



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0064492
(43) 공개일자 2017년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/164 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/5161 (2013.01)
A61K 31/164 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0163073
(22) 출원일자 2016년12월01일
심사청구일자 2016년12월01일
(30) 우선권주장
1020150169727 2015년12월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)
(72) 발명자
신화성
인천광역시 연수구 먼우금로 126, 210동 1201호(동춘동, 현대대림2차아파트)
윤광흠
경기도 용인시 기흥구 강남서로 62, 110호(구갈동)
정상명
서울특별시 강남구 논현로51길 25, 현대그린아파트동 304호(도곡동, 현대그린아파트)
(74) 대리인
김순웅

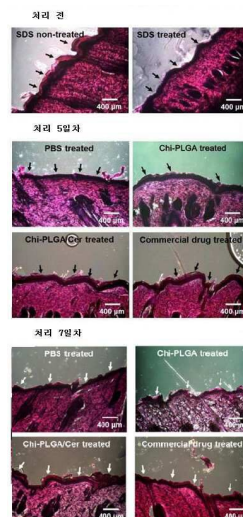
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 온도 및 pH 민감성 나노입자 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 pH 및 온도, 즉 두 가지 인자에 의하여 정교하게 약물 방출이 조절되며, 보다 구체적으로 생체적합한 키토산 코팅으로 pH에 따른 PLGA 나노입자 내 약물 분비 조절이 가능하고, 더 나아가 온도 변화에 따라 약물 전달을 제어할 수 있다. 따라서 본 발명의 나노입자는 다양한 피부 질환에 대한 예방 또는 치료물질을 함유하는 의약품으로 활용될 수 있고, 특히 세라마이드를 포함하는 PLGA 나노입자로서 아토피 피부염, 건선 등과 같은 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 피부 외용제 및 화장품 조성물 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도11



(52) CPC특허분류

A61K 9/5153 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 48861-1

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양수산개발원

연구사업명 해양생명공학 기술개발

연구과제명 해양유래 세포지지체를 이용한 동물시험 대체 및 이식용 인공피부 개발

기 여 율 1/1

주관기관 포항공과대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

(a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 pH 4.5 내지 6에서 키토산 코팅이 제거되어 약물이 방출되는 것을 특징으로 하는, pH 및 온도 민감성 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 30 내지 40 °C에서 수축되어 약물을 방출하는 것을 특징으로 하는, pH 및 온도 민감성 나노입자.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 45 내지 55 mV의 제타전위를 갖는 것을 특징으로 하는, pH 및 온도 민감성 나노입자.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 150 내지 250 nm의 지름을 갖는 것을 특징으로 하는, pH 및 온도 민감성 나노입자.

청구항 6

(a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 약물전달체.

청구항 7

(a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 피부 질환은 아토피, 여드름, 건선, 습진, 피부건조증, 피부 알러지로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 질환인 것을 특징으로 하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

(a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 개선용 피부 외용제 조성물.

청구항 10

(a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 보습용 화장료 조성물.

청구항 11

(1) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체를 PVA(폴리비닐 알코올) 용액에 첨가하고 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;

(2) 상기 혼합물에 세라마이드를 첨가하여 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자를 제조하는 단계; 및

(3) 상기 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자에 키토산 용액을 첨가하여 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는, 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자의 제조방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 (1) 내지 (3) 단계 중 1 이상의 단계는 2℃ 내지 6℃에서 수행하는 것을 특징으로 하는, pH 및 온도 민감성 나노입자의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 각질층 또는 피부 장벽(Stratum corneum, Skin barrier)은 죽은 각질세포(Corneocyte)와 세포간 지질(Intercellular lipid)로 구성되어 있고, 외부 자극으로부터 피부를 보호하며 피부에서 수분이 증발하는 것을 막아주는 피부 보호막으로서 피부건강에 핵심적인 기능을 담당한다. 특히, 피부의 수분 불투과성은 죽은 각질세포(corneocyte)와 세포간 지질에 의해 획득되는데, 죽은 각질세포의 표면을 구성하는 각질세포 외피(corneocyte envelope)는 세포간 지질의 안정성에 중요한 역할을 한다.

[0004] 세라마이드는 스핑고신, 피토스핑고신, 스핑가닌이라는 스핑고 염기(sphingoid base)에 지방산이 아미드 결합된 물질이다. 세라마이드는 그 구조를 이루는 지방산 및 스핑고 염기의 종류에 따라 분류되며, 피부에서는 현재까지 7~9종의 세라마이드가 확인되었고 그 기능에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

- [0005] 현재까지 알려진 피부에서의 세라마이드의 대표적인 역할은 지질 이중층을 형성하고 피부 보습을 담당하는 것 외에도, 콜레스테롤의 용해성에 기여, 생체막의 유동성 감소, 피부세포 분화와 성장 촉진, 및 피부에서의 신호 전달 매개 등이 있다. 다만, 세라마이드의 농도가 과하게 되면, 오히려 피부 재생을 방해하여 세포 사멸을 유도하고 피부 염증 및 노화를 촉진할 수 있기 때문에, 이의 농도를 적절한 농도로 조절하는 것은 매우 중요하다.
- [0006] 나노입자 시스템을 사용하는 캡슐화(encapsulation)는 약물 표적화와 전달에 이용될 수 있다. 특히, 최근 pH, 산화환원 반응에 감응하여 구조가 붕괴되는 가교제를 이용한, 고분자 나노입자에 대한 연구가 보고된 바 있다. 다만, 상기 나노입자는 유기 가교제를 사용하므로 체내에서 나노입자의 화학적 구조가 변질되며 또한 분해시 독성 부산물을 발생시킬 수 있다는 단점이 있어 인체에 응용되는 데 한계가 있다.
- [0007] 따라서, 독성이 없으며 동시에 정교하게 온도나 pH 등의 외부 자극에 의하여 조절될 수 있는 나노전달체의 개발이 중요한 이슈라고 할 수 있다. 이에 본 발명자들은 생체적합한 물질로서 약물 전달체로 사용할 수 있는 나노입자를 연구하던 중 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자가 pH 및 온도에 민감하며, 동시에 생체에서 독성을 나타내지 않고, 약물 전달 효율이 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국특허공개문헌 제10-2016-0117794호
(특허문헌 0002) 한국특허공개문헌 제10-2016-0110864호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자 및 약물 전달체를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 피부 질환 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 (1) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체를 PVA(폴리비닐 알코올) 용액에 첨가하고 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (2) 상기 혼합물에 세라마이드를 첨가하여 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자를 제조하는 단계; 및 (3) 상기 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자에 키토산 용액을 첨가하여 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는, 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 약물전달체를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0017] 또한, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 보습용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 (1) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체를 PVA(폴리비닐 알코올) 용액에 첨가하고 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (2) 상기 혼합물에 세라마이드를 첨가하여 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자를 제조하는 단계; 및 (3) 상기 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자에 키토산 용액을 첨가하여 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는, 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 pH 및 온도, 즉 두 가지 인자에 의하여 정교하게 약물 방출이 조절되며, 보다 구체적으로 생체적합한 키토산 코팅으로 pH에 따른 PLGA 나노입자 내 약물 분비 조절이 가능하고, 더 나아가 온도 변화에 따라 약물 전달을 제어할 수 있다. 따라서 본 발명의 나노입자는 다양한 피부 질환에 대한 예방 또는 치료물질을 함유하는 의약품으로 활용될 수 있고, 특히 세라마이드를 포함하는 PLGA 나노입자로서 아토피 피부염, 건선 등과 같은 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 피부 외용제 및 화장품 조성물 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자가 약물 전달체로서 적용되는 기본 원리를 나타내는 도이다.
- 도 2는 TEM을 통하여 키토산 코팅되지 않은 PLGA 나노입자, 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(4 ℃) 및 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(36 ℃)의 형태학적 관찰 결과를 나타내는 도이다.
- 도 3은 레이저 입자 크기 분석기를 이용한 제타전위 값을 그래프화하여 나타내는 도로, (a)는 PLGA 나노입자, (b)는 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자, (c)는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 및 (d)는 세라마이드가 담지되고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자에 대한 결과를 나타내었다.
- 도 4는 적외선 분광법(FT-IR)을 통한 PLGA 나노입자의 구성을 분석한 결과를 나타내는 도로, (a)는 PLGA, 세라마이드, PVA 및 키토산 단독, (b)는 PLGA 나노입자(PLGA NP), 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자(PLGA NP including Cer) 및 세라마이드가 담지되고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-PLGA/Cer)에 대한 결과를 나타내었다.
- 도 5는 세라마이드가 담지된 키토산 코팅된 PLGA 나노입자에서 키토산 농도 및 세라마이드 간 상관관계를 확인한 결과를 나타내는 도로, 구체적으로 (a)는 형광아민 분석법을 통한 키토산 코팅으로 인하여 흡수되는 키토산의 양을 정량화한 그래프, (b)는 랭뮤어 방정식 모델에 따른 그래프, (c)는 BET 방정식 모델에 따른 그래프, (d)는 프로인틀리히 모델에 따른 그래프를 나타내는 도이다. 좌측 그래프는 세라마이드를 담지하지 않는 키토산 코팅된 PLGA 입자에 대한 그래프이고, 우측 그래프는 세라마이드를 담지하는 키토산 코팅된 PLGA 입자에 대한 그래프를 나타내었다.
- 도 6은 박층크로마토그래피(TLC)를 통한 온도에 따른 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자의 세라마이드 방출 특성을 분석한 결과를 나타내는 도로, (1)은 키토산 코팅되지 않은 PLGA 나노입자(4 ℃), (2)는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(4 ℃), (3)은 키토산 코팅되지 않은 PLGA 나노입자의 상층액(4 ℃), (4)는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 상층액(4 ℃), (5)는 키토산 코팅되지 않은 PLGA 나노입자의 상층액(36 ℃) 및 (6)은 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 상층액(36 ℃)에 대한 결과를 나타내었다.
- 도 7은 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 통한 온도 및 pH에 따른 세라마이드를 담지하지 않는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 방출 특성을 나타내는 도이다.

도 8은 MTT 분석을 통한 피부 섬유아 세포독성을 나타내는 도이다.

도 9는 MTT 분석을 통한 피부 섬유아 세포 생존능력을 나타내는 도이다.

도 10은 FITC-표지를 통한 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 피부 투과성을 나타내는 도이다.

도 11은 H&E 염색을 통한 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자가 방출하는 세라마이드의 생체 내(in vivo) 아토피 개선 효과를 나타내는 도이다. commercial drug로는 노보손 크림을 사용하였다.

