



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년12월31일
(11) 등록번호 10-2345183
(24) 등록일자 2021년12월27일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/02 (2006.01) A61K 47/34 (2017.01)
A61K 47/42 (2017.01) A61K 8/65 (2006.01)
A61K 8/84 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/0295 (2013.01)
A61K 47/34 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0164073
- (22) 출원일자 2019년12월10일
심사청구일자 2019년12월10일
- (65) 공개번호 10-2020-0071685
- (43) 공개일자 2020년06월19일
- (30) 우선권주장
1020180158141 2018년12월10일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌
JP2009536162 A*
KR1020050081092 A*
KR1020180015984 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
- (72) 발명자
김진철
강원도 춘천시 퇴계로 220-20, 302동 1301호(석사동, 현대아파트)
김진아
서울특별시 도봉구 우이천로48길 83, 201호(쌍문동, 서광아파트)
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김정현

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 조미선

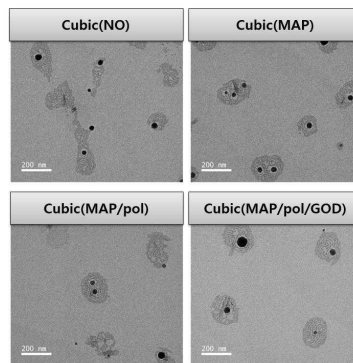
(54) 발명의 명칭 **소수화된 젤라틴, 소수화된 폴리에틸렌이민과 소수화된 글루코스 산화효소를 포함하는 모노올레인 큐빅상**

(57) 요약

본 발명은 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민이 지질 이중층에 고정된 상태로 수상채널내에서 복합체를 형성하여 상기 수상채널을 폐쇄하였다가 수상채널내의 pH가 저하된 환경에서 상기 복합체가 해체되어 수상채널이 개방되므로 수상채널에 탑재된 유효성분이 방출되는 특징이 있다. 특히 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 소수화된 글루코스 산화효소를 포함하여 글루코스를 감지하여 수상채널을 개방하는 특징이 있으며 그 크기가 100nm이하에서 피부 침투가 용이한 효과가 있다.

따라서 본 발명의 모노올레인을 이용하여 화장품등을 제조하게 되면 피부나 조직 깊숙이 침투하여 글루코스가 존재하는 환경에서만 수상채널 내부에 탑재한 유효성분을 방출할 수 있는 효과가 있다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

- A61K 47/42 (2013.01)
- A61K 8/65 (2013.01)
- A61K 8/84 (2013.01)
- A61K 9/0014 (2013.01)
- A61K 9/1274 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)

박석호

서울특별시 동대문구 전농로 124-5 202호 (전농동)

(72) 발명자

김태훈

강원도 춘천시 애막골길3번길 12, 104호(석사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	P0002756
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	(주)에이텍
연구사업명	지역주력산업육성사업
연구과제명	글루코스 감지반응 특성이 있는 등방성 지질 액정 나노제형 및 미백/주름개선 화장
품 개발	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	강원대학교 산학협력단
연구기간	2018.04.01 ~ 2019.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

지질이중층과 수상채널을 포함하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체에 있어서,

상기 모노올레인 큐빅상 나노 구조체는 상기 수상채널내에 소수화된 젤라틴(gelatin); 및 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine);을 포함하는 것을 특징으로 하며,

상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 pH가 4.7를 초과하는 환경에서 복합체를 형성하여 수상채널을 폐쇄시키고, pH가 4.7이하인 환경에서 복합체가 해체되어 수상채널을 개방시키는 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 소수화된 젤라틴은 상기 젤라틴의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride group)와 축합반응을 하여 소수화되며, 상기 소수화된 폴리에틸렌이민은 상기 폴리에틸렌이민의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride)와 축합반응을 하여 소수화되는 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 소수화된 젤라틴은 아미노기와 염화카보닐기의 몰비가 1: 0.3 내지 0.7(아미노기:염화카보닐기)이며, 상기 소수화된 소수화된 폴리에틸렌이민은 아미노기와 염화카보닐기의 몰비가 1: 0.04 내지 1.39(아미노기:염화카보닐기)인 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 모노올레인 큐빅상 나노 구조체는 레티닐 팔미테이트(Retinyl Palmitate)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체.

청구항 7

지질이중층과 수상채널을 포함하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체에 있어서,

상기 모노올레인 큐빅상 나노 구조체는 상기 수상채널내에 소수화된 젤라틴(gelatin); 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine); 및 소수화된 글루코스 산화효소(glucose oxidase);을 포함하는 것을 특징으로 하며,

상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 pH가 4.7를 초과하는 환경에서 복합체를 형성하여 수상채널을 폐쇄시키고, pH가 4.7이하인 환경에서 복합체가 해체되어 수상채널을 개방시키는 것을 특징으로 하며,

상기 소수화된 글루코스 산화효소는 글루코스를 감지하여 글루콘산으로 변환시키는 방법으로 상기 수상채널내 pH를 4.7 미만으로 감소시켜 상기 수상채널을 개방시키는 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상 나노 구조체.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 모노올레인 큐빅상 나노구조체는 마그네슘 아스코빌 포스페이트(magnesium ascorbyl phosphate)를 상기 수상채널내에 탑재한 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상나노 구조체.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 모노올레인 큐빅상 나노 구조체는 직경이 10 내지 100nm인 것을 특징으로 하는 모노올레인 큐빅상나노 구조체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소수화된 젤라틴, 소수화된 폴리에틸렌이민과 소수화된 글루코스 산화효소를 포함하는 모노올레인 큐빅상을 포함하는 모노올레인 큐빅상 관한 것으로 글루코스를 감지하면 수상채널을 개방하여 탑재된 유효성분을 방출하는 모노올레인 큐빅상에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 모노올레인(Monoolein)은 적정량의 물로 수화되는 경우 큐빅상(cubic phase)을 형성한다. 상기 모노올레인 큐빅상(Monoolein cubic phase)은 양친매성 분자로서 패킹 파라미터(packing parameter)는 1보다 약간 크며, 수용액 상에서 자가-결합하는 특성이 있다. 모노올레인 큐빅상은 두께가 약 3.5nm인 지질 이중층 및 반지름 약 5nm인 상호 교차 수상채널(intercrossing-water channel)로 구성되어 있다. 모노올레인의 지질 이중층은 지용성 물질을 포집할 수 있고 상기 수상채널은 수용성 물질을 포집할 수 있는 특징이 있다.

[0004] 모노올레인 큐빅상의 수상채널에 포집되는 수용성 유효성분은 확산에 의해 빠른 시간에 방출되는 특징이 있다. 최근에는 모노올레인 큐빅상에 특정한 자극에 의해 방출여부를 조절하는 생화학적 스위치를 포함시켜 특정 자극에 의해서만 수상채널에 포집된 유효성분의 방출을 조절하는 연구들이 주목받고 있다.

[0005] 수용성 비타민 C의 안정한 유도체 중 하나인 마그네슘 아스코빌 포스페이트는 안정성이 높고, 항산화 효능이 우수하여 피부 미백 작용이 나타나는 것으로 알려져 있다. 그러나 상기 마그네슘 아스코빌 포스페이트는 수용성으로서 피부를 통과하지 못하여 그 효과가 반감되는 문제점이 있었다. 이에 상기 마그네슘 아스코빌 포스페이트를 모노올레인의 수상채널에 탑재하게 되면 모노올레인에 의해 피부침투효과가 향상되어 피부미백효과가 향상될 것으로 기대된다.

[0006] 모노올레인의 지질 이중층에는 지용성 유효성분이 포집된다. 지용성 유효성분은 소수성 정도에 따라 지질층으로 삽입되는 정도가 결정되므로 그 안정성이 향상되는 효과가 있다. 지용성 물질인 레티놀의 유도체인 레티닐 팔미테이트(Retinyl palmitate)는 피부가 건조해져서 각질이 생기는 플레이킹 현상을 줄이고 탄력을 회복시켜 건조하거나 손상된 피부를 생기 있게 변화시키는 효과가 있어서 화장품이나 샴푸 등에 많이 사용된다. 그러나 레티닐 팔미테이트는 지용성 비타민 A의 일종으로서 열, 빛, 수분 및 산소등에 의해 화학적 변성이 쉽게 일어나 안

정성이 쉽게 저하되는 문제점이 있었다.

[0007] 따라서 레티닐 팔미테이트와 같은 예민한 지용성 유효성분의 안정성을 향상시키고, 마그네슘 아스코빌 포스페이트와 같은 수용성 유효성분의 보관 및 운반을 용이하게 하며, 외부환경을 감지하여 능동적으로 약물을 방출하는 약물전달체가 개발된다면 효과와 지속성이 향상된 약물이나 화장품등을 개발할 수 있을 것으로 판단된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2018-0121103

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) Shah, J. C., Sadhale, Y., & Chilukuri, D. M. (2001). Advanced drug delivery reviews, 47(2-3), 229-250.

(비특허문헌 0002) Qiu, H., & Caffrey, M. (2000). Biomaterials, 21(3), 223-234.

(비특허문헌 0003) Razumas, V., Larsson, K., Mieziš, Y., & Nylander, T. (1996). The Journal of Physical Chemistry, 100(28), 11766-11774.

(비특허문헌 0004) Angelov, B., Angelova, A., Ollivon, M., Bourgaux, C., & Campitelli, A. (2003). Journal of the American Chemical Society, 125(24), 7188-7189.

(비특허문헌 0005) Riaz, M. N., Asif, M., & Ali, R. (2009). Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 49(4), 361-368.

(비특허문헌 0006) Simonne, A. H., & Eitenmiller, R. R. (1998). Journal of agricultural and food chemistry, 46(12), 5273-5277.

(비특허문헌 0007) Matsuda, M., & Taguchi, T. (2012). Science and technology of advanced materials, 13(6), 064212.

(비특허문헌 0008) Guo, H., & Kim, J. C. (2017). Journal of Dispersion Science and Technology, 38(2), 272-279.

(비특허문헌 0009) Caffrey, M. (1987). Biochemistry, 26(20), 6349-6363.

(비특허문헌 0010) Goncalves, A., Estevinho, B. N., & Rocha, F. (2016). Trends in Food Science & Technology, 51, 76-87.

(비특허문헌 0011) Jo, Seong-Min; Kim, Jin-Chul, Lipids, 43(10), 937-943, 2008

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 수상채널 내에 위치하는 소수화 젤라틴(gelatin)과 소수화 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)의 복합체가 pH 변화에 따라 형성 또는 해체되므로 수상채널을 폐쇄하거나 개방하는 모노올레인 큐빅상에 관한 것으로, 특히, 소수화된 글루코스 산화효소가 글루코스를 감지하여 수상채널 내부의 미세환경 pH를 변화시키므로 수상채널에 탑재된 유효성분을 방출할 수 있는 모노올레인 큐빅상을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 소수화된 젤라틴(gelatin); 및 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine);을 포함하는 모노올레인 큐빅상을 제공한다.

- [0014] 상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 상기 지질이중층에 고정된 상태로 복합체를 형성하면 수상채널을 폐쇄시키고 복합체가 해체되면 수상채널을 개방하는 것을 특징으로 하며 상기 수상채널의 pH가 4.7를 초과하는 환경에서 복합체를 형성하고 pH가 4.7이하인 환경에서 복합체가 해체되므로 수상채널을 조절하게 된다.
- [0015] 상기 소수화된 젤라틴은 상기 젤라틴의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanoyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride group)와 축합반응을 하여 소수화되며, 상기 소수화된 폴리에틸렌이민은 상기 폴리에틸렌이민의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanoyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride)와 축합반응을 하여 소수화된다. 상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 지질이중층에 고정되어 있고 pH가 4.7을 초과하는 환경에서 수상채널내에서 복합체로 존재하며 pH가 4.7 미만의 환경이 되면 상기 복합체가 해체되어 수상채널을 개방하게 된다.
- [0016] 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 레티닐 팔미테이트(Retinyl Palmitate)를 더 포함할 수 있으며 상기 레티닐 팔미테이트는 지질이중층에 위치하여 그 안정성이 향상된다.
- [0017] 본 발명은 소수화된 젤라틴(gelatin); 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine); 및
- [0018] 소수화된 글루코스 산화효소(glucose oxidase);을 포함하는 모노올레인 큐빅상을 제공한다.
- [0019] 상기 모노올레인 큐빅상은 pH 4.7을 초과하는 조건에서 상기 수상채널을 폐쇄하며, 소수화된 글루코스 산화효소가 글루코스(glucose)를 감지하면 상기 수상채널내 pH를 4.7 미만으로 감소시켜 상기 수상채널을 개방하게 된다.
- [0020] 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 비타민 C의 유도체인 마그네슘 아스코빌 포스페이트(magnesium ascorbyl phosphate)을 포함하며 그 직경이 10 내지 100nm에 지나지 않아 피부에 침투되어 마그네슘 아스코빌 포스페이트의 세포내재화를 향상시키는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명은 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민이 지질이중층에 고정된 상태로 수상채널내에서 복합체를 형성하여 상기 수상채널을 폐쇄하였다가 수상채널내의 pH가 저하된 환경에서 상기 복합체가 해체되어 수상채널이 개방되므로 수상채널에 탑재된 유효성분이 방출되는 특징이 있다. 특히 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 소수화된 글루코스 산화효소를 포함하여 글루코스를 감지하여 수상채널을 개방하는 특징이 있으며 그 크기가 100nm 이하여서 피부 침투가 용이한 효과가 있다.
- [0023] 따라서 본 발명의 모노올레인을 이용하여 화장품등을 제조하게 되면 피부나 조직 깊숙이 침투하여 글루코스가 존재하는 환경에서만 수상채널 내부에 탑재한 유효성분을 방출할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 젤라틴(Gelatin)(A), 데카노일 젤라틴(Decanoyl Gelatin, DeGel)(1/0.3)(B), DeGel(1/0.5)(C), DeGel(1/0.7)(D)의 ¹H NMR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- 도 2는 폴리에틸렌이민(poly(ethylene imine), PEI)(A), 데카노일 폴리에틸렌이민(Decanoyl poly(ethylene imine), DePEI)(1/2.5)(B), DePEI(1/5) (C), DePEI (1/10) (D) 및 DePEI (1/20) (E) 의 ¹H NMR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- 도 3은 Gelatin(A), DeGel(1/0.3)(B), DeGel(1/0.5) (C) 및 DeGel (1/0.7) (D)의 FT-IR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- 도 4는 PEI (A), DePEI(1/2.5) (B), DePEI(1/5) (C), DePEI(1/10) (D) 및 DePEI(1/20) (E) 의 FT-IR 스펙트럼을 도시한 것이다.
- 도 5는 Gelatin (●), DeGel(1/0.3) (△), DeGel(1/0.5) (▼) 및DeGel(1/0.7) (□)의 공기/물 계면 프로파일을 도시한 것이다.
- 도 6은 PEI (●), DePEI(1/2.5) (○), DePEI(1/5) (▼), DePEI (1/10) (△) 및 DePEI (1/20) (□) 의 공기/물 계면 프로파일을 도시한 것이다.
- 도 7은 DeGel/DePEI 복합체의 수력학적 반지름(hydrodynamical diameter, □) 및 Gelatin의 Carboxylic group

과 PEI의 amino group의 몰비를 9/1에서 1/9로 변화면서 pH 7.0에서 현탁액의 광 산란 강도(light scattering intensity)(●)을 도시한 것이다.

