

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 9월 15일 (15.09.2016)



(10) 국제공개번호
WO 2016/143939 A1

(51) 국제특허분류:

C07H 15/256 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61K 47/06 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 47/08 (2006.01) *A23K 1/16* (2006.01)
A61K 31/7042 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2015/003643

(22) 국제출원일: 2015년 4월 10일 (10.04.2015)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:

10-2015-0032284 2015년 3월 9일 (09.03.2015) KR
10-2015-0050804 2015년 4월 10일 (10.04.2015) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-015 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 김도만 (KIM, Do Man); 232-916 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1 320 동 101 호, Gangwon-do (KR). 누옌티탄한 (NGUYEN, Thi Thanh Hanh); 232-916 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1 302 동 302 호, Gangwon-do (KR). 김지연 (KIM, Ji Youn); 232-916 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1 302 동 301 호, Gangwon-do (KR).

(74) 대리인: 특허법인 하나 (HANA IP LAW FIRM); 135-923 서울시 강남구 테헤란로 20길 10 6층, 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, 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.

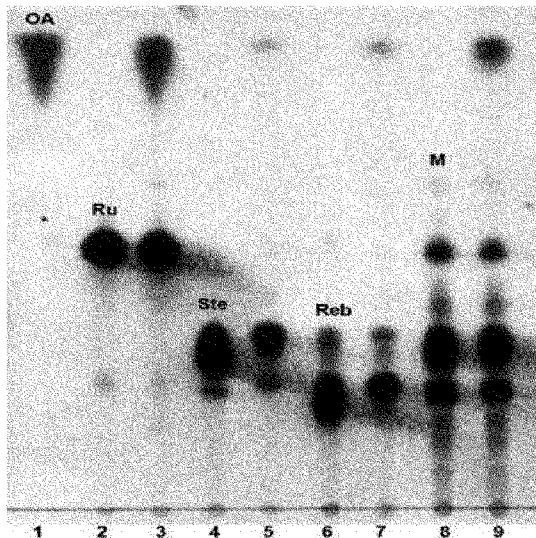
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, 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 제 21 조(3))

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR COMPLEX OF STEVIOL GLYCOSIDE AND SPARINGLY SOLUBLE MATERIAL HAVING IMPROVED SOLUBILITY, AND COMPLEX OF STEVIOL GLYCOSIDE AND SPARINGLY SOLUBLE MATERIAL HAVING IMPROVED SOLUBILITY PRODUCED THEREBY

(54) 발명의 명칭: 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체



(57) Abstract: The present invention relates to a production method for a complex of a steviol glycoside and a sparingly soluble material having improved solubility, and to a complex of a steviol glycoside and a sparingly soluble material having improved solubility produced thereby. More specifically, the present invention relates to a method for improving the solubility of a sparingly soluble material by producing a complex of a steviol glycoside and the sparingly soluble material, by mixing the steviol glycoside and the sparingly soluble material and dissolving in a solvent, and relates to the complex of the steviol glycoside and the sparingly soluble material produced thereby.

(57) 요약서: 본 발명은 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 난용성 소재와 스테비올배당체를 혼합하여 용매에 용해시킴으로써 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체를 제조하여 난용성 소재의 용해성을 개선시키는 방법 및 이에 의하여 제조된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체에 관한 것이다.

명세서

발명의 명칭: 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체

기술분야

- [1] 본 발명은 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법 및 이에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명은 난용성 소재와 스테비올배당체를 혼합하여 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체를 제조하여 난용성 소재의 용해성을 개선시키는 방법 및 이에 의하여 제조된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 일반적으로 약물은 용매에 용해되어 있는 상태에서 생리작용을 나타낼 수 있으므로 약물의 가용화는 그 효과에 밀접한 관계를 갖는다. 물에 잘 녹는 약물은 그 제조 공정과 작용을 위한 흡수가 용이하나, 난용성 약물의 경우에는 가용화가 필수적이다. 난용성 약물은 가용화하지 않은 상태에서는 커다란 집합체로 존재하며, 단일분자로 용해되지 않으므로 전혀 흡수되지 않아 그 효과를 기대할 수 없게 된다.

[4]

- [5] 한편, 스테비올배당체(steviol glycosides)는 천연첨가물로 분류되는 감미료로, 국화과 스테비아의 잎에서 추출하여 제조된다. 감미도는 설탕의 약 200~300배이다. 스테비아는 남미의 파라과이원산 식물로, 현지인들은 오래전부터 건조한 잎을 감미제로 이용하여 왔다. 현재 저칼로리식품, 탄산음료, 과자, 절임식품 등에 사용되고 있다. JECFA(합동식품첨가물 전문가위원회)에서 안전성 평가 결과, 1일 섭취허용량(ADI)은 0~4mg/kg·체중/일(스테비올)로 설정되어 있다. 스테비올배당체의 종류로는 스테비오사이드(stevioside), 레바오디오사이드(rebaudioside), 돌코사이드(dulcoside), 루부소사이드(rubusoside), 스테비올사이드(steviolside) 등이 존재한다.

- [6] 특히, 루부소사이드(Rubusoside; 13-O-β-glucosyl-19-O-β-d-glucosyl-steviol)는 스테비아 외에도 *Rubus suavissimus*라는 식물에서 얻어지는 성분으로 중국 감미차의 성분으로도 포함되어 있는 희귀 천연 감미료다. 루부소사이드는 설탕의 약 115배의 감미도를 지닌 무칼로리, 충치 방지 및 청점감(시원한 맛)을 지닌 감미 소재로 설탕의 대체품으로써 비만증, 당뇨병, 심혈관병, 신장 등의 질병을 지니고 있는 사람들에게 양호한 보조효과를 낼 수 있다. 또한, 항당뇨, 항고혈압, 항종양(항돌연변이), 항바이러스, 장내균총 개선, 신장기능 개선 등의

역할이 보고되어 있으며, 이외에도 Diterpene 배당체로써 피부 자극 완화 작용이 우수하며, 천연 보습 인자와 아미노산을 함유하여 보습효과가 탁월하여 화장품 소재로서 응용도 가능하다고 알려져 있다.

[7]

발명의 상세한 설명

[8] 본 발명자들은 난용성 소재의 용해성 개선 방법에 대한 연구를 수행하던 중, 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체를 이용하는 경우 난용성 소재의 용해성이 현저히 개선됨을 발견함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[9]

[10] 본 발명의 일 측면에 따르면,

[11] 스테비올배당체와 난용성 소재를 에탄올에 혼합하고 교반하는 제 1 단계;

[12] 상기 혼합물을 원심 분리하는 제 2 단계;

[13] 상등액을 분리하는 제 3 단계; 및

[14] 분리된 상등액 내에 포함된 에탄올을 제거하는 제 4 단계;를 포함하는

[15] 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법이 개시된다.

[16] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 스테비올배당체가 효소와 반응하는 효소 산물을 포함하는 것이 가능하다. 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 제 1 단계 이전에 스테비올 배당체와 효소를 혼합하여 스테비올 배당체 효소 반응액을 제조하는 단계를 더 포함하고, 상기 제 1 단계에서는 상기 제조된 스테비올 배당체 효소 반응액을 사용하는 것일 수 있다. 즉, 본 발명에 따른 난용성 소재의 용해성 개선 방법에 있어서, 상기 스테비올배당체는 정제된 것이거나 효소 반응산물인 것일 수 있다.

[17] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 효소는 락타아제일 수 있다.

[18] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 난용성 소재 100 중량부당 상기 스테비올배당체는 800 내지 1200 중량부의 비율로 혼합되는 것일 수 있다.

[19] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 상기 스테비올배당체는 스테비오사이드(stevioside), 레바오디오사이드 A(rebaudioside A), 레바오디오사이드 B(rebaudioside B), 레바오디오사이드 C(rebaudioside C), 레바오디오사이드 D(rebaudioside D), 레바오디오사이드 E(rebaudioside E), 루부소사이드(rubusoside), 돌코사이드 A(dulcoside a), 스테비올사이드(steviolside) 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[20] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 상기 난용성 소재는 의약품, 동물용 의약품, 의약부외품, 화장품 및 농약 중 어느 하나의 유효 성분이 되는 물질 또는 식품 첨가물일 수 있다.

[21] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 상기 난용성 소재는 올레아논산(oleanolic acid, OA), 이데베논(idebenone,

ID), 파이토스핑고신(phytosphingosine, PS), 세라마이드 IIIB(ceramide IIIB, CR), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 또는 아스트라갈린(astragalin) 일 수 있다.

- [22] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 올레아논산(OA)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 1이 성립하는 것일 수 있다.

[23] [관계식 1]

$$[24] \quad Y = 0.90 \times X - 0.38$$

- [25] 상기 식에서 Y는 용매에 용해된 올레아논산(OA)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 첨가된 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

- [26] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 이데베논(ID)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 2가 성립하는 것일 수 있다.

[27] [관계식 2]

$$[28] \quad Y = 2.94 \times X - 4.58$$

- [29] 상기 식에서 Y는 용매에 용해된 이데베논(ID)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

- [30] 본 발명에 따른 난용성 소재의 용해성 개선 방법에 있어서, 스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 파이토스핑고신(PS)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 3이 성립하는 것일 수 있다.

[31] [관계식 3]

$$[32] \quad Y = 0.94 \times X - 0.90$$

- [33] 상기 식에서 Y는 용매에 용해된 파이토스핑고신(PS)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

- [34] 본 발명에 따른 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체의 제조 방법에 있어서, 스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 세라마이드 IIIB(CR)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 4가 성립하는 것일 수 있다.

[35] [관계식 4]

$$[36] \quad Y = 0.15 \times X - 0.29$$

- [37] 상기 식에서 Y는 용매에 용해된 CR의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

- [38] 일 측면에 따르면, 본 발명의 제조 방법에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체를 제공한다.

- [39] 일 측면에 따르면, 상기 제 4 단계에서 얻어진 생성물을 수용매에 용해시키고 교반한 후 원심분리하는 제 5 단계; 및 원심 분리된 상등액을 분리하는 제 6 단계;를 더 포함하는 것인 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 용액의 제조 방법을 제공한다.

[40]

도면의 간단한 설명

[41] 도 1은 실시예 1에 따른 올레아논산(OA)과 스테비올 배당체 복합체를 용매에 용해시킨 경우에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸다.

[42] 도 2는 실시예 1에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소반응액에서의 올레아논산(OA) 용해도 증가 실험 결과를 나타낸다.

[43] 도 3은 실시예 1에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소 반응액의 농도에 따른 올레아논산(OA) 용해도 증가 그래프를 나타낸다.

[44] 도 4는 실시예 2에 따른 이데베논(ID) 스테비올 배당체 복합체에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸다.

[45] 도 5는 실시예 2에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소반응액에서의 이데베논(ID)의 용해도 증가 실험 결과를 나타낸다.

[46] 도 6은 실시예 2에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소 반응액의 농도에 따른 이데베논(ID)의 용해도 증가 그래프를 나타낸다.

[47] 도 7은 실시예 3에 따른 파이토스핑고신(PS)과 스테비올배당체 복합체에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸다.