도 12는 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자가 방출하는 세라마이드의 생체 내(in vivo) 아토피 개선 효과를 H&E 염색 결과의 정량화를 통해 그래프로 나타내는 도이다.

도 13은 필라그린 염색면역법을 통한 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 생체 내(in vivo) 아토피 개선 효과를 나타내는 도로, (a)는 PBS, (b)는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자, (c)는 세라마이드가 담지되고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 및 (d)는 노보손 크림을 처리한 것이며, 각 물질을 처리하고 7일이 경과한 후 래트의 피부를 관찰한 결과를 나타내었다.

도 14는 염증 인자 발현 분석을 통한 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자의 생체 내(in vivo) 안정성을 나타내는 도로, 래트에 상기 나노입자를 처리하고 (a) 5일 경과 후, (b) 7일 경과 후 결과를 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자를 제공한다.
- [0025] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0026] 본 발명에 있어서, "PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체"는 Poly(lactic acid)(PLA)와 Poly(glycolic acid)(PGA) 단량체를 중합시켜서 얻은 물질이다. 상기 공중합체는 락트산은 트리카복실산 회로로 도입하고, 대사되어 CO₂ 및 물로서 제거되고, 글리콜산은 소변에 비변형 상태로 배출되거나, 크랩스 회로로 도입하여 또한 CO₂ 및 물로서 제거되는 바, 생분해성, 생체 적합성을 가지며, 세포 흡수율이 높은 것이 특징이다.
- [0027] 본 발명에 있어서, "세라마이드"는 9,10,16-트리하이드록시팔미틴산과 알킬옥시-3-하이드록시-2-아미노프로판의 축합반응으로 합성되는 화합물로서, 이의 유도체 또는 베타메타손발레레이트가 세라마이드를 대체하여 본 발명의 범위에 포함될 수 있다. 다만, 스테로이드 성분의 약물은 내분비계의 교란 등의 부작용이 존재하고 장기적인 치료에 적합하지 않는바, 스테로이드 성분을 포함하지 않는 세라마이드를 본 발명의 구성으로서 활용하는 경우 pH 및 온도 민감성을 가지는 나노입자로서 약물 전달 효과가 보다 현저하다.
- [0028] 본 발명에 있어서, "담지"는 어떤 물질, 물건 등을 넣는 것을 의미하며, 넣는 방법을 가리지 않고 넣는 모든 것을 포함한다.
- [0029] 본 발명에 있어서, "키토산"은 게나 가재, 새우 껍데기에 들어 있는 키틴을 탈아세틸화하여 얻어낸 물질을 말한다.
- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 산성 pH에서 용해되어 키토산 코팅이 제거될 수 있으며, 바람직하게는 pH 7 미만, 보다 바람직하게는 pH 4.5 내지 6에서 키토산 코팅이 제거되어 약물을 방출할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 키토산 코팅이 제거된 나노입자는 체온 범위, 바람직하게는 30 내지 40 °C 범위의 온도에서 PLGA 나노입자가 수축되어 약물 방출 속도가 증가하는 것을 특징으로 한다. 상기와 같이 본 발명의 세라마이드가 담지되고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 pH 및 온도, 즉 두 개의 인자에 의하여 약물 방출이 정교하게 제어되는바, 효과적인 약물 전달을 위한 나노입자로서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 일정 범위의 제타전위를 가지며, 바람직하게는 40 내지 60 mV의 제타전위, 보다 바람직하게는 45 내지 55 mV의 제타전위를 가지며, 이는 상기 나노입자 내 키토산과 PLGA 나노입자 간에 정전기적 상호작용이 나타나고, 그 외 추가적인 화학 반응이 수반되지 않음을 나타낸다. 이

와 같이 화학 반응이 수반되지 않기 때문에 키토산 코팅으로 PLGA 나노입자의 성질이 변형되지 않고, 이에 따라 본 발명의 pH 및 온도 민감성 나노입자가 탁월한 약물 전달체로서 사용될 수 있다. 상기 제타전위는 입자 사이의 반발력과 인력의 크기를 단위로 나타낸 것을 의미한다.

[0033] 본 발명에 있어서, 상기 pH 및 온도 민감성 나노입자는 코팅에 사용되는 키토산의 농도와 불문하고 일정 두께의 코팅을 형성하고, 바람직하게는 100 내지 1000 nm의 지름을 가질 수 있으며, 보다 바람직하게는 100 내지 300 nm, 보다 더 바람직하게는 150 내지 250 nm의 지름을 가질 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0035] 다른 양태로서, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 약물전달체를 제공한다.

[0036] 본 발명에 있어서, 약물전달체는 장기간 동안 약물의 지속성 방출이 제어 가능한 약물전달체를 의미하며, 약물 전달체에는 세라마이드 이외에도 한 가지 이상의 약물이 봉입될 수 있다. 상기 약물은 질병의 예방, 치료, 완화 또는 경감을 위해 사용되는 모든 생물학적, 화학적 물질을 포함한다. 보다 구체적으로, 상기 약물은 단백질, 펩타이드, 화합물, 추출물, 핵산(DNA, RNA, 올리고뉴클레오타이드, 벡터) 등의 다양한 형태를 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 약물은 특정 약제나 분류에 의해 제한되지 않으며, 예를 들어, 피부보습제, 항아토피제, 항산화제, 항염증제, 항암제, 항세포사멸제, 혈전용해제, 소염진통제, 항바이러스제, 항균제, 호르몬 등일 수 있으며, 바람직하게는 피부보습제 및 항아토피제이다. 약제에는 희석제, 방출 지연제, 비활성 오일, 결합제 등의 당 기술 분야의 다양한 부형제가 선택적으로 혼합될 수 있다. 본 발명의 약물전달체에 담지된 약물은 세포 내에서 확산, 용해, 삼투압 또는 이온교환 등에 의하여 방출될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약물전달체는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 적절한 방법으로 투여될 수 있다. 본 발명의 약물전달체는 통상의 방법에 따라 경구형 제형 또는 멸균 주사용액 등의 형태로 다양하게 제형화 할 수 있으며, 고체의 미립구 분말로 제조할 수 있어, 흡입형 약물전달체로도 이용 가능하고, 외용제의 형태로 제형화되어 피부에 도포되는 방식의 약물전달체로도 이용가능하며, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 다른 양태로서, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 본 발명에서 용어, "예방"이란 조성물의 투여에 의해 암을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0041] 본 발명에서 용어, "치료"란 조성물의 투여에 의해 암에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 피부 질환은 피부가 건조하게 됨으로써 발생하는 모든 피부 질병을 포함하며, 바람직하게는 아토피, 여드름, 건선, 습진, 피부 건조증, 피부 알러지로 이루어진 군으로부터 하나 이상 선택된 질환이며, 보다 바람직하게는 아토피이다.

[0043] 상기 아토피 환자의 피부의 pH(약 6.0)는 정상적인 피부의 pH(5 내지 5.5)와 달리 다소 높은 pH를 가진다. 높은 pH에서는 세린 프로테아제의 활성 증가로 인하여 피부 장벽의 회복이 늦춰지는데, 이를 극복하기 위하여 산성수 및 연고 등과 같은 약산성 물질의 처리가 수반된다. 상기 산성 물질의 처리로 인하여 낮아진 pH에서 본 발명의 나노입자에서 키토산 코팅이 벗겨지게 되고, 동시에 체온 범위에서 수용성 공중합체인 PLGA의 도움으로 지용성인 세라마이드의 방출이 보다 원활하게 이루어지므로 본 발명의 나노입자는 아토피 치료에 특히 탁월할 것이나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0044] 본 발명의 조성물은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산과 함께 피부 질환에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0045] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄

늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여시에 비경구로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다. 상기 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다.

[0047] 상기 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0048] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다.

[0049] 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 피부 질환의 치료를 위하여 단독으로, 또는 레이저, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0052] 다른 양태로서, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 질환 개선용 피부 외용제 조성물을 제공한다.

[0053] 본 발명의 피부외용제 조성물은 신체 부위에 따라 그 제형이 특별히 한정되지 않으며, 당업계의 공지기술을 참조하여 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있다. 예를 들어, 액제, 연고제, 크림제, 로션제, 스프레이제, 패취제, 오일제, 왁스제, 유탁액제, 현탁액제, 젤제 또는 에어로졸제 등 형태로 사용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0054] 본 발명의 피부외용제 조성물은 통상적인 첨가제, 예를 들어 보존제, 의약 침투를 보조하는 용매, 연고 및 크림의 경우 연화제 등을 포함할 수 있으며, 에탄올 또는 올레일 알코올과 같은 통상적 담체를 함유할 수 있다.

[0055] 본 발명의 피부외용제 조성물은 상술한 성분에 한정되지 않고, 필요에 따라 통상의 화장품 조성물 또는 약학 조성물에 배합되는 다른 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면활성제, 유기 또는 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 포함할 수 있다.

[0057] 다른 양태로서, 본 발명은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산을 포함하는, 피부 보습용 화장품 조성물을 제공한다.

[0058] 상기 화장품 조성물은 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산과 함께 피부 보습 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.

- [0059] 본 발명에 있어서, 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 보다 구체적으로, 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 유탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이, 페이스트, 팩, 세안제, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스, 파운데이션 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말 (foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0060] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 유효성분인 (a) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체 나노입자; (b) 상기 나노입자 내에 담지된 세라마이드; 및 (c) 상기 나노입자를 코팅하는 키토산 이외에 추가로 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속 이온 봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가로 함유할 수 있다. 또한, 상기의 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.
- [0061] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 제형은 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 등이 포함될 수 있다.
- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트, 폴리아미드 파우더 등이 포함될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄, 디메틸 에테르 등의 추진제를 포함할 수 있다.
- [0063] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로 용매, 용해제, 유탁화제 등이 포함될 수 있고, 구체적으로 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프 로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테 르 등이 포함될 수 있다.
- [0064] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로 물, 에탄올, 프로필렌글리콜 등의 액상 희석제; 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 등의 현탁제; 미 소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가, 트라칸트 등이 포함될 수 있다.
- [0065] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물의 제형이 계면활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시 네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄 올아미드, 식물성유, 라놀린유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 포함될 수 있다.
- [0066] 또한, 이외에 첨가해도 되는 배합 성분은 이에 한정되는 것은 아니며, 또, 상기 어느 성분도 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 배합 가능하지만, 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.01-10% 중량 백분율, 보다 바람직하게는 0.01-5% 중량 백분율로 배합된다.
- [0068] 다른 양태로서, 본 발명은 (1) PLGA(poly(lactic-co-glycolic acid)) 공중합체를 PVA(폴리비닐 알코올) 용액에 첨가하고 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (2) 상기 혼합물에 세라마이드를 첨가하여 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자를 제조하는 단계; 및 (3) 상기 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자에 키토산 용액을 첨가하여 나노입자를 코팅하는 단계;를 포함하는, 약물 전달용 pH 및 온도 민감성 나노입자의 제조방법을 제공한다.
- [0069] 즉, 본 발명은 안정화제인 PVA를 사용하여 PLGA를 안정화시키고, 이 후 세라마이드를 PLGA 내에 담지시키고, 마지막 단계로 키토산으로 코팅하는 단계를 통하여 본 발명의 세라마이드가 담지되고 키토산으로 코팅된 PLGA 나

노입자를 제조하는 방법을 제공한다.

- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 (1) 내지 (3) 단계 중 1 이상의 단계는 2℃ 내지 6℃에서 수행하는 것을 특징으로 하며, 모든 단계를 2℃ 내지 6℃에서 수행하는 것이 바람직하나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0071] 본 발명에 있어서, 상기 (1) 단계에서 PLGA 공중합체에 대하여 첨가되는 PVA의 중량비는 1: 0.5 내지 1: 1.5일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1:0.8 내지 1:1.2일 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0072] 본 발명에 있어서, 상기 (2) 단계에서 상기 혼합물에 대하여 혼합되는 세라마이드의 중량비는 1:0.1 내지 1:1일 수 있으며, 보다 바람직하게는 1:0.2 내지 1:0.6일 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.
- [0073] 본 발명에 있어서, 상기 (2)단계 이 후에 제조되는 세라마이드가 담지된 PLGA 공중합체 나노입자를 추가로 균질화시키는 단계를 포함할 수 있다. 또한, 이에 더하여 초원심 분리를 시키는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명에 있어서, 상기 나노입자는 다양한 형태로 제조될 수 있는데, 수중유적형(oil in water type), 유중수적형(water in oil type), 다중상, 용액, 현탁액, 무순생성물 등으로 제조될 수 있고, 바람직하게는 수중유적형, 다중상으로 제조될 수 있고, 보다 바람직하게는 수중유적형으로 제조될 수 있으나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 수중유적형은 분산매인 물 속에 기름이 가는 입자모양으로 분산되어 있는 에멀션을 총칭하는 것으로, 본 발명의 일 실시예에서는 클로로포름을 이용하여 제조하는 것이 특징이며, 이 외 수중유적형 물질을 제조하기 위해 사용될 수 있는 물질이면 어떤 것을 사용하여도 된다.
- [0076] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예 및 제조예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예 및 제조예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0080] **실시예 1. 세라마이드를 담지하고, 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 제조**
- [0081] PLGA(Poly (lactic-co-glycolic) acid, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 나노입자(PLGA NP)는 수중유적형(oil-in water emulsion) 방법을 수행하여 용매를 증발시켜 제조하였다. 보다 구체적으로, 상기 PLGA 공중합체 50 mg를 클로로포름 1 ml에 용해시키고, 상기 PLGA 공중합체 용액을 10 ml의 증류수 내 0.5% v/v PVA(폴리비닐알코올, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA) 용액과 혼합하였다. 비이온성이자 친수성인 고분자 PVA는 PLGA의 분산을 안정화시키는 안정제로 사용하였다. 다음, 세라마이드 20 mg를 상기 PLGA 용액에 첨가하여 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자(PLGA NP including Cer)를 제조하였다. 구체적으로 상기 용액을 초음파기(STH-2000S, SL Science, South Korea)를 사용하여 1500W에서 15초 동안 균질화시켰으며, 투명한 용액이 불투명한 색을 나타내었다. 다음으로 하루동안 100 rpm에서 마그네틱으로 혼합하는 단계를 수행하여 상기 불투명해진 용액에서 클로로포름을 증발시켰다. 모든 과정은 4℃에서 수행하였다. PLGA 나노입자의 완성을 위하여, 상기 용액을 4℃에서 20분 동안 20,000 g에서 초원심분리(Hanil, South Korea)시켰고, 그 후 10 ml의 증류수 내 PVA 용액에 용해시켰다. 상기 과정으로 문쳐진 입자는 0.45 μm 막 필터를 사용하여 제거하였고, 최종 용액은 4℃에서 저장하였다. 다음으로, PLGA 나노입자에 키토산을 코팅하기 위하여, 1% 아세트산 및 다양한 농도(0 mg/ml, 0.11 mg/ml, 0.22 mg/ml, 0.33 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.66 mg/ml, 0.83 mg/ml 및 1 mg/ml)의 키토산 용액을 준비하였다. 상기 과정을 통해 수득한 세라마이드를 담지한 PLGA 나노입자 용액에 상기 키토산 용액을 4℃에서 2시간 동안 마트네틱으로 저으면서 첨가함으로써, 키토산으로 코팅된 나노입자를 수득하고 이를 상기에서 개시한 내용과 동일한 방법으로 저장해두었다. 상기에서 제조된 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자(이하, Chi-PLGA/Cer라고 함)의 기본적인 원리는 도 1에 나타내었다. 이하 실시예 5 내지 7에서 사용한 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 0.33 mg/ml 농도의 키토산 용액을 이용하여 키토산 코팅한 나노입자를 사용하였다.

[0083] 실시예 2. 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-PLGA/Cer)의 형태학적 관찰

[0084] 2-1. SEM 및 TEM을 통한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 형태학적 관찰

[0085] 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 모양 및 키토산의 코팅을 SEM 및 TEM을 이용하여 확인하였다. 먼저, 이를 위하여 상기 나노입자를 진공상태에서 완전히 건조시키고 백금으로 코팅하고 SEM으로 관찰하였다. 추가적으로 TEM 실시를 위하여 상기 나노입자를 TEM의 그리드에 떨어뜨리고, 어둠속에서 1% 우라닐 아세트산 용액으로 염색하였다. 그 후 샘플을 증류수로 세척하고 그리드에 떨어뜨린 방울을 제거하였다. 그리드가 완전히 건조될때까지 하루동안 진공에 방치하고, 일정 시간이 경과한 후에 TEM으로 관찰하였다. 그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0086] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 PLGA 나노입자는 세라마이드를 포함하고 있는 매끄러운 구 형태인 것으로 관찰되었다. 구체적으로 4 °C 및 36.5 °C에서 압축된 코팅층을 가지고 있음을 관찰하였으며, 내부 PLGA 나노입자의 수축에도 키토산의 코팅이 유지되는 것을 관찰하였다. 이는 상기 코팅은 키토산 및 PLGA/세라마이드 사이 정전기적 상호작용에 의하여 형성되는 것이고, 그 외 추가적인 화학 반응이 일어나지 않으며 키토산 코팅은 입자 표면 온도에 불문하고 유지됨을 의미한다. 따라서 PLGA 나노입자는 화학 반응의 어떠한 부산물 없이 초기 재료들만을 포함하고, 생물적으로 사용가능한 분자들만으로 이루어져 있으므로, 이는 피부 표면에서 작용하는 물질로써 활용도가 높음을 알 수 있다.

[0088] 2-2. 레이저 입자 크기 분석기를 통한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 형태학적 관찰

[0089] 레이저 입자 분석기(Mastersizer 2000, Malvern, UK)를 이용하여 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 크기, 분산력, 제타전위를 분석하였다. 표본 용액은 각 나노입자 용액을 증류수로 10배 희석하여 제조하였다. 관찰 결과는 표 1에 나타내었고, 특히 관찰된 제타전위 값을 그래프화한 것을 도 3에 나타내었다.

표 1

Sample	Diameter	Z-potential
Empty PLGA nanoparticles	207.8 ± 43.1 nm	-46.86 ± 3.5 mV
PLGA nanoparticles containing ceramide	226.5 ± 30.5 nm	-34.24 ± 6.7 mV
Empty Chi-PLGA NP	213.9 ± 30.8 nm	36.23 ± 2.7 mV
Chi-PLGA nanoparticles containing ceramide	211.4 ± 35.2 nm	49.31 ± 2.4 mV

[0090]

[0091] 키토산 코팅 및 세라마이드 함유에 따른 나노입자의 크기 및 제타전위로, 나타난 값은 평균±표준편차(n = 3)로 나타내었다.

[0093] 표 1에 나타난 바와 같이, 상기 공(empty) PLGA 나노입자 및 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자의 지름은 각각 207.8±43.1 nm 및 226.5±30.5 nm으로 측정되었다. 1% 아세트산 용액에 용해시킨 0.33 mg/ml 키토산 용액을 첨가하여 나노입자를 코팅한 후에, 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 및 키토산 코팅된 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자의 지름은 각각 213.9±30.8 nm 및 211.4±35.2 nm으로 측정되었다. 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, PLGA 나노입자는 평균 -46.86±3.5 mV의 제타전위를 가지고, 이는 PLGA 나노입자의 이온화된 카복시 그룹에 의한 값을 알 수 있다. 반면, 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자는 세라마이드 첨가에 의하여 평균 -34.24±6.7 mV의 제타전위를 가짐을 확인하였다. 이 후 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 및 키토산 코팅된 세라마이드가

담지된 PLGA 나노입자는 각각 평균 $+36.23 \pm 2.7$ mV 및 $+49.31 \pm 2.4$ mV의 제타전위를 가짐을 확인하였다. 중성pH 용액에서 PLGA 및 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자의 강한 음전하는 양쪽 모두에서 내부-입자 반발력 및 더 나은 분산 안정성을 가지도록 분리시키나, 키토산 코팅 후에 나노입자의 평균 제타전위는 급격하게 증가하게 된다. 상기 결과를 통하여 나노입자의 계면층의 전기전위의 측정값인 제타전위는 현탁액 내 내부-입자 반발력 및 안정성을 결정하므로 아미노기를 포함하는 양전하 고분자인 키토산이 음전하 나노입자의 표면과 수소결합을 형성하여 보다 안정된 양전하의 제타전위를 나타내는 것임을 알 수 있다.

[0095] 실시예 3. 적외선 분광법(FT-IR)을 통한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 구성분석

[0096] 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자 내 세라마이드를 확인하기 위하여, 푸리에 변환 적외선 분광법(Fourier transform infrared spectroscopy, VERTEX 80V, Bruker, Billerica, MA, USA)을 이용하였다. 상기 나노입자는 각 표준 분자(PLGA, PVA, 세라마이드)와 비교하였고, 표준은 KBr와 혼합하고 곱게 갈아서 제조하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0097] 도 4에 나타낸 바와 같이, 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-Cer/PLGA NP)는 3개의 주요 피크를 나타내었다. 3개 중 2개인 1757 cm^{-1} 및 $3000\text{--}2700\text{ cm}^{-1}$ 의 흡수 피크는 각각 C=O(stretching) 및 C-H(stretching)를 나타낸다. 다른 1개는 1500 cm^{-1} 의 흡수 피크이고, 이는 C-H(deformation), C-H(wagging vibration) 및 에스터 C-O(stretching)를 나타낸다. 추가적으로 PVA의 흡수로 인한 PVA의 하이드록시기를 나타내는 $3600\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ 의 피크가 나타나고 에스터 C-O기에 의하여 $1300\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ 의 피크가 나타났다.