도 8은 Gelatin의 Carboxylic group와 PEI의 amino group를 1:1의 몰비로 유지한 채 pH를 변화게끔 하면서 DeGel/DePEI 복합체의 수력학적 반지름을 도시한 것이다.

도 9의 패널 A)는 CP(nothing), CP(RP) 및 CP(RP/DeGel/DePEI)의 편광 광학 현미경 사진을 도시한 것이며 패널 B)는 Cubic(MAP), Cubic(MAP/pol), Cubic(MAP/pol/GOD)의 편광 광학 현미경 사진을 도시한 것이다.

도 10은 에멀전의 현미경 촬영 사진으로, 에멀전 제조직후, 5℃에서 1주, 2주, 및 3주동안 보관한 에멀전에 대한 것이다.

도 11은 에멀전의 현미경 촬영 사진으로, 에멀전 제조직후, 40℃에서 1주, 2주, 및 3주동안 보관한 에멀전에 대한 것이다.

도 12는 CP(RP)에 탑재된 RP의 시간-의존성 화학적 안정성을 도시한 것이다(범례: 5℃ (●), 20℃ (○), 30℃ (▼) 및 40℃ (△)).

도 13은 CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP의 시간-의존성 화학적 안정성을 도시한 것이다(범례: 5℃ (●), 20℃ (○), 30℃ (▼) 및 40℃ (△)).

도 14는 O/W 에멀전에 탑재된 RP의 시간-의존성 화학적 안정성을 도시한 것이다(범례: 5℃ (●), 20℃ (○), 30℃ (▼) 및 40℃ (△)).

도 15는 모노올레인 큐빅상의 투과전자현미경 사진을 보여준다.

도 16은 글루코스 농도에 따른 모노올레인 큐빅상의 MAP 방출율을 보여준다.

도 17은 시간 경과에 따른 본 발명의 모노올레인 큐빅상의 MAP 유보율을 보여준다.

도 18은 본 발명의 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액의 비타민의 피부투과도(경피투과 속도)를 보여준다.

도 19는 비타민 용액과 글루코스 감지반응 특성이 있는 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상 현탁액의 세포 독성 평가결과를 보여준다.

도 20은 비타민 용액과 글루코스 감지반응 특성이 있는 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상 현탁액의 콜라겐 생합성량을 평가한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 지질이중층과 수상채널을 포함하는 모노올레인 큐빅상에 있어서, 소수화된 젤라틴(gelatin); 및 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine);을 포함하는 모노올레인 큐빅상을 제공한다. 상기 젤라틴은 단백질의 종류로서 사용된 것이며 상기 폴리에틸렌이민은 이온성 고분자로서 사용된다. 상기 단백질과 이온성 고분자는 수용성이므로 지질이중층과는 혼합되거나 그 내부에 존재할 수 없다. 그러나 본 발명에서는 상기 단백질인 젤라틴과 이온성 고분자인 폴리에틸렌이민을 소수화 개질하여 소수성을 향상시킨 것이다. 그 결과 상기 젤라틴과 폴리에틸렌이민의소수화 개질부분은 모노올레인 큐빅상의 지질이중층에 고정되며 그 나머지 부분은 수상채널에 드러나 있게 된다. 상기 젤라틴과 폴리에틸렌이민은 pH 4.7 이상의 환경에서 정전기적인 결합에 의해 복합체를 형성할 수 있다. 상기 복합체는 pH가 변화하여 상기 젤라틴과 폴리에틸렌이민의 표면전하가 변화하게 되면 해체되는 가역성 복합체인 특징이 있다.

[0027] 상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 상기 지질이중층에 고정된 상태로 복합체를 형성하면 수상채널은 폐쇄되고 상기 복합체가 해체되면 수상채널은 개방된다. 특별히, 상기 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민은 pH가 4.7를 초과하는 환경에서 복합체를 형성하고 pH가 4.7이하인 환경에서 복합체가 해체된다. 따라서 수상채널내의 미세환경 pH를 조절하면 상기 복합체의 형성 또는 해체를 조절할 수 있으므로 수상채널의 폐쇄 및 개방으로 인한 유효성분의 방출을 조절할 수 있게 된다.

[0028] 상기 젤라틴의 소수화는 상기 젤라틴의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanoyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride group)와 축합반응을 하여 소수화되는 것을 특징으로 하며, 상기 폴리에틸렌이민의 소수화는 상기 폴리에틸렌이민의 아미노기(amino group)가 데카노일 클로라이드(decanoyl chloride)의 염화

카보닐기(carbonyl chloride)와 축합반응을 하여 소수화되는 것을 특징으로 한다. 상기 소수화된 젤라틴은 아미노기와 염화카보닐기의 몰비가 1: 0.3 내지 0.7(아미노기:염화카보닐기)인 것을 특징으로 하며 상기 소수화된 소수화된 폴리에틸렌이민은 아미노기와 염화카보닐기의 몰비가 1: 0.04 내지 1.39(아미노기:염화카보닐기)인 것을 특징으로 하는데 상기 비율을 벗어나게 되면 소수화 젤라틴과 소수화 폴리에틸렌이민의 양친성이 저하되어 지질이중층에 고정되기 어렵다.

[0029] 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 레티닐 팔미테이트(Retinyl Palmitate)를 더 포함한다. 상기 레티닐 팔미테이트는 피부노화예방에 효과가 있으나 빛, 산소등에 매우 약하게 쉽게 변질되는 단점이 있다. 상기 레티닐 팔미테이트는 지질의 일종으로서 본발명의 모노올레인 큐빅상에 포함되면 지질이중층에서 위치하여 그 안정성이 향상되는 효과가 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 레티닐 팔미테이트(Retinyl Palmitate)을 포함하는 모노올레인 큐빅상은 종래의 레티닐 팔미테이트 수중유 에멀전에 대비하여 그 안정성이 우수하여 피부노화예방용 화장품 조성물로 사용하면 보존기간 및 그 효과가 더 향상되는 것으로 확인되었다.

[0030] 본 발명은 소수화된 젤라틴(gelatin); 소수화된 폴리에틸렌이민(polyethylenimine); 및

[0031] 소수화된 글루코스 산화효소(glucose oxidase);을 포함하는 모노올레인 큐빅상을 제공한다. 상기 모노올레인 큐빅상은 상기에서 설명한 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민의 수상채널내 복합체 형성을 조절하는 방법으로 수상채널을 폐쇄하거나 개방하게 된다. 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 소수화된 글루코스 산화효소를 포함하여 글루코스가 존재하는 환경에서 모노올레인 큐빅상의 수상채널을 개방하는 것을 특징으로 한다. 상기 모노올레인 큐빅상은 pH 4.7을 초과하는 조건에서 상기 수상채널을 폐쇄하고 있다가 소수화된 글루코스 산화효소가 글루코스(glucose)를 감지하면 상기 수상채널을 개방한다. 상기 소수화된 글루코스 산화효소는 글루코스를 감지하여 글루콘산으로 변환하게 되고 이 과정에서 상기 수상채널내의 pH가 4.7 미만으로 감소되어 소수화된 젤라틴과 소수화된 폴리에틸렌이민의 수상채널 내 복합체가 해체되므로 상기 수상채널이 개방된다.

[0032] 본 발명의 모노올레인 큐빅상은 비타민C의 유도체인 마그네슘 아스코빌 포스페이트(magnesium ascorbyl phosphate)를 상기 수상채널 내에 탑재할 수 있다. 상기 마그네슘 아스코빌 포스페이트가 탑재된 모노올레인 큐빅상은 직경이 10 내지 100nm이어서 피부침투가 용이한 장점이 있다. 상기 직경이 10nm 미만이면 크기가 너무 작아 세포독성이 나타날 수 있으며 상기 직경이 100nm을 초과하면 피부장벽을 통과하기 어려워 그 효과가 반감될 수 있다.

[0033] 하기에서 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] **실시예**

[0037] **1. 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 복합체**

[0038] **1.1 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 이민의 제조**

[0039] 데카노일 젤라틴(Decanoyl Gelatin, DeGel)은 Matsuda et al. (2012)의 방법에 따라 준비하였다. 먼저, 젤라틴(Gelatin, Gel) 10g과 트라이메틸아민(TMA) 1ml을 다이메틸 설폭사이드(DMSO) 99ml에 용해시켜 혼합용액을 만들었다. 젤라틴의 아미노기(amino group)와 데카노일 클로라이드(decanyl chloride)의 염화카보닐기(carbonyl chloride)의 몰비(molar ratio)가 1:0.3, 1:0.5 및 1:0.7이 되도록 데카노일 클로라이드의 첨가량을 달리하여 혼합용액을 제조하고 상온의 질소분위기에서 12시간동안 젤라틴의 아미노기와 데카노일 클로라이드의 염화 카보닐기의 축합반응을 수행하였다. 상기 축합반응이 완료된 혼합용액에 차가운 에탄올 600ml을 부어 DeGel을 침전시킨 후 여과지로 고액분리하여 DeGel을 수득하였다. 상기 수득한 DeGel은 다시 차가운 에탄올로 세척하고 50도 오븐에서 건조시켰다. 상기 방법에 따라 제조된 DeGel은 아미노기(a)와 염화카보닐기(b)의 몰비에 따라 DeGel(a/b)로 명명하였다.

[0040] 데카노일 폴리에틸렌이민(Decanoyl Polyethylenimine, DePEI)은 Guo et al., (2017)의 방법에 따라 제조하였다. 폴리에틸렌이민 5g을 다이클로로메탄(DCM) 50ml에 용해시켜 폴리에틸렌이민 용액을 제조한 후 트라이메틸아민 200 μ l을 더 첨가하였다. 데카노일 클로라이드 1.3g, 2.65g, 5.3g 및 11.1g을 각각을 다이클로로메탄 50ml에 용해시켜 데카노일 클로라이드 용액을 제조하였다. 상기 데카노일 클로라이드 용액을 상기 폴리에틸렌이민 용액에 30분 동안 천천히 첨가하면서 반응시켰으며 반응시간 동안 마그네틱 바를 이용하여 교반시켜주었다. 반응이 완료된 데카노일 클로라이드 및 폴리에틸렌이민의 혼합용액은 상온의 질소분위기에서 12시간 동안 교반하였으며 에틸에테르 700ml을 첨가하여 DePEI를 침전시켰다. DePEI가 침전된 혼합용액은 여과지를 이용하여 고액분리하였으며 상기 고액분리를 통해 수득된 DePEI는 다이클로로메탄에 다시 용해시킨 후 비용매 조건에서 재침전시키는 방법으로 순도를 향상시켰다. 상기 재침전을 통해 수득한 DePEI는 40도 오븐에서 진공상태로 건조시

켰다. 상기 방법에 따라 제조된 DePEI은 아미노기(a)와 염화카보닐기(b)의 몰비에 따라 DePEI(a/b)로 명명하였다.

[0042] 1.2 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 이민의 합성 확인

[0043] 1.2.1 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 이민의 수소핵자기 공명분석

[0044] DeGel과 DePEI를 중수(D₂O)에 10mg/ml이 되도록 용해시켰다. 수소핵자기공명스펙트럼은 NMR 분광기(JNM-ECZ400S/L1 400 MHz, JEOL, Japan; located in the Central Laboratory of Kangwon National University)로 얻었다.

[0045] 도 1은 젤라틴(Gel), 데카노일 젤라틴(DeGel)의 수소핵자기공명 스펙트럼을 보여주며 상기 DeGel은 DeGel(1/0.3), DeGel(1/0.5) 및 DeGel(1/0.7)로 제조된 것이다. 소수성 잔기인 메틸렌기(methylene group)의 수소 핵자기공명 신호는 1.1ppm 및 2.6ppm에서 확인된다. DeGel의 경우 젤라틴에 대비하여 메틸렌기 신호가 상대적으로 강한 것으로 확인되어 소수성 잔기인 데카노일 잔기(decanoyl group)가 젤라틴에 결합된 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 도 2는 폴리에틸렌이민(PEI)과 데카노일 폴리에틸렌이민의 수소핵자기공명 스펙트럼을 보여주며 상기 DePEI는 DePEI(1/2.5), DePEI(1/5), DePEI (1/10) 및 DePEI (1/20)로 제조된 것이다. 수소핵자기공명 스펙트럼의 CH₂는 2.53ppm에서 확인되며, DePEI의 데카노일 메틸 잔기(methyl group)는 0.87ppm에서, DePEI의 메틸렌 잔기(methylene group)는 1.29ppm에서 확인된다. 또한 PEI의 아미노 결합 주변의 메틸렌 잔기는 3.14ppm에서 발견되었다. PEI의 메틸렌 잔기와 데카노일의 메틸 잔기의 스펙트럼 면적을 적분하여 PEI와 DC의 몰비를 계산한 결과, 실제 각각 메틸렌 잔기: 메틸 잔기가 1:0.01, 1:0.02, 1:0.04 및 1.1.39로 계산되었다.

[0048] 1.2.2 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 이민의 FT-IR 분광분석

[0049] 젤라틴, DeGel 및 DePEI 각각을 KBr과 함께 분쇄한 후 프레스를 이용하여 펠릿으로 만들어 FT-IR 분광기(Frontier, PerkinElmer, UK; located in the Central Laboratory of Kangwon National University) 분석을 실시하였다.

