



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년04월21일
(11) 등록번호 10-1386096
(24) 등록일자 2014년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
D01F 9/00 (2006.01) D01D 5/34 (2006.01)
D01F 1/10 (2006.01) A61K 9/70 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0022127
(22) 출원일자 2013년02월28일
심사청구일자 2013년02월28일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110099475 A
US20100047310 A1
KR1020110027949 A
WU Li-li 외 3명. Chem. Res. Chinese Universities.: 2011, 27(4), 708-711

(73) 특허권자
강원대학교산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
유혁상
서울 서초구 신반포로 270, 101동 1901호 (반포동, 반포자이)
최지숙
강원 춘천시 삭주로80번길 37, (효자동)
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

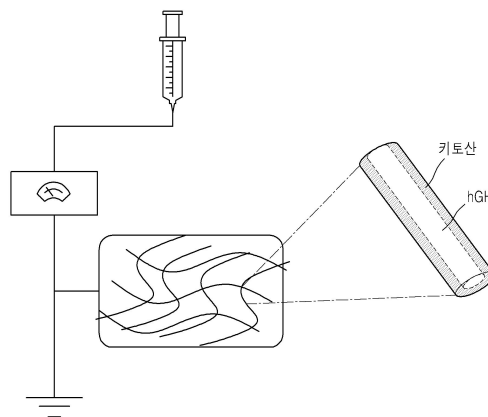
심사관 : 최봉돈

(54) 발명의 명칭 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유, 그 제조방법 및 그 키토산 나노섬유를 포함하는 경점막 투여제

(57) 요약

본 발명은 음이온성 단백질 약물을 포함하는 약물 수용액을 내부 노즐에 주입하고, 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 외부 노즐에 주입하여 동축전기방사시켜 얻은, 코어에 음이온 단백질을 함유하고 쉘에 키토산을 함유하는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유, 그 제조방법, 및 그 키토산 나노섬유를 포함하는 경점막 투여제를 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김영희

강원 강릉시 보래미상길 65, 3동 404호 (포남동,
포남1주공아파트)

강지현

강원도 양양군 양양읍 남문1리 4반

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C1008913-09-01

부처명 교육과학기술부

연구사업명 [산학협력선도대학육성사업] 강원대학교 LINC사업단

연구과제명 전기방사 기술을 이용한 고효율 인간성장호르몬 키토산 미립구제조

기 여 율 1/1

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

음이온성 단백질 약물을 포함하는 약물 수용액을 내부 노즐에 주입하고, 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 외부 노즐에 주입하여 동축전기방사시켜 얻어진 나노섬유를 알칼리 용액 중에 중성화시킨 나노섬유로서, 코어에 음이온 단백질을 함유하고 쉘에 키토산을 함유하는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 약물 수용액은 폴리비닐알콜, 폴리부텐, 폴리아크릴산나트륨, 포비돈, 폴리포스포릴콜린 글라이콜아크릴레이트, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 메틸셀룰로오즈, 하이셀, 카보폴프리젤, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 점도 조절제를 더 포함하는 것인 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 음이온성 단백질은 인간성장호르몬, 소혈청 알부민(BSA), 홍합 접착 단백질, 및 이들의 조합으로 구성된 그룹에서 선택되는 것인 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 키토산 유도체는 아크릴화 키토산, 티올화 키토산, 또는 포스포릴화 키토산인 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유.

청구항 5

음이온성 단백질 약물의 수용액을 듀얼노즐의 내부 노즐에 주입하는 단계;

키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 듀얼노즐의 외부 노즐에 주입하는 단계;

전압을 20 ~ 27 kV 가하면서, 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 각각 0.05~0.1 ml/h 및 0.5~1.5 ml/h로 가하여 동축전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계; 및

상기 제조된 나노섬유를 알칼리용액 중에서 중성화하는 단계를 포함하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 키토산 나노섬유의 제조방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 음이온성 단백질 약물의 수용액은 폴리비닐알콜, 폴리부텐, 폴리아크릴산나트륨, 포비돈, 폴리포스포릴콜린글라이콜아크릴레이트, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 메틸셀룰로오즈, 하이셀, 카보폴프리젤, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 점도 조절제를 더 포함하는 제조방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액의 용매는 트리플루오로 아세트산 및 디클로로 메탄의 혼합용매 또는 헥사플루오로이소프로판올 및 트리플루오로 아세트산 혼합용매인 제조방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제 5 항에 있어서, 상기 알칼리용액은 탄산나트륨, 탄산칼슘, 탄산칼륨, 또는 인산나트륨 용액인 제조방법.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 키토산 나노섬유를 포함하는 음이온성 단백질의 경점막 투여제.