[0098] 한편, 도 4a에서 확인할 수 있는 바와 같이 스펅고신 및 지방산을 가지는 세라마이드의 주요 피크는 3350 cm^{-1} 및 1560 cm^{-1} 에서 나타나지만, 도 4b에서 확인할 수 있는 바와 같이, Chi-Cer/PLGA NP에서는 해당 피크를 관찰하지 못하였다. 동시에 Chi-Cer/PLGA NP의 FT-IR 분석 결과는 PLGA 나노입자(PLGA NP)의 FT-IR 분석결과와 동일한 형태의 그래프로 나타나지만, 반면 세라마이드가 담지된 PLGA 나노입자(PLGA NP including Cer)의 그래프는 PLGA NP의 그래프 및 세라마이드 단독으로 확인한 그래프의 피크를 모두 포함하는 것을 확인하였다. 이는 키토산의 코팅이 유지되는 한, 내부 세라마이드가 방출되지 않고 보호됨을 나타내고, 더 나아가 키토산 코팅된 PLGA 나노입자가 피부 표면에서 작용하는 물질로써 활용도가 높음을 의미한다.

[0100] 실시예 4. 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자에서 키토산 농도 및 세라마이드 간 상관관계 확인

[0101] 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 표면에 대한 키토산의 양적인 분석을 위하여 형광아민 분석을 수행하였다. 아민기를 가지는 유일한 나노입자 화합물인 키토산;과 아민 기능기와 반응하여 형광 산물을 생산하는 형광아민;을 이용하는 형광아민 분석법으로 정량화하였다. 먼저 $20\text{ }\mu\text{l}$ 의 샘플 용액을 DMSO(다이메틸 설펍사이드, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)에 녹인 2 mg/ml 농도의 형광아민 용액 $4\text{ }\mu\text{l}$ 와 혼합하고 어둠 속에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후에, 발생하는 형광 세기는 바리오스칸 플래쉬 스펙트럴 스캐닝 리더(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 390 nm 여기(excitation) 및 515 nm 방출 파장에서 확인하였고, 그 결과는 도 5a에 나타내었다. 이때 나노입자에 부착된 키토산의 양은 코팅 반응 후에 남아있는 키토산 및 초기 키토산 사이의 양 차이로 측정하였다. 형광세기는 순수한 키토산의 표준 곡선과 비교하여 키토산의 농도로 변환하였다. 입자에 부착된 키토산의 양은 다음의 흡착작용(adsorption) 등온선 방정식(수학식 1)에 적용된다.

수학식 1

$$q = \frac{(C_i - C_e) V}{W}$$

[0102]

[0103] 상기 q 는 나노입자의 무게 당 PLGA 나노입자에 부착된 키토산의 양이고, V 는 나노입자 용액의 부피이고, W 는 나노입자의 질량이며, C_i 및 C_e 는 각각 초기 상태 및 평형 상태에서의 키토산의 농도를 나타낸다.

[0104] 랭뮤어(Langmuir) 방정식(수학식 2), BET 방정식(수학식 3) 및 프로인틀리히(Freundlich) 방정식(수학식 4) 모델은 상기 등온선 방정식으로부터 유래한 것으로 실험 모델에 적용되며 흡착 기작을 입증한다.

수학식 2

$$\frac{C_e}{q} = \frac{1}{bq_m} + \frac{C_e}{q_m} \quad (2)$$

[0105]

수학식 3

$$\frac{C_e}{q(1-C_e)} = \frac{1}{bq_m} + \frac{b-1}{bq_m} C_e \quad (3)$$

[0106]

수학식 4

$$\log q = \log k + \frac{1}{n} \log C_e \quad (4)$$

[0107]

[0108] 상기 방정식에서, q , q_m 및 K 은 흡착능력(adsorption capacity)이고, b 및 n 은 흡착력(adsorption strength)이다. 각 등온 방정식으로부터 도출한 결과는 도 5b 내지 5d에 직선 방정식으로 나타내었다.

[0109] 도 5에 나타난 바와 같이, 키토산의 농도가 증가할수록 입자 표면에 코팅되는 키토산의 양 또한 증가하는 반면, 코팅의 두께는 포화점에 도달한 후에도 일정하게 유지되었다. 즉, PLGA의 양에 따라 흡수되는 키토산의 양은 처리된 키토산의 양에 의존하여 0 mg 내지 80 mg 키토산/mg PLGA에 따라 증가하였다.

[0110] 다음으로, 코팅 상태에 따른 세라마이드의 효과를 관찰하기 위하여, 열역학 모델(랭뮤어, BET 및 프로인틀리히 방정식)은 4℃, 평형 상태에서 흡수되는 키토산의 양(q) 및 농도(C_e)에 따라 다르게 적용되었다. 즉, 실험 결과는 낮은 농도의 흡수질(adsorbate)에서 랭뮤어 및 BET 모델과 상응하였다. 그러나 상기 모델은 높은 농도에서 키토산 코팅의 메커니즘을 설명하지 못하였다.

[0111] 대조적으로 실증적인 흡수 등온선 방정식에 기초한 프로인틀리히 모델은 $R^2 = 0.95$ 을 가진다. 상기 모델의 방정식은 평형 상태에서 PLGA의 양에 따른 흡수되는 키토산(q)의 양 및 키토산 농도(C_e)를 사용하여 만들었다. n 값은 키토산, PLGA 및 나노입자 사이 친화도를 나타내고, 반면 0.1 내지 0.5의 경사면($1/n$)은 강한 흡수를 나타낸다. 1.013 및 1.0027의 N 값이 관찰되었고, 이는 강한 흡수를 나타낸다. 표 2는 세라마이드를 추가하였는지 여부를 불문하고 q 값에 현저한 차이가 발생하지 않음을 나타낸다. 이는 세라마이드의 추가가 나노입자의 표면과 키토산 사이의 결합에 영향을 미치지 않음을 나타낸다.

표 2

Isotherm equation	Chi-PLGA NP		Chi-PLGA NP with ceramide	
	Adsorption intensity	Regression coefficient	Adsorption intensity	Regression coefficient
Langmuir	$q_m = 56.1798$	0.9367	$q_m = 60.9756$	0.9414
BET	$q_m = 54.3478$	0.9388	$q_m = 59.5238$	0.9435
Freundlich	$k = 0.6256$	0.9584	$k = 0.3936$	0.9583

[0113]

[0114]

흡수 등온선의 기준 값을 나타내는 것으로, 랭뮤엘 및 BET은 0-0.8 mg/ml 범위의 낮은 키토산 농도에서 사용된다.

[0116]

종합적으로 본 발명의 나노입자에 코팅되는 키토산은 약물인 세라마이드를 저장하는 동안 나노입자의 견고함과 일정한 세라마이드 농도를 제공하기 위한 수단으로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0118]

실시예 5. 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 방출 특성 분석

[0119]

5-1. 박층크로마토그래피를 통한 온도에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 방출 특성 분석

[0120]

박층크로마토그래피를 수행하여 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자에서 세라마이드의 방출을 정량적으로 확인하였다. 6:4 비율의 클로로포름 및 메탄올이 이동상으로 사용되었다. PLGA, 키토산, PVA 및 세라마이드를 포함하는 나노입자의 구성성분의 분석을 위해, 먼저 상기 나노입자를 표본으로 하고 이를 바늘 및 스프레드(spread)를 이용하여 TLC 플레이트에 떨어뜨렸다. 그 후 30분 동안 방치하고 10% 황산을 TLC 플레이트에 첨가하고 1시간 동안 150 °C로 가열하였다. 가열 후에는 분리 밴드가 가시화되어 나타났다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0121]

도 6에 나타난 바와 같이, 37 °C에서 키토산으로 코팅되지 않고 세라마이드를 포함하고 있는 PLGA 나노입자(5)에서 세라마이드가 방출되어 검은색으로 나타났다. 그러나, 동일한 조건에서 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자(6)의 경우, 세라마이드의 방출이 관찰되지 않았다. 또한, 세라마이드는 키토산 막 내에 위치하고 있고, 세라마이드의 방출은 상기 코팅이 벗겨지기 전까지는 발생하지 않으므로 4 °C에 저장된 표본에서, 키토산 코팅과 무관하게 세라마이드가 방출되지 않음을 확인하였다(2, 3, 4). 이는 세라마이드를 담지하는 PLGA 나노입자의 수축이 36.5 °C에서 발생하더라도, 세라마이드의 방출은 키토산 코팅이 제거되지 않는다면 발생하지 않는바, 단순한 온도 변화에 의하여 곧바로 세라마이드 방출이 발생하지 않음을 의미한다.

[0123]

5-2. 고성능 액체 크로마토그래피를 통한 온도 및 pH에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 방출 특성 분석

[0124]

상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자로부터 세라마이드의 방출을 확인, 즉 어느 정도의 세라마이드가 나노입자에 포함되어 있고, 후에 상기 나노입자로부터 얼마나 많은 세라마이드가 방출되는지를 정량적으로 확인하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 수행하였다. C18 고분자 칼럼(ϕ : 4.6 mm, L : 15 cm)을 이동상으로 사용하기 위해 19:1 비율의 클로로포름 및 메탄올의 혼합으로 사용하였다. 흐름 비율 및 압력을 각각 0.6 ml/min 및 780 psi으로 유지한 상태에서, 30 °C에 10 μ l의 표본을 주사로 주입하였다. 초반 캡슐화 효율은 나노입자 제형화 후의 상청액(supernatant)으로 계산하였다. 방출된 세라마이드를 정량화하였고 4 °C, 31 °C 및 36.5 °C(각 온도 조건에서 pH는 5.5 및 7.4)로 조절하여 저장된 키토산 코팅 또는 무-코팅 PLGA 나노입자의 방출패턴을 1, 2, 3, 5 및 7일차에 각각 분석하였다. 크로마토그래피는 10 ml의

표본을 원심분리로 10배 농축시킨 후에 수행하였다. 상청액은 진공에서 건조하였고, 10 μ l의 이동상에서 용해되었으며 HPLC의 주입구로 주사되었다. 그 결과는 도 7에 나타내었다.