[48] 도 8은 실시예 3에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소반응액에서의 파이토스핑고신(PS) 용해도 증가 실험 결과를 나타낸다.

[49] 도 9는 실시예 3에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소 반응액의 농도에 따른 파이토스핑고신(PS) 용해도 증가 그래프를 나타낸다.

[50] 도 10은 실시예 4에 따른 세라마이드와 스테비올 배당체 복합체에 대한 TLC 분석 결과를 나타낸다.

[51] 도 11은 실시예 4에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소반응액에서의 세라마이드 수용성 증가 실험 결과를 나타낸다.

[52] 도 12는 실시예 4에 따른 스테비오사이드와 락타아제 효소 반응액의 농도에 따른 세라마이드 용해도 증가 그래프를 나타낸다.

[53] 도 13은 루부소사이드와 올레아논산 복합체가 단백질 분해 효소(3CL^{pro})에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

[54]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[55] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않은 한, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다. 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사건이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용 가능하다. 비록 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법, 프로토콜 및 시약으로 본 발명을 제한하는

것으로 이해되어서는 안 된다.

[56] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수형은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면 복수의 대상을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 달리 언급되지 않는 한, "또는"은 "및/또는"을 의미한다. 더욱이, 용어 "포함하는" 뿐만 아니라, 다른 형태, 예를 들어, "가지는", "이루어지는" 및 "구성되는"은 제한적이지 않다.

[57] 수치 범위는 상기 범위에 정의된 수치를 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최대의 수치 제한은 낮은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 낮은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 최소의 수치 제한은 더 높은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼 모든 더 높은 수치 제한을 포함한다. 본 명세서에 걸쳐 주어진 모든 수치 제한은 더 좁은 수치 제한이 명확히 쓰여져 있는 것처럼, 더 넓은 수치 범위 내의 더 좋은 모든 수치 범위를 포함할 것이다. 본 명세서에 제공된 제목은 다양한 면 또는 전체적으로 명세서의 참조로서, 하기의 구현예를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[58]

[59] 본 발명은 난용성 소재를 스테비올배당체와 복합체를 형성함으로써 난용성 소재의 용해도 개선 방법을 제공하고자 한다.

[60] 일 구현예에 따르면,

[61] 스테비올배당체와 난용성 소재를 에탄올에 혼합하고 교반하는 제 1 단계;

[62] 상기 혼합물을 원심 분리하는 제 2 단계;

[63] 상등액을 분리하는 제 3 단계; 및

[64] 분리된 상등액 내에 포함된 에탄올을 제거하는 제 4 단계;를 포함하는 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체 제조 방법이 제공된다.

[65] 본 명세서에서 사용된 "난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체"는 난용성 소재와 스테비올배당체를 에탄올 용매 중에서 혼합 교반하고, 원심 분리한 후, 에탄올을 제거하여 제조되는 물질로, 난용성 소재와 스테비올배당체 사이에 명확한 공유 결합이 형성되지는 않으나, 분자간 결합에 의해 물리적으로 일정 구조를 형성하는 상태를 의미한다.

[66] 본 발명에서 "용해"는 물을 포함하는 용매에 완전히 녹는 상태뿐만 아니라 미셀 등에 의한 가용화 상태, 또는 수성 용매 중에 균일하게 분산되어 육안으로 투명한 액의 상태를 포함하며, 각 물질의 용해도 측정에 일반적으로 사용되는 시험 방법으로 측정되는 상태를 의미한다.

[67] 본 발명에 의한 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체 제조 방법에 있어서, 에탄올에 용해시킨 후 상등액 내에서 에탄올을 다시 제거함으로써 난용성 소재와 스테비올배당체의 복합체를 수득하게 된다. 상기 제 1 단계에서 용매로 에탄올을 사용하였으나, 이에 한정되지 않으며, 복합체 형성 후 상등액 내에서 에탄올을 제거하기 위한 방법은 증발 시키는 방법을 포함하며 특별히 제한되지

않는다.

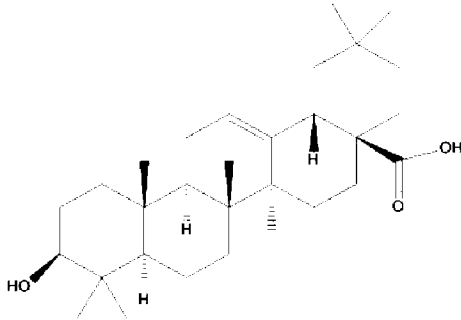
- [68] 본 명세서에서 사용된 용어 “난용성 소재”는 “약간 녹기 어려운”, “녹기 어려운”, “극히 녹기 어려운” 및 “거의 녹지 않는”을 의미하는 것으로, 의약품, 동물용 의약품, 의약부외품, 화장품, 식품 또는 농약에 사용되는 물질을 포함할 수 있다. 상기 의약품, 동물용 의약품, 의약부외품, 화장품, 식품 또는 농약은 특별히 제한되지 않는다.
- [69] 예를 들면, 상기 난용성 소재는 보다 구체적으로는 올레아논산(oleanolic acid), 이데베논(idebenone), 파이토스핑고신(phytosphingosine), 세라마이드(ceramide), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate), 아스트라갈린(astragalin), 파클리탁셀(paclitaxel), 파클리탁셀 유도체, 탁소티어(taxotere), 아드리아마이신(adriamycin), 테니포사이드(teniposide), 에토포사이드(etoposide), 다우노마이신(daunomycin), 메토틱렉세이트(methotrexate), 미토마이신 C(mitomycin C), 카르무스틴(carmustine), 부설판(busulfan), 닥티노마이신(dactinomycin), 로무스틴(lomustine), 메게스트롤 아세테이트(megestrol acetate), 멜파란(melphalan), 마이토잔트론(mitoxantrone), 인도메타신(indomethacin), 에토도락(etodolac), 이부프로펜(ibuprofen), 캄토테신(camptothecin), 토포테칸(topotecan), 아스피린(aspirin), 피록시캄(piroxicam), 시메티딘(cimetidine), 에스트로젠(estrogen), 프레드니솔론(prednisolone), 코티손(cortisone), 하이드로코티손(hydrocortisone), 디플로라손(diflorasone), 페네스테린(phenesterine), 다우노루비신(daunorubicin), 미토탄(mitotane), 비사딘(visadine), 할로니트로소레아류(halonitrosoureas), 엔트로사이클린류(antrocyclines), 엘립티신(ellipticine), 디아제팜(diazepam), 오메프라졸(omeprazole), 메톡시플루오란(methoxyfluorane), 이소플루오란(isofluorane), 엔플루오란(enfluorane), 할로탄(halothane), 벤조카인(benzocaine), 단트롤린(dantrolene), 바르비투레이트(barbiturates), 사이클로스포린 A(cyclosporin A), 아자티오프린(azathioprine), 암포테리신 B(amphotericin B), 나이스타틴(nystatine), 이트라코나졸(itraconazole), 비페닐디메틸디카르복실레이트(biphenyl dimethyl dicarboxylate(BDD)), 피포술포판(piposulfan), 다나졸(danazole), 헤모글로빈(hemoglobin), 커큐미노이드계(curcuminoid) 화합물, 레스베라트롤(resveratrol), 글리실리진산(glycyrrhizinic acid) 또는 그의 유도체일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명에 따르면, 상기 난용성 소재로서 올레아논산(oleanolic acid), 이데베논(idebenone), 파이토스핑고신(phytosphingosine), 세라마이드 IIIB(ceramide IIIB), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 및 아스트라갈린(astragalin)을 사용하였다.

[70]

- [71] 상기 올레아논산(Oleanolic acid, 3 β -hydroxy-olea-12-en-28-oic acid; OA)는 하기의 화학식 1의 구조를 갖는 물질로서, triterpenoid saponin으로 자유산 혹은

비배당체로 존재한다. 주름개선, 항염 또는 피지케어에 사용되나, 수계에서 석출되는 현상이 있고 오일에서도 녹는점이 매우 높기 때문에 제품 개발이 쉽지 않은 문제점이 있다.

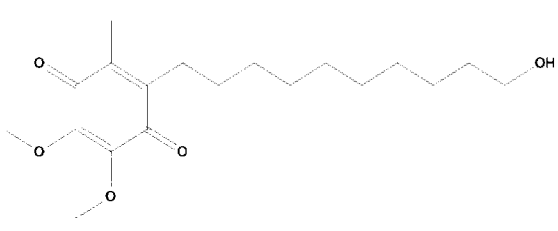
[72] 화학식 1



[73]

[74] 상기 이데베논(Idebenone, Hydroxydecyl Ubiquinone, Id)은 하기의 화학식 2의 구조를 갖는 물질로서, short chain benzoquinone으로 구조적으로는 coenzyme Q10과 유사하지만, Q10에 비해서 항산화 효과가 매우 높기 때문에, 현재 화장품 시장에서 새롭게 주목 받는 성분이다. 이데베논은 강력한 항산화 물질로 전자 전달자이며, 피부 노화를 억제하는 효과외에도 신경 및 미토콘드리아 보호, 심장 비대 완화등에 효과가 있음이 알려져 있으나, 액상(수계) 제품에서 석출 현상으로 안정화가 어려운 단점이 있다.

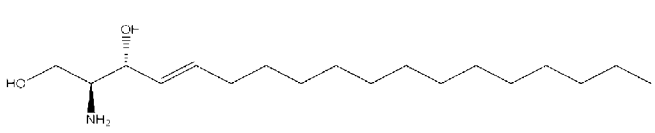
[75] 화학식 2



[76]

[77] 상기 파이토스핑고신(Phytosphingosine, 2-amino-4-octadecene-1, 3-diol)은 하기의 화학식 3의 구조를 갖는 18-carbon amino alcohol로 불포화 탄화수소 사슬을 가지고 있어 중요한 인지질인 sphingolipids를 구성한다. 세포간 시그널링에도 관여하며, 세라마이드처럼 피부장벽 복원 효과가 높아 아토피 크림이나 재생크림 등에 사용되나, 많이 연구된 성분이 아니어서 아직 액상제품은 거의 개발되지 않고 있는 상황이다.

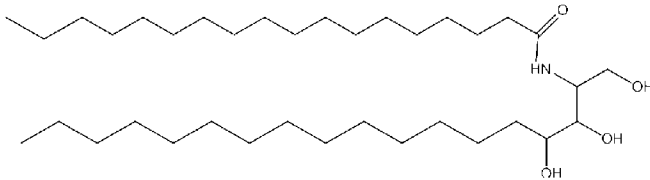
[78] 화학식 3



[79]

- [80] 상기 세라마이드 IIIB(Ceremide IIIB 또는 Ceremide C-6)은 하기의 화학식 4의 구조를 갖는 waxy lipid인 세라마이드의 한 종류로 세라마이드는 일반적으로 물에 녹지 않지만, 최근 화장품 처방기술이 많이 발달해서 액상 제품이 많이 개발되어 있다. 다만, 실제 피부에 세라마이드 IIIB가 가장 높은 분포를 보이나, 현재 화장품에 적용되어 있는 액상의 세라마이드는 대부분 세라마이드 II라는 점에서 세라마이드 III의 액상화가 요구된다.