[0050] 도 3은 젤라틴(Gelatin), DeGel(1/0.3), DeGel(1/0.5) 및 DeGel(1/0.7)의 FT-IR 스펙트럼을 보여준다. C-O-C 스트레치(stretch)는 1015cm⁻¹, C-N 스트레치는 1240cm⁻¹, -CH₃는 1380cm⁻¹, 아마이드(II)는 1537cm⁻¹, 아마이드(I)는 1637cm⁻¹, -CH₂ 밴딩(bending)은 2933cm⁻¹, 아마이드(III)는 3280cm⁻¹에서 발견되었다. 데카노일과 젤라틴의 몰비가 증가할수록, 아마이드에 대응하는 신호는 증가하였는데, 이는 데카노일이 젤라틴에 아마이드 결합을 통해 성공적으로 결합(conjugated)되었음을 보여준다.

[0051] 도 4는 폴리에틸렌이민(PEI), DePEI(1/2.5), DePEI (1/5), DePEI (1/10) 및 DePEI (1/20)의 FT-IR 스펙트럼을 보여준다. PEI 스펙트럼의 경우 CN은 1299cm⁻¹, CH는 1459cm⁻¹, 2817cm⁻¹ 및 2937cm⁻¹, NH는 1578cm⁻¹ 및 3277cm⁻¹, CO는 1640-1690cm⁻¹으로 확인되었다. DePEI 스펙트럼의 경우 데카노일 잔기의 CH₂는 2843-2863cm⁻¹, amide(I)는 3300-3500cm⁻¹에서 발견되었는데, 이는 데카노일이 성공적으로 폴리에틸렌이민에 성공적으로 결합(conjugated)되었음을 보여준다.

[0053] 1.2.3 데카노일 젤라틴 및 데카노일 폴리에틸렌 이민의 액체-기체 계면장력 분석

[0054] 수용액 상태에서 젤라틴, DeGel, 폴리에틸렌이민 및 DePEI의 계면장력(interfacial tension)을 측정하여 액체-기체 계면활성도를 조사하였다. 젤라틴 및 DeGel을 증류수에 각각 10mg/ml의 농도가 되도록 용해시킨 후 증류수를 이용하여 2회 희석하였다. 폴리에틸렌이민 및 DePEI 또한 증류수에 각각 10mg/ml의 농도가 되도록 용해시킨 후 증류수를 이용하여 2회 희석하였다. 액체-기체 계면장력은 계면장력계(DST 60, SEO, South Korea)를 이용한 환절법(ring method)로 측정하였다.

[0055] 도 5는 젤라틴(Gelatin), DeGel(1/0.3), DeGel(1/0.5) 및 DeGel(1/0.7)의 액체-기체 계면장력 프로파일을 보여준다. 젤라틴은 단백질의 일종으로 양친매성이 있어 오일/워터 에멀전을 위한 유화제로 사용된다. 젤라틴 용액의 액체-기체 계면장력은 그 농도가 10mg/ml 증가할 때, 72에서 61dyne/cm으로 감소하는 것으로 확인되었다. DeGel 용액의 액체-기체 계면장력을 분석한 결과, Gelatin 용액과 같이 포화방식(saturation manner)으로 감소하는 것이 확인되었으며 데카노일과 젤라틴의 몰비가 커질수록 더 낮아지는 것이 확인되었다(DeGel(1/0.3):

59.5dyne/cm, DeGel(1/0.5): 48.0dyne/cm 및 DeGel(1/0.7): 36 dyne/cm). 이는 데카노일 잔기가 젤라틴에 결합함에 따라, 소수성이 증가하여 젤라틴의 양친매성이 향상된다는 것을 의미한다.

[0056] 도 6은 폴리에틸렌이민(PEI), DePEI(1/2.5), DePEI(1/5), DePEI(1/10) 및 DePEI(1/20)의 액체-기체 계면장력 프로파일을 보여준다. 폴리에틸렌이민 용액의 액체-기체 계면장력은 농도 변화에 대하여 무관하였으며 DePEI(1/2.5) 및 DePEI(1/5)의 액체-기체 계면장력 또한 거의 변화가 없었다. 수소핵자기공명스펙트럼을 이용하여 DePEI(1/2.5) 및 DePEI(1/5)의 폴리에틸렌이민(PEI)과 데카노일(DC)의 몰비를 계산한 결과, 각각 1:0.01(PEI:DC) 및 1:0.02(PEI:DC)인 것이 확인되었다. 상기 결과는 DePEI(1/2.5) 및 DePEI(1/5)의 데카노일 잔기의 양이 소수성을 증가시켜 폴리에틸렌이민의 양친매성(표면활성도)을 향상시킬 수 없다는 것을 의미한다.

[0057] 이에 반하여 DePEI(1/10) 용액은 그 농도가 10mg/ml 증가하는 경우, 액체-기체 계면장력이 72dyne/cm에서 65.1dyne/cm으로 낮아졌으며 DePEI(1/20) 용액의 경우 72dyne/cm에서 48.8dyne/cm으로 급격히 저하된 것이 확인되었다. 이는 데카노일 잔기가 폴리에틸렌이민에 결합함에 따라, 소수성이 증가하여 폴리에틸렌이민의 양친매성(표면활성도)이 향상된다는 것을 의미한다. 수소핵자기공명스펙트럼을 이용하여 DePEI(1/10) 및 DePEI(1/20)의 폴리에틸렌이민(PEI)과 데카노일(DC)의 몰비를 계산한 결과, 각각 1:0.04(PEI:DC) 및 1:1.39(PEI:DC)인 것이 확인되었다.

[0059] **1.3 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민 복합체의 제조 및 분석**

[0060] **1.3.1 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민 복합체의 제조**

[0061] 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민(DeGel/DePEI) 복합체를 제조하기 위하여 DeGel과 DePEI를 동시에 시트르산-나트륨 인산 완충용액(citrate-sodium phosphate buffer, pH 7.0)에 용해시켜 젤라틴의 카르복실기와 폴리에틸렌이민의 아미노기는 몰비가 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5, 4:6, 3:7, 2:8 및 1:9가 되도록 하였다. 상기 용해된 DeGel과 DePEI의 젤라틴과 폴리에틸렌이민의 총 농도는 1%(w/w)가 되도록 하였다.

[0063] **1.3.2 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민 복합체의 크기분석**

[0064] DeGel/DePEI 복합체에 대한 pH의 효과를 확인하기 위하여 젤라틴의 카르복실기와 폴리에틸렌이민의 아미노기의 몰비가 5:5가 되도록 DeGel 및 DePEI를 버퍼 용액(pH 3.0 내지 9.0)에 용해시켰다. DeGel/DePEI 복합체의 수력학적 반지름(Hydraulic Radius) 및 DeGel/DePEI 복합체 현탁액의 광 산란 강도는 광 산란 장치(Plus 90, Brookhaven instrument, USA)를 이용하여 결정하였다.

[0065] 도 7은 DeGel/DePEI 복합체의 수력학적 반지름(nm)과 광 산란 강도(dynamic light scattering)의 측정결과를 보여준다. DeGel/DePEI 복합체에서 젤라틴의 카르복실기와 폴리에틸렌이민의 아미노기의 몰비가 9:1에서 5:5로 변화하는 경우, DeGel/DePEI 복합체의 반지름은 669nm에서 1606nm로 증가하고 5%를 넘어서는 경우 감소하는 것이 확인되었다. 상기 결과는 DeGel/DePEI 복합체가 이온화된 카르복실기와 수소화된 아미노기의 정전기적 상호작용에 의해 형성되기 때문으로 판단된다. DeGel/DePEI 복합체는 이온화된 카르복실기와 수소화된 아미노기의 정전기적 상호작용에 의해 형성되기 때문에 상기 카르복실기와 아미노기의 몰비가 동일하게 되면 상기 복합체의 크기는 증가하게 된다. 상기 카르복실기와 아미노기의 이온화 정도는 pH 7.0에서 동일하다. 따라서 DeGel/DePEI 복합체의 최대 복합화도는 젤라틴의 카르복실기와 폴리에틸렌이민의 아미노기의 몰비가 5:5인 경우에서 확인된다. 광 산란 강도는 복합체의 크기 및 수에 비례한다. 상기 광 산란 강도 역시 가장 강한 것으로 확인되었다.

[0066] 도 8은 젤라틴의 카르복실기와 폴리에틸렌이민의 아미노기의 몰비가 5:5로 유지된 상태에서 pH 변화에 따른 DeGel/DePEI 복합체의 수력학적 반지름을 확인한 결과를 보여준다. 실험결과 pH 값이 3 에서 6으로 증가함에 따라 반지름이 196nm에서 358nm로 증가하는 것이 확인된다. DeGel의 pK 값은 약 4에 해당한다. 따라서 pH 3의 환경에서 DeGel은 양전하를 띄게 되어 음전하 성질이 감소하므로 DeGel과 DePEI 사이의 정전기적 상호작용이 저하되어 복합체의 반지름이 줄어든다. 이에 반하여 pH 값이 3에서 6으로 증가하게 되면, DeGel이 더 강한 음전하 성질을 가지게 되므로 DePEI와의 정전기적 상호작용을 강화되어 복합체의 반지름이 증가된다.

[0067] pH가 6에서 7로 변하는 경우 복합체의 반지름은 358에서 6724nm로 급격하게 증가하는 것이 확인되는데 이는 DeGel 및 DePEI의 정전기적 인력은 더 강해졌기 때문이다. 한편, pH가 7에서 9로 변하는 경우, 상기 복합체의 반지름은 6742nm에서 137nm로 급격히 작아지는 것이 확인된다. 이는 폴리에틸렌이민의 아미노기가 탈양성자화(deprotonated)되어 이온화도가 급격히 감소하기 때문이다. 폴리에틸렌이민의 아미노기는 pK 값이 pH 9.0에서 크게 벗어나지 않는다. 따라서 pH가 7에서 9로 변하는 경우, 폴리에틸렌이민의 아미노기는 이온화도가 급격히 저하되어 DeGel과 DePEI의 정전기적 상호작용은 약화되므로 복합체의 반지름 또한 뚜렷하게 감소되는 것이다.

[0069] **2. 소수화 개질 글루코스 산화효소**

[0070] **2.1 글루코스 산화효소(GOD,Glucose oxidase)의 소수화**

[0071] 글루코스 산화효소를 상기 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민(DeGel/DePEI) 복합체와 함께 모노올레인 지질층에 고정시키기 위하여 소수화 하였다. 글루코스 산화효소(Glucose oxidase, 이하 GOD)의 소수성 앵커로 팔미트산(Palmitic acid)을 사용하였으며 상기 팔미트산중 Palmitic acid N-hydroxysuccinimide ester(이하 PA)을 사용하였다. GOD에 PA를 결합한 것을 소수화 개질 글루코스 산화효소(hydrophobically modified GOD, HmGOD)로 명명하였다.

[0072] GOD와 PA의 물 비율은 1:40이 되도록 하였다. 먼저 GOD 40mg를 인산완충용액(sodium phosphate 0.16M, pH 8.8, 2% deoxycholate) 10ml에 녹였다. 동시에 PA 3.6mg을 1,4-dioxane 0.4ml에 녹였다. GOD 용액에 PA 용액을 2시간마다 0.1ml씩 첨가하며 교반하였다. 0.4ml을 모두 투입한 후, 30℃를 유지하며 12시간 동안 반응시켜주었다.

[0073] 상기 반응이 끝난 후, 불용성 우레아(urea)를 제거하기 위해 0.45 μ m 주사 필터링을 하고, 인산완충용액(sodium phosphate 0.2M, pH8.0) 500ml에서 투석하였다. 이때 투석 막의 pore 크기는 MW 10,000을 사용하였다. 12시간 동안 투석시키되, 3시간마다 완충용액을 교체하였고, 12시간 이후 0.15M PBS 완충용액 pH 7.4 500ml에서 12시간 투석하였다. 투석이 모두 끝난 후, 0.22 μ m 주사 필터링하고 동결 건조하여 건조 상태의 HmGOD를 얻었다.

[0074] 소수화 과정에서 사용되는 분산제는 hydrophilic lipophilic balance number(HLB number)가 4~15인 분산제가 적합한 것으로 확인되었다. 상기 범위를 벗어난 분산제를 사용할 경우에 글루코스 산화효소가 변성되고, palmitic acid N-hydroxysuccinimide ester를 효과적으로 분산시킬 수 없다. HLB가 4~15인 분산제는 sorbitan laurate와 sorbitan palmitate, PEO(20) sorbitan trioleate, deoxycholate 등이 있다. 또한, 용액에서의 분산제 농도는 0.1~5%가 적합하며, 가장 적합한 범위는 1~3%이다. 이 범위를 벗어나면 낮은 경우 소수성 앵커인 PA를 녹이기 위해 더 많은 양의 유기용매가 첨가되어 글루코스 산화효소가 변성되며, 높은 경우에는 PA가 용해되지 않거나 응집되어 반응이 진행되지 않을 수 있다.

[0075] 소수화시 글루코스 산화효소와 소수성 앵커의 물 비율은 1:50~1:30이 가장 적합하다. 이보다 낮은 범위일 경우 글루코스 산화효소에 결합되는 소수성 앵커가 적어 모노올레인 큐빅상에 고정화될 수 없고, 이보다 높은 범위일 경우 소수성 앵커가 과도해 효소 활성이 저하되기 때문이다.