[0125] 도 7에 나타난 바와 같이, 저장 조건(4 $^{\circ}$ C)에서는 키토산으로 코팅된 세라마이드를 담지하는 PLGA 나노입자 내 세라마이드가 코팅되지 않은 세라마이드를 담지하는 PLGA 나노입자 내 세라마이드보다 천천히 방출되었다. 보다 구체적으로 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅되지 않은 PLGA 나노입자의 경우 pH 5.5 및 36 $^{\circ}$ C에서 상기 나노입자에서의 세라마이드 방출량은 $72.51 \pm 0.64\%$ 로드비(load ratio)로 확인되었다. 상기 방출량을 PLGA에 대한 세라마이드의 최대 담지량으로 판단하고 이에 따라 제조 단계에서 20 mg 세라마이드를 50 mg PLGA에 첨가하였음을 바탕으로 계산한 결과 첨가된 세라마이드 중 14.5 ± 0.32 mg의 세라마이드는 PLGA 나노입자에서 방출되지 않고 남겨졌음을 확인할 수 있었다. 즉, 상기 나노입자에서의 PLGA : 세라마이드의 비는 1:0.29인 것으로 확인되었다.

[0126] 한편, 코팅되지 않은 PLGA 나노입자에서, 더 많은 세라마이드가 pH와 무관하게 고온에서 방출되었다. 반면 키토산 코팅된 PLGA 나노입자에서는 pH 7.6에서 키토산 코팅이 벗겨지지 않았고, 키토산 코팅이 벗겨지지 않으면 입자 표면 온도와 무관하게 세라마이드 방출량이 $13.3 \pm 0.07\%$ 이하로 측정됨을 확인하였다. 또한, 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 pH 5.5 및 체온 부근의 온도에서 가장 우수한 세라마이드 방출 효율을 나타내었다.

[0127] 상기 결과를 통해, 본 발명에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자는 온도 및 pH에 민감성을 가지며, 피부에 닿으면 피부의 산도(바람직하게는 pH 4.5 내지 6)에서 키토산 코팅이 벗겨지고, 체온(바람직하게는 30 내지 40 $^{\circ}$ C) 범위에서 담지되어 있던 세라마이드를 분출하는 효과가 우수함을 확인하였다.

[0128] 아토피 환자의 피부의 pH(약 6.0)는 정상적인 피부의 pH(5 내지 5.5)와 달리 다소 높은 pH를 가진다. 높은 pH에서는 세린 프로테아제의 활성 증가로 인하여 피부 장벽의 회복이 늦춰지는데, 이를 극복하기 위하여 산성수 및 연고 등과 같은 약산성 물질의 처리가 수반된다. 상기 산성 물질의 처리로 인하여 낮아진 pH에서 본 발명의 나노입자에서 키토산 코팅이 벗겨지게 되고, 동시에 체온 범위에서 수용성 공중합체인 PLGA의 도움으로 지용성인 세라마이드의 방출이 보다 원활하게 이루어지는데, 본 발명의 나노입자는 다양한 피부 질환에 대한 예방 또는 치료물질을 함유하는 의약품으로 활용될 수 있고, 특히 세라마이드를 포함하는 PLGA 나노입자로서 아토피 피부염, 건선 등과 같은 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 피부 외용제 및 화장료 조성물 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

[0130] 실시예 6. 피부 섬유아세포를 이용한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 안정성 확인

[0131] 6-1. 실험에 사용된 피부 섬유아세포의 제조

[0132] 1일된 SD 래트(DBL, South Korea)로부터 추출한 피부 조직에서 피부 섬유아세포를 분리하였다. 보다 구체적으로, 분리된 피부 441개를 PBS로 세척하였고, 그 후 피부 내 혈관은 핀셋을 사용하여 제거하고 표본은 PBS로 세척하였다. 진피 내 섬유아세포를 얻기 위하여, 상기 피부를 하루동안 4 $^{\circ}$ C 조건 하 PBS 용액에서 디스페이즈(dispase)(1mg/ml)(Gibco, Grand Island, NY, USA)와 반응시켜 진피(dermis) 및 표피(epidermis)로 분리하였다. 분리된 진피를 하루 동안 4 $^{\circ}$ C 조건 하 PBS 용액에서 다시 콜라게나제(collagenase) 2(1 mg/ml)(Gibco, Grand Island, NY, USA)와 반응시킨 후 세포 잔해물을 제거하였다. 다음으로, 분리된 피부 섬유아세포를 CO₂ 배양기 내에서 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항진균성 항생제(antibiotic-antimycotic)(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 함유하는 DMEM-고 글루코스 배양 배지(Gibco, Grand Island, NY, USA)에서 배양하였다. 3회 계대배양한(passage 3) 피부 섬유아세포를 이하 모든 실험에서 이용하였다.

[0134] 6-2. MTT 분석을 통한 피부 섬유아 세포독성 및 세포 생존능력 확인

[0135] 상기 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세포독성 및 세포 생존능력을 확인하기 위하여 MTT 분석을 수행하였다. 먼저, 상기 나노입자의 세포독성 및 세포의 생존능력을 확인하기 위하여 MTT 분석을 수행할 세포 배양을 수행하였다. 세포독성을 측정하기 위하여 키토산, PLGA 나노입자 및 키토산 코팅된 PLGA 나노입자를 24시간 동안 배양 배지 내에서 배양하여 수득하였다. 섬유아세포를 하루동안 3×10^3 세포/웰 농도로 96-웰 플레이트에서 배양하고, 이후 상기 각 물질로 전-처리한 배양 배지에 로드(load)하였다. 한편, 세포의 생존능력을 측정하기 위하여 상기 섬유아세포를 1×10^4 세포/웰 농도로 24-웰 플레이트에 시

당하고(seeded) 7일 동안 0, 1 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자 (실시에 1에서 수득한 나노입자)를 포함하는 배지에서 배양하였다.

[0136] 다음으로, 0.5 mg/ml 농도의 MTT(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)를 포함하는 DMEM-H 배지를 제조하였으며, 각 배양 플레이트 내 배지를 제거하고 PBS로 3회 세척한 후 500 μl 의 MTT 용액을 첨가하고 1시간 동안 CO_2 배양기 내에서 배양하였다. 그 후 MTT 용액을 제거하고 DMSO 1ml를 첨가하였다. MTT 용액에 의해 생산된 포르마잔(formazan)은 상온에서 1시간 동안 저어 용해시켰다. 마지막으로 용해된 포르마잔을 포함하는 DMSO 용액을 96-웰 플레이트에 옮긴 후 마이크로 플레이트 리더(Tecan Australia)를 사용하여 540 nm에서 흡광도(optical density)를 측정하였다. 세포독성을 확인한 결과는 도 8에 나타내었고, 세포 생존능력을 확인한 결과는 도 9에 나타내었다.

[0137] 따라서 도 8 및 9에 나타난 바와 같이, 7일 동안 세포 수준의 활동의 측정은 일반적인 배지에서 배양한 세포와 본 발명의 PLGA 나노입자를 포함하는 배양 배지에서 배양한 세포 사이에 큰 차이가 발생하지 않음, 즉 PLGA 나노입자가 독성을 가지지 않음을 확인하였다. 이는 키토산 및 PLGA가 생체적합적인 물질이고, 이들 구성은 독성을 가지고 있지 않고 알려져 있으며, PLGA 나노입자의 형성 동안 키토산 및 PLGA 사이에 특이적인 반응이 발생하지 않았음을 의미한다.

[0139] **실시에 7. 동물을 이용한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 전달 및 이에 따른 아토피 개선 효과 확인**

[0140] **7-1. 실험 동물**

[0141] 모든 동물 연구는 National Institutes of Health and ARRIVE guidelines (<http://www.nc3rs.org/ARRIVE>)에서 추천하는 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals에 따라 수행하였다. 모든 동물 실험은 승인받았으며 INHA-IAUC(Inha University-Institutional Animal Care and Use Committee) 가이드라인에 맞추어 수행하였다(승인 넘버 INHA 150924-381). 모든 동물 실험의 절차는 IACUC-INHA 프로토콜에 맞춰 수행하였다.

[0143] **7-2. FITC-표지를 통한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 피부 투과성 확인**

[0144] 탈체(*ex-vivo*) 분석을 위하여, 조직은 털을 제거 한 후 4 주가 경과된 SD-래트의 등으로부터 확보하였다. 상기 조직은 1g의 플루오레세인 이소티오시안산염(FITC, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)을 200mM의 중탄산나트륨(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 중 1 ml에 용해하였다. 이 후 실시에 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자 용액 1 ml를 원심분리로 모았고 1시간 동안 1 ml의 FITC 용액과 혼합하였다. 반응 후에, 상기 나노입자는 증류수로 세척하였고 PBS에서 분산시켰다. 필터종이는 1 cm^2 로 자르고 확보한 조직 위에 놔두었다. 상기 필터 종이는 100 μl 의 FITC로 표지한 나노용액 용액으로 적셨고 36.5 $^{\circ}\text{C}$ 에서 두시간 동안 배양하였다. PBS 세척 후에, 조직은 저온유지장치(cryostat)로 절단하였다. 조직 부분은 465 nm 여기 및 545 nm의 방출 파장에서 관찰하였다. 그 결과는 도 10에 나타내었다.

[0145] 도 10에 나타난 바와 같이, 상기 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자는 각질층을 관통(penetration)하고 진피와 외피 사이의 경계면에서 축적되었다. 그러나 상기 나노입자는 진피층(dermis layer)에서는 발견되지 않았다. 이는 상기 나노입자의 축적은 각질층으로 관통하기 전에는 담지된 세라마이드의 손실을 감소시키고 그 후 상기 나노입자 내 대부분의 세라마이드는 관통 후에 표적 위치로 이동함을 확인하였다.

