



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0076761
(43) 공개일자 2023년05월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/11 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A23P 10/30 (2016.01) A61K 8/65 (2006.01)
A61K 9/50 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/11 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0153038
(22) 출원일자 2022년11월15일
심사청구일자 2022년11월15일
(30) 우선권주장
1020210162250 2021년11월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
학교법인연세대학교
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동)
주식회사 뉴트렉스테크놀러지
충청남도 금산군 추부면 송암로 135
(72) 발명자
노영훈
서울특별시 성동구 왕십리로 16, 101동 1702호(성수동1가, 트리마제)
양경직
서울특별시 서대문구 성산로17길 7, 303호(연희동, 연희궁빌딩)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

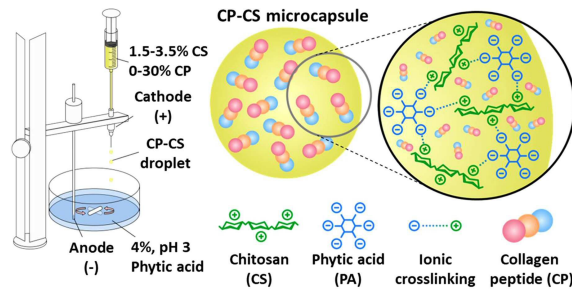
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 저분자 콜라겐의 서방형 방출 및 체내 흡수율 증진을 위한 키토산 기반 마이크로캡슐의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법에 관한 것으로서, 키토산과 피틴산의 정전기적 상호작용을 통해 형성된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 탑재된 저분자 콜라겐의 서방형 방출을 유도하면서, 생체내 저분자 콜라겐의 흡수율을 현저히 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23P 10/30 (2016.08)
A61K 8/65 (2013.01)
A61K 9/5036 (2013.01)
A61K 9/5052 (2013.01)
A61K 9/5089 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/5422 (2013.01)
A61K 2800/92 (2013.01)

(72) 발명자

안승환

서울특별시 구로구 중앙로8길 11, 104동 1202호(고척동, 고척 월드메르디앙)

유원규

충청남도 천안시 서북구 공원로 195, 101동 704호(불당동, 펜타포트)

김상원

충청북도 청주시 청원구 오창읍 오창중앙로 65, 606동 1203호(우림필유2차아파트)

박지용

경기도 고양시 일산동구 노루목로 80, 312동 201호(장항동, 호수마을3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425148090
과제번호	S3006131
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	지역특화산업육성+(R&D)
연구과제명	콜라겐의 체내 흡수율 개선용 키토산 마이크로 캡슐 제품 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	(주)뉴트렉스테크놀로지
연구기간	2020.09.01 ~ 2021.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 키토산을 아세트산 수용액에 용해하여, 키토산 농도가 1.5 내지 3.5%(w/v)인 키토산 용액을 제조하는 단계;
- (b) 상기 키토산 용액에 저분자 콜라겐을 혼합하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하는 단계; 및
- (c) 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 피틴산 수용액을 향해 하전된 액적(droplet) 형태로 정전(electrostatic)분무하여, 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형성하는 단계;를 포함하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 평균 직경은 600 내지 690 μm 인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 상기 아세트산 수용액은 1%(v/v) 아세트산 수용액인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서, 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 2.5 내지 3.5%(w/v)인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 저분자 콜라겐 농도가 10 내지 30%(w/v)인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 피틴산 수용액은 피틴산 농도가 4%(w/w)인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 피틴산 수용액의 pH는 3인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 하전된 액적은, 전압이 인가된 노즐을 포함하는 정전기 액적 생성장치 또는 정전분무장치를

이용하여 분무되는 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 노즐에 인가된 전압은 1~50 kV 전압이 인가되며, 상기 노즐의 내부 직경은 0.1 내지 1 mm인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 제조방법으로 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 중심에서부터 표면 방향으로 공극이 점차 치밀해지는 구조인 것을 특징으로 하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중에서 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 저분자 콜라겐의 서방형 방출을 위한 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저분자 콜라겐의 서방형 방출 및 체내 흡수율 증진을 위한 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 대표적인 구조단백질인 콜라겐은 몸속에서 녹은 상태로 있지 않고 섬유 상태로 존재하며, 동물의 몸이나 장기를 지탱하거나, 결합하거나, 경계를 만들거나, 지지하는 역할을 한다. 이러한 콜라겐 단백질은 글리신, 히드록시 프롤린, 프롤린의 3종 아미노산이 규칙적으로 배열된 트리플 헬릭스(Triple helix) 형태의 3차원 구조 단백질이다.

[0003] 콜라겐 단백질은 이러한 구조적 특징에 기인하여 단단하고, 산 가용성이며, 흡수력이 굉장히 낮다. 물, 묽은 산, 묽은 알칼리에는 녹지 않지만 끓이면 젤라틴이 되어 용해되며 트립신 등의 단백질 분해효소의 작용은 받기 어려운 것으로 알려져 있다. 동물이나 해양 생물 등의 피부, 뼈 및 조직 등의 부산물에서 얻을 수 있다. 콜라겐은 미용뿐만 아니라, 관절염, 근육통, 골다공증 등의 관절, 근육, 인대, 연골 등의 질환을 완화시켜주는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 콜라겐은 인체 단백질의 대략 1/3 정도를 차지하며, 콜라겐 단백질이 부족할수록 우리 몸에는 여러 가지 문제가 발생하게 된다. 일반적으로 알려진 바에 의하면, 인간이 25세부터 콜라겐 단백질이 1년에 1%씩 감소하고, 40대가 되면 20대의 절반 수준으로 저하되게 된다. 또한, 진피층의 콜라겐 단백질의 함량이 줄어들게 되면 탄력이 떨어지고 느슨해져 굴곡이 지며, 피부 표면의 주름살이 늘게 되어 피부 노화를 촉진하게 된다.

[0005] 콜라겐의 보충을 위해 화장품 또는 연고 등과 같은 피부외용제 조성물에 콜라겐을 배합한 제품들이 출시되었으나, 콜라겐 자체를 피부에 도포하는 경우, 고분자 물질인 콜라겐의 경피 흡수가 어려워 충분한 효과를 나타낼 수 없고, 콜라겐을 섭취하는 경우에도 분자량이 매우 커서 체내로 잘 흡수되지 않는 문제가 있다.