[0077] **2.2 글루코스 산화효소의 소수화 분석**

[0078] 소수화 개질 글루코스 산화효소(hydrophobically modified GOD, HmGOD)의 경우, 단백질로서 ¹H-NMR로 소수화 정도를 분석하기 어려운 문제점이 있어 TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid)법을 이용하여 소수화를 분석하였다. 먼저 인산완충용액(sodium phosphate 0.01M, pH 8.9)을 제조하였다. 상기 완충용액을 이용하여 5% sodium lauryl sulfate (SLS)용액과 0.03% TNBS 용액을 제조하였다. 5% SLS용액은 SLS 1g을 20.74ml의 인산완충용액에 녹여 제조하였다. 0.03% TNBS 용액은 5% TNBS 용액 100 μ l를 인산완충용액 16.6ml에 넣어 제조하였다. HmGOD는 1mg/ml이 되도록 인산완충용액에 녹였다. 5% SLS 용액 1ml, 0.03% TNBS 용액 1ml과 HmGOD 용액 0.5ml을 10ml 바이알에 넣고 50℃에서 1시간동안 반응시켰다. 이후, 1.9ml HCl(0.21M) 용액을 넣고, 상온에서 30분간 방치하여 반응을 종료시켰다. 이후 335nm UV spectrometer를 통해 흡광도를 관찰하여 소수화정도를 확인하였다. 이때, 다양한 농도의 아미노산 표준용액을 상기와 같은 절차에 따라 표준 곡선을 제조하였다. GOD에 결합된 팔미트산의 수는 흡광도를 표준 곡선과 비교함으로써 결정되었다. 소수화 시키지 않은 GOD도 동일한 과정으로 아미노기를 측정하였다. GOD의 흡광도는 0.222이고, HmGOD의 흡광도는 0.205로 측정되었다. 표준 곡선에 대입하여 계산한 결과에 의하면, HmGOD의 아미노기 수는 21개이며 GOD의 아미노기 수는 24개로, 3개의 PA가 GOD에 결합되었음을 확인하였다.

[0080] **2.3 소수화 개질 글루코스 산화효소의 효소활성 분석**

[0081] 소수화 개질 글루코스 산화효소(hydrophobically modified GOD, HmGOD) 효소 활성을 평가하였다(Jo & kim, *Lipids*, 43(10), 937-943, 2008).

[0082] 10% 글루코스 용액 0.173ml과 0.21mM o-dianisidine dihydrochloride 용액 0.827ml를 혼합 하였다. 그 후 0.33 mg/ml horseradish peroxidase 용액 (60 purpurogallin units/ml) 0.033ml을 용액에 첨가했다. 최종적으로, 미리 제조된 용액에 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충용액 (0.023mg/ml) 중의 0.1% 효소 용액을 첨가하였다. 효소 반응의 정도는 시간에 따라 500nm에서 흡광도를 측정하여 측정하였다. 대조군으로서, 효소가 없는 아세트산나트륨 완충용액을 사용하였다. 활성은 기울기로, HmGOD의 효소 활성은 GOD의 효소 활성의 70.54% 수준인 것

으로 확인되었다.

[0084] 2.4 pH에 따른 소수화 개질 글루코스 산화효소의 효소활성 확인

[0085] 시간에 따른 글루코스 용액의 pH를 측정함으로써 GOD와 HmGOD의 효소활성을 확인하였다. 2.5mg의 GOD와 HmGOD를 5ml의 글루코스 용액에 용해시켰다. 글루코스 용액의 농도는 0mg/dL, 50mg/dL, 100mg/dL, 200mg/dL, 400mg/dL이며, 상온에 두어 pH 변화를 12시간 동안 측정하였다. GOD의 글루코스 농도에 따른 용액의 pH 변화는 글루코스가 포함되지 않은 용액의 경우 pH 6.3 내지 6.2 로 6.25 근처에서 12시간동안 거의 일정하게 유지되지만, 글루코스 농도가 50mg/dL인 경우, pH값이 2시간 동안 pH 6.21에서 pH 3.70으로 감소하는 것이 확인 되었다. 2시간 이후 pH 3.37까지 감소하는 것이 확인 되었는데, 이는 HmGOD가 글루코스를 글루콘산으로 전환시켜 용액의 pH가 감소하는 것으로 판단된다. 또한 1시간동안 pH가 급격히 감소한 경우, 효소반응이 1시간 이내에 종결되는 것이 확인 되었다. 글루코스 농도가 100mg/dL, 200mg/dL, 400mg/dL 용액 또한 pH 3.22, 3.07, 2.98까지 감소하였는데 이는 글루코스 농도가 높음에 따라 글루콘산으로 전환되는 양이 많기 때문에 pH의 감소정도가 컸던 것으로 판단된다. HmGOD의 글루코스 농도에 따른 용액의 pH 변화는 글루코스가 포함되지 않은 용액의 경우 pH 7.2 내지 6.8로 7.0 근처에서 12시간동안 거의 일정하게 유지되지만, 글루코스 농도가 50mg/dL인 경우, pH값이 2시간동안 pH 7.4에서 pH 4.47로 감소하는 것이 확인 되었으며 2시간 이후에는 pH 3.48까지 감소하는 것이 확인되었다. 상기 결과는 HmGOD가 글루코스를 글루콘산으로 전환시켜 용액의 pH가 감소하였다는 것을 의미하며 4시간동안 pH가 급격히 감소한 경우, 효소반응이 4시간 이내에 종결되었음을 의미한다. 추가적으로 글루코스 농도가 100mg/dL, 200mg/dL, 400mg/dL 용액 또한 pH 3.31, 3.21, 3.19까지 감소하는 것이 확인되었다. 글루코스 농도가 높음에 따라 글루콘산으로 전환되는 양이 많기 때문에 감소하는 정도가 높았다. 이를 통하여 HmGOD가 GOD와 마찬가지로 글루코스를 글루콘산으로 전환시킬 수 있는 활성이 있음을 확인하였다.

[0087] 3. 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/레티닐 팔미테이트 모노올레인 큐빅상

[0088] 3.1 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/레티닐 팔미테이트 모노올레인 큐빅상의 제조

[0089] 모노올레인 2g을 20ml 유리용기에 넣고 50℃ 수조에서 중탕하여 용융시켜 모노올레인 용융물을 제조한 후 상온에 두었다. 상기 제조한 모노올레인 용융물의 온도가 40℃가 되면 레티닐 팔미테이트(Retinyl Palmitate, RP) 40mg을 상기 모노올레인 용융물에 첨가하여 모노올레인-레티닐팔미테이트 혼합물을 제조하였다.

[0090] DeGel 카복실기와 DePEI 아미노기의 몰비가 5:5가 되도록 DeGel 및 DePEI를 증류수에 용해시키고 pH를 5.0으로 맞춘 후 35℃로 가열하여 DeGel-DePEI 혼합용액을 제조하였다. 이때 DeGel 및 DePEI의 양은 합하여 증류수 총 농도의 1%(w/w)가 되도록 하였다. 상기 DeGel-DePEI 혼합용액 0.714ml를 상기 제조한 모노올레인-레티닐 팔미테이트 혼합물에 상기 20ml 유리용기에 담겨 제조된 모노올레인-레티닐 팔미테이트 혼합물에 조심스럽게 도포하였다. 7일 이후, 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민 복합체를 형성하기 위하여, 0.143ml의 pH 7.4 PBS를 첨가하였다. 그 후 질소가스로 충전하여 상기 20ml 유리용기의 입구를 밀봉하고 DeGel-DePEI 혼합용액과 PBS 용액이 모노올레인에 완전히 흡수되어 깨끗하고 투명한 겔이 될 때까지 30℃ 오븐에 두어 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/레티닐 팔미테이트 모노올레인 큐빅상을 제조하였다. 이와 함께 모노올레인만으로 구성된 모노올레인 큐빅상, DeGel/DePEI과 모노올레인만으로 구성된 모노올레인 큐빅상을 제조하였다.

[0091] RP, DeGel 및 DePEI를 포함하는 모노올레인 큐빅상을 CP(RP/DeGel/DePEI)라고 명명하였으며, 모노올레인만으로 구성된 큐빅상을 CP(nothing)이라 하였으며, 레티닐 팔미테이트(RP)와 모노올레인만으로 구성된 큐빅상을 CP(RP)라고 명명하였다.

[0093] 3.2 CP(nothing), CP(RP), CP(RP/DeGel/DePEI)에 대한 편광 광학 현미경 분석

[0094] 상기 제조한 모노올레인 큐빅상을 커버 글라스의 O-링 스페이서에 채워 넣고 커버 글라스를 올린 후 상기 큐빅상이 위치한 셀을 만들었다. 상기 셀은 고온반응기(heating block, HS81, Mettler Toledo, USA)에서 30℃에서 80℃까지 분당 2도씩 온도를 상승시키면서 편광 광학 현미경을 통하여 큐빅상의 상전이를 관찰하였다.

[0095] 도 9의 패널 A)는 상기의 방법으로 관찰한 CP(nothing), CP(RP), and CP(RP/DeGel/DePEI)의 편광 광학 현미경 사진을 보여준다. CP(nothing)은 61℃ 보다 낮은 온도에서 평평한 채질감을 보여주었으며, 61.7℃에서 복굴절(birefringence)을 나타내어 고온에서는 복굴절이 더 명확히 관찰되었다. 모노올레인 큐빅상은 편광을 조사하는 경우 복굴절을 나타내지 않는 광학적 등방성을 가지며 80℃ 부근에서 육각상(hexagonal phase)으로 상전이가 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 육각상은 광학적 이방성(anisotropic)을 가지기 때문에, 편광 조사시 복굴절을 나타내며 상기 복굴절이 일어나기 시작하는 온도는 큐빅-육각 상전이 온도로부터 확인이 가능하다.

[0096] 본 발명에서는 실시예를 통하여 모노올레인 큐빅상의 상전이 온도를 확인하였다. 본 발명의 CP(nothing)의 상전이 온도는 61.7℃로 종래의 모노올레인 큐빅상에 대비하여 낮은 상전이 온도를 가지는 것으로 확인되었다. 본 연구에서 사용된 모노올레인은 리놀레산의 글리세라이드, 스테아릭산 및 팔리틱 산과 같은 불순물이 약 14%정도 포함하고 있다. CP(nothing)은 상기 불순물에 의해 모노올레인 큐빅상 이중층의 상전이 온도가 감소하게 되었으므로 인해 유동성을 가지게 된 것으로 판단된다.

[0097] 본 발명의 CP(RP)는 상전이 온도가 58.2℃로 CP(nothing)보다 약 3.5℃ 낮은 것으로 확인 되었다. 상기 RP는 지용성 화합물로서 모노올레인 큐빅상의 이중층에 녹이 들어가게 되며 그 함량은 모노올레인 질량 기준 2%(w/w)이다. 상기 RP는 이중층 막에 끼어들어가 유동성을 증가시킨다. 따라서 CP(RP)의 상전이 온도는 CP(nothing)보다 낮다. 추가적으로 CP(RP)의 등방성 성질(isotropic property)이 보다 낮은 온도 범위(30 내지 57.8℃)에서 관찰되는 것으로 보아 상기 RP는 모노올레인 큐빅상 이중층의 구조붕괴 없이도 안전하게 탑재될 수 있는 것으로 판단된다(도 9 참조).

[0098] CP(RP/DeGel/DePEI)의 상전이 온도는 약 56.9℃로 CP(RP)의 상전이 온도보다 1.3℃ 더 낮은 것으로 확인 되었다. 이는 DeGel 및 DePEI가 양친매성이 있는 표면-활성적인 화합물이며 DeGel 및 DePEI에 존재하는 소수성인 데카노일 잔기가 이중층 막에 삽입되어 존재하기 때문으로 판단된다. 상기 모노올레인 큐빅상에 포함된 DeGel 및 DePEI는 모노올레인 질량 대비 0.43%(w/w)이다.

[0099] 도 9의 결과에 따르면, CP(RP/DeGel/DePEI)는 30 내지 56.9℃의 저온 범위에서 광학적 등방성이기 때문에 DeGel 및 DePEI가 모노올레인 큐빅상의 구조가 붕괴되지 않고도 탑재될 수 있는 것으로 판단된다.

[0101] **4. 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/레티닐 팔미테이트 모노올레인 큐빅상에 포함된 레티닐 팔미테이트의 안정성 평가**

[0102] **4.1 레티닐 팔미테이트 수중유(O/W) 에멀전의 제조**

[0103] 유상(oil phase)으로서 레티닐 팔미테이트(RP) 용액을 사용하였다. 상기 RP 용액은 레티닐 팔미테이트(RP) 1.26g를 30ml 대두유에 용해시켜 그 농도가 4.2%(w/v)가 되도록 하였다. 수상(water phase)으로서 유화제 용액을 사용하였다. 상기 유화제 용액은 트윈 80(tween 80) 1.5g를 증류수 150ml에 용해시켜 그 농도가 1%(w/v)가 되도록 하였다. 상기 RP 용액을 유화제 용액에 서서히 첨가하면서, 호모게나이저(120V/60Hz, PC-420D, CORNING, USA)를 이용하여 1150rpm으로 혼합하였으며, 그 후 5분 동안 고속 호모믹서(high speed homomixer, HG-15D, WiseTis, South Korea)로 5000rpm에서 균질화하였다.

[0105] **4.2 레티닐 팔미테이트 수중유 에멀전의 안정성 평가**

[0106] 상기 제조한 RP 수중유 에멀전 20ml을 50ml짜리 유리용기 4개에 각각 담고, 뚜껑을 닫아 단단히 밀봉한 뒤 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 4주 동안 보관하였다. 정해진 시간에 각 유리용기에 담긴 RP 수중유 에멀전 시료를 채취하여 광학 현미경(CX31, OLYMPUS, Japan)으로 관찰하였으며 이미지 분석기(Image-Pro Plus, Media Cybernetics, USA)를 이용하여 광학현미경 사진을 분석하고 그 반지름을 추정하였다.

[0107] 도 10은 4도에서 RP 수중유 에멀전의 시간에 따른 변화를 현미경으로 촬영한 사진을 보여준다. 제조된 직후의 RP 수중유 에멀전은 오일드롭(oil drop)의 반지름은 평균 26.83±10.80μm로서 성공적으로 제조되었다. 본 발명에서 사용한 트윈 80의 경우 poly(oxyethylene) 부분이 완전히 수화되면, 트윈 80의 poly(oxyethylene) 부분은 수상 벌크쪽으로 배향되고, 트윈 80의 올레산 사슬(oleic hydrocarbon chain) 부분은 오일 드롭쪽으로 배향되므로 오일 드롭을 안정화시키는 효과가 있다. 제조 후 1, 2, 3 및 4주 동안 5℃에서 보관한 RP 수중유 에멀전의 경우, 그 반지름이 각각 27.24±13.74μm, 28.56±15.17μm, 28.90±16.46μm, 및 28.90±19.26μm인 것으로 확인되어 시간이 지남에 따라 반지름이 증가하는 것이 확인된다. 이는 시간이 지남에 따라오일 드롭 사이의 융합(coalescence)이 진행되어 에멀전이 비균질화 되었기 때문으로 판단된다. 상기와 같은 에멀전의 불안정화 과정은 크리밍(creaming), 응결(agglomeration) 및 융합(coalescence)로 구성되어 있다. 상기 오일드롭은 통상 연속상의 수분에 비하여 가벼운 특성이 있어 뜨기 쉬우며 크리미층(creamy layer)과 같은 짙은 막을 형성하는 특징이 있다. 상기 크리미층에서 상기 오일 드롭은 다른 드롭들과 서로 접하게 되고, 응결(agglomeration)하게 된다. 그러면 오일 드롭 간의 얇은 수분층은 빠져나가게 되고, 오일 드롭을 둘러싸고 있는 유화제가 측면으로 이동하게 되므로 융합이 진행된다. 오일 드롭의 반지름의 증가는 이러한 에멀전의 불안정화 과정에 기인하게 되는 것이다.