청구항 11

제10항에 있어서, 구강 점막을 통한 음이온성 단백질 약물의 전달을 위한 경점막 투여제.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유, 그 제조방법, 및 그 키토산 나노섬유를 포함하는 경점막 투여제에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 동축전기방사법(coaxial electrospinning)에 의해 제조되는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유, 그 제조방법, 및 그 키토산 나노섬유를 포함하는 경점막 투여제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질 약물을 체내로 전달하기 위한 방법에는 미립구에 의한 투여, 또는 고분자 결합 방식에 의한 투여 등이 있다. 그러나, 이러한 제제를 이용하여 경구투여 할 경우, 간과 위에 의한 초회통과효과 때문에 체내로의 전달 효율이 매우 낮다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 w/o/w 이중 유제, 리포솜 등의 방법이 개발되기도 했지만, 이러한 방법들은 제조단계가 복잡하고 단백질 변성이 일어나거나 물리적으로 강도가 약하기 때문에 단백질 약물이 손상을 받게 되는 한계점이 존재했다. 또, 다른 방법인 점막투여 제형의 경우, 단백질 약물을 혈관 내에 직접 주입하여 체내로의 전달효율을 높이하고자 하였다. 그러나, 이 방법은 주사기 바늘에 대한 두려움과 약물이 주입될 때의 통증 때문에 환자들에게 거부감을 불러 일으킨다. 또한 주입된 단백질 약물이 혈관 내에서 순환하면서 손실되는 양이 많아, 단백질 약물의 효과가 발현되기 위해서는 다량의 단백질 약물을 주입해야 하므로 경제적인 손실이 발생한다. 따라서, 단백질 약물의 체내 흡수를 증진시키기 위해서는 효율적인 약물 전달 시스템이 필요하다.

[0003] 단백질 약물의 체내 흡수를 증진시키기 위한 투여 방법으로 구강 점막을 통한 약물 전달 방법이 제안되었다. 구강 점막은 혈관이 잘 발달되어 있어 단백질, 약물등과 같은 물질 전달에 효과적이며, 효소에 의한 활성도가 낮은 특성을 가진다. 또한, 다른 점막조직과 비교하여 알레르기 항원에 잘 견디고 국소 및 전신 투여 모두를 위한 약물전달이 가능하다. 더욱 중요한 것은, 구강점막을 통해 단백질 약물이 투여되면 간과 위에 의한 초회통과효과를 피할 수 있어 약물의 손실을 최소화 할 수 있다는 점이다. 따라서, 최근에는 구강 점막을 통해 단백질 약물을 전신투여 하고자 하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0004] 단백질 약물의 체내 흡수를 증진시키기 위해 제제로서 나노 섬유가 제안되었다. 나노 섬유는 전기방사기술을 이용해 제조되는데, 바늘 끝에 맺힌 고분자 용액에 그 표면장력보다 큰 힘의 고전압을 가하여 고분자 용액을 한 줄기의 고분자 유체(fluid)로 만들어 수집기 전극(collector electrode)에 쌓이게 하여 만들어진다. 상기 고분자로는 폴리비닐피롤리돈, 폴리카프로락톤, 또는 폴록사머 등과 같은 고분자가 사용된다. 이렇게 만들어진 나노 섬유는 부피 대비 매우 넓은 면적을 가지며, 나노 사이즈의 섬유들이 서로 얽혀서 쌓여있는 다공성의 구조이다. 따라서 그 나노섬유의 다공성 구조의 내부에 약물 등의 물질을 함유시킬 수 있고 피부 점막에도 쉽게 접착된다. 그러나, 단일 노즐(nozzle)에서 방사되는 나노 섬유의 경우, 약물 담지 시 약물이 초기에 급격하게 방출되는 단점이 있는데, 이는 높은 농도의 약물이 체내에 한꺼번에 방출되어 부작용을 일으키게 된다. 그리고, 전기방사를 위한 고분자 용액의 용매로는 주로 유기용매가 이용되는데, 단백질과 같은 물질을 고분자와 함께 단일 노즐로 전기방사 할 경우 용액의 준비과정에서 단백질이 유기용매에 오랜 시간 노출되어 단백질이 변성되고 체내에서의 활성을 잃게 되는 문제가 있다. 또한, 전기방사 시 고분자 물질을 수용액 중에 단백질과 함께 고르게 분산시키는 것이 쉽지 않기 때문에 단백질 약물을 나노 섬유 내에 포접시키는 것은 더욱 힘들다.

[0005] 이러한 문제점의 대안으로, 동축전기방사법(coaxial electrospinning)을 이용하여 제조되는 나노 섬유가 있다. 동축전기방사에 의한 나노 섬유는 도 1에 나타난 바와 같은 두 개의 노즐(nozzle)이 한 축을 이루어 주사기를 형성하고 주사기의 말단에 표면장력 보다 고전압을 가하여 수집기 전극 상에 코어(core)와 셸(shell)의 형태로 나노섬유가 만들어진다. 보통, 코어와 셸의 용매로 각각 물과 유기용매가 사용되는데, 이 두 가지 용매의 서로 다른 성질에 의해 전기방사 시, 상 분리가 일어나 코어-셸 구조를 이루게 된다. 이 과정에서 단백질 약물은 유기용매가 아닌 물에 분산되어 있는 상태로 전기 방사되기 때문에 단백질 변성이 일어나지 않는 장점이 있다. 또한, 동축방사에 의한 나노 섬유는 고분자가 단백질 약물을 포접하는 형태로 제조되는데, 이는 약물이 초기에 다량 방출되는 것을 방지한다(비특허문헌 1).