[0006] 상기 문제를 해결하기 위하여 어류 유래 콜라겐을 산, 열, 효소 처리 등의 공정을 통해 가수분해하여 약 500 Da 미만의 저분자량을 갖는 GHP(Glycine-Proline-Hydroxyproline) 트리펩타이드가 개발되었으나, 어류 특유의 불쾌취가 있어 장기간 복용이 어려워 시장에서 외면받고 있는 실정이다. 게다가 저분자 콜라겐은 분자량이 작은 만큼 체내에서 빠르게 배출되어버리므로 실질적으로 체내 저분자 콜라겐 흡수 효과를 기대할 수 없다는 문제점이 있다.

[0007] 이외에도 체내에서 콜라겐 합성을 촉진하는 물질과 관련된 제품들이 개발되었다. 상기 콜라겐 합성촉진 물질로는 비타민 C, 히알루론산, 엘라스틴 등이 있다. 그러나 상기 물질들은 콜라겐보다 그 효과가 극히 미미하다는 문제점이 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 저분자 콜라겐의 문제점을 개선하여 소화환경에서 서방형으로 서서히 방출되면서도 체내 흡수가 용이한 저분자 콜라겐 제품을 개발하기 위하여 예의 연구노력하였고, 그 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 대한민국 공개특허공보 제10-2021-0113836호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 따라서 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 저분자 콜라겐의 체내흡수율을 현저히 향상시키는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 상기 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법으로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 상기 목적을 이루기 위하여, (a) 키토산을 아세트산 수용액에 용해하여, 키토산 농도가 1.5 내지 3.5%(w/v)인 키토산 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 키토산 용액에 저분자 콜라겐을 혼합하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하는 단계; 및 (c) 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 피틴산 수용액을 향해 하전된 액적(droplet) 형태로 정전(electrostatic)분무하여, 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형성하는 단계;를 포함하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법을 제공한다.

[0013] 상기 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 평균 직경은 600 내지 690 μm 일 수 있다.

[0014] 상기 (a) 단계에서, 상기 아세트산 수용액은 1%(v/v) 아세트산 수용액일 수 있다.

[0015] 상기 (a) 단계에서, 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 2.5 내지 3.5%(w/v)일 수 있다.

[0016] 상기 (b) 단계에서 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액에서 저분자 콜라겐의 농도가 10 내지 30%(w/v)일 수 있다.

[0017] 상기 (c) 단계에서 피틴산 수용액은 피틴산 농도가 4%(w/w)일 수 있다.

[0018] 상기 (c) 단계에서 피틴산 수용액의 pH는 3일 수 있다.

[0019] 상기 (c) 단계에서 하전된 액적은, 전압이 인가된 노즐을 포함하는 정전기 액적 생성장치 또는 정전분무장치를 이용하여 분무되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 노즐에 인가된 전압은 1~50 kV 전압이 인가되며, 상기 노즐의 내부 직경은 0.1 내지 1 mm일 수 있다.

[0021] 상기 제조방법으로 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 중심에서부터 표면 방향으로 공극이 점차 치밀해지는 구조일 수 있다.

[0022] 본 발명은 상기 다른 목적을 이루기 위하여, 상술한 제조방법으로 제조된 저분자 콜라겐의 서방형 방출을 위한 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 따르면, 키토산과 피틴산의 정전기적 상호작용을 통해 형성된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 탑재된 저분자 콜라겐의 서방형 방출을 유도하면서, 생체내 저분자 콜라겐의 흡수율을 현저히 증진시킬 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에 저분자 콜라겐을 탑재할 경우, 약동학적 제약으로 인해 높은 효율로 체내에 흡수되고, 빠르게 조직으로 이동하여 생체 내에서 이용될 수 있도록 한다.

[0025] 또한 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 중심에서부터 표면 방향으로 공극이 점차 치밀해지는 구

조를 가져, 위액환경에서는 안정하고, 장액 환경에서는 서서히 붕괴되어 저분자 콜라겐을 방출함으로써 저분자 콜라겐의 흡수 특성을 고려하여 활용할 수 있다.

[0026] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 내에 저분자 콜라겐이 고르게 분포되어 있어 장내 환경에서 서서히 방출되더라도 일정한 농도의 저분자 콜라겐을 장기간 제공할 수 있다.

[0027] 그러므로 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 화장품뿐만 아니라 식품 및 노화예방을 위한 조성물로써 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1은 키토산 및 저분자 콜라겐의 농도를 조절하여 제조한 저분자 콜라겐 탑재 키토산 마이크로캡슐 제작 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 마이크로캡슐의 제조 장치를 개략적으로 도시한 도면이다.

도 3은 본 발명에 따른 마이크로캡슐이 소장 내에서 흡수되는 원리를 개략적으로 도시한 것으로, 마이크로캡슐에 저분자 콜라겐이 탑재되어 소장 내에서 서방형 방출되고, 점막 친화성을 가져 외부로의 배출이 제한되어 체내 흡수율이 증가한 것을 설명한다.

도 4는 실시예 1 내지 15 및 비교예 1 내지 5로부터 제조된 키토산 마이크로캡슐의 형태를 관찰하기 위하여, DSLR(digital single-lens reflex) 카메라(D5300, Nikin, Tokyo, Japan)로 촬영하고, Image J 소프트웨어(v1.8, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States)로 분석한 이미지이다.

도 5는 실시예 8 또는 실시예 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 전체모습(overall)과 표면(surface) 및 단면(cross-section)을 주사전자현미경으로 촬영한 이미지이다. 전체모습(overall)에서 스케일바는 500 μm 이고, 표면(surface) 및 단면(cross-section)의 스케일바는 200 μm 이다.

도 6은 실시예 8 또는 실시예 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 단면을 확대하여 주사전자현미경으로 촬영한 이미지이다. 저배율(low magnification)에서 스케일바는 5 μm 이고, 고배율에서 스케일바는 500 nm이다.

도 7은 FITC로 표지된 실시예 8 또는 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 공초점 현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.

도 8A는 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 또는 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형광현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.

도 8B는 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 또는 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 동결절편에 대한 공초점 현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.

도 9A는 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대한 PXRD 분석이다.

도 9B는 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대한 FT-IR 분석이다.

도 10은 Caco-2 세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.

도 11은 HT-29세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.

도 12는 생체 외(*in vitro*), 인공 장액 조건 하에서 실시예 8(2.5 CS) 및 실시예 14(3.5 CS)로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 시간에 따른 방출양(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 13은 Caco-2/HT-9 세포에 대한 저분자 콜라겐(free CP), 실시예 8로부터 제조된 마이크로캡슐 및 실시예 14로부터 제조된 마이크로캡슐의 겔보기 투과계수를 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 14는 생체 내(*in vivo*)에서 저분자 콜라겐(Free CP), 실시예 8 또는 실시예 14의 마이크로캡슐의 시간에 따른 혈중 free Hyp를 측정한 결과 그래프이다.

