGL이 약 3.62±1.20 배 증가하였다(도 8 참조). 도 8에서 vehicle only는 산소를 포접하지 않은 산소전달 수송체를 의미하고, O_2 NP는 산소가 포접된 산소전달 수송체를 의미한다. 또한, Control은 올레인산은 처리되었으나 산소전달 수송체가 처리되지 않은 비교예1을 의미한다.

도면

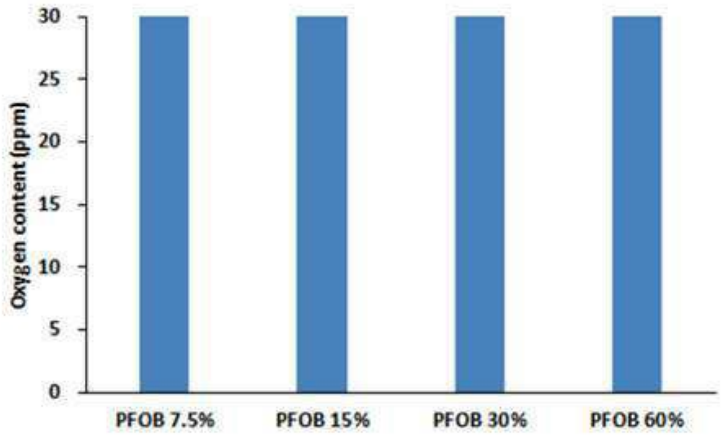
도면1


0day
1day
2day
4°C
RT
37°C
EggPC/Tween80
Span80/Tween80
Particle diameter(nm)
100/0
75/25
50/50
25/75
0/100

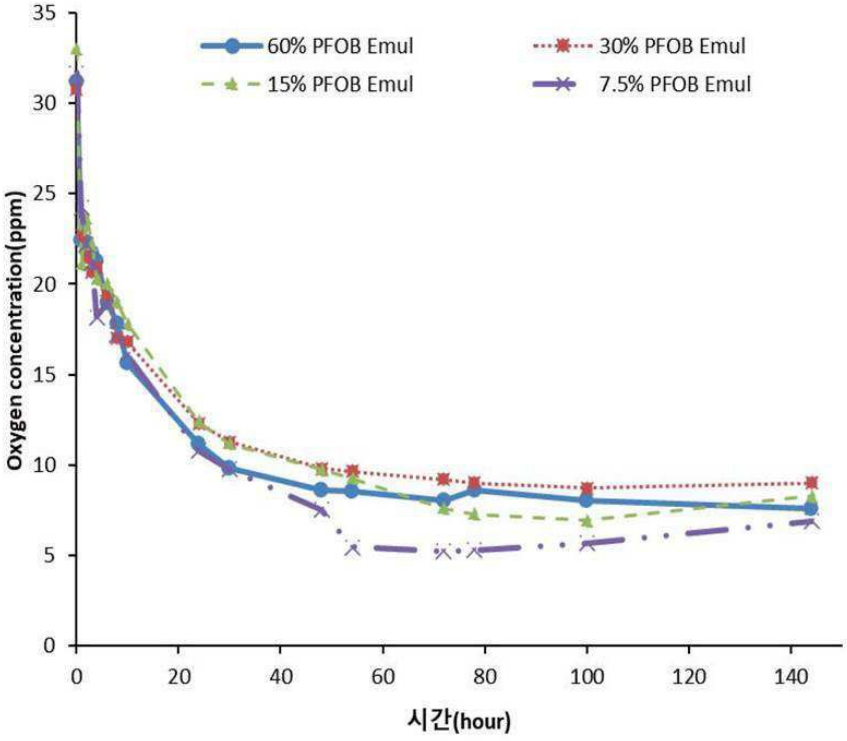
도면2


0day
1day
2day
4°C
RT
37°C
EggPC/Poloxamer188
Span80/Poloxamer188
Particle diameter(nm)
0
50
100
150
200
250
300
350
400
100/0
75/25
50/50
25/75
0/100