[0147] **7-3. H&E 염색을 통한 생체 내(*in vivo*) 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드의 전달 및 이의 아토피 개선 효과 확인**

[0148] 각질층은 SDS에 의하여 건조제지고, 이로 인하여 피부층(layer)이 건조되어 피부층 내 지질 구성이 변화한다. 따라서 SDS를 처리한 조직에서 H&E 염색을 통한 세라마이드 전달 효율, 특히 영유아, 어린이, 청소년들에서 아토피 개선 효과를 확인하였다. 먼저, 생후 4주가 경과한 SD-래트를 사용하여 실험을 수행하였다. 털을 래트의 등으로부터 제거하였고, 이 후 증류수 내 10%의 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate)(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)을 이틀동안 적용하여 건선(psoriasis) 모델을 만들었다. 3일차에, 래트의 등을 네부분으로 구분하고 각 부분에 PBS 내 5% 세라마이드 용액, PBS 내 20% 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-PLGA NP),

PBS 내 20% 세라마이드로 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-PLGA/Cer NP) 및 노바손 크림(Novason Cream; Green Cross, South Korea)을 처리하였다. 다음으로, 래트의 등 부위 피부는 치료 후 5일 및 7일에 추출하였고 건선 피부의 회복은 H&E 염색으로 확인하였다. 먼저, 추출한 피부 조직은 밤새 4% 파라포름알데하이드 용액에서 고정하였고 그 후 피부 조직이 고정될 때 까지 계속적으로 30% 및 50% 과당을 처리하였다. 각 피부 조직 표본의 OCT 블록은 그 후 OCT 화합물(Sakura, Netherlands)을 사용하여 만들었다. OCT 블록은 -40 °C에서 저온유지장치(cryostat)를 사용하여 20-25 μm로 절편을 만들었다. 남아있는 OCT 화합물은 PBS로 세척하여 제거하였고, 그 후 상기 피부 조직(skin section)은 헤마토실린(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)으로 8분 동안 염색하였다. PBS로 세척한 후, 절단 부분은 에오신-플록신 용액(Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)에서 1분 동안 염색하고 그 후 PBS로 세척하였다. 염색된 절편 부분은 광학 현미경으로 관찰하였고, 그 후 각질층의 회복을 비교하였다. 5일 및 7일에서 각 표본의 두께는 현미경을 이용하여 관찰하였고, 그 후 이미지 J.를 사용하여 정량화하였다. 그 결과는 도 11 및 12에 나타내었다.

[0149] 도 11 및 12에 나타낸 바와 같이, SDS 처리 후, 현미경으로 관찰한 결과 실험 5일차에, PBS로 처리된 표본에서 각질층은 보다 뽁뽁해지고 표면으로부터 분리되는 반면, 상기 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자(Chi-PLGA/Cer NP) 및 노바손크림으로 처리한 표본에서 각질층이 일부 회복함을 확인하였다. 실험 7일차에, Chi-PLGA/Cer NP를 처리한 조직이 정상적인 조직과 비슷한 상태로 회복함을 확인하였다. 게다가 조직 회복 수준이 자가-재생산보다 더 빨랐고 노바손 크림을 처리한 조직에서 관찰되는 수준과 유사한 속도보다 빠른 속도로 회복이 이루어졌다. 보다 구체적으로 SDS 처리 전에, 각질층의 두께는 $48.97 \pm 3.54 \mu\text{m}$ 이었다; 그러나, 두께는 SDS 처리 후에 $23.90 \pm 1.90 \mu\text{m}$ 까지 감소함을 확인하였다. 실험 5일차에 PBS로 처리한 각질층의 두께는 $21.84 \pm 1.70 \mu\text{m}$ 이었고, Chi-PLGA NP를 처리한 피부층(layer)은 $24.00 \pm 5.20 \mu\text{m}$ 이었으며, Chi-PLGA/Cer NP를 처리한 피부층은 $35.41 \pm 5.72 \mu\text{m}$ 이었고, 노바손 크림을 처리한 피부층은 $37.87 \pm 6.08 \mu\text{m}$ 이었다. 상기 결과를 바탕으로 PBS 처리는 피부층의 재생에 어떠한 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 7일 경과 후, 피부층은 $31.51 \pm 5.70 \mu\text{m}$ (PBS), $31.23 \pm 6.70 \mu\text{m}$ (Chi-PLGA), $50.40 \pm 8.00 \mu\text{m}$ (Chi-PLGA/Cer NP) 및 $39.47 \pm 7.84 \mu\text{m}$ (노바손 크림)로 나타났다. 이는 PBS는 미세한 회복을 나타내고, 본 발명에 따른 Chi-PLGA/Cer NP의 처리는 최적의 회복, 즉 거의 정상적인 수준의 표본으로 회복되는 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0151] 7-4. 필라그린(filaggrin) 염색면역법을 통한 생체 내(*in vivo*) 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 세라마이드 전달 및 이에 따른 아토피 개선 효과 확인

[0152] 각질층의 구성 단백질인 필라그린(filaggrin)을 통하여 각질층의 재생 효율을 분석하였다. 필라멘트 연관 단백질인, 필라그린은 재생된 각질층에서 잘 분산된다. 필라그린은 표피층의 항산성을 유지하고 이의 지질 보호 기능으로 지질로 찬 각질층을 구성하는 데 중요한 역할을 한다. 먼저 실시예 7-2에서 제조한 피부 조직(skin section)을 헤마토실린 및 에오신-플록신으로 염색하는 대신, 항-필라그린 항체(Abcam, UK)로 염색하고 공초점 형 현미경으로 관찰하였다. 그 결과는 도 13에 나타내었다.

[0153] 도 13에서 나타낸 바와 같이, 필라그린 분석을 통해 본 발명의 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 각질층을 뽁뽁한 구조로 회복시킴을 확인할 수 있다. 보다 구체적으로 세라마이드는 각질 세포(keratinocyte)를 호르니 세포(horny cell)로 분화시키고 각질층을 생성하는 데 사용되는 물질을 공급하기 때문에 필라그린은 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자를 처리한 경우(c) 및 노바손 크림을 처리한 경우(d)의 각질층에서 잘 분산된다. 반면, 필라그린은 단순히 PBS만을 처리한 경우(a) 및 세라마이드를 담지하지 않는 키토산 코팅된 PLGA 나노입자(b)의 경우 각질층에서 거의 관찰되지 않았다. 이는 궁극적으로 세라마이드를 처리한 표피층이 자연적으로 치료하는 경우보다 빠르게 회복되는 것을 나타낸다.

[0155] 7-5. 염증 인자 발현 분석을 통한 생체 내(*in vivo*) 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 안정성 확인

[0156] qPCR을 통한 염증 분석(inflammation assay)을 통하여 실시예 1에서 수득한 세라마이드를 담지하고 키토산으로 코팅된 PLGA 나노입자의 안정성을 확인하였다. 이때 상기 실시예 7-2 및 7-3에서 사용한 조직과 동일한 조직을 사용하였고, 상기 조직으로부터 트리졸 및 RNeasy 플러스 미니 키트(Qiagen, Netherland)를 사용하여 mRNA를 추출하였다. 그 후 qRT-PCR(Qiagen, Netherland)을 사용하여 표 3에 나타낸 염증 마커(MCP-1 및 TNF-α)의 수준을 분석하였고, 이를 대조군인 β-액틴 발현 수준과 비교하였다. 그 결과는 도 14에 나타내었다.

표 3

Gene	Forward (5'→3')	Reverse (3'→5')
MCP-1	GCTTGGTGGTTTGCTACGAC	ATGGGCTCCCTCTCATCAGT
TNF- α	TGATCCCAATGAGTCGGCTG	TGGACCCATTCTTATTGGGG

[0157]

[0158] 래트 생체 내 피부에서 염증 분석을 위해 고안된 프라이머 서열

[0160] 도 14에 나타낸 바와 같이, 실험 7일 경과 후 MCP-1 및 TNF- α 은 세라마이드의 담지나 키토산의 코팅 여부에 상관없이 유사한 발현 수준을 나타내었다. 이는 본 발명에 따른 나노입자가 염증을 유발하지 않는 생체적합한 입자임을 나타낸다.

[0162] 상기 모든 실험은 3회 반복하여 수행하였으며, 시그마-플롯 프로그램을 이용하여 T-분석법으로 분석하였다. 아울러, 상기 실험 결과는 평균 $\pm$ S. D.(표준분포)로 나타내었다.

[0164] 종합적으로, 본 발명에 따른 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자는 pH 및 온도, 즉 두 가지 인자에 의하여 정교하게 약물 방출이 조절되며, 보다 구체적으로 생체적합한 키토산 코팅으로 pH에 따른 PLGA 나노입자 내 약물 분비 조절이 가능하고, 더 나아가 온도 변화에 따라 약물 전달을 제어할 수 있다. 따라서 본 발명의 나노입자는 다양한 피부 질환에 대한 예방 또는 치료물질을 함유하는 의약품으로 활용될 수 있고, 특히 세라마이드를 포함하는 PLGA 나노입자로서 아토피 피부염, 건선 등과 같은 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물, 피부 외용제 및 화장품 조성물 등으로 다양하게 활용될 수 있다.

[0166] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제제예를 예시한다.

[0168] 제제예 1. 약학적 제제의 제조

[0169] 액제의 제조

[0170] 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 20 mg

[0171] 이성화당 10 g

[0172] 만니톨 5 g

[0173] 정제수 적량

[0174] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0176] 제제예 2. 화장품 제제의 제조

[0177] 1. 유연화장수 제조

[0178] 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 0.1중량%

[0179] 1,3-부틸렌글리콜 5.2중량%, 올레일알코올 1.5중량%

[0180] 에탄올 3.2중량%

- [0181] 폴리솔베이트 20 3.2중량%
- [0182] 벤조페논-9 2.0중량%
- [0183] 카르복실비닐폴리머 1.0중량%, 글리세린 3.5중량%
- [0184] 미량의 향, 미량의 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법으로 유연화장수를 제조하였다.

[0186] 2. 밀크로션 제조

- [0187] 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 0.1중량%
- [0188] 글리세린 5.1중량%
- [0189] 프로필렌글리콜 4.2중량%
- [0190] 토크페틸아세테이트 3.0중량%
- [0191] 유동파라핀 4.6중량%
- [0192] 트리에탄올아민 1.0중량%
- [0193] 스쿠알란 3.1중량%
- [0194] 마카다미아너트오일 2.5중량%
- [0195] 폴리솔베이트 60 1.6중량%
- [0196] 솔비탄세스퀴올레이트 1.6중량%
- [0197] 프로필파라벤 0.6중량%
- [0198] 카르복실비닐폴리머 1.5중량%
- [0199] 미량의 향, 미량의 방부제, 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법으로 밀크로션을 제조하였다.

[0201] 3. 영양크림 제조

- [0202] 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 0.5중량%
- [0203] 글리세린 4.0중량%
- [0204] 바셀린 3.5중량%
- [0205] 트리에탄올아민 2.1중량%
- [0206] 유동파라핀 5.3중량%
- [0207] 스쿠알란 3.0중량%
- [0208] 밀납 2.6중량%
- [0209] 토크페틸아세테이트 5.4중량%
- [0210] 폴리솔베이트 60 3.2중량%
- [0211] 카르복실비닐폴리머 1.0중량%
- [0212] 솔비탄세스퀴올레이트 3.1중량%
- [0213] 미량의 향, 미량의 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법으로 영양크림을 제조하였다.