도 15는 UVB를 0~50 mJ/cm²로 처리한 HaCaT 세포의 생존율을 분석한 그래프이다.

도 16은 HaCaT 세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.

도 17A는 UVB 하에서, 저분자 콜라겐(Free CP), 실시예 8 또는 실시예 14의 마이크로캡슐의 처리에 따른 HaCaT 세포에서의 MMP-1 단백질 발현량을 분석한, 웨스턴 블랏 결과이다.

도 17B는 도 17A의 웨스턴 블랏 결과를 이미지 정량으로 분석한 그래프이다. 각 군별 상대적인 콜라겐 분해효소 MMP-1 발현량을 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0030] 본원발명의 일 측면은 하기 단계를 포함하는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 제조방법에 관한 것이다:
- [0031] (a) 키토산을 아세트산 수용액에 용해하여, 키토산 농도가 1.5 내지 3.5%(w/v)인 키토산 용액을 제조하는 단계;
- [0032] (b) 상기 키토산 용액에 저분자 콜라겐을 혼합하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하는 단계; 및
- [0033] (c) 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 피틴산 수용액을 향해 하전된 액적(droplet) 형태로 정전(electrostatic)분무하여, 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형성하는 단계.
- [0034] 이하, 도 1 및 도 2를 참고하여 각 단계를 상세하게 설명한다.
- [0035] 콜라겐은 대표적인 구조단백질로, 콜라겐 단백질이 부족할수록 우리 몸에는 여러 가지 문제가 발생하는 것으로 알려져 있다. 이러한 콜라겐을 회복시키기 위해, 피부외용제 조성물에 콜라겐을 배합한 제품들이 출시되었으나, 피부 표면에 도포하는 것으로 고분자 물질인 콜라겐의 경피 흡수가 어려워 본질적인 효과를 얻을 수 없었다. 이에 저분자 콜라겐이 개발되었으나, 아무리 뛰어난 효능을 지닌 성분이라고 할지라도 생체에 적용시 생체 내로 흡수되지 못하고 빠르게 배출되어, 충분한 효과를 발휘하지 못하는 문제가 있었다. 본 발명은 상술한 문제를 해결하기 위하여 저분자 콜라겐의 생체 내 흡수를 촉진할 수 있는 키토산 기반의 캡슐을 개발하고자 노력한 바, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0036] 종래 키토산 기반 캡슐은 대부분 분자량이 5 kDa 이상 이면서 전하를 띄는 물질들을 탑재하여 제조되었는데, 이들은 전하를 띄고 있으므로 음전하의 피틴산과 이온성 겔화를 통해 마이크로캡슐을 합성하는데 어려움이 없다. 그러나 저분자 콜라겐은 1 kDa 미만의 저분자이면서도 전하를 띄고 있지 않으므로 특정 조건에서 서방성 방출 특성을 달성할 수 있을 뿐만 아니라 저분자 콜라겐의 체내 흡수율을 2 배 이상 현저히 향상시키며, 체내에 흡수 후 조직으로의 이용율도 증가시켰으며, 최종적으로 저분자 콜라겐의 경구투여를 통한 약리학적 효과도 1.5배 이상 현저히 증가시키는 것을 확인하였다.
- [0037] **a. 키토산 용액 제조단계**
- [0038] 우선, 키토산을 아세트산 수용액에 용해하여, 키토산 농도가 1.5 내지 3.5%(w/v)인 키토산 용액을 제조한다(a 단계).
- [0039] 본 발명에서 "키토산"은 다당류로, 갑각류 껍질로부터 얻어지는 키틴의 -CH₃CONH의 탈아세틸화에 의하여 유도된 천연 고분자 물질이다. 즉, 키토산은 키틴의 단량체에 존재하는 아세틸기(acetyl group; -COCH₃)가 아미노기(-NH₂)로 치환된 형태이다. 한편, 게, 가재, 새우 등 갑각류의 껍질로부터 얻는 키틴은 셀룰로오스 다음으로 풍부한 천연고분자로 셀룰로오스 C-2위치의 OH가 CH₃CONH로 치환된 구조이며 셀룰로오스와 매우 비슷한 구조를 가진 불용성 물질이다.
- [0040] 이러한 키토산은 천연고분자 중 유일한 양이온성을 갖는 물질로 알려져 있다. 또한 키토산은 생체 적합성을 갖고, 비독성이며 면역 유발성이 낮을 뿐만 아니라 산성 환경에서 용해도가 높고 양전하를 띄는 경향이 있고, 점막질 같은 곳에 쉽게 부착하는 성질이 있고 항균성과 지혈 효과 및 항산화 활성을 갖는다. 산성 용액에 높은 용해도를 나타낸다.
- [0041] 본 발명에 따른 키토산은 당업계에서 널리 사용되는 것이라면 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게 탈아세틸화 단위인 D-글루코사민, 그리고 아세틸화 단위인 N-아세틸-D-글루코사민을 포함하는 선형 폴리사카라이드일 수 있

다. 상기 키토산으로는 폴리[β -(1-4)-2-아미노-2-디옥시-D-글루코피라노즈] (poly[β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose]) 및 그 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

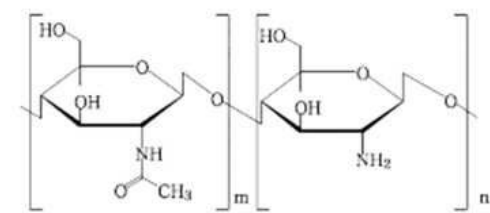
[0042] 상기 키토산 유도체는 티올화 키토산(thiolated chitosan), 트리메틸화 키토산(trimethylated chitosan), 카르복시메틸 키토산(carboxymethyl chitosan) 및 N-(2-히드록실 프로필-3-트리메틸 암모늄)키토산 클로라이드 (N-(2-hydroxyl propyl-3-trimethyl ammonium) chitosan chloride)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0043] 상기 키토산은 수평균분자량이 30,000 내지 1,000,000 Da인 것일 수 있는데, 바람직하게는 80,000 내지 300,000 Da이고, 더 바람직하게는 80,000 내지 150,000 Da일 수 있으며, 가장 바람직하게는 90,000 내지 100,000 Da일 수 있다. 상기 키토산의 수평균분자량이 30,000 Da 미만인 경우 키토산 용액의 점도가 낮아져서 수율이 떨어질 우려가 있고, 1,000,000 Da을 초과하면 키토산 용액의 점도가 지나치게 높아져 캡슐화 공정을 진행하는데 어려움이 있어 바람직하지 못하다. 상기 키토산의 분자량이 90,000 Da 미만인 경우에는 마이크로캡슐 제조시 위액 환경에서 쉽게 분해되어 서방형을 나타내지 못하는 문제가 발생할 수 있고, 100,000 Da를 초과하면 물에 대한 용해도 또는 항산화 활성이 낮아 바람직하지 않다.