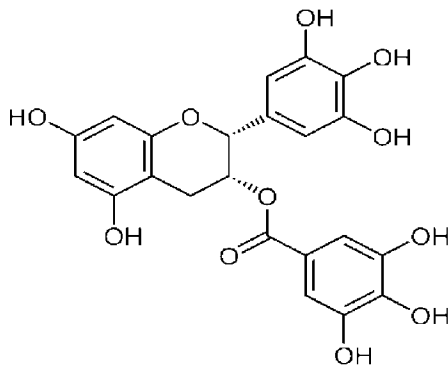
- [81] 화학식 4



- [82]

- [83] 상기 에피갈로카테킨 갈레이트(Epigallocatechin gallate, EGCG, 갈산염-3-에피갈로카테킨) 혹은 카테킨은 하기의 화학식 5를 갖는 녹차엽의 추출물인 폴리페놀의 일종으로 강력한 항산화 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

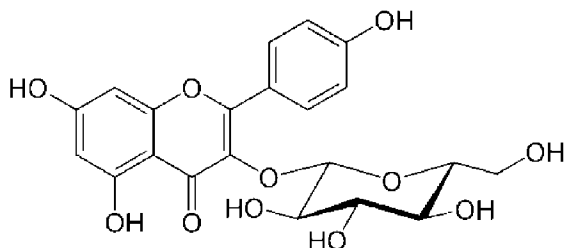
- [84] 화학식 5



- [85]

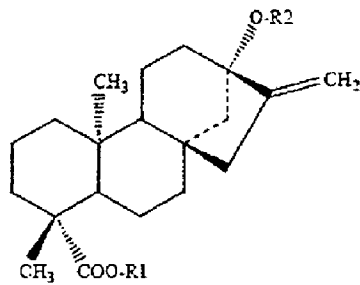
- [86] 상기 아스트라갈린은(kaempferol-3-O-glucopyranoside, astragalin)은 하기의 화학식 6을 가지며, 플라보노이드(flavonoids)계 화합물을 함유하고 있는 것으로, 항염증 및 항알레르기, 피부염 경감 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

- [87] 화학식 6



- [88]

- [89] 본 명세서에서 사용된 용어 “스테비올배당체(steviol glycoside)”는 스테비아의 앞에 존재하는 화합물로서 단맛을 내는 물질을 의미한다. 스테비아 앞 내의 스테비올배당체는 예를 들면, 스테비오사이드(stevioside), 레바오디오사이드(rebaudioside), 레바오디오사이드 A, 레바오디오사이드 C, 돌코사이드(dulcoside) A 뿐만 아니라, 레바오디오사이드 B, D, E, F, 루부소사이드(rubusoside), 스페티올모노사이드, 스테비올비오사이드 또는 이들의 혼합물을 포함할 수 있다.
- [90] 상기 스테비올배당체의 화학구조는 하기와 같다:
- [91] 화학식 7



화합물 명칭	R1	R2
스테비올	H	H
스테비올바이오사이드	H	β -Glc- β -Glc(2→1)
스테비오사이드	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
레바오디오사이드 A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
레바오디오사이드 B	H	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
레바오디오사이드 C (돌코사이드 B)	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1) β -Glc(3→1)
레바오디오사이드 D	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
레바오디오사이드 E	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- β -Glc(2→1)
레바오디오사이드 F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2→1) β -Glc(3→1)
루부소사이드	β -Glc	β -Glc
돌코사이드 A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1)

[92]

- [93] 일 구현예에 따르면, 상기 제 1 단계 이전에 스테비올 배당체와 효소를 혼합하여 스테비올 배당체 효소 반응액을 제조하는 단계를 더 포함하고, 상기 제 1 단계에서는 상기 제조된 스테비올 배당체 효소 반응액을 사용하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올배당체 복합체의 제조 방법이 제공된다. 즉, 본 발명에 있어서, 스테비올배당체 자체를 사용하거나, 스테비올배당체 효소 반응액을 모두 사용하는 것이 가능하다. 일 구현예에 따르면, 상기 효소는 락타아제인 것이 가능하다.
- [94] 일 구현예에 따르면, 상기 난용성 소재 100 중량부당 상기 스테비올배당체는 800 내지 1200 중량부의 비율로 혼합되는 것이 가능하다. 상기 스테비올배당체의 혼합 비율이 8:1(w/w) 보다 높거나 12:1(w/w) 보다 낮은 경우, 스테비올배당체와 난용성 소재의 복합체 형성 효율이 낮아져서 스테비올배당체에 의한 난용성 소재의 용해성 개선 정도가 크지 않거나 감소될 수 있다.
- [95] 또한, 스테비올배당체와 난용성 소재를 에탄올에 혼합하고 교반하는 제 1 단계는 10분 내지 20분 동안 수행될 수 있다. 상기 혼합 시간이 10분 이하일 경우 복합체 형성을 위한 충분한 반응이 일어나지 못하며, 상기 혼합 시간이 20분 이상일 경우 불필요한 혼합과정으로 반응 효율이 저하될 수 있다. 상기 난용성 소재는 15% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 80% 이상 수용화 되거나 실질적으로 전부 수용상태가 될 수 있다.
- [96] 본 발명은 또한, 본 발명의 제조 방법에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체를 제공한다.
- [97]
- [98] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [99]
- [100] <실시예>
- [101] 실험재료
- [102] 올레아놀산(3β -hydroxy-olea-12-en-28-oic acid, OA) 및 이데베논(ID)은 Tokyo chemical industry company (Japan)에서 구입하였으며, 스테비올배당체 혼합물은 국내업체에서 구입하였다. 스테비오사이드 및 레바오디오사이드는 MPLC (Grace Discovery Science, China)로 정제하여 사용하였다. 루부소사이드는 본 발명자들이 개발한 방법을 이용하여 준비하였다
- [103]
- [104] 실시예 1. 스테비올배당체를 이용한 OA 수용화 증가 확인 실험
- [105] 1-1. 수용화 예비시험
- [106] 루부소사이드(Ru), 스테비오사이드(Ste), 레바오디오사이드(Reb) 및 이들의 혼합물(M) 각각 100 mg에 올레아놀산(OA) 10 mg을 혼합하였다. 각 혼합물을 1 mL 무수 에탄올에 첨가하여 15분 동안 강하게 교반한 후, 12,000 rpm으로 10분

동안 원심분리하였다. 상등액을 다른 에펜도프 튜브(eppendorf tube)에 옮겨 담았다. 분리된 상등액에서 에탄올을 증발시켜서 난용성 소재와 스테비올배당체 복합체를 수득하였다.

- [107] 얻어진 난용성 소재 올레아논산(OA)와 스테비올배당체 복합체인 올레아논산(OA)-루부소사이드 복합체, 올레아논산(OA)-스테비오사이드 복합체, 올레아논산(OA)-레바오디오사이드 복합체 및 올레아논산(OA)-M 복합체 각각을 물 1 mL에 용해시키고, 다시 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상등액 내에 존재하는 각 성분의 양을 확인하여 용해도를 측정였다. 전개용매로는 아세토니트릴/물 85:15 (v/v)를 사용하였으며, 표준액으로는 N,N-디메틸포름아마이드(DMF)에 녹인 0.25 mg.mL⁻¹ - 12 mg.mL⁻¹을 사용하였다. 올레아논산(OA)는 TLC 플레이트 상에서 UV 254 nm로 확인하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

- [108] 도 1에서 각 lane 은 아래와 같다.

- [109] ·Lane 1: 10 mg.mL⁻¹ OA in DMF

- [110] ·Lane 2: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액

- [111] ·Lane 3: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액에 들어 있는 올레아논산(OA)

- [112] ·Lane 4: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액

- [113] ·Lane 5: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액에 들어 있는 올레아논산(OA)

- [114] ·Lane 6: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액

- [115] ·Lane 7: 110% (w/v) 레바오디오사이드 수용액에 들어 있는 올레아논산(OA)

- [116] ·Lane 8: 10% 스테비올배당체 혼합물 수용액

- [117] ·Lane 9: 10% (w/v) 스테비올배당체 혼합물 수용액에 들어 있는 올레아논산(OA)

- [118]

- [119] 상기 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 이들의 혼합물과 난용성 소재 올레아논산(OA) 복합체의 물에 대한 용해도를 하기의 표 1에 나타내었다. 루부소사이드와의 복합체의 경우 올레아논산(OA)의 용해도가 가장 높게 나타났다.

- [120] 표 1

[Table 1]

	물	Ru	Ste	Reb	M
OA	-	8.69 ± 0.27	0.14	0.22 ± 0.02	3.04 ± 0.34

- [121] 1-2. 복합체 형성을 위한 루부소사이드의 첨가 농도에 따른 올레아논산(OA) 용해도 증가실험

- [122] 10 mg 올레아논산(OA)를 각 1.0% (w/v), 2.0% (w/v), 4.0% (w/v), 6.0% (w/v), 8% (w/v) 및 10.0% (w/v)의 루부소사이드와 에탄올에 혼합한 후, 상기 실시예 1-1과 동일한 방법으로 용해도를 확인하였다. 그 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

[123] 표 2

[Table 2]

Ru의 첨가량 (%)	OA(mg.ml ⁻¹)	
	첨가량	용해된 OA의 양
1.0	10.0	0.40 ± 0.17
2.0		1.59 ± 0.47
4.0		3.21 ± 0.15
6.0		5.0 ± 0.14
8.0		6.63 ± 0.46
10.0		8.69 ± 0.45

[124]

[125] 표 2를 참고하면, 올레아논산(OA)의 용해도는 복합체 형성을 위해 첨가되는 루부소사이드(Ru)의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 확인되었다. 상기 표 2의 결과를 바탕으로 OA의 용해도와 루부소사이드(Ru)의 농도 간의 선형 관계식을 하기와 같이 도출하였다.

[126] [관계식 1]

[127] $Y = 0.90 \times X - 0.38$

[128] 상기 식에서 Y는 용해된 OA의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 첨가된 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[129] 1-3. 효소반응액 사용시 올레아논산(OA) 용해도 증가 실험

[130] 스테비오사이드와 락타아제를 같이 혼합하여 스테비오사이드를 락타아제로 효소 반응하여 효소 반응액을 제조하고 루부소사이드를 정제 함이 없이 올레아논산(OA)의 물에 대한 용해도 증가 결과를 확인하고, 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[131] 도 2에서 각각의 lane 은 아래와 같다.

[132] ·lane 1: 0.25 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[133] ·lane 2: 1 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[134] ·lane 3: 2 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[135] ·lane 4: 4 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[136] ·lane 5: 8 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[137] ·lane 6: 12 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[138] ·lane 7: 24 mg.ml⁻¹ OA in DMSO[139] ·lane 8: 스테비올 배당체 효소 반응액 수용액에 들어 있는 10 mg.ml⁻¹ OA[140] ·lane 9: 스테비올 배당체 효소 반응액 수용액에 들어 있는 20 mg.ml⁻¹ OA[141] ·lane 10: 스테비올 배당체 효소 반응액 수용액에 들어 있는 40 mg.ml⁻¹ OA

[142] ·lane 11: 스테비올 배당체 효소 반응액 수용액에 들어 있는 60 mg.ml⁻¹ OA

[143]

[144] 도 2 및 도 3을 참고하면, 스테비올배당체의 락타아제 효소 반응액을 혼합하는 경우에도 난용성 소재인 올레아논산(OA)와 스테비올배당체 복합체가 형성되고, 그 결과 물에 대한 용해도가 증가됨을 확인하였다. 특히, 스테비오사이드 락타아제 효소 반응액 40 mg을 혼합하는 경우 물에 대한 올레아논산(OA)의 용해도가 가장 높았다.