[0006] 그러나, 종래 단백질 약물을 코어로 한 동축전기방사에 의한 나노섬유는 단백질 약물의 포집 효율은 8.3 % 이하로서 높지 않았다(비특허문헌 2). 또한, 그러한 나노섬유는 점막과의 부착성이 높지 않은 단점이 있었다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Kangjie Zhu et al., Modulation of Protein Release from Biodegradable Core-Shell Structured Fibers Prepared by Coaxial Electrospinning, Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2005, 50-57

(비특허문헌 0002) 2. F.Z. Cui et al., Electrospun collagen-chitosan nanofiber: A biomimetic extracellular matrix for endothelial cell and smooth muscle cell, Acta Biomaterialia, 2010(6), 372-382

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 음이온성 단백질 약물이 급격하게 방출되지 않고, 약물의 포집 효율이 높으며, 구강 점막에도 잘 부착될 수 있는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 나노섬유를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 나노섬유의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명이 또 다른 목적은 상기 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 나노섬유를 포함하는 음이온성 단백질 약물의 경점막 투여제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명의 일 측면은

[0012] 음이온성 단백질 약물을 포함하는 약물 수용액을 내부 노즐에 주입하고, 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 외부 노즐에 주입하여 동축전기방사시켜 얻은, 코어에 음이온 단백질을 함유하고 쉘에 키토산을 함유하는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유를 제공한다.

[0013] 본 발명의 다른 일 측면은

[0014] 음이온성 단백질 약물의 수용액을 듀얼노즐의 내부 노즐에 주입하는 단계;

[0015] 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 듀얼노즐의 외부 노즐에 주입하는 단계; 및

[0016] 전압을 20 ~ 27 kV 가하면서, 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 각각 0.05~0.1 ml/h 및 0.5~1.5 ml/h로 가하여 동축전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계를 포함하는 상기 본 발명의 일 측면에 따른 키토산 나노섬유의 제조방법을 제공한다.

[0017] 본 발명의 또 다른 일 측면은 상기 본 발명의 일 측면에 따른 코어에 음이온 단백질을 함유하고 쉘에 키토산을 함유하는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유를 포함하는 음이온성 단백질의 경점막 투여제를 제공한다.

[0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0019] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 전체가 참고로 통합된다.

[0020] 본 발명자들은 음이온성 단백질을 보다 효율적으로 포집할 수 있으며, 점막에 용이하게 부착하여 단백질 약물 전달을 향상시킬 수 있는 경점막 투여 가능한 나노섬유 제제에 대해 연구한 결과, 고분자로서 키토산 또는 키토산 유도체를 이용하여 동축전기방사법에 의해 쉘을 구성하도록 하고 음이온성 단백질을 코어를 구성하는 나노섬유를 동축전기방사법에 의해 제조하면 상기 목적을 달성할 수 있음을 발견하여, 본 발명을 완성하게 되었

다.

- [0021] 따라서, 본 발명은 일 측면에 있어서,
- [0022] 음이온성 단백질 약물을 포함하는 약물 수용액을 내부 노즐에 주입하고, 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 외부 노즐에 주입하여 동축전기방사시켜 얻은, 코어에 음이온 단백질을 함유하고 셸에 키토산을 함유하는 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유를 제공한다.
- [0023] 상기 음이온성 단백질 약물을 포함하는 약물 수용액은 폴리비닐알콜, 폴리부텐, 폴리아크릴산나트륨, 포비돈, 폴리포스포릴콜린글라이콜아크릴레이트, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 하이셀, 카보폴프리젤, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 점도 조절제를 더 포함할 수 있다. 이는 동축전기방사에 의한 나노섬유 제조 시, 코어에 추가되는 수용액의 점도가 떨어지면 섬유 형태의 모양이 만들어지지 않고, 부분적으로 비드가 발생될 수 있기 때문이다.
- [0024] 상기 음이온성 단백질 약물은 인체의 점막에 국소적으로 적용할 필요가 있거나 전신투여할 필요가 있는 임의의 음이온성 단백질 약물이 사용될 수 있다. 이러한 음이온성 단백질은 인간성장호르몬, 소혈청 알부민 (BSA), 홍합 접착 단백질, 및 이들의 조합으로 구성된 그룹에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 키토산 유도체는 아크릴화 키토산, 티올화 키토산, 또는 포스포릴화 키토산일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니고, 상기 동축전기방사법에 의해 나노섬유를 제조할 수 있는 임의의 키토산 유도체일 수 있다.
- [0026] 상기 키토산은 갑각류의 껍질에 풍부하게 함유된 물질인 키틴을 탈아세틸화하여 얻어진 고분자로서, 글루코사민과 N-아세틸글루코사민의 공중합체이다. 키토산은 최근 FDA에 의해 의료용으로 또는 식용으로 승인이 나는 등 뛰어난 생체적합성을 가진다. 또한, 버려지기 쉬운 게나 새우의 껍질에서 얻기 때문에 단가가 매우 저렴하고 장내 세균 등에서 분비되는 키틴나제(chitinase)에 의해 체내에서 분해될 수 있다. 상기 키토산 또는 그 유도체의 분자량은 70 ~ 500K 일 수 있으며, 바람직하게는 50 ~ 300K 이며, 가장 바람직하게는 100K이다. 키토산이 상기 분자량을 벗어날 경우, 나노섬유 제조 시, 비드가 생성되는 등 섬유의 형태가 유지되지 않아 나노섬유를 제조할 수 없는 문제가 발생될 수도 있다.
- [0027] 본 발명은 다른 일 측면에 있어서,
- [0028] 음이온성 단백질 약물의 수용액을 듀얼노즐의 내부 노즐에 주입하는 단계;
- [0029] 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액을 듀얼노즐의 외부 노즐에 주입하는 단계; 및
- [0030] 전압을 20 ~ 27 kV 가하면서, 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 각각 0.05 ~ 0.1 ml/h 및 0.5 ~ 1.5 ml/h로 가하여 동축전기방사하여 나노섬유를 제조하는 단계를 포함하는 상기 본 발명의 키토산 나노섬유의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 상기 음이온성 단백질 약물의 수용액은 폴리비닐알콜, 폴리부텐, 폴리아크릴산나트륨, 포비돈, 폴리포스포릴콜린글라이콜아크릴레이트, 잔탄검, 구아검, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 하이셀, 카보폴프리젤, 및 이들의 조합으로 구성된 군에서 선택된 점도조절제를 더 포함할 수 있다. 상기 음이온성 단백질 수용액의 농도는 음이온성 단백질 0.001 ~ 0.007 g/mL, 점도조절제 0.005 ~ 0.05 g/mL의 범위일 수 있다. 상기 농도 범위를 벗어날 경우는 단백질이 나노섬유 내에 적게 포접 되는 문제점 또는 내부 노즐 용액의 농도가 적절하지 않아, 나노섬유를 제작하는데 어려움이 발생할 수도 있다.
- [0032] 상기 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액의 용매는 트리플루로로 아세트산 및 디클로로메탄의 혼합용매, 헥사플루오로이소프로판올 및 트리플루로로 아세트산 혼합용매와 같은 산성 용액일 수 있다. 상기 키토산 또는 그 유도체를 포함하는 용액의 농도는 0.05 ~ 0.1 g/mL의 범위일 수 있다. 상기 농도 범위를 벗어날 경우는 용액의 낮은 점성에 의해 비드가 형성되는 문제점 또는 높은 점성으로 인해 전기방사 도중 불안정한 전류가 흘러 불꽃이 발생할 수 있어 문제가 된다.
- [0033] 상기 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속은 바람직하게는 각각 0.07~0.09 ml/h 및 0.9~1.1 ml/h로 할 수 있다.
- [0034] 상기 제조된 나노섬유는 키토산의 아민기가 용매 중의 트리플루로로 아세트산(TFA)과 극성이 높은 염 ($\text{NH}_3^+\text{CF}_3\text{COO}^-$)을 형성하여, 나노섬유가 물에 잘 용해될 수 있는 문제가 있다. 이를 방지하기 위해, 상기 제조방법은 나노섬유를 제조하는 단계 후에 알칼리 용액 중에서 나노섬유를 중성화하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 알칼리 용액은 예를 들어 탄산나트륨, 탄산칼슘, 탄산칼륨, 또는 인산나트륨 등의 수용액 일 수 있다. 상