[0044] 상기 키토산은 탈아세틸화도가 50 내지 99%인 것일 수 있고, 바람직하게는 60 내지 99%인 것일 수 있으며, 보다 바람직하게는 80 내지 96%인 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 95.44%인 것일 수 있다.

[0045] 본 발명의 키토산의 화학구조는 하기 화학식 1로 표시할 수 있다.

[0046] [화학식 1]



[0047]

[0048] 상기 (a) 단계에서, 상기 아세트산 수용액은 1%(v/v) 아세트산 수용액일 수 있다. 상기 아세트산 수용액에서 아세트산의 농도가 1%(v/v) 미만이면 추후 키토산이 충분히 용해되지 못해, 마이크로캡슐 형성 자체가 이루어지지 않거나, 마이크로캡슐이 제조되더라도 저분자 콜라겐이 30%, 20%, 10% 이하로 거의 탑재되지 못하는 문제가 발생할 수 있다.

[0049] 상기 아세트산 수용액에서 아세트산의 농도를 1%(v/v) 초과하여 제조할 경우에는, 혼합되는 키토산 농도를 증가시킬 수 있다. 그러나 키토산 농도가 증가할수록 마이크로캡슐의 평균 직경이 1000 μm 로 커지면서 다소 불균일해지는 경향(표준편차 200~500 μm 이상)을 나타내므로 바람직하지 않다. 또한 아세트산 특유의 냄새가 남아 소비자 기호를 떨어뜨리는 문제가 있다.

[0050] 따라서 상기 아세트산 농도가 1%(v/v)인 아세트산 수용액에 키토산 농도가 1.5 내지 3.5%(w/v)가 되도록 혼합되는 것일 수 있고, 바람직하게는 2.5 내지 3.5%(w/v)일 수 있다. 상기 조건으로 키토산 용액이 제조됨에 따라, 각 성분의 상호작용에 따른 상승효과로 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 수득률이 높아지고, 분산력이 증가한다.

[0051] 본 발명에서 아세트산(acetic acid; CH_3COOH)은 에탄산(ethanoic acid) 이라고도 부르는 물질로, 특 쏘는 냄새가 나는 무색 액체이며 약산성 화합물이다.

[0052] 상기 (a) 단계에서, 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 1.5 내지 4%(w/v)인 것이 바람직하고, 2.5 내지 3.5%(w/v)인 것이 보다 바람직하다. 상기 키토산 용액에서 키토산 농도가 1.5%(w/v) 미만이면 형태가 불안정하여 제대로 유지되지 못하고 붕괴되는 문제가 발생한다. 상기 키토산 용액에서 키토산 농도가 4%(w/v)를 초과하면 추후 정전분무 과정에서 키토산 고분자 사슬 간의 엉킴에 의해 캡슐 형태가 아닌 연속적인 섬유형태가 형성되는 것을 확인할 수 있다. 3.5%(w/v)를 초과하는 경우에도 일부 섬유상이 관찰되는 바, 균일하고 미세한 마이크로캡슐을 제조하기 위해서는 상기 아세트산 농도가 1%(v/v)인 아세트산 수용액에 키토산 농도가 2.5 내지 3.5%(w/v)가 되도록 혼합되는 것이 바람직하다.

[0053] 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 2.5%(w/v)인 경우, 중심에서부터 표면 방향으로 공극이 점차 치밀해지는 구

조를 갖는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 얻을 수 있으며, 위액 환경에서는 붕괴되지 않고, 장내 환경에서 서서히 붕괴되는 서방형 방출 특성을 가지며, 저분자 콜라겐의 체내 흡수율 지표인 AUC(Area Under Curve)는 저분자 콜라겐 단독투여에 비해 3.7배 증가하였고, 혈중농도 최대값(C_{max})은 저분자 콜라겐 단독투여에 비해 1.5배 증가하였으며, 혈중농도 최대값 도달시간(T_{max})도 4배 이상 증가한 것으로 확인되었다.

[0054] 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 3.5%(w/v)인 경우에도, 2.5%(w/v)일 때와 달리 치밀한 구조의 셸부와 공극 구조의 코어부로 극명한 구조를 갖는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 얻을 수 있으며, 이는 장내 환경에서 서서히 붕괴되는 서방형 방출 특성 측면에서는 우수하였다. 나아가 체내 혈액으로 흡수된 후, 조직으로 흡수되어 광노화 억제효과를 나타내는 것은 저분자 콜라겐 단독과 유사한 수준이었으나, 서방성 방출을 통해 저분자 콜라겐을 체내에 오래 제공할 수 있는 특성을 가지는 것을 확인할 수 있다. AUC값은 저분자 콜라겐 단독투여에 비해 4.8배 이상 증가한 것을 확인하였고, 혈중농도 최대값 도달시간(T_{max})도 저분자 콜라겐 단독투여에 비해 8배 이상 증가한 것을 확인할 수 있다. 본 발명에 따른 마이크로캡슐의 사용목적에 따라 적절히 사용할 수 있다.

[0055] 또한, 상기 키토산 용액은 키토산 농도가 2.5%(w/v)인 경우에는 저분자 콜라겐 단독 투여군(1.9)에 비해 MMP-1 발현량이 57% 이상 유의적으로 현저히 감소하였고, 키토산 농도가 3.5%(w/v)인 경우에는 저분자 콜라겐 단독 투여군(1.9)에 비해 MMP-1 발현량이 36% 이상 유의적으로 현저히 감소하였다. 즉, 항노화와 같은 약학적 효과 역시 저분자 콜라겐 단독 투여보다 유의적으로 현저히 증가하는 것을 알 수 있다.

[0056] b. 키토산-저분자 콜라겐 용액 제조

[0057] 다음, 상기 키토산 용액에 저분자 콜라겐을 혼합하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조한다(b 단계).

[0058] 상기 (b) 단계에서 키토산-저분자 콜라겐 용액에서 상기 저분자 콜라겐 농도가 10 내지 30%(w/v)인 것이 바람직한데, 상기 조건을 벗어나는 경우 저분자 콜라겐이 캡슐 내부에 고르게 분포되지 못하는 문제가 발생할 수 있다. 이 경우 특정 장소에서 서서히 방출하는 것을 목적으로 하는 본 발명의 마이크로캡슐의 제조에 적합하지 않으므로, 저분자 콜라겐의 농도는 10 내지 30%(w/v)를 만족하는 것이 바람직하다.