[145]

[146] 실시예 2. 이데베논(ID) 용해도 증가 확인 실험

[147] 2-1. 수용화 예비시험

[148] 난용성 소재로서 이데베논(ID)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 이데베논(ID)의 용해도 증가 확인 실험을 수행하고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[149] 도 4 에서 각 lane 은 아래와 같다.

[150] ·lane 1: 10 mg.ml⁻¹ 이데베논(ID) in DMSO

[151] ·lane 2: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액

[152] ·lane 3: 10 mg.ml⁻¹ 루부소사이드 수용액에 들어있는 이데베논(ID)

[153] ·lane 4: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액

[154] ·lane 5: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액에 들어있는 이데베논(ID)

[155] ·lane 6: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액

[156] ·lane 7: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액에 들어있는 이데베논(ID)

[157] ·lane 8: 10% 스테비올배당체 혼합물 수용액

[158] ·lane 9: 10% (w/v) 스테비올배당체 혼합물 수용액에 들어있는 이데베논(ID)

[159]

[160] 도 4를 참고하면, 이데베논(ID) 루부소사이드 복합체, 이데베논(ID) 스테비오사이드 복합체, 이데베논(ID) 레바오디오사이드 복합체 및 이데베논(ID) 스테비올배당체 혼합물 복합체를 형성하는 경우 이데베논(ID)의 용해도가 증가함이 확인되었다.

[161] 상기 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 이들의 혼합물과 난용성 소재인 이데베논(ID) 복합체를 형성하는 경우 이데베논(ID)의 물에 대한 용해도를 하기의 표 3에 나타내었다.

[162] 표 3

[Table 3]

	물	Ru	Ste	Reb	M
이데베논(I - D)	-	28.79 ± 0.15	1.26 ± 0.07	4.92 ± 0.28	11.8 ± 0.23

[163] 표 3을 참고하면 루부소사이드 이데베논(ID) 복합체의 물에 대한 용해도는

28.79 mg.ml⁻¹이었고, 10% (w/v) 스테비올배당체 혼합물 이데베논(ID) 복합체는 11.8mg.ml⁻¹, 10% (w/v) 레바오디오사이드 이데베논(ID) 복합체의 경우 4.92 mg.ml⁻¹, 그리고 10% (w/v) 스테비오사이드 이데베논(ID) 복합체의 경우 물에 대해 0.26mg.ml⁻¹의 용해도를 보여 이데베논(ID) 가 루부소사이드와 복합체를 형성하는 경우 이데베논(ID)의 용해도가 가장 높은 것으로 확인 되었다.

[164]

[165] 2-2. 복합체 형성을 위해 첨가되는 루부소사이드의 농도에 따른 루부소사이드 이데베논(ID) 용해도 증가 실험

[166] 10 mg 이데베논(ID)를 각 1.0% (w/v), 2.0% (w/v), 4.0% (w/v), 6.0% (w/v), 8% (w/v) 및 10.0% (w/v)의 루부소사이드와 혼합하여 복합체를 제조한 후, 상기 실시예 2-1과 동일한 방법으로 수용화 정도를 확인하고, 그 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.

[167] 표 4

[Table 4]

Ru의 첨가량 (%)	ID(mg.ml ⁻¹)	
	첨가량	용해된 OA의 양
1.0	30.0	0.33 ± 0.07
2.0		0.86 ± 0.17
4.0		8.25 ± 0.14
6.0		9.24 ± 0.46
8.0		15.07 ± 0.45
10.0		28.79 ± 0.27

[168] 표 4를 참고하면, 루부소사이드 이데베논(ID) 복합체의 수용성은 복합체 형성시 첨가되는 루부소사이드(Ru)의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 확인되었다. 상기 표 4의 결과를 바탕으로 이데베논(ID) 용해도와 첨가되는 루부소사이드(Ru)간의 선형 관계식을 하기와 같이 도출하였다.

[169] [관계식 2]

[170] $Y = 2.94 \times X - 4.58$

[171] 상기 식에서 Y는 용해된 이데베논(ID)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 첨가된 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[172] 2-3. 효소 반응액을 이용한 이데베논 용해도 증가 실험

[173] 스테비오사이드와 락타아제를 같이 혼합하여 스테비오사이드를 락타아제로 효소 반응하여 효소 반응액을 제조하고 루부소사이드를 정제 함이 없이 SDS page 를 통해 이데베논(ID) 의 물에 대한 용해도 증가 결과를 확인하고, 그 결과로도 5 및 도 6에 나타내었다.

- [174] 도 5 에서 각각의 lane 은 아래와 같다.
- [175] ·lane 1: 1.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [176] ·lane 2: 1.5 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [177] ·lane 3: 2.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [178] ·lane 4: 3.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [179] ·lane 5: 4.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [180] ·lane 6: 5.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [181] ·lane 7: 6.0 mg.ml⁻¹ ID 가 첨가된 DMSO
- [182] ·lane 8: 스테비오사이드 효소 반응액 수용액에 들어있는 10 mg.ml⁻¹ ID
- [183] ·lane 9: 스테비오사이드 효소 반응액 수용액에 들어있는 20 mg.ml⁻¹ ID
- [184] ·lane 10: 스테비오사이드 효소 반응액 수용액에 들어있는 40 mg.ml⁻¹ ID
- [185] ·lane 11: 스테비오사이드 효소 반응액 수용액에 들어있는 60 mg.ml⁻¹ ID
- [186]
- [187] 도 5 및 6을 참고하면, 스테비올배당체의 락타아제 효소 반응액을 혼합하는 경우에도 난용성 소재인 이데베논(ID)과 스테비올배당체 복합체가 형성되고, 그 결과 이데베논(ID)의 물에 대한 용해도가 증가됨을 확인하였다. 특히, 스테비오사이드 락타아제 효소 반응액 20 mg을 혼합하는 경우 물에 대한 올레아논산(OA)의 용해도가 가장 높았다.
- [188]
- [189] 실시예 3. 스테비올배당체를 이용한 파이토스핑고신(PS) 용해도 증가 확인 실험
- [190] 3-1. 수용화 예비시험
- [191] 난용성 소재로서 파이토스핑고신(PS)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 파이토스핑고신(PS)의 용해도 증가 확인 실험을 수행하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [192] 도 7 에서 각 lane 은 아래와 같다.
- [193] ·lane 1: 10 mg.ml⁻¹ PS in DMSO
- [194] ·lane 2: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액
- [195] ·lane 3: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액에 들어있는 PS
- [196] ·lane 4: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액
- [197] ·lane 5: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액에 들어있는 PS
- [198] ·lane 6: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액
- [199] ·lane 7: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액에 들어있는 PS
- [200] ·lane 8: 10% 스테비올배당체 혼합물 수용액
- [201] ·lane 9: 10% (w/v) 스테비올배당체 혼합물 수용액에 들어있는 PS
- [202]
- [203] 도 7을 참고하면, 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 이들의 혼합물과 파이토스핑고신(PS)를 혼합하여 복합체를 형성하는 라인 3, 5, 7 및

9에서 파이토스펑고신(PS)의 용해도가 증가됨이 확인되었다.

- [204] 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 이들의 혼합물과 파이토스펑고신(PS)를 혼합하여 복합체를 형성하는 각각의 경우 파이토스펑고신(PS)의 DMSO에 대한 용해도를 하기의 표 5에 나타내었다.

- [205] 표 5

[Table 5]

	물	Ru	Ste	Reb	M
PS	-	8.86 ± 0.35	0.83 ± 0.07	1.98 ± 0.15	4.83 ± 0.21

- [206] 3-2. 복합체 형성을 위해 첨가되는 루부소사이드의 농도에 따른 파이토스펑고신(PS) 용해도 증가 실험

- [207] 10 mg 파이토스펑고신을 각 1.0% (w/v), 2.0% (w/v), 4.0% (w/v), 6.0% (w/v), 8% (w/v) 및 10.0% (w/v)의 비율로 루부소사이드와 에탄올에 혼합하여 복합체를 제조한 후, 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 파이토스펑고신(PS)의 용해도를 확인하였다. 그 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

- [208] 표 6

[Table 6]

Ru의 첨가량 (%)	PS(mg.ml ⁻¹)	
	첨가량	용해된 OA의 양
1.0	10.0	0.21 ± 0.03
2.0		1.25 ± 0.05
4.0		2.65 ± 0.17
6.0		4.14 ± 0.07
8.0		6.65 ± 0.23
10.0		8.86 ± 0.20

- [209]

- [210] 표 6을 참고하면, 파이토스펑고신(PS)의 용해도는 파이토스펑고신(PS)와 복합체를 형성하기 위해 첨가되는 루부소사이드의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 확인되었다. 상기 표 6의 결과를 바탕으로 파이토스펑고신(PS)의 용해도와 첨가되는 루부소사이드의 농도와의 선형 관계식을 하기와 같이 도출하였다.

- [211] [관계식 3]

- [212] $Y = 0.94 \times X - 0.90$

- [213] 상기 식에서 Y는 파이토스펑고신(PS)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[214]

[215] 3-3. 스테비오사이드의 효소반응액에서의 파이토스핑고신(PS) 용해도 증가 실험

[216] 스테비오사이드와 락타아제를 같이 혼합하여 스테비오사이드를 락타아제로 효소 반응하여 효소 반응액을 제조하고 루부소사이드를 정제 함이 없이 파이토스핑고신(PS)의 물에 대한 용해도 증가 결과를 확인하고, 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.

[217] 도 8 에서 각각의 lane 은 다음과 같다.

[218] ·lane 1: DMSO 내의 2 mg.ml⁻¹ PS

[219] ·lane 2: DMSO 내의 4 mg.ml⁻¹ PS

[220] ·lane 3: DMSO 내의 6 mg.ml⁻¹ PS

[221] ·lane 4: DMSO 내의 8 mg.ml⁻¹ PS

[222] ·lane 5: DMSO 내의 10 mg.ml⁻¹ PS

[223] ·lane 6: 스테비오사이드효소 반응 수용액에 들어 있는 30 mg.ml⁻¹PS

[224] ·lane 7: 스테비오사이드효소 반응 수용액에 들어 있는 40 mg.ml⁻¹PS

[225] ·lane 8: 스테비오사이드효소 반응 수용액에 들어 있는 50 mg.ml⁻¹PS

[226] 도 8 및 9를 참고하면, 스테비올배당체의 락타아제 효소 반응액을 혼합하는 경우에도 난용성 소재인 파이토스핑고신(PS)와 스테비올배당체 복합체가 형성되고, 그 결과 파이토스핑고신(PS)의 물에 대한 용해도가 증가됨을 확인하였다.