기 알칼리 용액의 농도는 1 ~ 6 M 일 수 있으며, 약 6 ~ 24 시간 동안 방치함으로써 중성화할 수 있다. 상기 중성화 하는 단계에 의해 나노섬유의 직경은 팽창될 수 있으나, 나노섬유의 형태는 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다.

[0036] 상기 본 발명에 따른 나노섬유는 음이온성 단백질이 내부 코어에 존재하고 키토산 또는 그 유도체가 그 음이온성 단백질을 감싸는 형태를 가진다. 본 발명의 일 구현예에 따라 음이온 단백질로서 인성장호르몬(hGH)을 사용하여 동축전기방사법에 의해 제조된 나노섬유의 단면도를 도 2에 나타내었다. 도 2에 나타난 바와 같이, 본원 발명의 동축전기방사법 의해 수집기 전극(collector electrode)에 수집된 나노섬유의 단면은 셸 부분에 키토산이 감싸고 있고 코어 부분에 음이온성 단백질에 해당하는 hGH이 존재하는 형태를 갖는다.

[0037] 키토산은 아민기의 존재로 인해 양이온성을 띠므로 내부에 음이온성 약물을 안정적으로 포접할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 동축전기방사법에 의한 나노섬유는 음이온성 약물을 매우 효율적으로 포접할 수 있는 장점이 있다.

[0038] 또한, 생체의 점막은 음이온을 띠므로, 상기 본 발명에 따른 나노섬유는 셸 부분이 양이온을 띠는 키토산으로 구성되어, 생체 점막에 적용 시 점막과의 부착력이 높다. 따라서, 본 발명에 따른 나노섬유는 구강 점막에 적용 시, 구강 점막과의 부착력이 높아 음이온성 단백질의 구강 점막을 통한 약물전달이 촉진될 수 있어 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 나노섬유는 나노섬유의 코어 내에 음이온성 단백질이 존재하여 생체에 적용 시 약물의 방출의 급작스럽게 이루어지지 않고 서서히 방출할 수 있는 장점도 있다.

[0039] 따라서, 본 발명은 다른 일 측면에 있어서, 상기 본 발명에 따른 음이온성 단백질 약물 전달을 위한 키토산 나노섬유를 포함하는 음이온성 단백질의 경점막 투여제를 제공한다.