[0059] 상기 저분자 콜라겐은 어류 비늘, 돈피 등에서 유래된 콜라겐을 효소분해하여 얻은 저분자량의 콜라겐일 수 있다. 일반적으로, 콜라겐은 분자량에 따라 고분자 콜라겐과 저분자 콜라겐으로 나눌 수 있다. 고분자 콜라겐은 일반적으로 분자량 5,000 Da 이상의 것을 의미하고, 저분자 콜라겐은 분자량 1,000 Da 이하인 것을 의미하며, 바람직하게는 분자량이 300 Da 이하인 저분자 콜라겐 펩타이드도 포함하는 것일 수 있다.

[0060] 상기 저분자 콜라겐은 어류 비늘 유래 콜라겐을 효소분해한 것일 수 있으며, 바람직하게는 어류 비늘 유래 콜라겐을 알칼라제(alkalase), 플라보르자임(flavourzyme) 및 프로타멕스(protamex)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 효소로 효소분해된 것일 수 있다.

[0061] 상기 저분자 콜라겐은 직접 제조하거나 통상 시판되고 있는 제품을 구입하여 이용할 수 있으며, 특별히 그 종류에 제한되지 않는다.

[0062] 상기 저분자 콜라겐은 분자량이 0.01 내지 1,000 Da인 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 0.1 내지 500 Da일 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 300 Da일 수 있다.

[0063] C. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 제조

[0064] 최종적으로 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 피틴산 수용액을 향해 하전된 액적(droplet) 형태로 정전(electrostatic)분무하여, 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형성한다(c 단계).

[0065] 상기 (c) 단계에서, 상기 하전된 액적은, 전압이 인가된 노즐을 포함하는 정전기 액적 생성장치 또는 정전분무장치를 이용하여 분무되는 것일 수 있다. 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 전압이 인가된 노즐을 통해 피틴산 용액 내로 액적형태로 방출 또는 적가(droplet)된다. 도 2는 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 피틴산 용액에 향해 하전된 액적(droplet) 형태로 정전(electrostatic)분무하여 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제조하기 위한 본 발명의 일 실시예에 적용된 정전기 액적 생성장치 또는 정전분무장치를 개략적으로 나타낸 것이다.

[0066] 도 2를 참조하면, 상기 장치(10)는 전압이 인가된 노즐(120), 상기 노즐(120)이 연결되어 있는 실린지 펌프(110), 하부전극(130) 및 피틴산 용액이 포함된 반응조(140)를 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로 상기 장치(10)는 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 실린지 펌프(110)에 의해 노즐(120)로 일정 유량으로 공급하면서 전압 발생장치를 이용하여 노즐(120)과 하부전극(130)사이에 전압을 발생시켜 공급된 키토산-저분자 콜라겐 용액

을 하부전극(130) 상에 구비된 피틴산 용액이 포함된 반응조(140)로 분사되어 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐이 생성된다. 도시된 것 이외에 통상의 정전분무장치라면 활용할 수 있으며, 정전기 액적 생성장치일 수도 있다.

- [0067] 상기 노즐(120)의 내부 직경은 0.1 내지 1 mm이고, 바람직하게는 0.3 내지 0.7 mm이고, 가장 바람직하게는 0.5 내지 0.6 mm일 수 있다. 상기 노즐(120)은 24G 니들을 사용하며, 실린지 펌프(110)와 노즐(120)은 실리콘 튜브를 이용하여 연결되어 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액의 공급속도를 0.5 내지 10 ml/hr로 일정하게 유지하는 것일 수 있다.
- [0068] 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액의 공급유량이 0.5 ml/h 미만인 경우는 느린 용액 공급으로 인해 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 생성에 어려움이 있으며, 10 ml/hr를 초과하는 경우에는 과도한 용액 공급으로 불균일한 박막이 생성된다.
- [0069] 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액은 전압이 인가된 노즐(120)을 통해 하전된 액적 형태로 피틴산 수용액을 향해 방출 또는 적가되므로, 상기 피틴산 수용액이 들어있는 반응조(140)는 노즐(120)의 하부전극(130) 상에 배치된다.
- [0070] 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액을 하전된 액적 형태로 안정되게 방출 또는 적가하기 위하여, 노즐(120)과 하부전극(130)에 직류 전압 발생기(150)를 연결하여 0 내지 50 kV의 전압을 걸어주는데, 바람직하게는 1 내지 50 kV이고, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 kV이며, 가장 바람직하게는 10 kV의 고전압일 수 있다. 상기 전압을 제어하여 마이크로캡슐의 크기를 조절할 수 있으므로 특별히 이에 제한되지 않는다. 다만 1 내지 10 kV 특히 10 kV에서 수행되는 것이 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 치밀 구조를 위액 환경에서는 붕괴되지 않으면서도 장내 환경에서는 서서히 붕괴되는 서방형 방출 특성을 갖도록 함으로써, 체내 흡수율의 지표를 증가시키며, 이에 따른 약리효과도 높이는 효과를 달성할 수 있으므로 가장 바람직하다.
- [0071] 상기 반응조(140)에는 피틴산 용액이 들어있고, 상기 반응조(140)는 하부전극(130)과 상기 노즐(120) 사이에 구비되어 있으며, 상기 반응조(140)와 노즐(120)과의 거리는 10 내지 50 cm로 조절될 수 있다. 상기 거리가 10 cm 미만이면 균질한 형태의 캡슐을 얻을 수 없고, 상기 거리가 50 cm를 초과하면 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액이 피틴산 용액에 분사되지 않고 밖으로 흩날리는 문제가 있다.
- [0072] 상기 반응조(140)는 200 내지 400 rpm으로 교반할 수 있는 교반기구(미도시)가 구비될 수 있다. 상기 교반기구는 상기 반응조(140) 하부 바닥면에 마그네틱바가 구비된 형태일 수 있다. 상기 교반속도가 200 rpm 미만이거나, 초과하는 경우에는 캡슐의 형태가 구형보다 찌그러진 모양으로 얻어지는 문제가 있다.
- [0073] 상기 하부전극(130)은 상기 키토산-저분자 콜라겐과 피틴산 용액의 반응을 위한 적절한 온도를 유지할 수 있도록 전열기구(미도시)가 구비될 수 있다. 상기 반응 온도는 특별히 이에 제한되지 않으나 20 ℃ 내지 50 ℃일 수 있으며, 바람직하게는 20 내지 30 ℃일 수 있다.
- [0074] 상기 피틴산은 도정되지 않은 통곡물의 외피에서 얻을 수 있는 성분이며, 보다 구체적으로는 씨앗 및 씨눈에 주로 얻을 수 있으며, 통상적으로 상기 피틴산을 추출할 수 있는 물질이라면 특별히 이에 제한되지 않고 사용할 수 있다.
- [0075] 상기 피틴산은 물에 혼합되어 피틴산 수용액으로 존재할 수 있으며, 구체적으로는 상기 (c) 단계에서 상기 피틴산 수용액은 피틴산 농도가 4%(w/w)인 것이 바람직하다. 상기 피틴산 수용액의 일 예로, 증류수 100 g에 피틴산 4 g을 첨가하고, 마그네틱 바를 이용하여 균일하게 혼합하여 제조된 것일 수 있다. 상기 피틴산 수용액에서 피틴산 농도가 4%(w/w)를 벗어나는 경우에는 오히려 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 체내 유입시 흡수력을 저하시키는 문제가 발생할 수 있다.
- [0076] 나아가, 상기 피틴산 수용액의 농도가 너무 높은 경우에는 일정 농도 외에 반응에 참여하지 않는 미반응 피틴산만이 증가되므로 비경제적이다.
- [0077] 상기 피틴산은 분자 구조에 2개의 음전하를 띠는 곳이 존재해 고밀도의 음전하를 가지기 때문에 키토산-저분자 콜라겐 용액과의 반응을 통해 마이크로캡슐을 형성할 수 있다. 구체적으로, 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액의 하전된 액적이 상기 피틴산과 반응하여 상기 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형성할 수 있다.
- [0078] 상기 피틴산 수용액은 pH 3인 것이 바람직한데, 상기 조건을 초과하면 마이크로캡슐의 가교물질이 과도하게 높아 밀집 구조를 갖는 쉼부의 두께가 증가하게 되므로, 장내 환경에서도 저분자 콜라겐이 방출되지 못하는 문제가 발생할 수 있다. 상기 조건 미만일 경우에는 단단한 쉼부를 형성할 수 없으므로 외부 환경에 대한 안정성