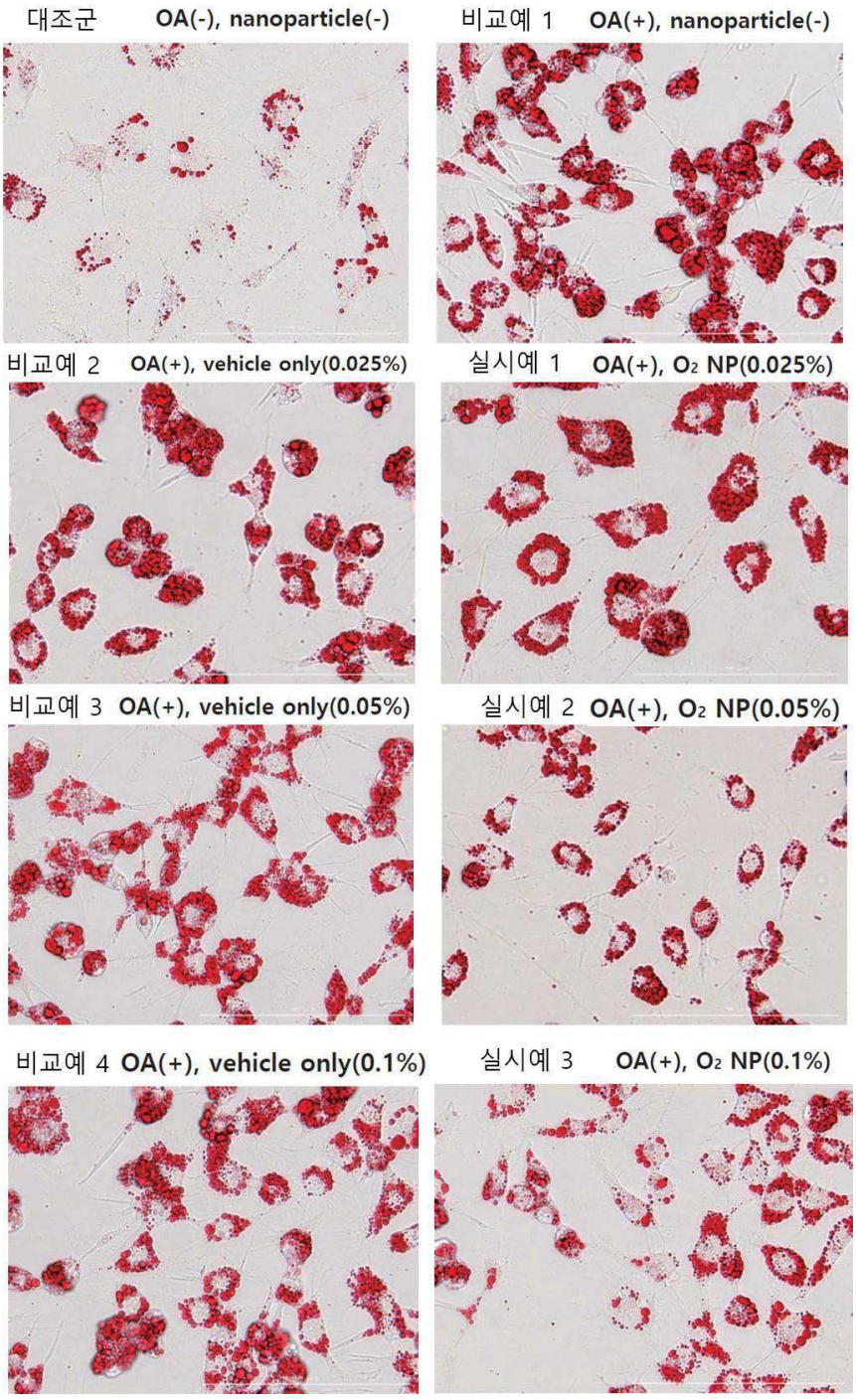
도면3


Oxygen content (ppm)
30
25
20
15
10
5
0
PFOB 7.5%
PFOB 15%
PFOB 30%
PFOB 60%

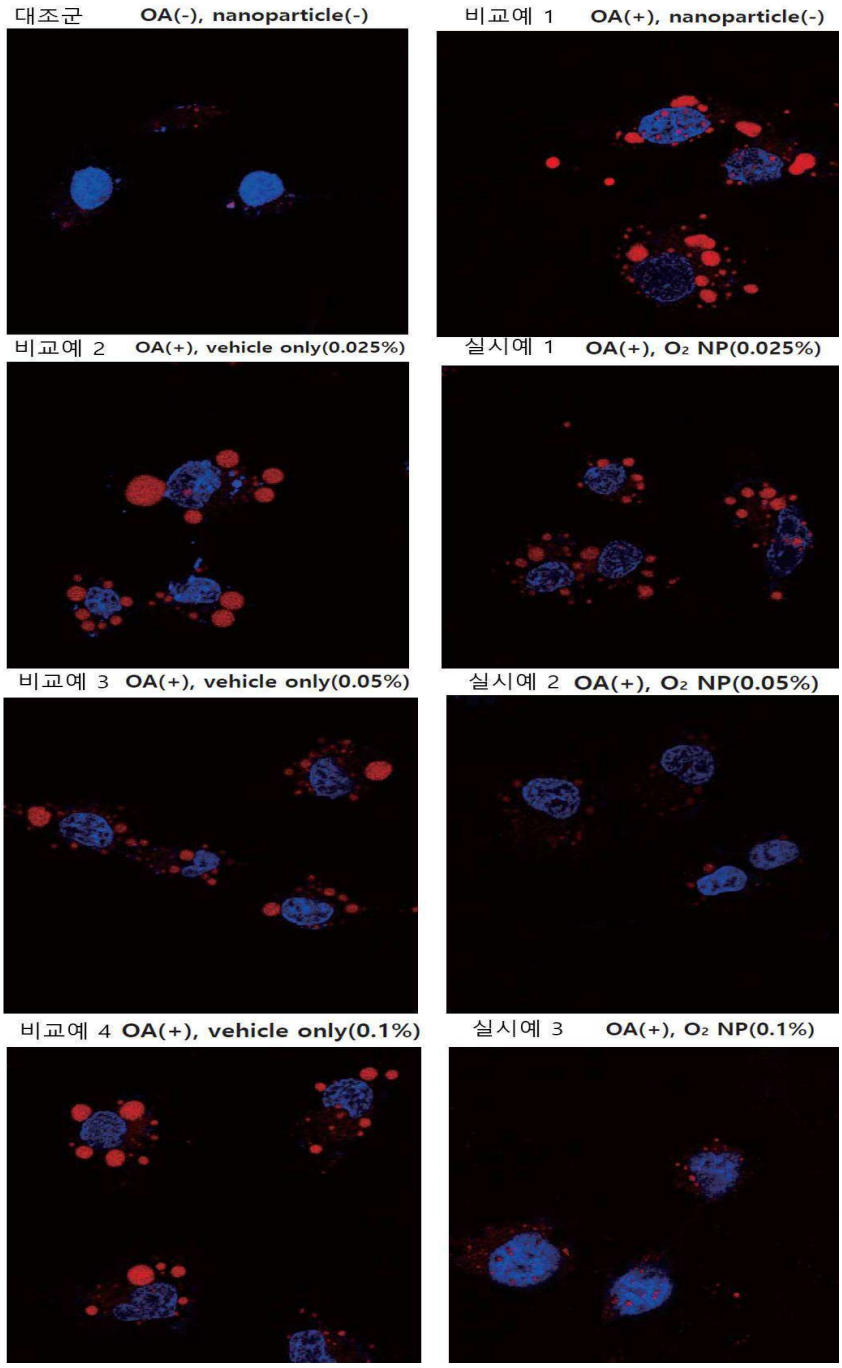
도면4


60% PFOB Emul
30% PFOB Emul
15% PFOB Emul
7.5% PFOB Emul
Oxygen concentration(ppm)
35
30
25
20
15
10
5
0
0
20
40
60
80
100
120
140
시간(hour)