[227]

[228] 실시예 4. 스테비올배당체를 이용한 CR 수용화 증가 확인 실험

[229] 4-1. 수용화 예비시험

[230] 난용성 소재로서 세라마이드 IIIB(CR)를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 세라마이드 IIIB(CR)의 용해도 증가 확인 실험을 수행하고, 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[231] 도 10에서 각 lane 은 다음과 같다.

[232] ·lane 1: 10 mg.ml⁻¹ CR in DMSO

[233] ·lane 2: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액

[234] ·lane 3: 10% (w/v) 루부소사이드 수용액에 들어 있는 CR

[235] ·lane 4: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액

[236] ·lane 5: 10% (w/v) 스테비오사이드 수용액에 들어 있는 CR

[237] ·lane 6: 10% (w/v) 레바오디오사이드 수용액

[238] ·lane 7: 10% (w/v) 레바오디오사이드수용액에 들어 있는 CR

[239] ·lane 8: 10% 스테비올배당체 혼합물 수용액

[240] ·lane 9: 10% (w/v) 스테비올배당체 혼합물수용액에 들어 있는 CR

[241]

[242] 도 10을 참고하면, 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및

이들의 혼합물과 세라마이드 IIIB(CR)를 에탄올에서 혼합하여 복합체를 형성하는 레인 3, 5, 7 및 9에서 세라마이드 IIIB(CR)이 용해됨이 확인되었다.

[243]

[244] 4-2. 복합체 형성을 위해 첨가되는 루부소사이드의 농도에 따른 세라마이드 IIIB(CR) 용해도 증가 실험

[245] 10 mg CR을 각 1.0% (w/v), 2.0% (w/v), 4.0% (w/v), 6.0% (w/v), 8% (w/v) 및 10.0% (w/v)의 루부소사이드와 에탄올에 혼합하여 복합체를 형성한 후, 상기 실시예 4-1과 동일한 방법으로 수용화 정도를 확인하였다. 그 결과를 하기의 표 7에 나타내었다.

[246] 표 7

[Table 7]

Ru의 첨가량 (%)	CR(mg.ml ⁻¹)	
	첨가량	용해된 OA의 양
1.0	10.0	0.48 ± 0.02
2.0		0.59 ± 0.02
4.0		0.85 ± 0.02
6.0		1.17 ± 0.02
8.0		1.53 ± 0.05
10.0		1.81 ± 0.02

[247] 표 7을 참고하면, 세라마이드 IIIB(CR)의 용해도는 복합체 형성을 위해 첨가되는 루부소사이드(Ru)의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것으로 확인되었다. 상기 표 7의 결과를 바탕으로 CR의 용해도와 Ru간의 선형 관계식을 하기와 같이 도출하였다.

[248] [관계식 4]

[249] $Y = 0.15 \times X - 0.29$

[250] 상기 식에서 Y는 용해된 세라마이드 IIIB(CR)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 첨가되는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[251]

[252] 4-3. 스테비오사이드의 효소반응액에서의 CR 수용화 증가 실험

[253] 스테비오사이드와 락타아제를 같이 혼합하여 스테비오사이드를 락타아제로 효소 반응하여 효소 반응액을 제조하고 루부소사이드를 정제 함이 없이 세라마이드 IIIB(CR)의 물에 대한 용해도 증가 결과를 확인하고, 그 결과를 도 11 및 도 12에 나타내었다.

[254] 도 11에서 각각의 lane 은 다음과 같다.

[255] ·lane 1: DMSO 내의 1 mg.ml⁻¹ CR

- [256] ·lane 2: DMSO 내의 1.5 mg.ml⁻¹ CR
- [257] ·lane 3: DMSO 내의 2 mg.ml⁻¹ CR
- [258] ·lane 4: DMSO 내의 3 mg.ml⁻¹ CR
- [259] ·lane 5: DMSO 내의 4 mg.ml⁻¹ CR
- [260] ·lane 6: DMSO 내의 5 mg.ml⁻¹ CR
- [261] ·lane 7: 스테비오사이드효소 반응액 수용액에 들어 있는 60 mg.ml⁻¹CR
- [262] ·lane 8: 스테비오사이드효소 반응액 수용액에 들어 있는 80 mg.ml⁻¹CR
- [263] ·lane 9: 스테비오사이드효소 반응액 수용액에 들어 있는 100 mg.ml⁻¹CR
- [264]
- [265] 도 11 및 12를 참고하면, 스테비올배당체의 락타아제 효소 반응액을 혼합하는 경우에도 세라마이드 IIIB(CR) 스테비올배당체 복합체가 형성되고, 그 결과 용해도가 증가됨을 확인하였다. 특히, 스테비오사이드락타아제 효소 반응액 80 mg에서 가장 우수한 용해도를 나타내었다.
- [266]
- [267] 실험예 1: SARS의 3CL^{pro}inhibition에 대한 소재 특성 연구
- [268] 중증급성 호흡 증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome; SARS)은 사스-코로나 바이러스(SARS coronavirus, SARS-CoV)가 인간의 호흡기를 침범하여 발생하는 전염병으로, 38°C 이상의 갑작스런 발열, 기침, 호흡곤란, 저산소증, 방사선 촬영상의 폐렴 증상 중 하나 이상이 나타나게 된다. 2002년 11월 중국 남부 광둥(廣東)성에서 발생, 홍콩을 거쳐 벨기에를 제외한 유럽 각국과 미국·캐나다 등 북아메리카, 그리고 한국·일본을 제외한 아시아 각국 등 세계 32개국에서 83,000여 명이 감염되었으며, 이 중 10%가 사망하였다.
- [269] 세계보건기구(WHO)는 사스의 원인병원체를 변종 코로나바이러스로 밝힌 바 있는데, 코로나바이러스는 사람에게서는 경증 또는 중증의 상부 호흡기 질병을 일으키고 동물에게서는 호흡기, 위장관, 간, 신경질환을 일으키는 바이러스이다. 코로나 바이러스는 한 가닥의 RNA를 유전물질로 가지고 있는 바이러스. 인간에게 감염을 일으키는 형태는 제1형과 제2형이 주로 알려져 있으며, 다른 새로운 종류인 것도 나타나고 있어 새로운 변종의 발생에 대한 예방 및 치료방법이 필요하다. 바이러스가 전파되는 경로는 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 현재까지 밝혀진 감염경로는 환자가 재채기나 기침할 때 내뿜는 침방울이고, 이것이 다른 사람의 호흡기로 들어갈 때 전염되는 것으로 알려져있다. 침방울이 전달되는 거리는 보통 1m로 보고 있으며, 공기를 통해 전염이 가능하다는 주장이 제기됐지만 아직 확인되지 않았다.
- [270] 사스-코로나 바이러스에 노출된 후 2~7일 정도의 잠복기가 지나면 발열, 무력감, 두통, 근육통의 신체 전반에 걸친 증상이 나타난다. 이후 기침과 호흡 곤란 증상이 발생하고 25%의 환자에게는 설사가 동반되고, 심한 경우에는 증상이 2주 이상 지속되며 호흡 기능이 크게 나빠지고 급성 호흡곤란 증후군 및 다기관부전증으로 진행된다.

[271]

[272] 1-1. 형질 전환 및 준비 실험

[273] 효모균에서 재조합 사스-코로나바이러스 3CL 프로테아제를 효율적으로 발현할 수 있는 벡터로 사스-코로나바이러스 3CL 프로테아제를 생산하여 연구를 진행하였다. 유전자 확보 및 재조합 발현 벡터 구축은 사스-코로나바이러스 3CL 프로테아제(SARS-CoV 3CL protease)의 유전정보[중증 급성 호흡기 증후군의 원인이 되는 사스-코로나 바이러스 3 C L 프로테아제의 활성 저해제 및 스크리닝 방법, 2014, 국내등록특허 10-1418898]를 바탕으로 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 유전자를 합성하고, 활성 단백질을 발현하기 위하여 pPICZ α A(인비트로젠, 미국) 벡터의 다중 클로닝 위치에 도입하여 α -factor signal peptide 바로 뒤에 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 유전자를 포함하는 재조합 벡터 pPICZ α A-3CLpro를 제작하였다.

[274] 효모균의 형질전환은 준비된 competent cell인 효모균 *Pichia pastoris* GS115 (인비트로젠, 미국)에 240 μ l 50% 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol) 3350, 36 μ l의 1M LiCl, 25 μ l의 single strand salmon sperm DNA(2 mg/ml) 및 재조합 pPICZ α A-3CLpro DNA(5 μ g)를 넣고 1분 동안 격렬하게 혼합하였다. DNA를 삽입하기 위하여 30°C에서 25분 동안 방치한 후 42°C에서 25분 동안 열 충격을 가하였다. 그 이후, 원심 분리하여 세포만 회수하고, 이를 다시 1 ml의 YPD 배지[1%(w/v) 효모 추출액, 2%(w/v) 펩톤, 2%(w/v) 포도당]을 넣어주고 30°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양액을 제오신(Zeocin, 100 μ g/ml)이 첨가된 YPD 고체배지에서 30°C에서 이틀 동안 배양하고, 재조합 사스-코로나바이러스 3CL 프로테아제의 생산은 배양된 형질전환 균주를 BMGY[1%(w/v) 효모 추출액, 2%(w/v) 펩톤, 100 mM 인산칼륨, pH 6.0, 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids, 4 x 10⁻⁵% Biotin, 1%(w/v)글리세롤] 배지에서 28°C에서 18시간 동안 배양하였다. 상기 배양물을 원심 분리하여 회수한 세포를 BMMY[1%(w/v) 효모 추출액, 2%(w/v) 펩톤, 100 mM 인산칼륨, pH 6.0, 1.34% yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids, 4 x 10⁻⁵% Biotin, 0.5%(w/v)메탄올] 배지에 OD 600이 1.0이 되도록 현탁한 후, 28°C에서 4일 동안 배양하였다. 효소 발현을 위해 최종농도 1.0% 메탄올을 24시간마다 배양액에 첨가하였으며, 얻어진 배양액의 상등액으로 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 활성을 확인했다.

[275] 재조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제에 대한 활성 조사를 위하여, 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 분석에 이용되는 기질로서 사스-코로나 바이러스 복제효소(SARS-CoV replicase) 유전자에 의해 합성된 다단백질(pp1ab)에 존재하는 절단 부위를 모방하여 디자인된 합성 펩타이드(DABCYL-Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Leu-Gln-Ser-Gly-Phe-Arg-Lys-Met-Glu-EDANS, Bachem, 스위스)를 이용하였다. 상기 기질에는 형광 도너인 EDANS와 형광 소멸자인 DABCYL이 결합되어 있다[Matayoshi, E.D., Wang, G.T., Kraff, G.A. and

Erickson, J. Novel fluorogenic substrates for assaying retroviral proteases by resonance energy transfer. Science. 247: 954-958(1990)]. 형광은 기질이 절단되어 EDANS group이 DABCYL group으로부터 분리되었을 때만 확인된다[Luker, K.E., Francis, S.E., Gluzman, I.Y. and Goldberg. Kinetic analysis of plasmepsin I and II aspartic protease of the Plasmodium falciparum digestive vacuole. Mol. Biochem.Parasitol. 79:71-78(1996)].