[0040] 상기 점막은 약물의 투여가 가능한 임의의 점막일 수 있으며, 예를 들어 구강 점막, 눈 점막, 비 점막, 귀 점막, 위장 점막, 질 점막, 또는 항문 점막 등일 수 있다. 바람직하게는, 상기 경점막 투여제는 구강 점막을 통한 투여제일 수 있다. 구강 점막은 앞서 언급한 바와 같이, 혈관이 잘 발달되어 있어 단백질 약물 전달에 효과적이며, 구강점막을 통해 단백질 약물이 투여되면 간과 위에 의한 초회통과효과를 피할 수 있어 약물의 손실을 최소화 할 수 있다는 점에서 매우 바람직하다.

[0041] 상기 본 발명에 따른 나노섬유를 실제로 경점막 투여제로 적용하기 위해서는 그대로 이용될 수도 있으며, 경점막 투여제로 제제화하기 위해 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 제제화 기술이 이용될 수도 있다.

발명의 효과

[0042] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 나노섬유는 동축전기방사법에 의해 셸 부분에 키토산 또는 그 유도체가 감싸고 있고 코어 부분에 음이온성 단백질이 포접되는 형태를 가져, 음이온성 단백질을 보다 효율적으로 포접할 수 있으며, 셸 부분의 키토산의 존재로 인해 점막에 용이하게 부착하여 단백질 약물의 체내 전달력이 매우 우수하다. 또한, 약물이 코어 부분에 존재하여 약물이 급격히 방출되지 않아, 급격한 약물의 흡수에 따른 부작용을 방지하고 약물을 지속적으로 체내에 전달할 수 있는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 코어-셸 나노섬유를 제조할 수 있는 동축전기방사에 의한 나노 섬유 제조 실험장치를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 구현예에 따라 동축전기방사법에 의해 제조되는 나노섬유 및 그 나노섬유의 단면도를 함께 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 나노섬유의 중성화 단계 전 및 후의 사진을 배율을 달리하여 전계방사형주사전자현미경으로 관찰한 결과를 촬영한 사진이다.

도 4는 동축전기방사법에서 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 변화시켜 가면서 제조된 나노섬유 및 단일 노즐을 이용해 제조된 나노섬유를 광학현미경으로 관찰한 사진이다.

도 5는 동축전기방사법에서 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 변화시켜 가면서 제조된 나노섬유에서 내부 노즐의 FITC-BSA가 나노섬유의 내부로 들어가는 양상을 확인하기 위한 공초점 레이저 현미경사진이다.

도 6은 증류수 중의 FITC-BSA 농도에 따른 형광 값을 나타내는 표준곡선이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] **실시예 1: 동축전기방사법을 이용한 키토산/FITC-BSA 나노섬유 제조**
- [0046] 키토산/FITC-BSA 나노섬유는 셀에는 키토산(Mw 100,000, Wako)이, 코어에는 플루오레세인 5(6)-이소티오시아네이트 (FITC) (Mw 389.38, Sigma)가 결합한 소혈청알부민(BSA)(Mw 66,000, Sigma) 및 폴리비닐알콜(PVA)(Mw 27,000, Sigma)로 구성된다. 외부 노즐의 키토산 용액은 트리플루오로아세트산(TFA): 디클로로메탄(DCM)(7:3, v/v)의 혼합용매에 7% (w/v)의 농도로 준비하였다. 내부 노즐의 용액은 FITC-BSA를 1% (w/v) PVA 용액에 0.35 mg/ml의 농도로 녹였다. 듀얼 노즐의 내부 노즐에서는 FITC-BSA/PVA 용액이, 외부 노즐에서는 상기 키토산 용액이, 각각 0.08 및 1.0 ml/h의 유속으로 제공되었다(이하, "0.08-1.0 ml/h"로 표시한다). 전체 전압은 25 kV를 가하며, 바늘과 접지 간 사이의 거리는 15 cm를 유지하였다.
- [0047] **실시예 2: 키토산/FITC-BSA 나노섬유의 중성화**
- [0048] 키토산의 아민기에 의해 양이온성을 띄고 있는 키토산/FITC-BSA 나노섬유를 중성화하기 위하여 나노섬유를 4 M 탄산나트륨 용액에 12 시간동안 37°C 온도를 유지하며 담가 두었다. 이후, 증류수로 10 회의 세척을 거친 후 동결건조 하였다.
- [0049] 그리고, 중성화 하기 전 후의 나노섬유의 형태를 전계방사형주사전자현미경으로 관찰하였으며, 그 결과를 촬영한 사진을 도 3에 나타내었다.
- [0050] 도 3은 본 발명의 일 구현예에 따라 제조된 나노섬유의 중성화 단계 전 및 후의 사진을 배율을 달리하여 전계방사형주사전자현미경으로 관찰한 결과를 촬영한 사진이다.
- [0051] 키토산 나노섬유의 굵기는 중성화하기 전과 후가 각각 122.6 ± 32.5 nm, 252.5 ± 98.4 nm로 관찰되었다. 나노섬유가 탄산나트륨에서 중성화 되는 과정에서 팽창될 수 있기 때문에 나노섬유의 직경이 약 두 배로 늘어났지만, 키토산 나노섬유의 형태는 일정하게 유지되는 것으로 확인되었다.
- [0052] **실험예 1: 유속의 변화에 따른 나노섬유의 변화**
- [0053] 상기 실시예 1에서 유속을 내부 노즐의 FITC-BSA/PVA 용액 및 외부 노즐의 키토산 용액을 0.05-1.0 ml/h, 0.1-1.0 ml/h로 하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방식으로 나노섬유를 제조하였다.
- [0054] 또한, 싱글 노즐을 사용하여 나노섬유를 제조하였다. 구체적으로는, 전기방사에 필요한 용액은 트리플루오로아세트산 (TFA) : 디클로로메탄 (DCM) (7:3, v/v)의 혼합용매에 0.7 g/ml의 농도의 키토산을 녹이고, 여기에 0.0035 g/ml의 농도의 소혈청알부민 (BSA), 0.01 g/ml의 점도 조절제(폴리비닐알콜)을 첨가하였다. 그리고 단일 노즐에 이 용액을 가하고, 0.8 ml/h의 유속으로 공급하면서, 전체 전압은 25 kV를 가하며, 바늘과 접지 간 사이의 거리는 10cm를 유지하였다.
- [0055] 상기 실시예 1에서 제조된 나노섬유와 함께, 상기 제조된 나노섬유에 대해 섬유 모양을 광학 현미경으로 관찰한 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0056] 도 4는 동축전기방사법에서 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 변화시켜 가면서 제조된 나노섬유 및 단일 노즐을 이용해 제조된 나노섬유를 광학현미경으로 관찰한 사진이다.
- [0057] 7%(w/v)의 키토산 나노섬유를 단일 노즐을 이용해 1.0ml/h, 25kV로 방사하면 일정한 모양의 나노섬유가 제조된다(d). 반면에, 이중 노즐을 이용해 전기방사를 하게 되면 내부 노즐에 증류수가 포함되어 증발성이 낮아지면서 비드가 다수 형성된다(c). 따라서, 외부 노즐의 유속은 1.0 ml/h로 고정하고, 내부 노즐의 유속을 변화시켜 최적의 나노섬유가 방사되는 조건인 0.08 - 1.0ml/h (내부 노즐- 외부 노즐)(b)를 정립하였다.
- [0058] 또한, 상기 실시예 1에서 유속을 내부 노즐의 FITC-BSA/PVA 용액 및 외부 노즐의 키토산 용액을 0.02-1.0 ml/h, 0.04-1.0 ml/h, 0.06-1.0 ml/h로 하는 것을 제외하고, 상기 실시예 1과 동일한 방식으로 나노섬유를