[0215] 4. 마사지크림 제조

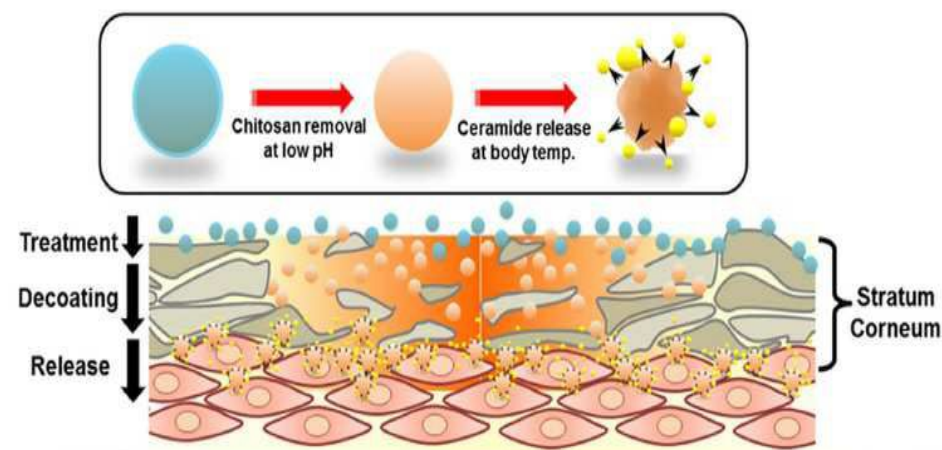
- [0216] 세라마이드를 담지하고 키토산 코팅된 PLGA 나노입자 0.5중량%

- [0217] 글리세린 4.0중량%
- [0218] 바셀린 3.5중량%, 트리에탄올아민 0.5중량%
- [0219] 유동파라핀 24.0중량%
- [0220] 스쿠알란 3.0중량%, 밀납 2.1중량%
- [0221] 토크페릴아세테이트 0.1중량%
- [0222] 폴리솔베이트 60 2.4중량%
- [0223] 카르복실비닐폴리머 1.0중량%
- [0224] 솔비탄세스퀴올레이트 2.3중량%
- [0225] 미량의 향, 미량의 방부제 및 잔량의 정제수를 혼합하여 통상의 방법으로 마사지크림을 제조하였다.

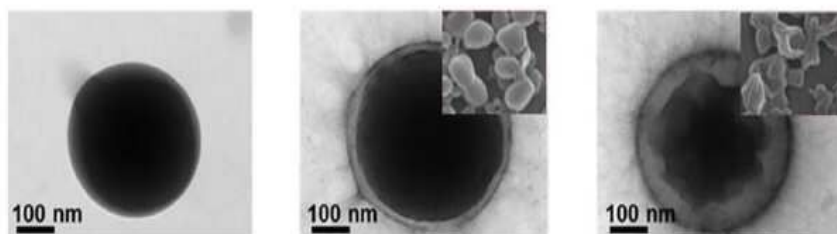
[0227] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예 및 제조예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

도면

도면1

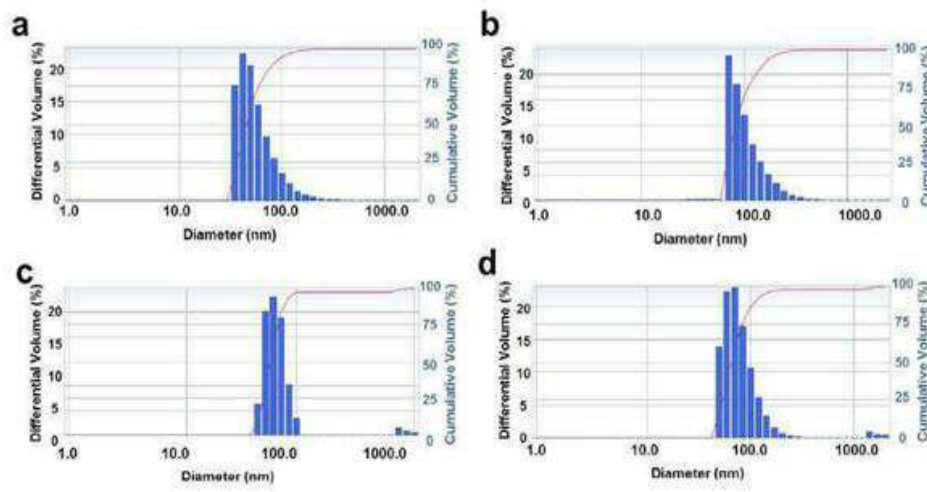


도면2

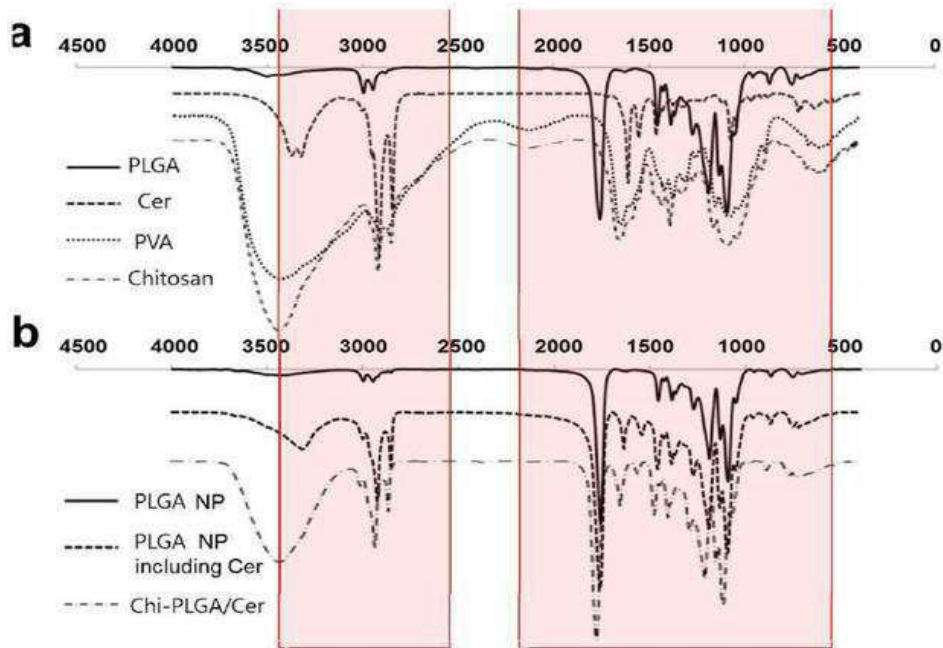


코팅되지 않은 PLGA 나노입자 코팅된 PLGA 나노입자(4 ℃) 코팅된 PLGA 나노입자(36 ℃)