[0108] 추가적으로 20℃ 및 30℃도에서 저장된 RP 수중유 에멀전에서도 5℃에서 저장된 RP 수중유 에멀전와 유사한 안

정성을 보이는 것으로 확인 되었다. 1, 2, 3 및 4주 동안 20℃에서 저장된 RP 수중유 에멀전의 반지름은 각각 $27.43 \pm 13.81 \mu\text{m}$, $28.79 \pm 16.27 \mu\text{m}$, $28.95 \pm 17.06 \mu\text{m}$, 및 $29.21 \pm 19.66 \mu\text{m}$ 인 것으로 확인 되었으며 1, 2, 3 및 4주 동안 30℃에서 저장된 RP 수중유 에멀전의 반지름은 각각 $27.87 \pm 14.07 \mu\text{m}$, $28.37 \pm 17.34 \mu\text{m}$, $28.98 \pm 18.77 \mu\text{m}$, 및 $29.95 \pm 21.1 \mu\text{m}$ 인 것으로 확인 되었다.

[0109] 도 11은 RP 수중유 에멀전의 제조 직후 및 40℃에서 1, 2, 3 및 4주 동안 저장한 후의 에멀전 상태를 촬영한 현미경 사진을 보여준다. 40℃에서 보관한 RP 수중유 에멀전은 처음 2주 동안은 5℃, 20℃ 및 30℃에서 보관한 RP 수중유 에멀전과 유사하게 큰 변화가 없었으나 3, 4주 동안 보관하게 되면 불안정해 지는 것으로 확인 되었으며 융합을 통해 생겨난 큰 오일 덩어리가 발견되었다. 40℃에서 보관한 RP 수중유 에멀전은 보관 후 3, 4주에서 급격히 불안정해 지는데 그 이유는 유화제로 사용한 트윈 80 때문인 것으로 판단된다. 상기 트윈 80은 비이온성 계면활성제로서 높은 온도(40도)에서 보관되면, 머리에 해당하는 poly(oxyethylene) sorbitan group이 탈수되어 유화능이 저하되기 때문으로 판단된다.

[0110]

[0111] **4.3 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/레티닐 팔미테이트 모노올레인 큐빅상에 포함된 레티닐 팔미테이트의 안정성 평가**

[0112] 모노올레인 큐빅상에 탑재된 레티닐 팔미테이트(RP)의 시간-의존적인 화학적 안정성을 조사하기 위하여, 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 4주 동안 CP(RP) 및 CP(RP/DeGel/DePEI)를 보관한 후 특정 시간에 각 큐빅상으로부터 RP 시료를 채취하였다. 상기 채취된 시료는 에멀전과 에탄올의 비율이 1:100(w/v)이 되도록 하였으며 액체 크로마토그래피 시스템을 이용하여 RP의 농도를 분석하였다. 상기 액체 크로마토그래피 시스템은 Eclipse XDB-C18(4.6 x 150, 3.5 μm) 컬럼을 이용하였으며 분당 1.5ml의 유속으로 메탄올과 함께 5μl의 RP 용액을 상기 컬럼에 주입하고 280nm에서 검출하였다.

[0113] 상기 제조한 RP 수중유 에멀전에 탑재된 RP의 시간-의존적인 화학적 안정성을 조사하기 위하여, 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 4주 동안 보관하였다. 상기 보관된 RP 수중유 에멀전으로부터 특정 시간에 시료를 채취하고, 상기 채취된 시료를 트라이히드로푸란(THF)에 RP 수중유 에멀전:THF=1:200(w/w)이 되도록 용해 시켰다. HPLC를 이용하여 RP를 분석하기 위하여 이동상으로 아세토나이트릴(acetonitrile)로 하였다. RP의 화학적 안정성은 초기 RP의 양 대비 특정 시간에서의 레티닐 팔미테이트의 잔류량 %로 표현하였다.

[0114] 도 12는 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 CP(RP)에 탑재된 RP의 시간에 따른 화학적 안정성을 평가한 결과를 보여 준다. CP(RP)를 5℃에서 보관하는 경우, 4주 이내에서 99%의 RP가 유지되어 화학적 안정성이 높은 것으로 확인 되었다. 이에 반하여 CP(RP)를 20℃에서 보관하는 경우, 4주 내 약 93%가 유지되어 화학적 안정성이 다소 감소한 것으로 확인 되었다. 또한 30℃에서 보관하는 경우, 4주 후 52%로 현저히 감소하였으며, 40℃에서 보관하는 경우, 4주 후 16.8%로 현저히 감소하였다. RP는 열, 빛, 습기 및 산소에 대해 불안정한 것으로 알려져 있으며, 이러한 요인은 화학적으로 RP를 저하시킨다. 따라서 보관 온도가 상승하는 경우 열에너지에 의한 화학적 열화로 RP의 안정성이 저하된 것으로 판단된다.

[0115] 도 13은 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP의 시간에 따른 화학적 안정성을 평가한 결과를 보여준다. CP(RP)에 탑재된 RP와 마찬가지로, CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP 역시 5℃(99%) 및 20℃(97%)의 저온에서 상대적으로 안정한 것으로 확인 되었으며 30℃(66.6%) 및 40℃(17.5%)의 고온에서는 상대적으로 불안정한 것으로 확인 되었다. 잔류량 %는 저온에서 4주 동안 현저하게 감소하지 않았다. 이를테면, 보관 온도가 5도와 20도일 때, 4주 잔존율은 각각 99%와 97%였다.

[0116] 상기 분석 결과에 따르면, 열에너지가 RP를 저하시키는 주된 원인으로 판단된다. CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP의 잔류량 %는 대부분의 온도에서 CP(RP)에 탑재된 RP의 잔량보다 더 높은 결과가 확인된다. 이를테면, 보관 온도가 30도 일 때, CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP의 4주 잔류량 %는 약 66.6%였고, CP에 탑재된 RP의 잔류량%보다 높았다. CP(RP/DeGel/DePEI)에 탑재된 RP는 CP(RP)에 탑재된 RP보다 더 안정적으로 보였다. 상기 CP(RP/DeGel/DePEI)는 상기 CP(RP)에 대비하여 DeGel 및 DePEI를 수상채널에 포함하고 있다는 점에서 차이점이 있다. DeGel/DePEI 복합체는 큐빅상의 수상채널에서 형성되어, 이중지질층에 고정되므로 상기 수상채널을 차폐할 수 있다. CP(RP/DeGel/DePEI)의 수상채널은 DeGel/DePEI 복합체에 의해 폐쇄되므로 그 내부에 위치하는 RP가 외부의 수상벌크로부터 보호되는 효과가 있다. 따라서 CP(RP)의 수상채널에 탑재된 RP보다 주위 온도변화에 더 안정적인 것으로 판단된다.

[0117] 도 14는 5℃, 20℃, 30℃ 및 40℃에서 RP 수중유 에멀전에 탑재된 RP의 시간에 따른 화학적 안정성을 보여준다.

테스트한 모든 보관 온도에서 잔류량 %는 4주 동안 경과 시간에 따라 감소했으며 보관 온도가 높을수록 잔류량%가 낮았다. 상기 실험은 온도를 제외한 모든 조건이 동일하고 암실서 보관하기 때문에 RP의 화학적 안정성을 저하시키는 것은 온도에 의한 것으로 판단된다.

[0119] **5. 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상**

[0120] 상기 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상은 데카노일 젤라틴/데카노일 폴리에틸렌이민/소수화 개질 글루코스 산화효소/마그네슘 아스코빌 포스페이트 모노올레인 큐빅상이 포함된 제형을 의미한다.

[0121] 상기 데카노일 젤라틴, 데카노일 폴리에틸렌이민, 소수화 개질 글루코스 산화효소는 상기에서 설명한 바와 같이 제조되어 사용되며 추가적으로 수용성 비타민 C의 유도체인 마그네슘 아스코빌 포스페이트(magnesium ascorbyl phosphate, MAP)을 수상채널에 탑재하여 제조한다.

[0123] **5.1 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 제조**

[0124] 소수화된 단백질로서 데카노일 젤라틴(DeGel), 소수화된 이온성 고분자로서 데카노일 폴리에틸렌이민(DePEI), 소수화 개질 글루코스 산화효소(Hyphobically modified Glucose Oxidase, HmGOD)와 비타민(MAP)이 탑재한 모노올레인 큐빅상을 제조하였다. 상기 모노올레인 큐빅상은 용융-수화법으로 제조하였으며 등방성 지질 액정과 동일한 용어로서 사용된다. 상기에서 설명한 방법과 2g의 모노올레인을 20ml 유리용기에 넣고 50℃ 항온조에서 용융시킨 후 상기 모노올레인 용융액이 40℃로 냉각되면, 상기 DeGel, DePEI, HmGOD, MAP의 혼합용액을 조심스럽게 첨가하였다. 이때, DeGel 카르복실기와 DePEI 아미노기의 몰비가 5:5가 되도록 DeGel과 DePEI를 증류수에 함께 용해시킨 용액이고, pH는 5.0으로 조정하였다. 또한, 마그네슘 아스코빌 포스페이트(magnesium ascorbyl phosphate, MAP)의 농도가 4%가 되도록 용해시켰다. 35℃의 DeGel/DePEI/HmGOD/MAP 혼합수용액 0.714ml을 모노올레인 위에 조심스럽게 첨가하고 투명한 겔이 형성될 때까지 30℃, 암소에서 보관하였다. 이후 모든 수용액이 수화된 후, 0.143ml의 pH 7.4 PBS를 첨가하였다.

[0125] 대조군으로서 상기 방법과 동일하게 비타민이 탑재되지 않은 모노올레인 큐빅상을 제조하였고, 각 모노올레인 큐빅상의 이름과 조성은 하기 표 1과 같다.

표 1

이름	DeGel/DePEI	HmGOD	MAP	직경	pH
Cubic(No)	X	X	X	100.2nm	5.87
Cubic(MAP)	X	X	0	84.9nm	6.51
Cubic(MAP/pol)	0	X	0	83.1nm	6.75
Cubic(MAP/pol/GOD)	0	0	0	80.7nm	5.76

[0128] 모노올레인 큐빅상을 나노 크기로 제조한 후 모노올레인 큐빅상 현탁액을 제조하였다. 증류수 10ml에 360mg의 pluronic F127을 첨가하여 pluronic F127 용액(3.6%)을 만들고, pH를 7.0이 되도록 조정하였다. 여기서 pluronic F127은 분산제로 사용되었다. 모노올레인 큐빅상을 100mg을 10ml 유리용기에 넣고 pluronic F127용액 0.417ml을 넣어 모노올레인:pluronic F127=100:15 (w/w) 비율이 되도록 하였다. 모노올레인 큐빅상을 스페큘라로 잘게 분쇄하고, 초음파를 처리하였다. 초음파 처리 조건은 tip type (VC 505, Sonic & Materials, USA)으로 pulse on 30초, pulse off 30초로 5분간 처리하여 모노올레인 큐빅상 현탁액을 제조하였다.

[0130] **5.2 Cubic(MAP), Cubic(MAP/pol), Cubic(MAP/pol/GOD)에 대한 편광 광학 현미경 분석**

[0131] 상기 제조한 모노올레인 큐빅상 현탁액을 커버 글라스의 O-링 스페이서에 채워 넣고 커버 글라스를 올린 후 상기 제형이 위치한 셀을 만들었다. 상기 셀은 고온반응기(heating block, HS81, Mettler Toledo, USA)에서 30℃에서 80℃까지 분당 2도씩 온도를 상승시키면서 편광 광학 현미경을 통하여 큐빅상의 상전이를 관찰하였다.

[0132] 도 9의 패널 B)는 상기의 방법으로 관찰한 Cubic(MAP), Cubic(MAP/pol), Cubic(MAP/pol/GOD)의 편광 광학 현미경 사진을 보여준다. 모노올레인 큐빅상은 편광을 조사하는 경우 복굴절을 나타내지 않는 광학적 등방성을 가지며 80℃ 부근에서 육각상(hexagonal phase)으로 상전이가 일어나는 것으로 알려져 있다. 또한 상기 육각상은 광학적 이방성(anisotropic)을 가지기 때문에, 편광 조사시 복굴절을 나타내며 상기 복굴절이 일어나기 시작하는 온도는 큐빅-육각 상 전이 온도로부터 확인이 가능하다.

[0133] 본 발명에서는 실시예를 통하여 모노올레인 큐빅상의 상전이 온도를 확인하였다. 본 발명의 Cubic(MAP)의 상전

이 온도는 59.1°C로 확인되며, Cubic(MAP/pol)는 상전이 온도가 54°C로 CP(nothing)보다 약 5.1°C 낮은 것으로 확인 되었다. 또한 Cubic(MAP/pol/GOD)의 상전이 온도는 약 52.9°C로 Cubic(MAP/pol)의 상전이 온도보다 1.1°C 더 낮은 것으로 확인 되었다. 도 9의 패널 B)의 결과에 따르면, Cubic(MAP/pol/GOD)는 30 내지 52.9°C의 저온 범위에서 광학적 등방성이기 때문에 MAP 및 GOD가 모노올레인 큐빅상의 구조가 붕괴되지 않고도 탑재될 수 있는 것으로 판단된다.