제조하였다. 그리하여 얻어진 나노섬유 및 상기 실시예 1의 나노섬유에 대해 나노 섬유 내부에 포접되는 FITC-BSA를 공초점 레이저 현미경으로 관찰한 결과를 촬영한 사진을 도 5에 나타내었다(600배, inner-outer).

[0059] 도 5는 동축전기방사법에서 내부 노즐 및 외부 노즐의 유속을 변화시켜 가면서 제조된 나노섬유에서 내부 노즐의 FITC-BSA가 나노섬유의 내부로 들어가는 양상을 확인하기 위한 공초점 레이저 현미경사진이다.

[0060] 도 5에 따르면, 내부 노즐의 유속이 0.02, 0.04 ml/h인 그룹의 경우(a,b)에는 FITC-BSA가 나노 섬유의 일부에만 포접되어 있고, 0.06 ml/h 그룹(c)에서는 비드의 생성으로 인해 그 주위에만 FITC-BSA가 중점적으로 위치하였다. 이에 비해 0.08-1.0 (inner-outer)ml/h로 방사한 나노섬유(d)에서는 FITC-BSA가 나노섬유의 내부에 비교적 균일하게 분포해 있는 것을 확인하였다.

[0061] 실험예 2: FITC-BSA의 포접 효율 측정

[0062] 상기 실험예 1 및 2에서 키토산/FITC-BSA 나노섬유의 코어에 함유된 BSA의 포접 효율을 측정하기 위하여, 중성화 하기 전의 나노섬유를 무게를 잰 뒤, 1 ml의 증류수에 완전히 녹인 후 형광분광계를 이용하여 형광을 측정하였다(excitation 495nm, emission 520nm). 표준곡선은 각 농도 별로 증류수에 녹여진 FITC-BSA의 형광 값을 사용하여 제작하였으며, 도 6에 나타내었다. 구체적으로는 표준곡선은 FITC-BSA의 농도 별(50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 mg/ml)의 형광 값으로 구해서 제작하였다.

[0063] 도 6은 증류수 중의 FITC-BSA 농도에 따른 형광 값을 나타내는 표준곡선이다.

[0064] 샘플 나노섬유에 포접된 FITC-BSA의 포접효율은 하기 식에 의해 산출하였다.

[0065] $\text{포접효율}(\%) = (\text{실제 측정된 FITC-BSA의 양} / \text{이론적으로 포접되는 FITC-BSA의 양}) \times 100$

[0066] 그 결과를 하기 표 1에 정리하였다.