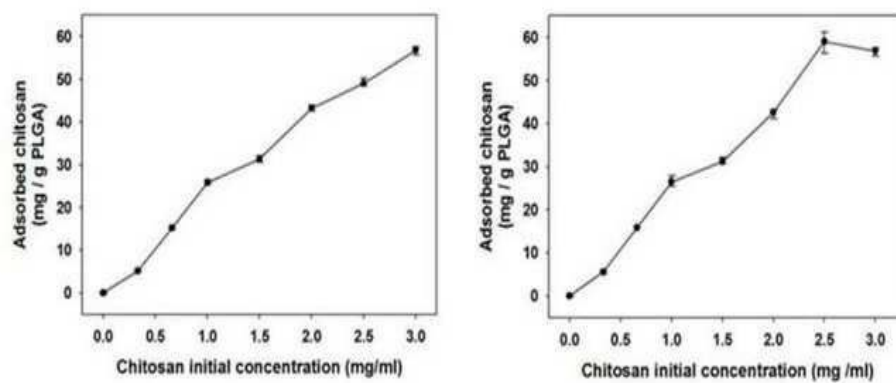
도면3



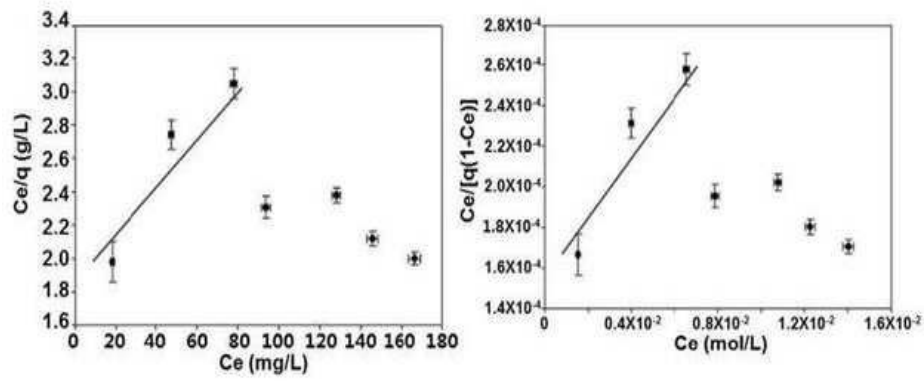
도면4



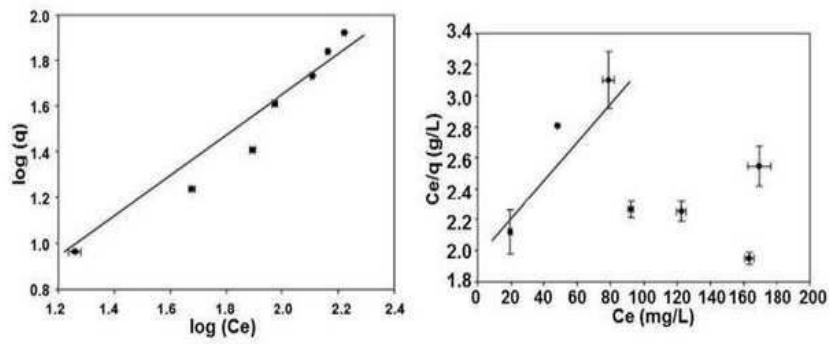
도면5a



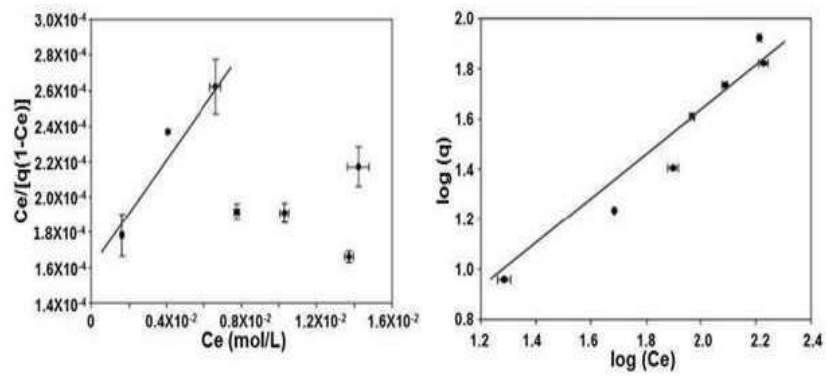
도면5b



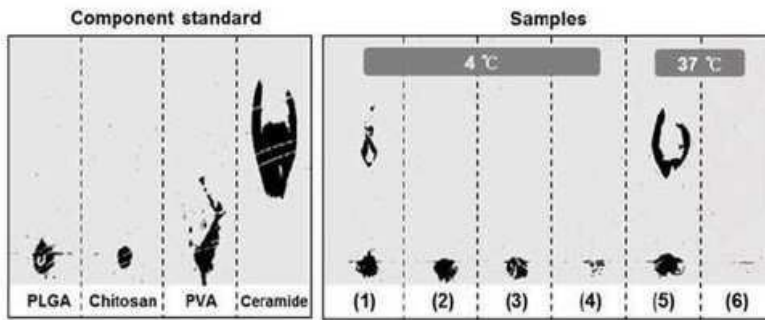
도면5c



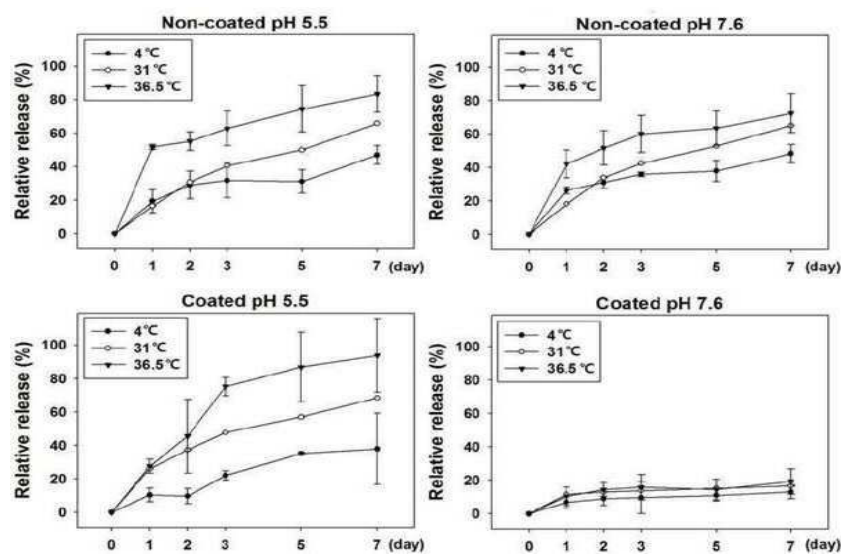
도면5d



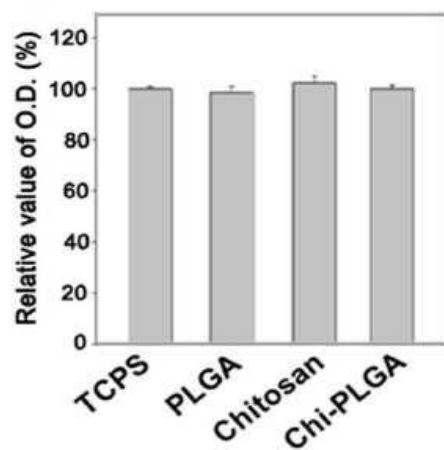
도면6



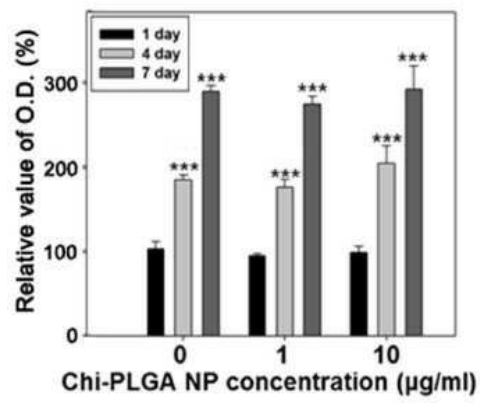
도면7



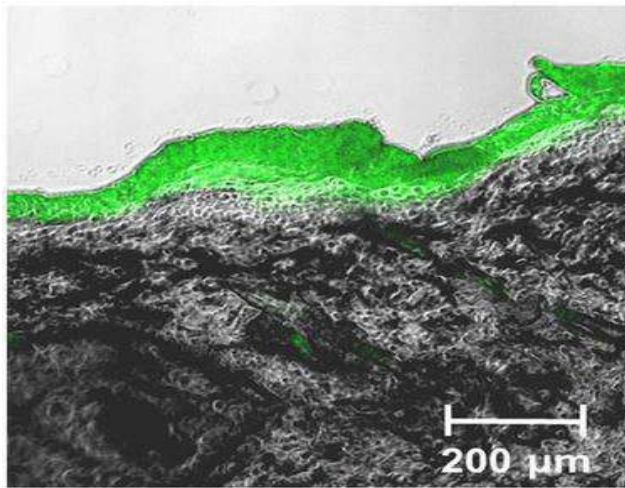
도면8



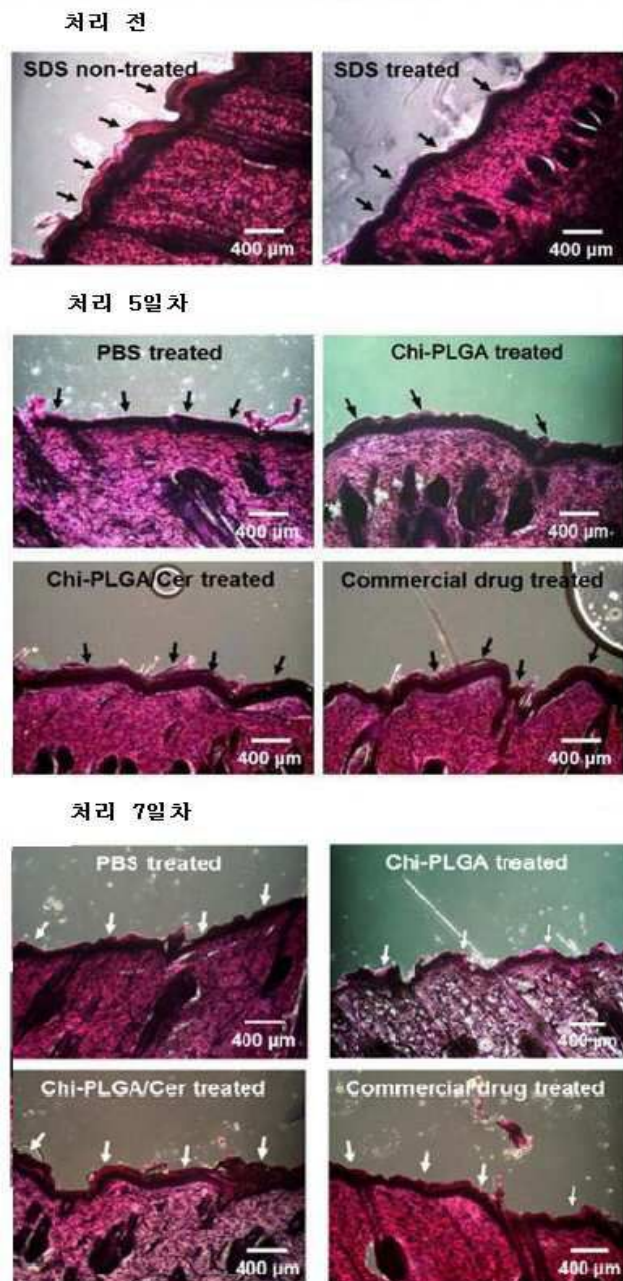
도면9



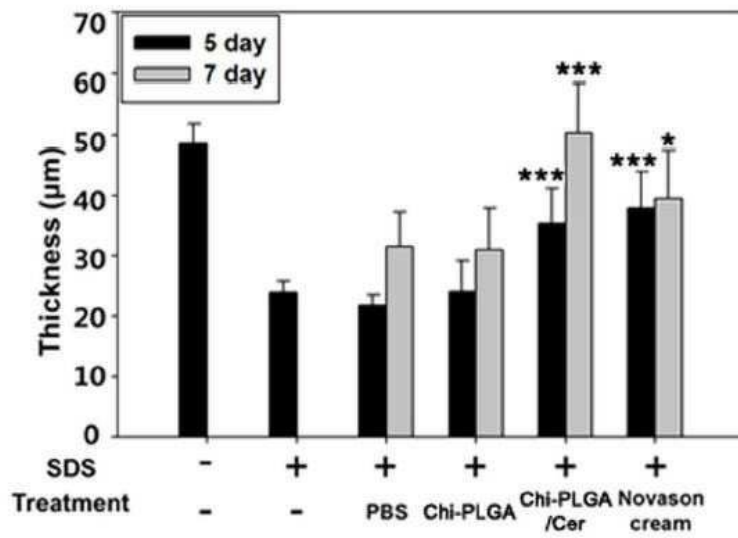
도면10



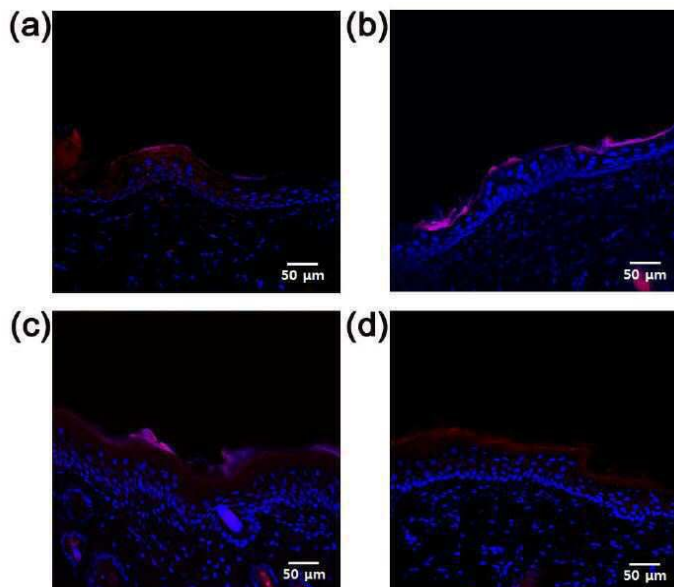
도면11



도면12



도면13



도면14