[0135] **5.3 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 구조관찰**

[0136] 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 구조를 투과전자현미경을 이용하여 관찰하였다. Phosphotungstic acid(PTA)를 DW에 2% 농도가 되도록 용해시키고, 1M KOH를 사용하여 pH 6.8로 조정하였다. 0.22 μ m 실린더 필터를 이용하여 필터링을 해주었다. 모노올레인 큐빅상 현탁액과 PTA 용액을 1:1 (v/v)로 혼합하고, 실온 암소조건에서 8시간동안 방치하여 염색하였다. 염색 이후, formavar/copper-coated grid 위에 조심스럽게 상기 혼합액을 올려 건조하였다. 건조된 formavar/copper-coated grid를 투과전자현미경(TEM, ransmission electron microscope, LEO 912AB OMEGA, Germany))을 통해 관찰하였다.

[0137] 도 15는 모노올레인 큐빅상의 투과전자현미경 사진을 보여준다. TEM 상에서 모든 모노올레인 큐빅상은 DeGel, DePEI, HmGOD, MAP 탑재 여부와 관계없이 모노올레인 큐빅상의 특정 구조인 라멜라 이중층 구조가 관찰되었다. 모노올레인 큐빅상의 모노올레인이 양친매성 분자로 수상에서 자가 결집하여 이중층 구조가 관찰되는데, DeGel, DePEI, HmGOD, MAP은 모노올레인 큐빅상의 형성에 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었다. DeGel, DePEI, HmGOD는 모노올레인의 매트릭스에 고정되어 모노올레인의 팩킹에 영향을 줄 가능성이 있으나, 모노올레인의 2% 미만으로 매우 적은 양으로 모노올레인 큐빅상 구조에 영향을 미치지 않았다고 볼 수 있다.

[0139] **5.4 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 크기 측정**

[0140] Cubic(No), Cubic(MAP), Cubic(MAP/pol), Cubic(MAP/pol/GOD)의 모노올레인 큐빅상의 입자 크기를 확인하기 위하여 상기 모노올레인 큐빅상 현탁액을 증류수로 희석시킨 후 공인인증 시험기관인 한국 세라믹 기술원의 광산란 장치를 이용하여 수력학적 직경을 측정하였다(표 1 참조). 분석결과 DeGel, DePEI, HmGOD, MAP 탑재 여부에 상관없이 100nm 이하의 크기를 나타내어, 나노제형이 성공적으로 제조되었음을 확인 하였다. 상기 모노올레인 큐빅상은 그 직경은 100nm 이하이므로 피부 세포 간격을 통해 피부로 침투될 수 있어 향상된 피부 침투성을 보일 것으로 판단된다.

[0142] **5.5 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액의 pH 측정**

[0143] 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액의 pH를 측정하였다. 상기 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 현탁액은 보관조건에서 수상채널에 탑재한 비타민인 MAP을 방출하지 않아야 한다. 모노올레인 큐빅상 현탁액의 보관 pH가 단백질(DeGel)의 pI 값(~4.7)보다 높으면 단백질과 이온성 고분자가 반응하여 코아세르베이트를 형성하게 되고 상기 코아세르베이트가 생성되면 비타민이 방출되지 않는다.

[0144] 본 발명의 모노올레인 큐빅상 현탁액은 pH가 5.76 이상이므로 코아세르베이트에 의해 방출이 억제되어 MAP을 방출하지 않을 것으로 판단된다(표 1 참조). 또한 화장품의 일반적인 pH는 5.0~7.0 범위이므로 보관조건에서 수상채널에 탑재한 비타민인 MAP을 방출되지 않아 글루코스 감지반응에만 MAP을 방출하는 나노제형 현탁액으로서 화장품 원료로 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0146] **5.6 생리학적 조건에서 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 방출 평가**

[0147] 모노올레인 큐빅상 현탁액 1ml을 투석막 (MWCO 15,000)에 넣어 방출을 24시간 동안 관찰하였다. 피부 생리학적 조건을 맞추기 위해 방출매질로 사용할 증류수를 pH 5.0로 조정하였고, 여기에 글루코스 농도를 0, 50, 100, 200mg/dL로 달리하여 방출을 관찰하였다. 50ml의 바이알에 각 농도의 글루코스 용액 10ml을 넣고, 모노올레인 큐빅상 현탁액이 들어있는 투석막을 넣고 roller mixer로 균질화하며 방출 실험을 진행하였다. 시간 경과에 따라 20 μ l의 방출매질을 채취하고, 투석막을 통해 방출되어 나온 MAP의 양을 HPLC 분석법을 이용하여 정량하였다. 또한 취한 만큼 새로운 글루코스 용액을 더 넣어줌으로써 동일한 부피를 유지하였다. 모노올레인 큐빅상의 MAP 방출율은 하기 수학적식1에 따라 계산하였다.

수학식 1

$$\text{등방성 지질 액정 나노제형의 MAP 방출율 (\%)} = \frac{\text{등방성 지질 액정 나노제형에서 방출된 MAP의 양}}{\text{등방성 지질 액정 나노제형에 탑재시킨 MAP의 양}} \times 100$$

[0148]

[0150]

도 16은 글루코스 농도에 따른 모노올레인 큐빅상의 MAP 방출율을 보여준다. Cubic(MAP)의 경우, 외부로 방출되는 비타민을 차폐시킬 코아세르베이트(DeGel, DePEI)가 없기 때문에 글루코스 농도에 관계없이 방출되는 것이 확인되었다. Cubic(MAP/pol)의 경우, 코아세르베이트의 차폐 효과로 인해 비타민이 외부로 방출되지 않는 것이 확인되었으며 HmGOD가 없으므로 글루코스의 농도에 상관없이 비타민이 외부로 방출되지 않는 것이 확인되었다. Cubic(MAP/pol/GOD)의 경우, 글루코스 농도가 증가할수록 방출이 증가하는 것이 확인되었다. 24시간이 경과된 후, 글루코스 농도가 50, 100, 200mg/dL로 증가하는 경우 방출율 또한 20.23%, 30.21%, 40.23%로 증가되었다. 글루코스 농도에 따라 방출율(%)이 증가하는 이유는 HmGOD의 작용으로 인해 글루코스가 글루콘산으로 변환되므로 모노올레인 큐빅상 주위의 국소 pH가 단백질(DeGel)의 pI(~4.7) 보다 낮아졌기 때문으로 판단된다. 상기 HmGOD에 의해 글루코스가 글루콘산으로 변환되면 pH가 낮아지게 되고 이는 모노올레인 큐빅상 내부의 DeGel과 DePEI 사이에 형성된 코아세르베이트를 해체하게 되면서 비타민이 외부로 방출되는 것이다. 상기 글루코스 반응에 의한 MAP의 방출은 6시간 이내로 모두 이루어지는 것으로 확인되었다.

[0152]

5.7 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 경시 유효율 측정

[0153]

본 발명의 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액을 보관조건(상온)에서 투석막(MWCO 15,000)에 넣고 보관용액에서 30일 동안 투석하였다. 시간경과(1주, 2주, 3주, 4주)동안 투석막을 통해 방출되어 나온 비타민의 양을 HPLC 분석법을 통하여 정량하였다. 상기 방출평가와 마찬가지로, 50ml의 유리용기에 각 보관용액인 증류수(pH 7.0) 10ml을 넣은 후 모노올레인 큐빅상 현탁액이 들어있는 투석막을 넣고 roller mixer로 균질화하며 방출실험을 진행하였다. 시간 경과에 따라 20 μ l의 매질을 채취한 후 상기 투석막을 통해 방출되어 나온 MAP의 양은 HPLC 분석법을 이용하여 정량하였다. 경시유효율은 하기 수학식2에 따라 계산하였다. 상기 경시 유효율은 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 양에 대비하여 방출되지 않고 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 유효되어 있는 비타민의 양의 백분율로 정의한다.

수학식 2

$$\text{등방성 지질 액정 나노제형의 MAP 유효율 (\%)} = 100 - \frac{\text{등방성 지질 액정 나노제형에서 방출된 MAP의 양}}{\text{등방성 지질 액정 나노제형에 탑재시킨 MAP의 양}}$$

[0154]

[0156]

도 17은 시간 경과에 따른 본 발명의 모노올레인 큐빅상의 MAP 유효율을 보여준다. DeGel, DePEI, 및 HmGOD가 탑재되어있는 모노올레인 큐빅상(Cubic(MAP/pol/GOD))은 시간이 흘러도 높은 경시 유효율을 보이는 것으로 확인되었다. Cubic(MAP/pol/GOD)의 경시유효율은 1주차, 2주차, 3주차 및 4주차에 각각 70.3%, 71.27%, 71.50%, 72.5%을 보여 비타민을 방출하지 않는 것으로 확인 되었다. 이에 반하여 코아세르베이트가 형성되지 않은 Cubic(MAP)은 24시간 경과, 1주, 2주, 3주, 및 4주차 일 때 각각 51.63%, 34.87%, 32.19%, 23.51%, 및 14.56%로 낮은 경시유효율을 보일 뿐 아니라 시간이 흐름에 따라 방출량이 증가하는 것이 확인되었다. 상기 결과는 Cubic(MAP)의 경우 외부로 방출되는 비타민을 막아줄 코아세르베이트가 없어 글루코스 농도에 관계없이 방출되기 때문인 것으로 판단된다. Cubic(MAP/pol) 또한 Cubic(MAP/pol/GOD)와 유사하게 각 주마다 86.14%, 81.75%, 80.14%, 80.24%의 높은 유효율을 나타내었다. Cubic(MAP/pol)와 Cubic(MAP/pol/GOD)는 코아세르베이트의 차폐 효과로 인해 비타민의 높은 유효율을 관찰할 수 있었다. 이는 상기 모노올레인 큐빅상의 보관조건에서는 보관조건의 pH가 단백질(DeGel)의 pI보다 높은 상태이므로 내부에 탑재된 이온성 고분자(DePEI)가 양이온고분자로 존재하게 되고, 수상채널 내부에서 단백질(DeGel)과 코아세르베이트를 형성하게 되므로 비타민의 방출을 억제하는 것으로 판단된다. 추가적으로 공인인증시험기관인 순천향대 생물소재 지역혁신센터를 통하여 “1개월간 보관 후 모노올레인 큐빅상에 남아있는 유효성분의 양”을 확인한 결과 상기 결과와 동일하게 비타민의 방출이 유효되는 것이 확인 되었다.

[0158] 5.8 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 피부 투과도 관찰

[0159] 인공피부를 확산셀(diffusion cell)의 receptor chamber에 장착한 뒤, 리셉터 셀(receptor cell)에 피부의 생리학적 조건의 완충용액(PBS, pH 5.5) 5ml을 채웠다. 리셉터 셀의 완충용액의 온도를 32℃가 되도록 설정하고, 12시간동안 인공피부가 충분히 수화되도록 하였다. donor cell에 대조군인 비타민 용액과 본 발명의 비타민이 탑재된 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액을 각각 1ml씩 첨가하였다. 리셉터 셀에는 마그네슘바를 넣어 200rpm으로 교반하였으며 1시간, 3시간, 6시간, 12시간, 24시간마다 리셉터 용액에서 일정량을 채취하였다. 상기 채취한 용액은 HPLC 분석법을 통하여 비타민의 양을 정량하였으며 채취한 만큼 새로운 완충용액을 넣어주어 부피를 동일하게 하였다. 비타민이 피부를 통해 침투된 누적량은 하기 수학식 3을 통해 계산하였다.

수학식 3

$$\text{피부를 투과한 MAP의 누적량} = \frac{\text{피부를 투과한 MAP의 양}}{\text{투과면적}}$$

[0160]

[0162] 상기 계산한 누적량은 시간별로 나누어 Flux(경피투과속도)를 계산하였다. 상기 경피투과속도는 하기 수학식 4를 이용하여 계산하였다.

수학식 4

$$\text{MAP의 피부투과도} = \frac{\text{피부를 투과한 MAP의 누적량}}{\text{각누적 시간}}$$

[0163]

[0165] 도 18은 본 발명의 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상 현탁액의 비타민의 피부투과도(경피투과속도)를 보여준다. 비타민 용액의 경우, 24시간 동안 피부를 전혀 투과하지 못하였다. 이에 반하여 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상의 비타민은 24시간에서의 피부투과도로서 $1.21\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$ 을 보이는 것이 확인되었다. 비타민은 수용성 물질로 피부 속으로 침투시키기 어려운 문제점이 있다. 모노올레인 큐빅상은 그 구성성분인 모노올레인이 피부지질과 친화성이 우수하기 때문에 피부 투과 촉진제로 작용하여 유효성분의 경피 흡수를 촉진시키는 것으로 판단된다. 또한, 상기 모노올레인 큐빅상의 사이즈가 100nm이하인 나노제형이므로 피부 세포간격을 통한 피부 침투가 용이한 것으로 판단된다.

[0167] 5.9 글루코스 감지반응 특성이 있는 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 주름개선 효능 평가

[0168] 5.9.1 모노올레인 큐빅상의 세포독성 평가

[0169] 한국 식약처 고시 “기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(II)”에 의거하여 주름 개선 효능을 collagen synthesis assay로 측정하였다. 섬유아세포가 생성하는 콜라겐 양을 정량하기 전, 모노올레인 큐빅상의 세포독성을 확인하기 위해 피부섬유아세포인 Detroit 551를 사용하여 MTT assay를 실시하였다. MTT assay는 다음과 같이 진행하였다. Detroit 551(사람 피부 섬유아세포)을 배양 접시에 접종한 후 FBS(fetal bovine serum) 10%와 페니실린(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 μg/mL) 1%를 함유하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 넣어 배양하였다. 세포는 37℃, 5.0% 이산화탄소를 조절하는 배양기에서 배양하였다. 섬유아세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well로 분주한 다음 세포배양조건에서 24시간 배양하였다. 배지를 버리고 PBS(phosphate buffered saline)로 세척한 다음 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상 현탁액 20ul를 FBS가 없는 DMEM배지 180ul에 투입하고 8시간 배양하였다. 본 발명의 모노올레인 큐빅상의 농도는 각각 5, 10, 15, 20, 50μg/ml이었다. 8시간 배양을 마친 후, 모노올레인 큐빅상 현탁액과 배지를 제거하고 FBS가 없는 DMEM 배지 180ul와 MTT 용액(5mg/ml) 20μl을 투입하였다. 그 후 37℃, 5.0% 이산화탄소 분위기 및 암소조건에서 4시간동안 배양하였다. 이후, 배지와 용액을 제거하여 dimethyl sulfoxide((DMSO) 200μl로 formazan을 용해시켰다. 용해시킨 formazan을 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Cell viability는 하기 수학식 5를 이용하여 계산하였

다.