이 낮아지는 문제가 있다.

- [0079] 상기 피틴산 수용액의 농도와 pH를 조절하는 공정은, 당업계 널리 알려져 있는 방법이라면 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어 피틴산 수용액을 증류수에 넣고 교반한 후, 5N 수산화나트륨 용액 또는 구연산나트륨을 이용하여 pH를 조정할 수 있다.
- [0080] 나아가, 상기 피틴산 수용액의 농도가 너무 낮거나 pH가 3이 아닐 경우 재빠른 가교결합이 진행되지 않아서 콜라겐의 탑재 효율이 낮아지거나 캡슐 모양이 일그러지는 등의 문제가 발생할 수 있다.
- [0081] 상술한 방법으로 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 평균 직경은 600 μm 내지 690 μm 으로, 상기 제조조건을 모두 만족하여 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 장내 환경에서 깨지지 않을 뿐만 아니라, 다양한 pH 조건(pH 3~7)이나 고압멸균(autoclave)을 하더라도 안정적인 형태를 유지할 수 있다는 장점을 갖는다. 그러나 상기 제조조건 중에서 어느 하나라도 벗어날 경우에는 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 평균 직경이 600 μm 미만이거나 690 μm 을 초과할 수 있으며, 미만이 경우에는 유효성분을 방출시키기 위한 캡슐의 효과를 구현해내기 어려우며, 초과하는 경우에는 캡슐이 쉽게 깨지거나 이물감이 생기는 문제가 발생할 뿐만 아니라 다양한 pH 조건(pH 3~7)이나 고압멸균(autoclave) 조건에서 구조를 유지하지 못하고 변형되는 문제가 발생한다.
- [0082] 상술한 과정을 통해 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 회수하기 위하여, 분리공정, 세척공정 및 건조공정 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 공정을 추가적으로 수행할 수 있다.
- [0083] 상기 분리공정은 여과 등의 통상의 분리방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 필터를 사용해 여과하거나, 냉동여과법 등을 이용해 여과할 수 있다. 상기 세척공정은 통상의 세척방법을 사용할 수 있고, 증류수 등으로 세척할 수 있다. 상기 건조공정은 통상의 공정방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 동결건조, 열풍건조 및 분무건조로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 방법을 이용해 건조하여 사용할 수 있다.
- [0084] 상술한 과정을 통해 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 저분자 콜라겐을 다량 함유하고 있고, 이의 효능을 증폭시키고 있으므로 화장품 조성물 또는 식품 조성물 또는 약학 조성물로 사용될 수 있다. 바람직하게는 콜라겐 감소로 인한 질환의 치료, 예방 또는 개선용일 수 있으나, 가장 바람직하게는 피부 노화 치료, 예방 또는 개선용 화장품 조성물 또는 식품 조성물 또는 약학 조성물로 사용될 수 있다.
- [0085] 상기 피부 노화는 콜라겐 감소에 의해 유도되는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 자외선에 의한 피부 광노화일 수 있다. 본 발명의 실험예들에서는 자외선(UV)에 의해 MMP-1의 발현량이 증가되는 것을 대조군(control)로 하여 상기 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에 의한 그 저해 효과를 시험하였다. 본 발명에 있어서, 상기 피부 노화의 개선이란 피부 주름 및 피부 탄력이 개선되고 피부세포의 손상이 개선되는 것을 포함한다.
- [0086] 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐이 화장품 조성물로 사용되는 경우, 마스크팩, 용액, 외용연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연화장수, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선스크린 크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0087] 또한, 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 일반 피부 화장품에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 어느 하나 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0088] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 포함하는 화장품 조성물에서, 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 구체적으로는 건조 중량으로, 화장품 조성물 총 중량의 0.0001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 보다 구체적으로는 0.0005 중량% 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 상기 범위 내에서 조성물의 제형이 안정화되는 이점이 있다.
- [0089] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 이를 유효성분으로 포함하는 식품 조성물의 형태로 사용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있다.
- [0090] 본 발명에 있어서, "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러

가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에 있어서, "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법으로 제조 가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0092] 또한, 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 인간 콜라겐 타입과 동일한 저분자의 콜라겐을 탑재한 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나며, 광노화를 억제하거나 피부 탄력을 증진시키기 위한 보조제로 섭취할 수 있다.