[276]

[277] 1-2. 사스-코로나 바이러스 3CL 프로타아제 준비 및 저해 실험

[278] 제조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제의 활성을 확인하기 위하여, 기질을 최종농도 20 μ M 농도로 20 mM Tris 완충액(pH 7.5)에 녹여 사용하였다. 제조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 3 μ g을 45종의 저해 활성 후보물질(최종농도 100 μ M)과 혼합하여 25°C에서 25분 반응시킨 후, 반응 산물은 형광 마이크로 플레이트 리더 SpectraMax Gemini XPS (Molecular Devices, USA) 기기를 이용하여 형광 세기[흡수(excitation) 355 nm, 방출(emission) 538 nm]를 측정하였다. 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제에 의해 기질이 분해됨에 따라 형광 세기가 증가하는 특성을 이용하여 저해 후보물질들에 대한 활성저해를 측정하였다. 제조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제 활성 저해를 비교하기 위하여, 저해 활성 물질 첨가 없이 단지 제조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제와 기질만을 포함하는 반응액을 대조군으로 사용했으며 종의 활성 저해 후보물질 중 우수한 활성저해를 나타내는 화합물을 선별하고자 하였고 활성 저해의 기준은 저해 활성 물질을 첨가하지 않았을 때의 제조합 사스-코로나 바이러스 3CL 프로테아제의 활성저해를 0%로 기준하고 화합물 첨가 후의 저해 효과에 의해 나타나는 활성을 %로 나타내었다.

[279] 형광 기질에 대한 효소의 Km 값은 $15.16 \pm 1.26 \mu$ M이었다. 루부소사이드(Ru), 올레아논산(OA), 루부소사이드와 혼합된 올레아논산 루부소사이드 복합체(OA-Ru)을 시료로 사용하였으며, 효소반응 다이제스트(100 μ l)는 3 μ g enzyme, 16 μ M FRET 기질, 200 μ M 각 소재, 20 mM Tris buffer (pH 7.5)를 혼합했으며, 반응은 25°C에서 20분 동안 진행하였다. 저해 정도는 하기 수식을 이용하여 계산하고, 그 결과를 도 13 및 표 8에 나타내었다.

[280] % inhibition = 100 - remaining activity (%), Remaining activity (%) = [(S-So)/(C-Co)] $\times$ 100

[281] 상기 식에서, C는 대조군(enzyme, buffer, 그리고 substrate)의 18분 배양 이후의 형광을 나타내고, Co는 0분의 형광을 나타내고, S는 실험 시료(효소, 실험 시료, 완충액 및 기질)의 20분 배양 이후의 형광을 나타내고, So는 0분에서의 실험 시료의 형광을 나타낸다.

[282] 표 8

[Table 8]

Compound	IC ₅₀ (μ M)
루부소사이드	10.73x10 ³
DMSO 내의 올레아논산	96.59
루부소사이드와 혼합된 올레아논산	17.38

[283] 도 13을 참고하면, 올레아논산(OA)를 루부소사이드와 혼합하여 복합체를 제조하는 경우, 단순 올레아논산(OA)를 DMSO에 용해시키는 경우에 비해 현저히 적은 양의 농도로도 3CL 프로테아제의 활성을 억제한다는 것이 확인되었다.

[284] 표 8을 참고하면, 올레아논산(OA)를 루부소사이드와 혼합하여 복합체를 제조하는 경우, 단순 올레아논산(OA)를 DMSO에 용해시키는 경우에 비해 약 5.6배 이상으로 저해능이 개선됨이 확인되었다.

[285]

[286] 1-3: 인간 티로시나아제(tyrosinase) 준비 및 OA, ID, PS 및 CR의 효소활성저해 실험

[287] 인간 tyrosinase (HTY)유전자를 합성하고, 발현시키는 방법은 본 발명자의 기존에 공지된 방법을 이용하였으며(Gene bank M62238.1) [Thi, T. H. N., Y. H. Moon, Y. B. Ryu, Y. M. Kim, S. H. Nam, M. S. Kim, A. Kimura, and D. Kim (2013) The influence of flavonoid compounds on the in vitro inhibition study of a human fibroblast collagenase catalytic domain expressed in E. coli. Enzyme Microb Tech. 52: 26-31], IC₅₀ 수치를 통해 티로시나아제에 대한 저해 특성을 확인하였다. HTY에 대한 OA, ID, PS 및 CR의 효소활성 저해능을 하기의 표 9에 나타내었다.

[288] 표 9

[Table 9]

Compound	DMSO 또는 DMF 내의 IC ₅₀ (μ M)	루부소사이드 내의 IC ₅₀ (μ M)
올레아논산	41.1	39.6
이테베논	74.8	-
파이토스핑고신	23.2	-
세라마이드 IIIB	Complete no solubility(can not detected)	-

[289] 표 9를 참고하면, 올레아논산(OA)이 루부소사이드와 혼합되어 복합체를 형성하는 경우 올레아논산(OA)의 용해도가 증가하여, 단순히 올레아논산(OA)만 DMSO에 용해된 경우에 비해 우수한 효소활성 저해 효과를

찾는 것이 확인되었다.

[290]

[291] 실험예 2: 스테비올배당체를 이용한 EGCG 수용화 증가 확인

[292] 2-1. 수용화 시험

[293] 난용성 소재로서 EGCG를 사용한 것을 제외하고는 실시예 1-1과 동일한 방법으로 EGCG 용해도 증가 확인 실험을 수행하고, 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 스테비올배당체와 EGCG 가 복합체를 형성하는 경우 EGCG 의 용해도를 하기의 표 10에 나타내었다.

[294] 표 10

[Table 10]

스테비올배당체 종류	물에 대한 처리 EGCG solubility (mg/ml)
SM(10%)	355
스테비오사이드(10%)	312
리바우디오사이드(10%)	241
루부소사이드 1%	396
물	20

[295]

[296] 상기 표 10으로부터 알 수 있듯이, 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 스테비올배당체와 EGCG가 복합체를 형성하는 경우 EGCG의 용해성은 루부소사이드, 스테비오사이드, 레바오디오사이드 및 스테비올배당체와 복합체를 형성하지 않는 경우에 비해 약 10 내지 약 20배 이상 증가함을 확인하였다.

[297]

[298] 2-2. 사람 소장 말타아제 활성 억제 특성

[299] 스테비올배당체와 EGCG 복합체가 사람소장 말타아제 활성 저해 특성을 확인하기 위하여, 0.04 U HMA(사람소장말타아제)/mL, 5 mM 말토오스(maltose), 100 μ M 테스트 시료를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5)에서 혼합하여 반응을 수행하였다.

[300] 사람소장말타아제에 의해 말토오스로부터 분해되어 나오는 포도당의 양은 Glucose-E kit (Korea)를 이용하여 확인하고, 그 결과를 하기의 표 11에 나타내었다.

[301] 표 11

[Table 11]

준비한 EGCG	사람 소장 말타아제 저해정도[100 μ M 처리시 저해 %]
스테비올배당체 무-처리 DMSO에서 녹인 EGCG	75.6
스테비올배당체 무-처리 물에서 녹인 EGCG	58.2
EGCG-SM 10%	79.9
EGCG-스테비오사이드 10%	61.2
EGCG- 리바우디오사이드 10%	76.7
EGCG - 루부소사이드 1%	76.7
EGCG - 루부소사이드 10%	92.15

[302] 상기 표 11로부터 알 수 있듯이, 스테비올배당체와 혼합 용해된 스테비올배당체 EGCG 복합체의 경우, EGCG를 스테비올 배당체와 혼합하지 않고 물에 녹인 경우에 비해 사람소장말타아제의 활성 억제 효과가 약 1.5배 증가함을 확인하였다. 또한, 루부소사이드를 10% 중량비로 혼합한 복합체의 경우 가장 우수한 소장말타아제 활성 억제 효과를 나타내었다.

[303]

[304] 실험예 3: 아스트라갈린 용해도 증가 확인

[305] 3-1. 수용화 시험

[306] 상기 실험예 2와 동일한 방법을 이용하여 아스트라갈린의 용해도를 측정하고, 그 결과를 하기의 표 12에 나타내었다.

[307] 표 12

[Table 12]

Rubusoside 첨가양 (%)	Astragalin	
	첨가한 아스트라갈린 양 (mg.ml ⁻¹)	Detected in Ru solution (mg. ml ⁻¹)
0.5	50	8.9 ± 0.8
1.0		12.7 ± 1.2
2.0		13.3 ± 1.3
3.0		20.9 ± 0.7
4.0		35.3 ± 2.2
5.0		37.0 ± 0.4
7.5		37.4 ± 2.2
10		39.0 ± 3.4

[308] 상기 표 12로부터 알 수 있듯이, 복합체 형성을 위해 첨가하는 루부소사이드의 함량이 증가할 수록 아스트라갈린의 용해도가 증가함이 확인되었다.

[309]

[310] 3-2. SARS 3CL^{pro}의 활성 저해 정도

[311] 실험예 1과 동일한 방법을 이용하여 20 μ M 아스트라갈린을 루부소사이드와 혼합하여 DMSO에 녹이고 SARS 3CL^{pro}의 활성 저해 정도를 측정하고 그 결과를 하기의 표 13에 나타내었다.

[312] 표 13

[Table 13]

시료	IC ₅₀ (μ M)
루부소사이드	10.73 x 10 ³
DMSO에 녹인 아스트라갈린	115.40 ± 3.64
루부소사이드 처리 후 녹인 아스트라갈린	69.16 ± 2.37

[313] 상기 표 13을 참고하면, 아스트라갈린을 루부소사이드와 혼합하여 용해시키는 경우, 루부소사이드와 혼합하지 않고 단독으로 DMSO에 용해시킨 경우에 비해 3CL 프로테아제 활성 억제능이 우수하다는 것이 확인되었다.

[314]

[315] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라

설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

- [316] 부호의 설명
- [317] OA: Oleanolic acid
- [318] ID: Idebenone
- [319] PS: Phytosphingosine
- [320] CR: Ceramide IIIB
- [321] Ru: Rubusoside
- [322] Ste: Stevioside
- [323] Reb: Rebaudioside
- [324] M: Steviol glycoside mix

청구범위

- [청구항 1] 스테비올배당체와 난용성 소재를 에탄올에 혼합하고 교반하는 제 1 단계;
상기 혼합물을 원심 분리하는 제 2 단계;
상등액을 분리하는 제 3 단계; 및
분리된 상등액 내에 포함된 에탄올을 제거하는 제 4 단계;를 포함하는
용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 제 1 단계 이전에 스테비올 배당체와 효소를 혼합하여 스테비올 배당체 효소 반응액을 제조하는 단계를 더 포함하는
용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 제 1 단계에서는 상기 스테비올 배당체 효소 반응액을 사용하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 4] 제2항에 있어서,
상기 효소는 락타아제인 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 난용성 소재 100 중량부당 상기 스테비올배당체는 800 내지 1200 중량부의 비율로 혼합되는 것인 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 스테비올배당체는 스테비오사이드(stevioside), 레바오디오사이드 A(rebaudioside A), 레바오디오사이드 B(rebaudioside B), 레바오디오사이드 C(rebaudioside C), 레바오디오사이드 D(rebaudioside D), 레바오디오사이드 E(rebaudioside E), 루부소사이드(rubusoside), 둘코사이드 A(dulcoside a), 스테비올사이드(steviolside) 또는 이들의 혼합물을 포함하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 난용성 소재는 올레아논산(oleanolic acid), 이데베논(idebenone), 파이토스핑고신(phytosphingosine),

세라마이드 IIIB(ceramide IIIB), 에피갈로카테킨 갈레이트(epigallocatechin gallate) 및 아스트라갈린(astragalin)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.