수학식 5

$$Cell\ viability = \frac{\text{등방성 지질 액정 나노제형 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

[0170]

[0172]

도 19는 비타민 용액과 글루코스 감지반응 특성이 있는 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상 현탁액의 세포 독성 평가결과를 보여준다. 8시간 후 모노올레인 큐빅상의 detroit 551 세포 독성 평가를 한 결과, cell viability가 80%이상인 5 μg/ml의 농도를 선택하였다. 80%이상의 cell viability는 세포의 생존에 영향을 주지 않음을 뜻한다. 이에, 모노올레인 큐빅상 5 μg/ml 농도에서 주름개선 효능 평가를 진행하였다.

[0174]

5.9.2 모노올레인 큐빅상의 주름개선 효능 평가(콜라겐 생합성량 확인)

[0175]

한국 식약처 고시 “기능성화장품의 유효성평가를 위한 가이드라인(Ⅱ)”에 의거하여 주름 개선 효능을 collagen synthesis assay로 측정하였다. 먼저, Detroit 551 세포를 FBS(fetal bovine serum) 10%와 페니실린 (100 IU/ml), 스트렙토마이신(100 μg/ml) 1%를 함유하는 DMEM 배지에서 37℃, 5.0% 이산화탄소를 조절하는 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 48well plate에 5x10⁴ cells/well가 되도록 분주하였다. 24시간동안 세포가 plate에 부착하도록 배양하였다. 이 후, 배지를 모두 제거하고 FBS가 없는 DMEM 배지 180 μl와 비타민을 탑재한 모노올레인 큐빅상 20 μl을 첨가하고, 24시간동안 배양하였다. 이때, 비타민을 탑재한 모노올레인 큐빅상을 함유한 배지에서 모노올레인 큐빅상의 농도는 MTT assay를 이용한 예비 실험을 통해 세포독성을 나타내지 않는 농도를 선택하였다. 24시간동안 배양을 마친 후, 배양액을 취하여 ELISA kit 방법중 하나인 procollagen type IC-peptide(PIP EIA kit)를 이용하여 콜라겐 생합성량을 측정하였다. 각 흡광 값을 검량곡선에서 PIP 농도(ng/ml)를 읽어 결과 값을 산출하였다. 이후, 상온에서 모노올레인 큐빅상 현탁액을 보관하며 0일, 5일, 10일 20일, 30일 경과마다 실험을 실시하여 동일한 조건에서 콜라겐 생합성량에 따른 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민의 주름개선 효능과 비유리 비타민의 주름개선 활성 평가를 실시하였다.

[0176]

도 20은 비타민 용액과 글루코스 감지반응 특성이 있는 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상 현탁액의 콜라겐 생합성량을 평가한 결과를 보여준다. 콜라겐은 주름과 밀접한 관계가 있으며, 콜라겐 생합성의 양은 전구체인 procollagen인 propeptide의 양을 측정하여 생합성의 결과를 유추한다. 유리 MAP 용액의 경우, 실험이 진행되는 동안 안정적으로 주름개선 효능을 유지하였다. 시간이 0일, 5일, 10일, 20일, 30일이 지남에 따라 각 콜라겐 생성량은 65.1ng/ml, 59.1ng/ml, 64.5ng/ml, 58.1ng/ml, 59.2ng/ml를 나타내어 시간에 따라 콜라겐의 생성량이 안정적임을 확인하였다. 모노올레인 큐빅상에 탑재된 비타민은 시간이 흐름에 따라 콜라겐의 생성량이 0일, 5일, 10일, 20일, 30일에서 95.4ng/ml, 60.5ng/ml, 87.5ng/ml, 81.5ng/ml, 72.6ng/ml인 것으로 확인되었다. 본 발명의 비타민이 탑재된 모노올레인 큐빅상은 유리 MAP 용액에 비해 1.4배가량 높은 콜라겐 생성량을 나타내는 것으로 확인되었는데 이는 모노올레인 큐빅상을 사용함으로써 비타민(MAP)의 세포내재화가 촉진되었기 때문으로 판단된다.

[0178]

본 명세서에서 설명된 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예 또는 예시를 대표하는 의미이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되지는 않는다. 본 발명의 변형과 다른 용도가 본 명세서 특허청구범위에 기재된 발명의 범위로부터 벗어나지 않는다는 것은 당업자에게 명백하다.

[0179]