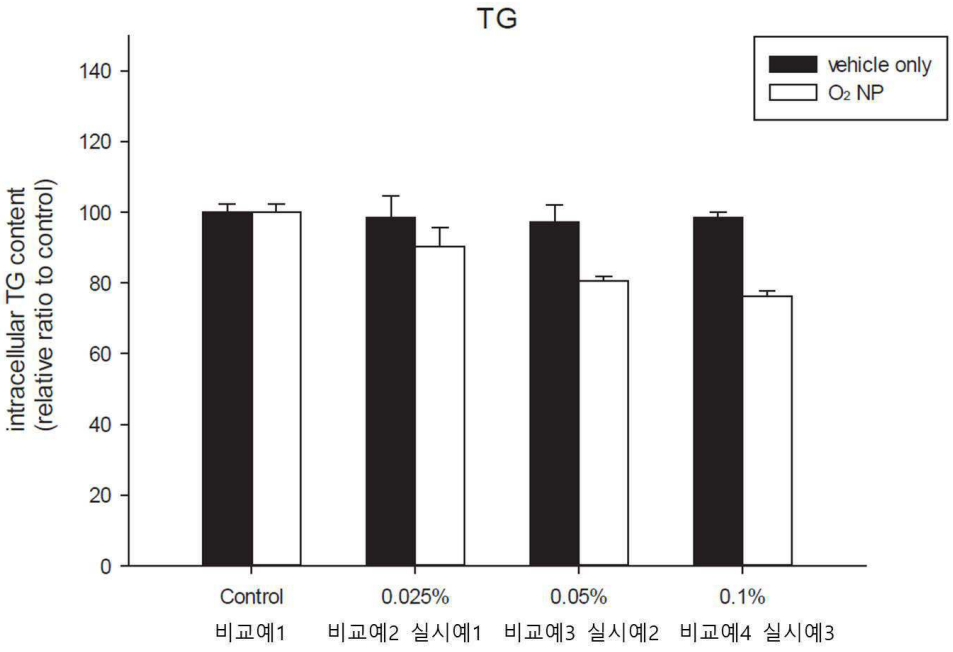
도면5


대조군 OA(-), nanoparticle(-)
비교예 1 OA(+), nanoparticle(-)
비교예 2 OA(+), vehicle only(0.025%)
실시예 1 OA(+), O2 NP(0.025%)
비교예 3 OA(+), vehicle only(0.05%)
실시예 2 OA(+), O2 NP(0.05%)
비교예 4 OA(+), vehicle only(0.1%)
실시예 3 OA(+), O2 NP(0.1%)

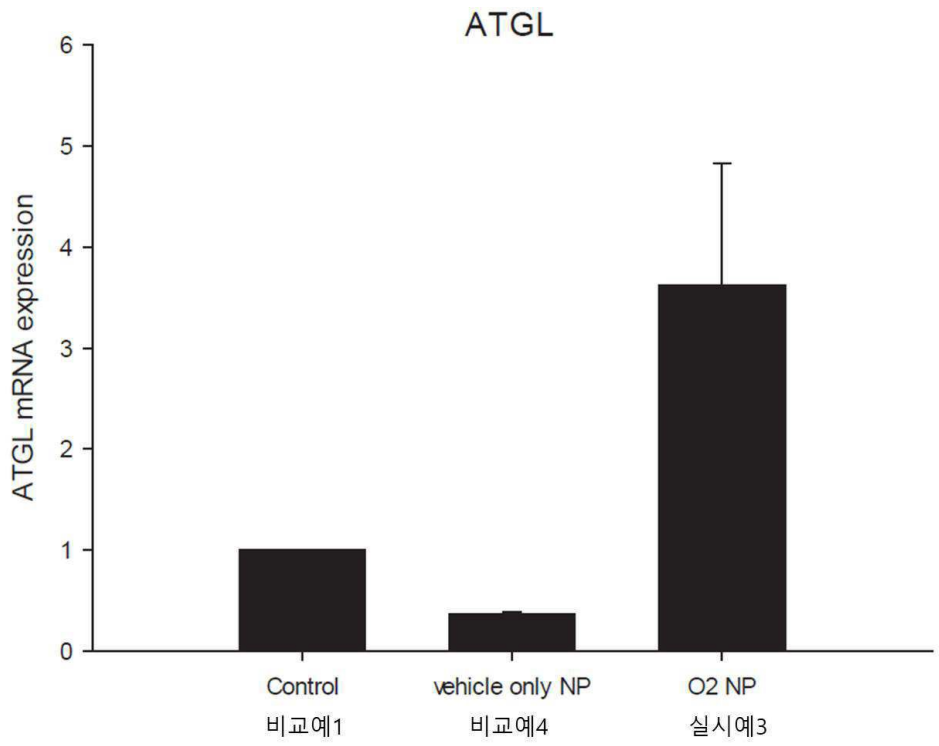
도면6


대조군 OA(-), nanoparticle(-)
비교예 1 OA(+), nanoparticle(-)
비교예 2 OA(+), vehicle only(0.025%)
실시예 1 OA(+), O2 NP(0.025%)
비교예 3 OA(+), vehicle only(0.05%)
실시예 2 OA(+), O2 NP(0.05%)
비교예 4 OA(+), vehicle only(0.1%)
실시예 3 OA(+), O2 NP(0.1%)

도면7


TG
vehicle only
O2 NP
intracellular TG content
(relative ratio to control)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0.025%
0.05%
0.1%
비교예1
비교예2 실시예1
비교예3 실시예2
비교예4 실시예3

도면8


ATGL
ATGL mRNA expression
6
5
4
3
2
1
0
Control
vehicle only NP
O2 NP
비교예1
비교예4
실시예3