[0093] 본 발명의 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용하여 사용할 수 있다. 아울러 본 발명의 건강기능식품은 당업자의 선택에 따라 식품에 포함될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 어류 유래 나노 사이즈의 콜라겐 펩타이드를 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함된다.

[0094] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 포함하는 약학 조성물은, 피부 노화 치료 또는 예방용 약학 조성물일 수 있다.

[0095] 또한, 본 발명에서 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0096] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상제하제는, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 증진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 본 발명의 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 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, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0097] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다.

[0098] 본 발명의 약학 조성물은 의도한 투여 방법에 적합한 임의의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 있어서 투여는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 상기 약학 조성물의 투여경로는 약물이 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

- [0099] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 경로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 경구 또는 비경구일 수 있으며, 상기 비경구 투여는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 관절내, 활액낭내, 흉골내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 피내, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 두개골내, 뇌혈관내(intracerebroventricular), 자궁내, 자궁내 경막, 설하 또는 직장을 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 유효성분이 표적 부위로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.
- [0100] 상기 약학 조성물 내의 유효성분의 함량은 약학 조성물의 사용 목적, 제형의 형태 등에 따라서 적절하게 조절 가능하며, 예컨대, 약학 조성물의 전체 중량 기준으로 0.001 내지 99 중량%, 0.001 내지 90 중량%, 0.001 내지 50 중량%, 0.01 내지 50중량%, 0.1 내지 50 중량%, 또는 1 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다
- [0101] 본 발명의 약학 조성물은 사용되는 유효성분의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여 경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001 내지 50 mg/kg 또는 0.001 내지 50 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있다.
- [0102] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0103] **제조예 1 내지 9 및 비교제조예 1 내지 11. 키토산-저분자 콜라겐 용액 제조**
- [0104] 키토산은 바이오테크(주)로부터 구입한 것으로, 탈아세틸화도가 95.44%인 것을 사용하였고, 저분자 콜라겐은 펩텍사로부터 구입한 평균 분자량 1 kDa 미만인 것을 구입하여 사용하였다.
- [0105] 1%(v/v) 아세트산 수용액에 키토산 분말을 1.5 내지 3.5 g으로 첨가하여 200 rpm에서 12 시간(overnight) 혼합하여 용해시켜, 키토산 농도가 1.5~3.5%(w/v)인 키토산 용액을 제조하였다. 상기 키토산 용액 100 ml에 저분자 콜라겐 분말 10 내지 30 g을 용해시켜 저분자 콜라겐 농도가 10~30%(w/v)인 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하였다. 상기 혼합액은 자기 교반기로 500 rpm에서 10분간 교반하여 분산한 후, 키토산 용액 속의 기포를 제거하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하였다.

표 1

구분	키토산 용액의 농도 (CS concentration), %(w/v)	저분자 콜라겐 수용액의 농도 (CP concentration), %(w/v)
비교제조예 1	1.5	0
제조예 1	1.5	10
제조예 2	1.5	20
제조예 3	1.5	30
비교제조예 2	2	0
제조예 4	2	10
제조예 5	2	20
제조예 6	2	30
비교제조예 3	2.5	0
제조예 7	2.5	10
제조예 8	2.5	20
제조예 9	2.5	30
비교제조예 4	3	0
제조예 10	3	10
제조예 11	3	20
제조예 12	3	30
비교제조예 5	3.5	0
제조예 13	3.5	10
제조예 14	3.5	20

제조예 15	3.5	30
--------	-----	----

[0107] **제조예 16. 피틴산 용액 제조**

[0108] 피틴산은 (주)엠에스씨 사로부터 구입하였다(41.2% 피틴산 함량 용액 구매). 상기 피틴산 용액을 4%(w/w) 농도가 되도록 증류수로 희석한 후, 구연산 나트륨을 이용하여 pH 3으로 조절하여 4%(w/w) 농도, pH 3의 피틴산 용액을 제조하였다.

[0109] **실시에 및 비교예. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 제조**

[0110] 도 2의 장치를 사용하여 키토산-저분자 콜라겐 용액과 피틴산 용액을 혼합하여 키토산 마이크로캡슐을 제조하였다. 구체적으로 제조예 1 내지 15 및 비교제조예 1 내지 5로부터 제조한 키토산-저분자 콜라겐 용액 0.5 ml를 각각의 실린더 펌프(110)에 주입하였다. 4%(w/v) 농도의 피틴산 용액 20 ml를 제조하고, 평편하고 넓은 반응조(140)에 담은 후, 상기 실린더 펌프에 연결된 노즐(120)을 상기 피틴산 수용액이 들어있는 반응조(140) 상에 배치하였다. 상기 키토산-저분자 콜라겐 용액이 들어있는 실린더 펌프(110)에 압력을 가하여 (+) 전압이 인가된 노즐(120)로부터 액적(droplet) 형태로 상기 피틴산 수용액을 향해 방출되도록 하였다. 상기 노즐(120)에 인가되는 전압은 10 kV이었다. 상기 액적 형태의 키토산-저분자 콜라겐과 피틴산 수용액이 접촉되면 30 분간 자가 교반기로 교반해주면서 이온성 겔화 반응을 통해 각각의 마이크로캡슐(실시에 1 내지 15 및 비교예 1 내지 5)을 제조하였다.

[0111] 상술한 과정을 통해 제조된 각각의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 분리하여 증류수로 2 내지 3회 세척한 후, 증류수에 담아 냉장보관하였다.

[0112] **실험예 1. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 물리적 특성 분석**

[0113] 실시에 1 내지 15 및 비교예 1 내지 5로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 형태와 평균 직경을 분석하기 위하여 광학 및 전자현미경을 이용하여 관찰하여 도 4에 나타내었다.

[0114] 저분자 콜라겐의 농도에 따른 캡슐화 정도를 측정하기 위해서 실시에 1 내지 15 및 비교예 1 내지 5로부터 제조된 마이크로캡슐에서 저분자 콜라겐의 포집율(entrapment efficiency, %)을 계산하였다. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제조하고 남은 피틴산 용액을 회수한 후, 피틴산 용액 안에 캡슐에 포집되지 않고 남아있는 저분자 콜라겐의 양을 HPLC를 이용하여 측정하고, 이를 계산하여 저분자 콜라겐의 포집율을 계산하여 표 2에 나타내었다.

[0115] 도 4는 실시에 1 내지 15 및 비교예 1 내지 5로부터 제조된 키토산 마이크로캡슐의 형태를 관찰하기 위하여, DSLR(digital single-lens reflex) 카메라(D5300, Nikin, Tokyo, Japan)로 촬영하고, Image J 소프트웨어(v1.8, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States)로 분석한 이미지이다. 스케일바는 2 mm 이다.