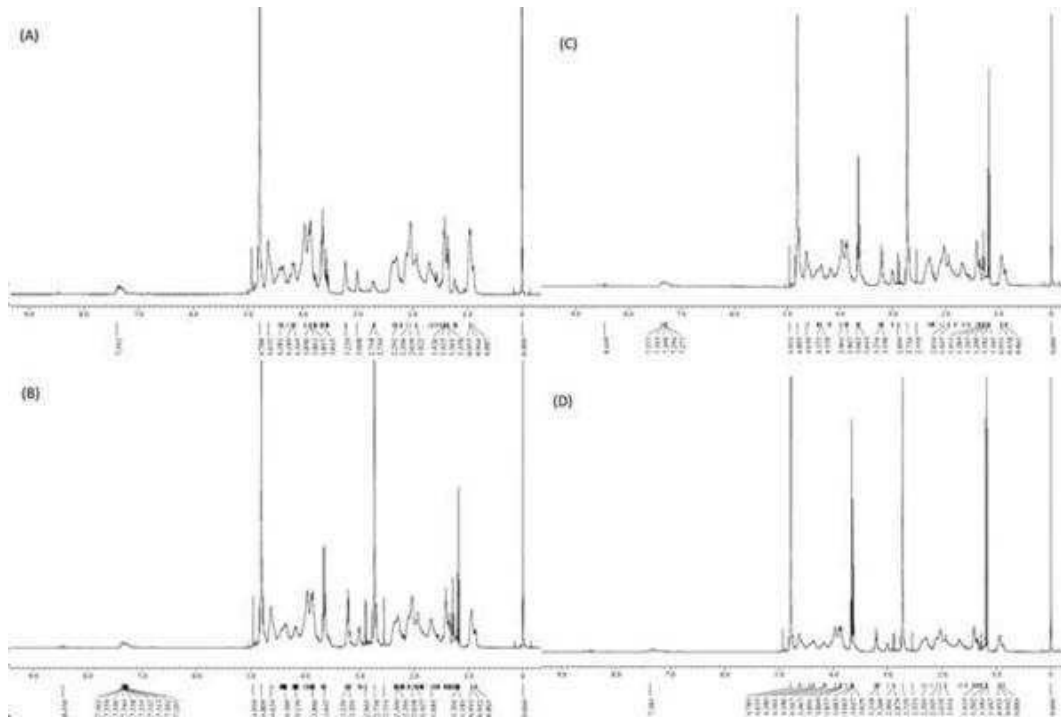
삭제

부호의 설명

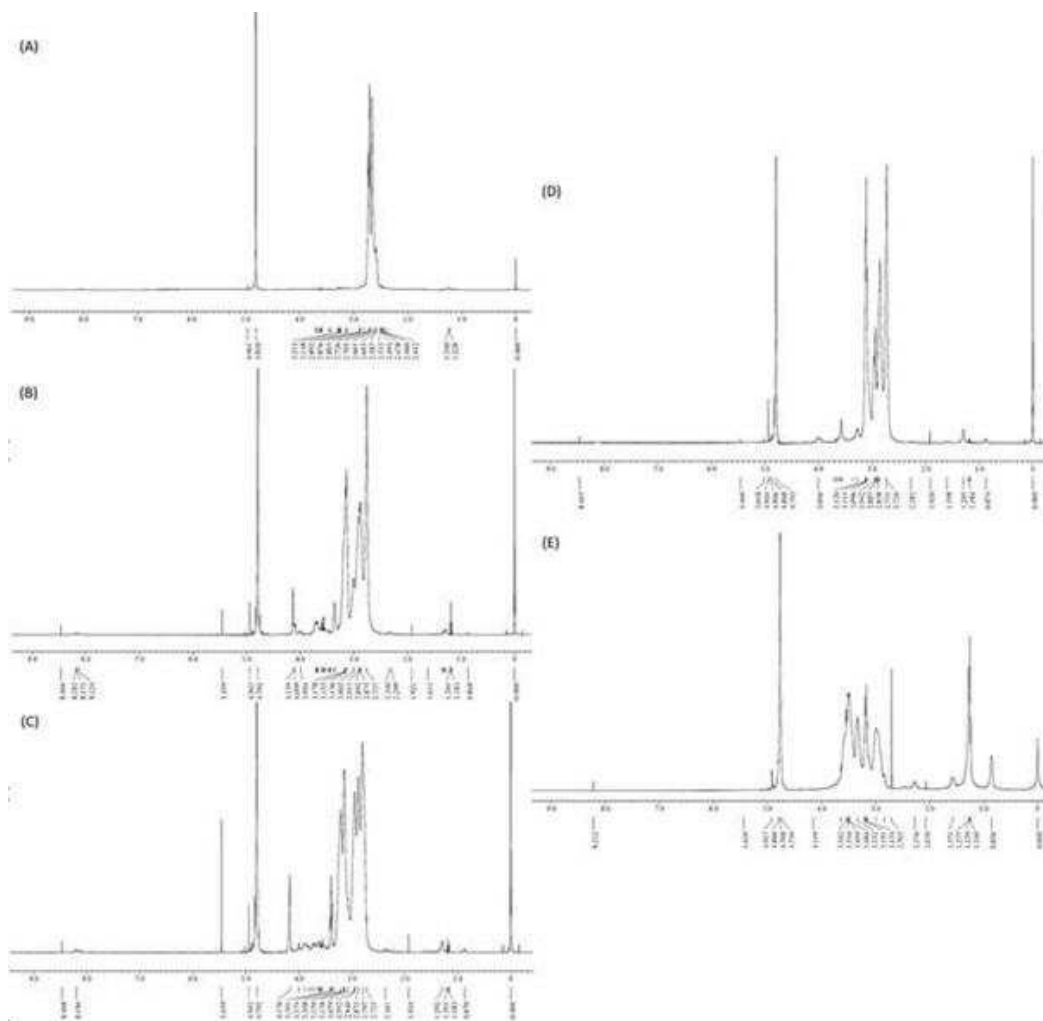
삭제

도면

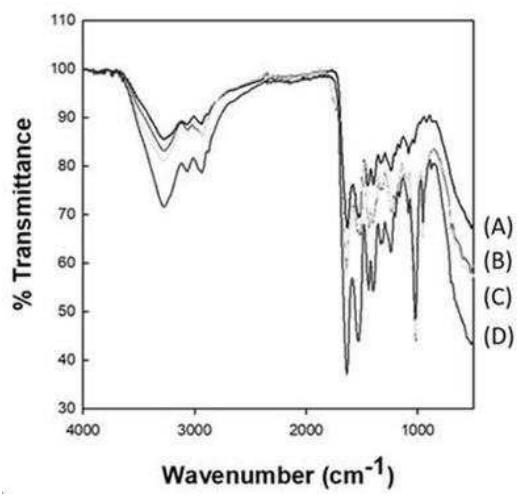
도면1



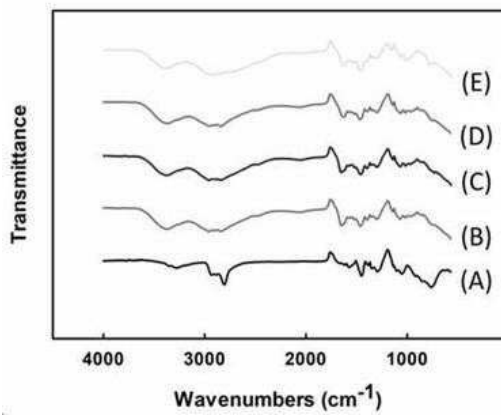
도면2



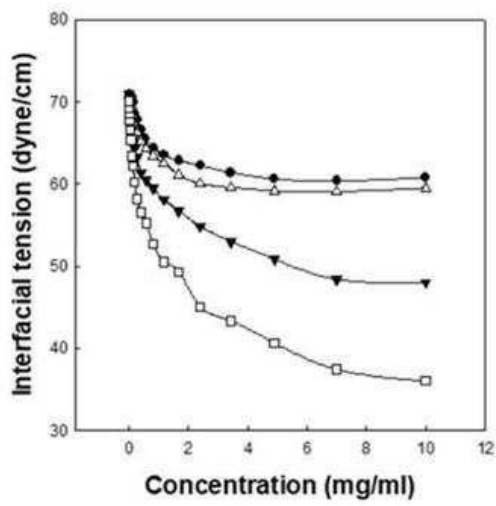
도면3



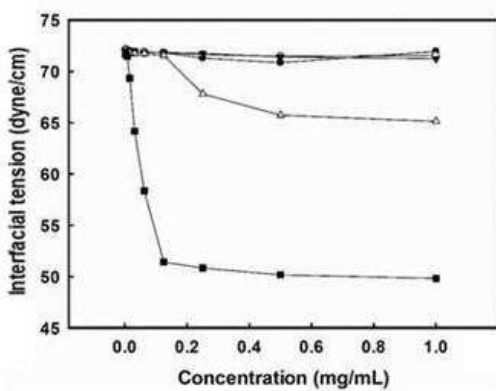
도면4



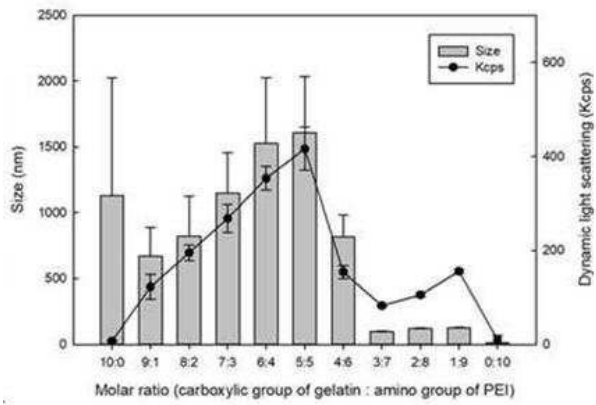
도면5



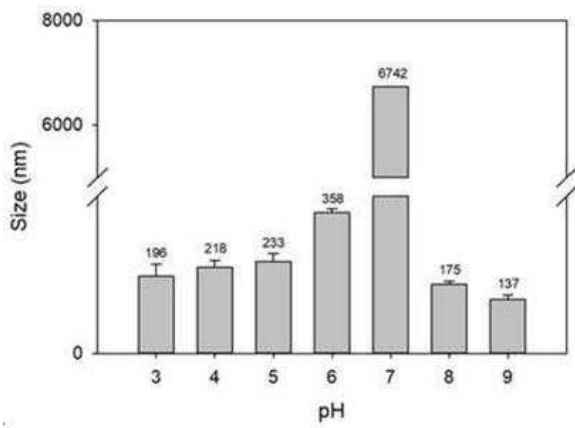
도면6



도면7



도면8



도면9

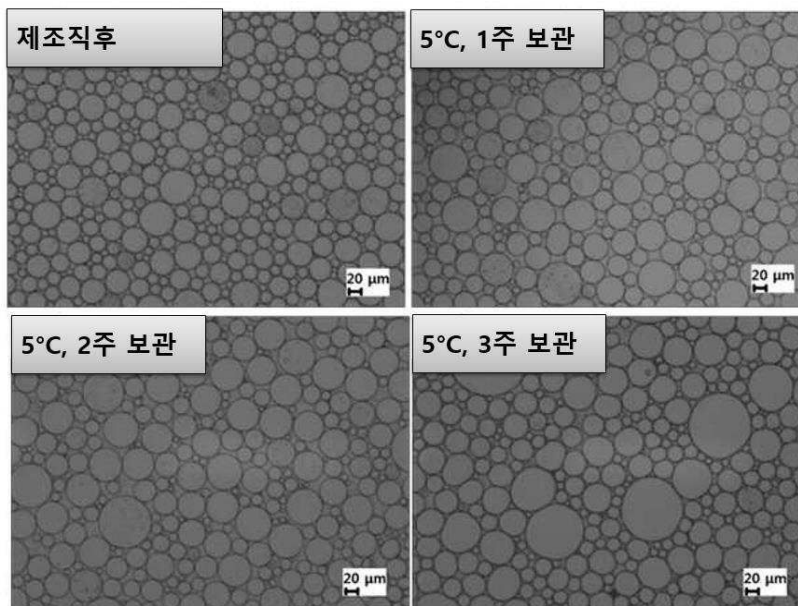
A)

Cubic(No)	61 °C	61.7 °C	70 °C	80 °C
Cubic(RP)	57.8 °C	58.2 °C	70 °C	80 °C
Cubic (RP/pol)	56.2 °C	56.9 °C	70 °C	80 °C
Cubic (RP/pol/GOD)	52.5 °C	53 °C	70 °C	80 °C

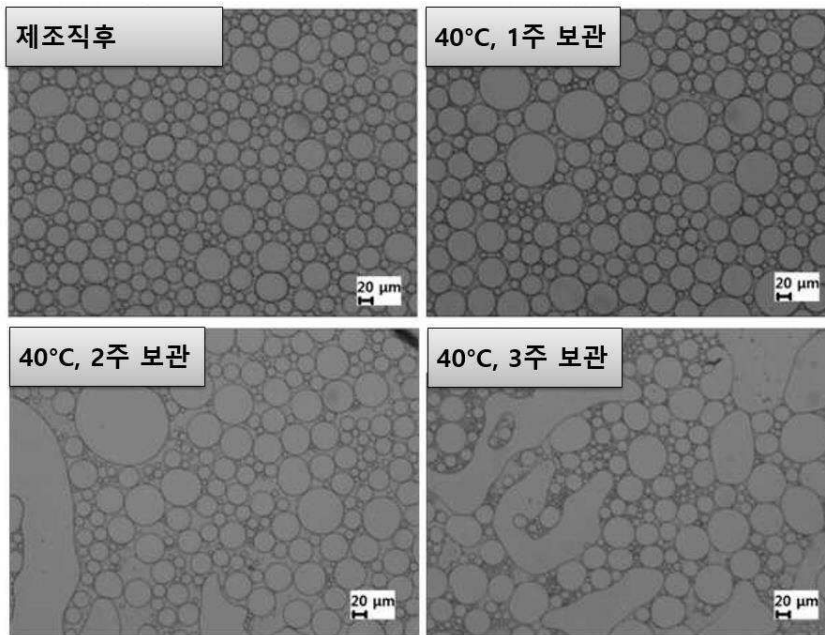
B)

Cubic(MAP)	58.5 °C	59.1 °C	70 °C	80 °C
Cubic (MAP/pol)	53.5 °C	54 °C	70 °C	80 °C
Cubic (MAP/pol/GOD)	52.1 °C	52.9 °C	70 °C	80 °C

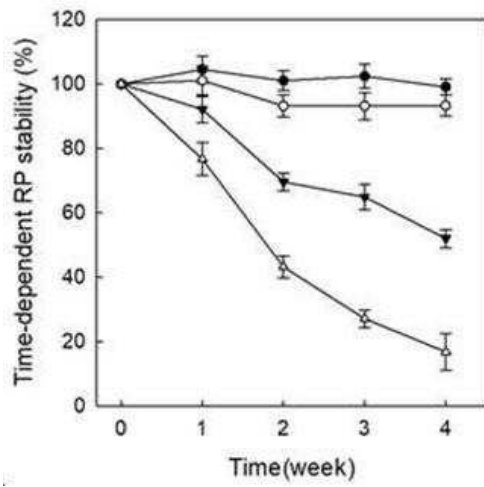
도면10



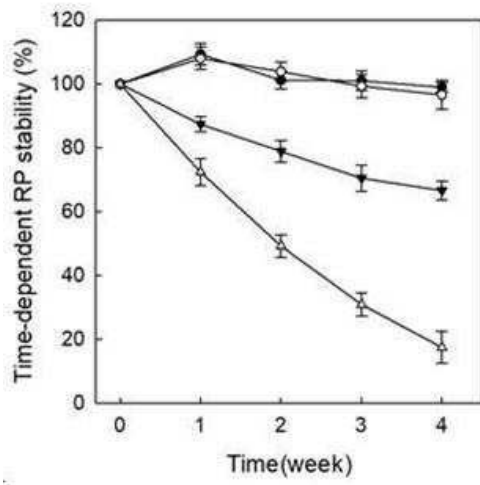
도면11



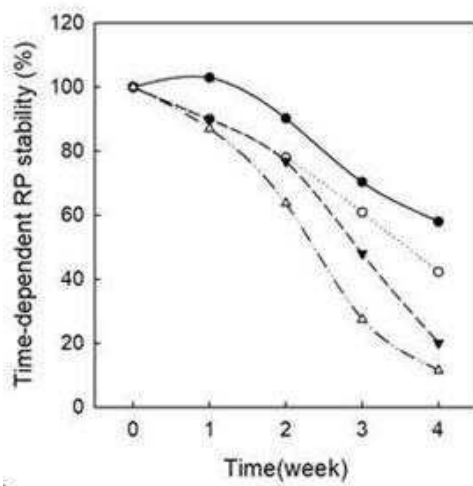
도면12



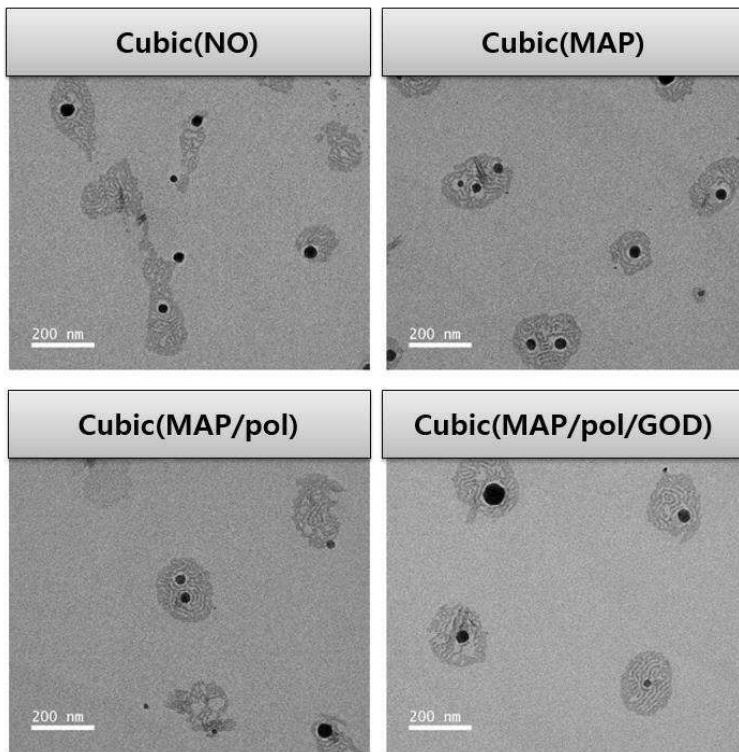
도면13



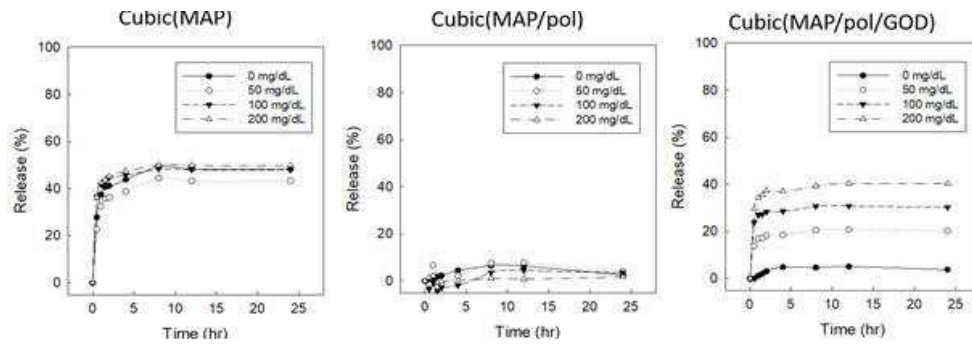
도면14



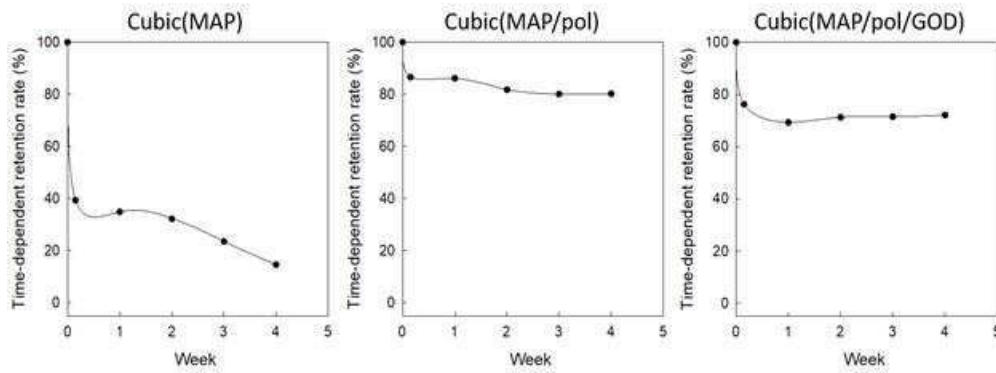
도면15



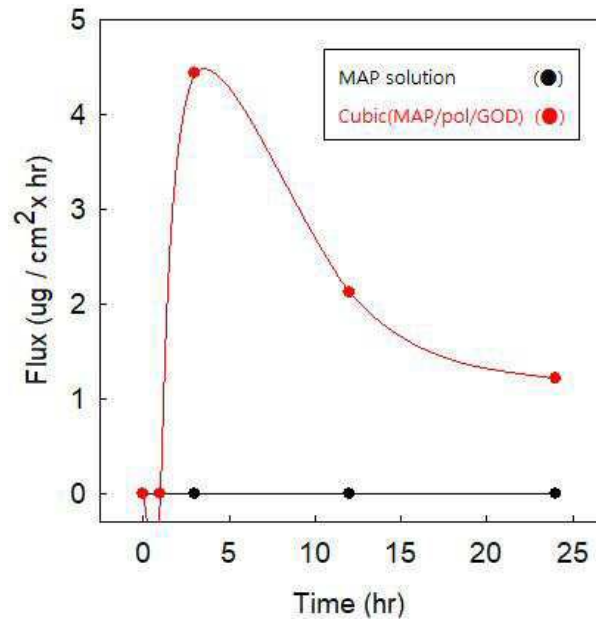
도면16



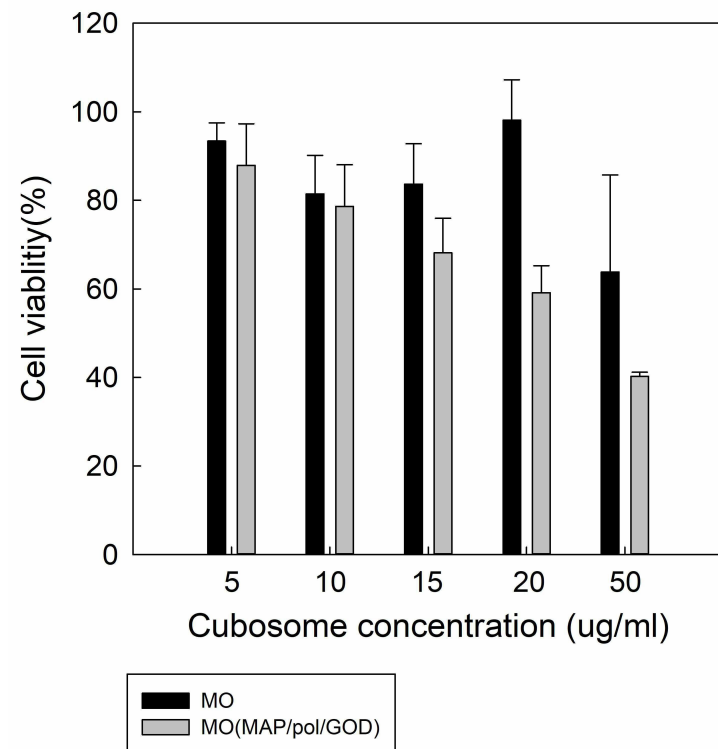
도면17



도면18



도면19



도면20