[청구항 8]

제1항에 있어서,
스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 올레아논산(OA)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 1이 성립하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.

[관계식 1]

$$Y = 0.90 \times X - 0.38$$

상기 식에서, Y는 OA의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 Ru의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[청구항 9]

제1항에 있어서,
스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 이데베논(ID)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 2가 성립하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.

[관계식 2]

$$Y = 2.94 \times X - 4.58$$

상기 식에서 Y는 이데베논(ID)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 루부소사이드(Ru)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[청구항 10]

제1항에 있어서,
스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 파이토스핑고신(PS)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 3이 성립하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.

[관계식 3]

$$Y = 0.94 \times X - 0.90$$

상기 식에서 Y는 파이토스핑고신(PS)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타내고, X는 루부소사이드(Ru)의 농도(mg.ml⁻¹)를 나타낸다.

[청구항 11]

제1항에 있어서,
스테비올배당체로서 루부소사이드(Ru)와 난용성 소재로서 세라마이드 IIIB(CR)을 혼합하는 경우, 하기의 관계식 4가 성립하는 것인, 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 제조 방법.

[관계식 4]

$$Y = 0.15 \times X - 0.29$$

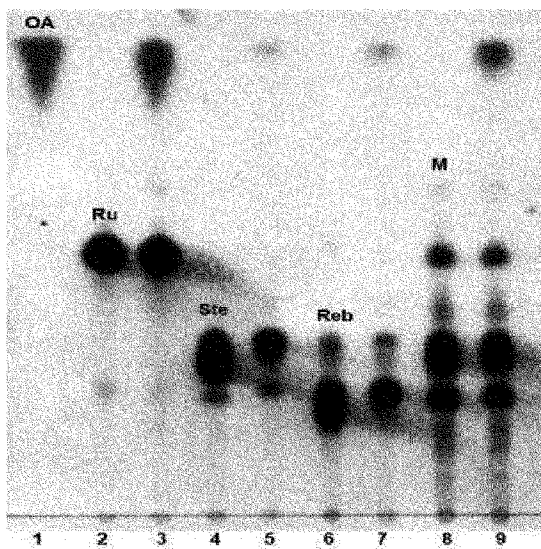
[청구항 12]

상기 식에서 Y는 세라마이드 IIIB(CR)의 농도($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)를 나타내고, X는 루부소사이드(Ru)의 농도($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)를 나타낸다.
제1항 내지 제 11항 중 어느 한 항의 제조 방법에 의하여 제조된 용해도가 개선된 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체.

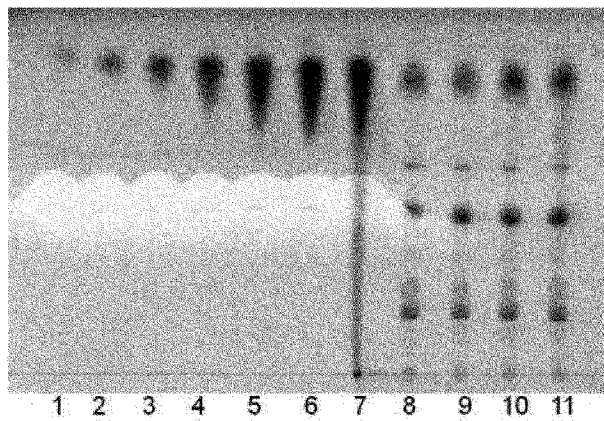
[청구항 13]

제1항에 있어서,
상기 제 4 단계에서 얻어진 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 생성물을 수용매에 용해시키고 교반한 후 원심분리하는 제 5 단계; 및
원심 분리된 상등액을 분리하는 제 6 단계;를 더 포함하는 것인 난용성 소재와 스테비올 배당체의 복합체 용액의 제조 방법.

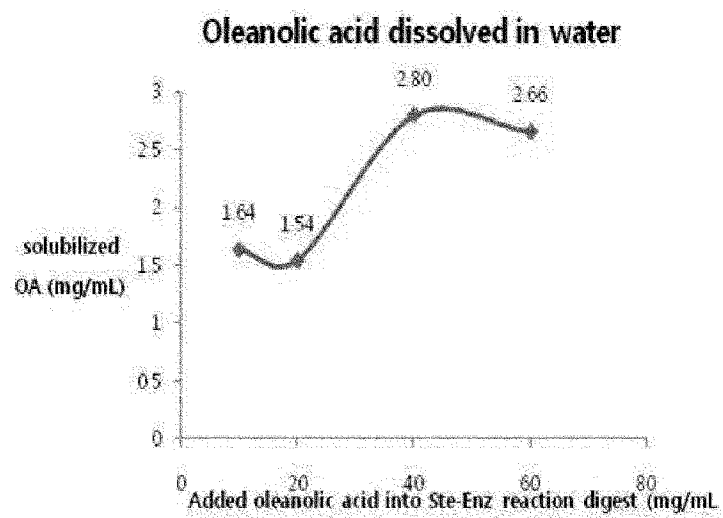
[Fig. 1]



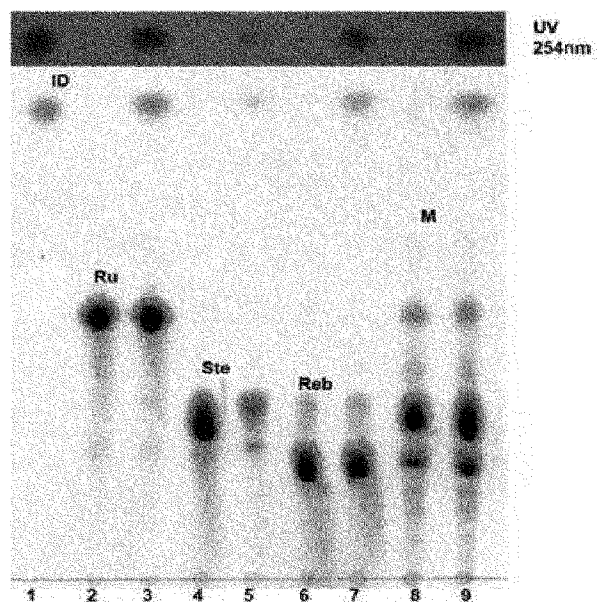
[Fig. 2]



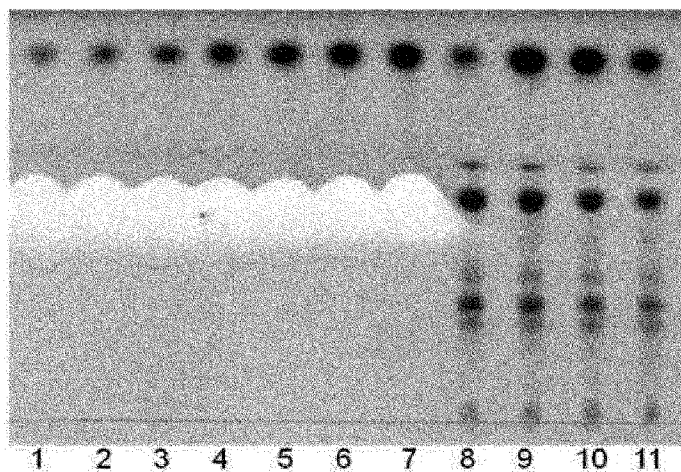
[Fig. 3]



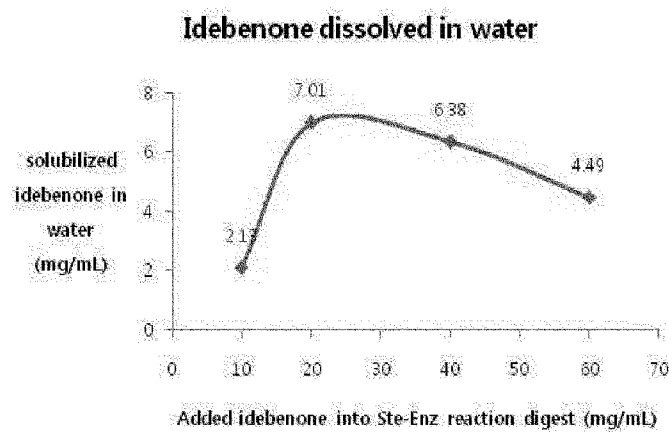
[Fig. 4]



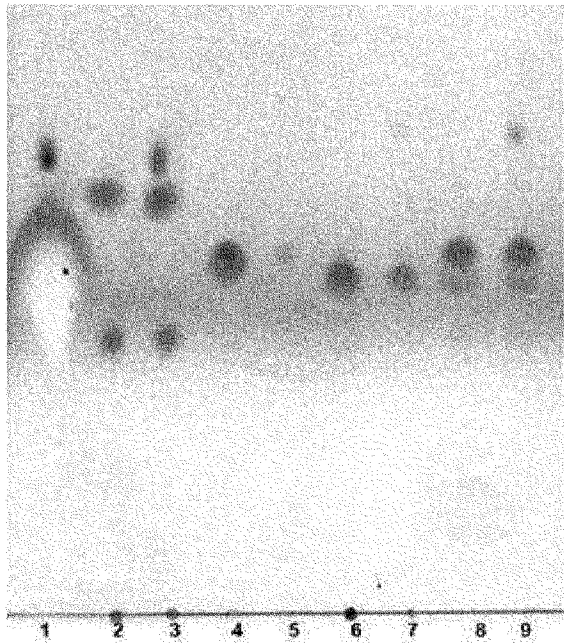
[Fig. 5]



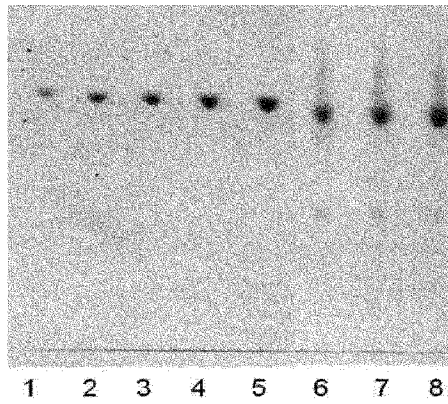
[Fig. 6]