표 1

키토산/FITC-BSA 나노섬유 안 FITC-BSA의 포접률

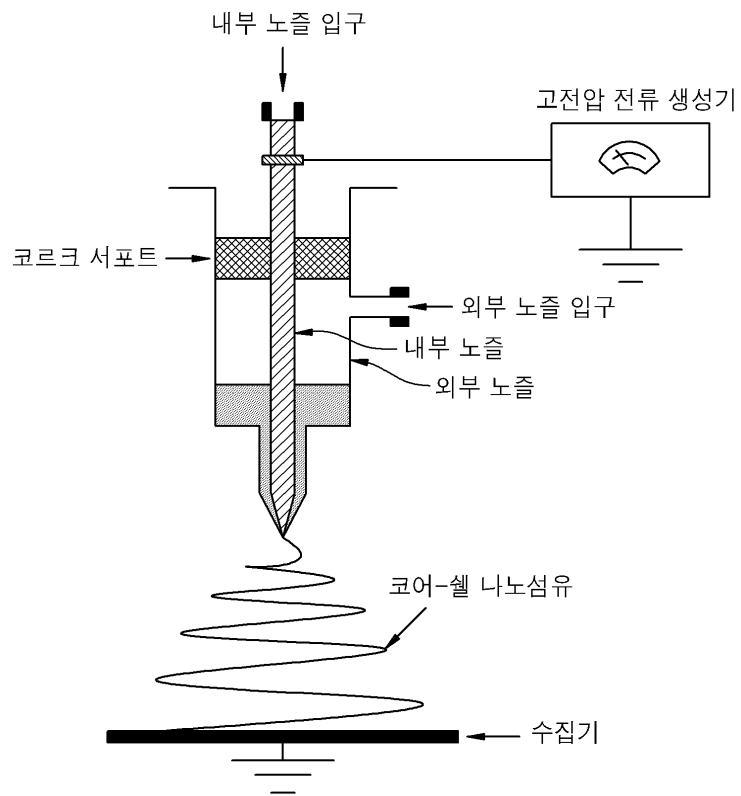
키토산/FITC-BSA NF	mg/ml	형광	FITC-BSA (mg/ml)	포접효율(%)
1	2.4	320.3	0.0065	69.6
2	2.1	310.9	0.0063	77.2
3	2.3	347.6	0.0071	78.8
4	2.4	377.6	0.0077	82.0
5	3	517.7	0.0105	89.9
6	4	591.8	0.0120	77.1
			평균	79.1
			편차	6.7

[0067]

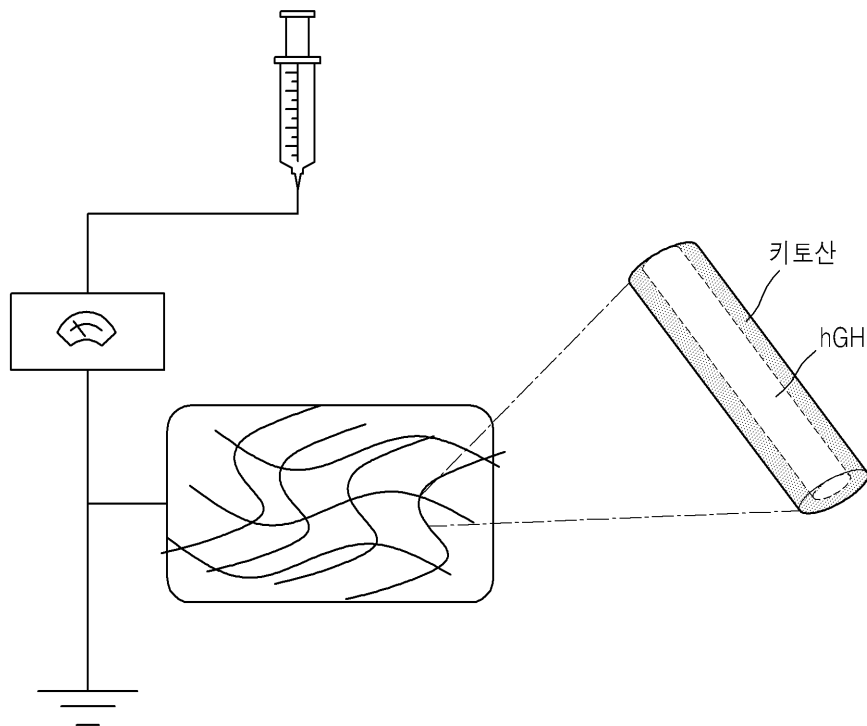
[0068] 상기 표 1의 결과에 따르면, 본 발명에 따라 제조된 나노섬유는 음이온성 단백질을 평균 79.1%의 높은 효율로 포접할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명에 따른 나노섬유는 음이온성 단백질을 높은 효율로 제조할 수 있어, 매우 경제성이 높은 것으로 나타났다.