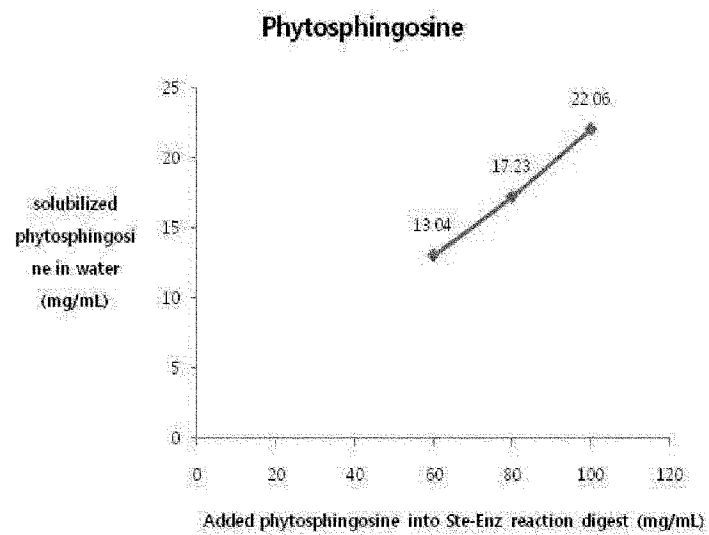
[Fig. 7]



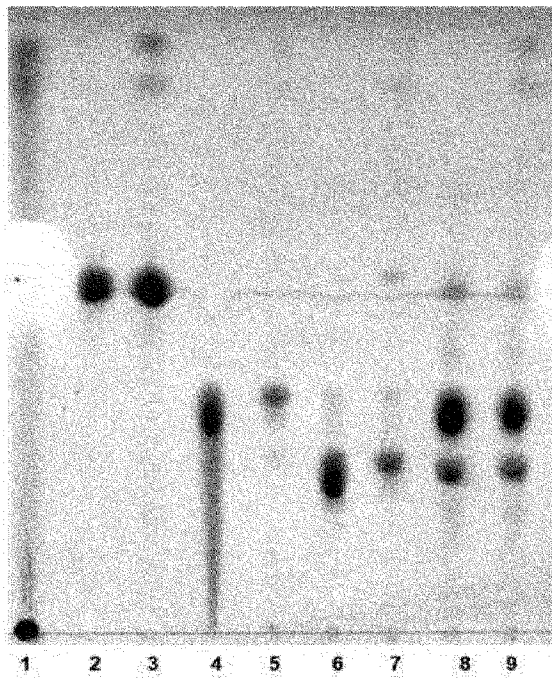
[Fig. 8]



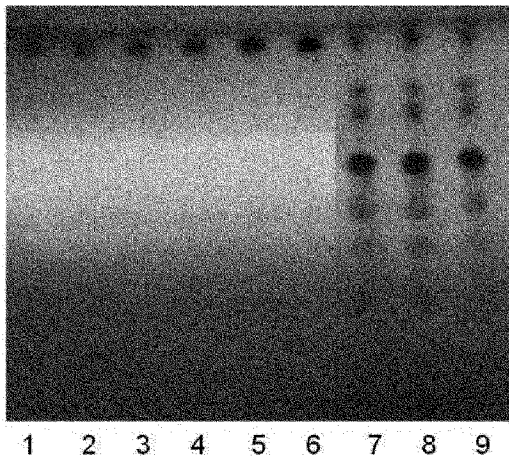
[Fig. 9]



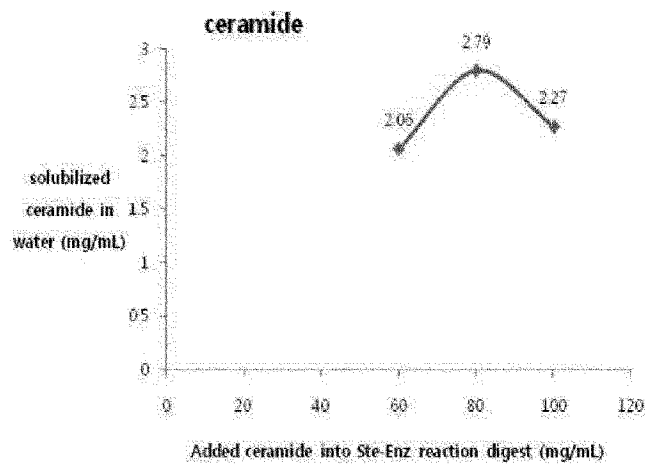
[Fig. 10]



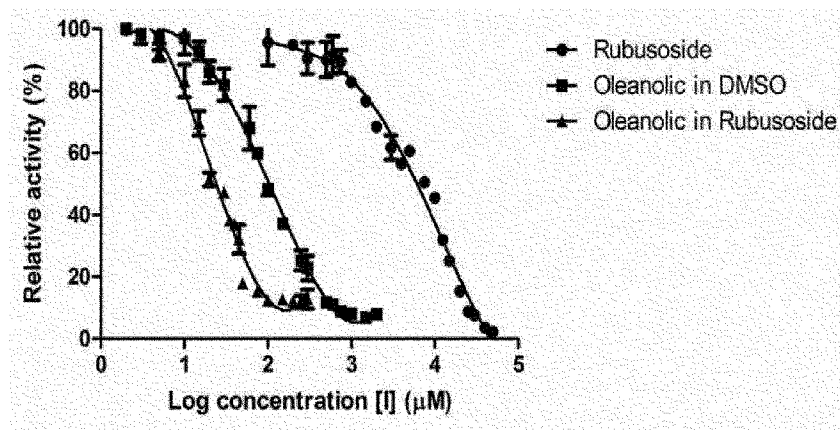
[Fig. 11]



[Fig. 12]



[Fig. 13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003643

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07H 15/256(2006.01)i, A61K 47/06(2006.01)i, A61K 47/08(2006.01)i, A61K 31/7042(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A23K 1/16(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)

C07H 15/256; A61K 31/10; C12P 19/46; A61K 9/127; A61K 9/16; A61K 9/48; A23L 1/30; A23L 2/38; A61K 47/26; A61K 47/48; C12P 19/02; A61K 47/06; A61K 47/08; A61K 31/7042; A61K 8/60; A23K 1/16

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: steviol glycosides, water insoluble material, ethanol, centrifugation, composite

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011-0033525 A1 (LIU, Zhijun) 10 February 2011 See claims 1-2, 29 and 31; paragraph [0072].	1-13
Y	EP 2292214 B1 (TOYO SUGAR REFINING CO., LTD.) 23 July 2014 See claims 1-6; paragraph [0052].	1-13
Y	WAN, Hui - Da et al., "Enzymatic Preparation of A Natural Sweetener Rubusoside from Specific Hydrolysis of Stevioside with β -Galactosidase from <i>Aspergillus</i> Sp.", <i>Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic</i> , October 2012, vol. 82, pages 12-17 See abstract; page 13, "2.3 Enzymatic hydrolysis of stevioside by β -galactosidase" section.	4
Y	WO 2013-133689 A1 (PURECIRCLE SDN BHD) 12 September 2013 See abstract; paragraph [0065]; claim 1.	4
A	KR 10-2013-0014451 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 07 February 2013 See claims 1 and 14-21.	1-13
A	JP 2005-168458 A (TOYO SEITO K.K.) 30 June 2005 See claims 1, 3-4 and 5.	1-13



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

30 NOVEMBER 2015 (30.11.2015)

Date of mailing of the international search report

30 NOVEMBER 2015 (30.11.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/003643

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	POLYAKOV, N. E. et al., "Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector: Synergy of Drug Transport and Efficacy", 2011, vol. 2, pages 64-72 See abstract.	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/003643

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 2011-0033525 A1	10/02/2011	AU 2009-234283 A1 AU 2009-234283 B2 CA 2758122 A1 EP 2276463 A2 EP 2276463 A4 JP 2011-517686 A WO 2009-126950 A2 WO 2009-126950 A3	15/10/2009 02/04/2015 15/10/2010 26/01/2011 04/12/2013 16/06/2011 15/10/2009 10/12/2009
EP 2292214 B1	23/07/2014	EP 2292214 A1 JP 05-653602 B2 JP 2011-051938 A US 2011-0189311 A1	09/03/2011 14/01/2015 17/03/2011 04/08/2011
WO 2013-133689 A1	12/09/2013	NONE	
KR 10-2013-0014451 A	07/02/2013	KR 10-1436464 B1 WO 2013-019049 A1	01/09/2014 07/02/2013
JP 2005-168458 A	30/06/2005	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07H 15/256(2006.01)i, A61K 47/06(2006.01)i, A61K 47/08(2006.01)i, A61K 31/7042(2006.01)i, A61K 8/60(2006.01)i, A23L 1/30(2006.01)i, A23K 1/16(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07H 15/256; A61K 31/10; C12P 19/46; A61K 9/127; A61K 9/16; A61K 9/48; A23L 1/30; A23L 2/38; A61K 47/26; A61K 47/48; C12P 19/02; A61K 47/06; A61K 47/08; A61K 31/7042; A61K 8/60; A23K 1/16

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: 스테비올배당체, 난용성 소재, 에탄올, 원심분리, 복합체

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	US 2011-0033525 A1 (LIU, ZHIJUN) 2011.02.10 청구항 1-2, 29 및 31; 단락 [0072] 참조.	1-13
Y	EP 2292214 B1 (TOYO SUGAR REFINING CO., LTD.) 2014.07.23 청구항 1-6; 단락 [0052] 참조.	1-13
Y	WAN, HUI-DA 등, 'Enzymatic preparation of a natural sweetener rubusoside from specific hydrolysis of stevioside with β -galactosidase from <i>Aspergillus</i> sp.', Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2012.10., 82권, 12-17 페이지 요약; 13 페이지, '2.3 Enzymatic hydrolysis of stevioside by β -galactosidase' 섹션 참조.	4
Y	WO 2013-133689 A1 (PURECIRCLE SDN BHD) 2013.09.12 요약; 단락 [0065]; 청구항 1.	4
A	KR 10-2013-0014451 A (한국생명공학연구원) 2013.02.07 청구항 1 및 14-21 참조.	1-13
A	JP 2005-168458 A (TOYO SEITO K.K.) 2005.06.30 청구항 1, 3-4 및 5 참조.	1-13

☒ 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

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

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

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

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

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

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

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 11월 30일 (30.11.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 11월 30일 (30.11.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



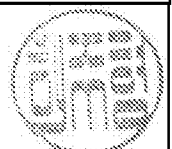
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	POLYAKOV, N. E. 등, `Glycyrrhizic Acid as a Novel Drug Delivery Vector: Synergy of Drug Transport and Efficacy`, 2011, 2권, 페이지 64-72 요약 참조.	1-13

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 2011-0033525 A1	2011/02/10	AU 2009-234283 A1 AU 2009-234283 B2 CA 2758122 A1 EP 2276463 A2 EP 2276463 A4 JP 2011-517686 A WO 2009-126950 A2 WO 2009-126950 A3	2009/10/15 2015/04/02 2010/10/15 2011/01/26 2013/12/04 2011/06/16 2009/10/15 2009/12/10
EP 2292214 B1	2014/07/23	EP 2292214 A1 JP 05-653602 B2 JP 2011-051938 A US 2011-0189311 A1	2011/03/09 2015/01/14 2011/03/17 2011/08/04
WO 2013-133689 A1	2013/09/12	없음	
KR 10-2013-0014451 A	2013/02/07	KR 10-1436464 B1 WO 2013-019049 A1	2014/09/01 2013/02/07
JP 2005-168458 A	2005/06/30	없음	