도면

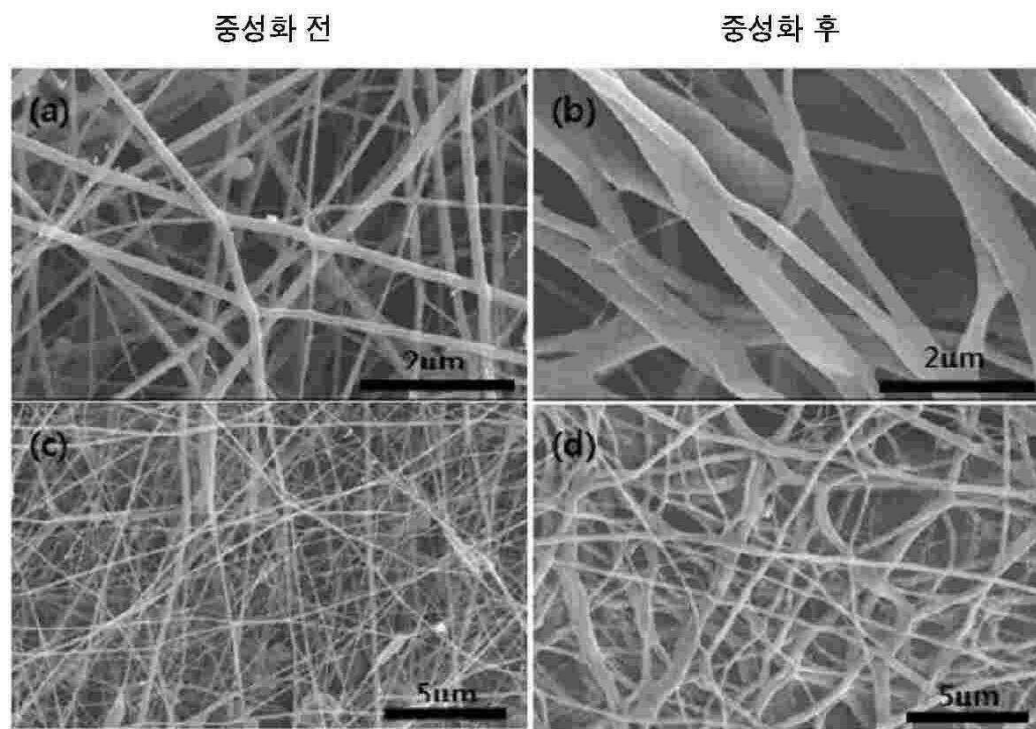
도면1



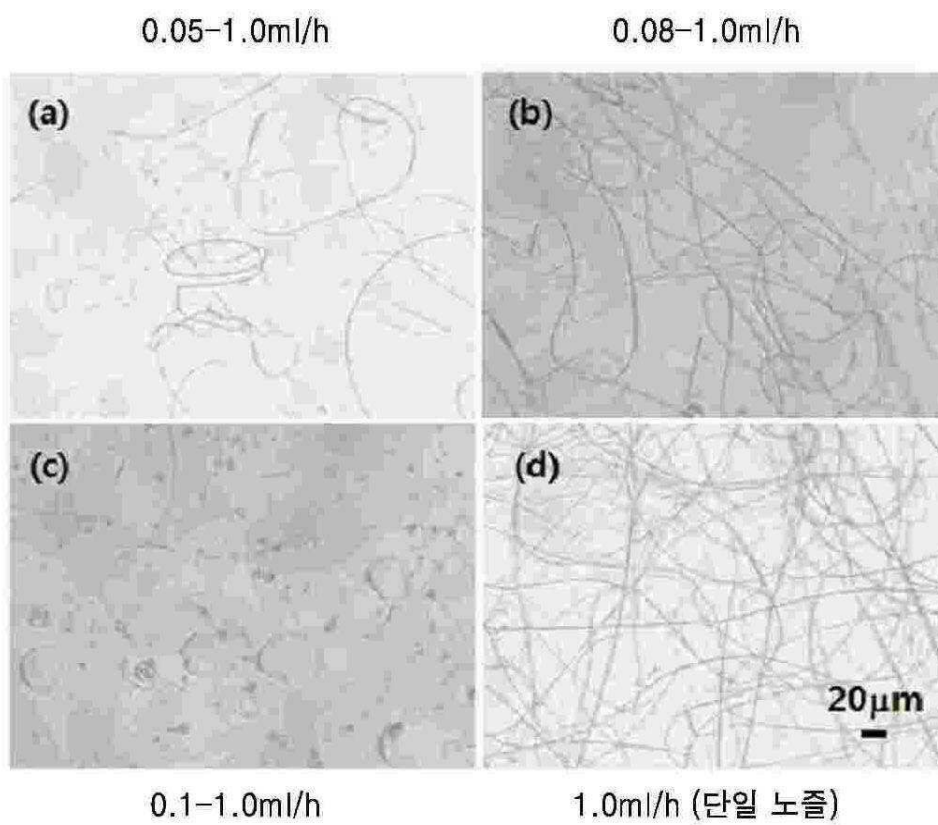
도면2



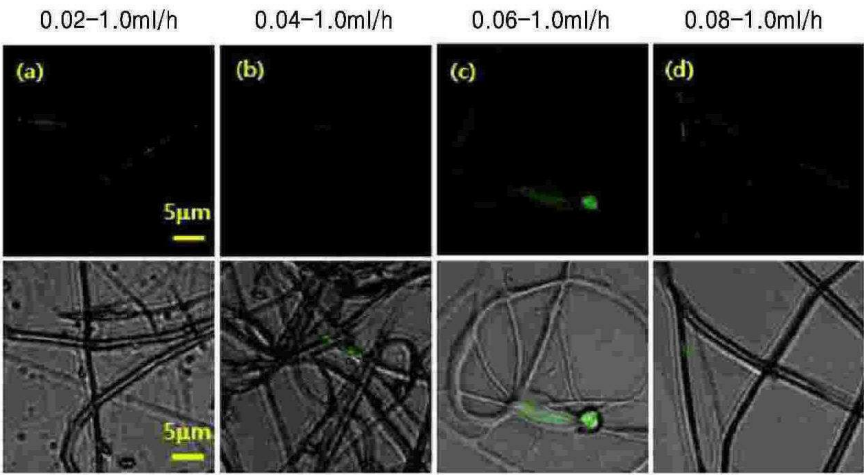
도면3



도면4



도면5



도면6