표 2

[0116]

구분	포집율(entrapment efficiency), %	평균직경(size), μm
비교예 1	-	349.5 \pm 55.2
실시에 1	46.26	398.9 \pm 67.3
실시에 2	58.82	455.9 \pm 97.3
실시에 3	43.01	504.4 \pm 104.3
비교예 2	-	351.1 \pm 77.0
실시에 4	53.87	516.9 \pm 96.9
실시에 5	63.94	531.6 \pm 88.0
실시에 6	66.35	568.2 \pm 74.6
비교예 3	-	559.1 \pm 53.0
실시에 7	60.97	604.5 \pm 96.9
실시에 8	74.30	660.3 \pm 27.1
실시에 9	69.49	648.1 \pm 43.0
비교예 4	-	495.7 \pm 38.1
실시에 10	65.18	645.7 \pm 31.4
실시에 11	70.53	672.3 \pm 41.2
실시에 12	72.03	684.2 \pm 40.1

비교예 5	-	511.1±63.4
실시에 13	55.6	624.5±34.2
실시에 14	60.5	687.5±42.5
실시에 15	65.8	683.8±42.6

- [0117] 도 4 및 표 2에 나타난 바와 같이, 저분자 콜라겐이 첨가되지 않은 채로 제조된 비교예 1 내지 5의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 평균직경은 동량의 키토산 용액으로 제조된 것보다 100 내지 150 μm 더 작은 평균직경을 갖는 것을 확인할 수 있다.
- [0118] 또한 전체적으로 살펴보면, 저분자 콜라겐의 농도가 높을수록 높은 포집율을 보였으며 특히 저분자 콜라겐의 농도가 20-30%(w/v)일 때 60% 이상의 포집율을 나타내는 것을 확인하였다.
- [0119] 다만 키토산 용액의 농도가 2.0% 이하인 비교예 1, 2, 실시에 1 내지 6의 마이크로캡슐은 저분자 콜라겐 포집율은 높았으나, 캡슐상태가 액상에서 불안정하여 서방성을 유지하지 못하고 30분 안에 50%의 캡슐의 구조가 붕괴되는 문제가 있는 것을 확인하였다.
- [0120] **실험예 2. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 단면 모양과 형태 분석**
- [0121] 실시에 8 및 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 단면 모양 및 형태를 분석하기 위하여 주사전자현미경으로 촬영하였다. 또한, 실시에 8 및 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 단면을 확대하여 내부 코어부와 셸부를 주사전자현미경으로 촬영하였다.
- [0122] 도 5는 실시에 8 및 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 전체모습(overall)과 표면(surface) 및 단면(cross-section)을 주사전자현미경으로 촬영한 이미지이다. 전체모습(overall)에서 스케일바는 500 μm 이고, 표면(surface) 및 단면(cross-section)의 스케일바는 200 μm 이다.
- [0123] 도 6은 실시에 8 및 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐 단면을 확대하여 주사전자현미경으로 촬영한 이미지이다. 저배율(low magnification)에서 스케일바는 5 μm 이고, 고배율에서 스케일바는 500 nm이다.
- [0124] 도 5에 나타난 바와 같이, 실시에 8 및 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 모두 표면이 매끄럽고 공극이 없는 주름진 형태인 것을 확인하였다. 그러나 단면의 경우, 매우 조밀한 외부 표면과 달리 내부 코어부는 공극이 다량 존재하는 구조인 것을 확인할 수 있다.
- [0125] 도 6에 나타난 바와 같이, 고배율을 살펴보면 실시에 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 표면과 내부의 구조가 극명하게 달랐으나, 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 표면과 내부의 구조의 차이가 없이 조밀한 구조라는 것을 확인하였다.
- [0126] **실험예 3. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 구조 분석**
- [0127] 키토산 대신 FITC로 표지된 키토산을 사용하여 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조하고, 이를 사용한 것을 제외하고 실시에 8 및 실시에 14와 모두 동일하게 하여 FITC로 표지된 실시에 8 및 실시에 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제조하였다.
- [0128] 상기 FITC로 표지된 키토산 마이크로캡슐을 파라핀 절편으로 포매한 후, 공초점현미경으로 촬영함으로써, 키토산 마이크로캡슐 내 FITC로 표시된 키토산의 분포를 관찰하였다.
- [0129] 도 7은 FITC로 표지된 실시에 8 및 실시에 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 공초점 현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.
- [0130] 도 7에 나타난 바와 같이, 실시에 8 및 실시에 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에는 저분자 콜라겐이 전체에 고르게 분포하고 있다는 것을 확인하였다. 다만 실시에 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 표면과 내부의 구조가 극명하게 차이가 나는 것을 확인하였다. 실시에 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 표면과 내부의 구조가 모두 조밀한 구조로 구성되어 있는 것을 알 수 있다.
- [0131] **실험예 4. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에서의 저분자 콜라겐 분포 분석**
- [0132] 키토산 대신 FITC로 표지된 키토산을 사용하고, 저분자 콜라겐 대신 Cy5.5로 표지된 저분자 콜라겐을 사용하는 것을 제외하고 모두 동일하게 키토산-저분자 콜라겐 용액을 제조한 후, 이를 사용하여 실시에 8 및 실시에 14와

모두 동일하게 하여 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 및 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 제조하였다.

- [0133] 상기 FITC/Cy5.5로 표지된 키토산 마이크로캡슐을 형광현미경으로 촬영하고, 상기 FITC/Cy5.5로 표지된 키토산 마이크로캡슐을 동결절편 포매한 후 공초점현미경으로 촬영하여, 키토산 마이크로캡슐 내 FITC로 표지된 키토산과 Cy5.5로 표지된 저분자 콜라겐의 분포를 관찰하였다.
- [0134] 도 8A는 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 및 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 형광현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.
- [0135] 도 8B는 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 및 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 동결절편에 대한 공초점 현미경으로 촬영한 이미지이다. 스케일바는 200 μm 이다.
- [0136] 도 8A 및 도 8B에 나타난 바와 같이, 실시예 8 및 실시예 14의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 키토산과 함께 저분자 콜라겐이 마이크로캡슐의 전역에 균일하게 존재하는 것을 확인할 수 있다. 따라서 장내 환경에서 마이크로캡슐이 붕괴될 경우 저분자 콜라겐이 일정하게 방출되는 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.
- [0137] **실험예 5. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에 대한 구조 분석**
- [0138] 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대하여 FT-IR(Fourier transform infrared spectroscopy) 및 PXRD(powdered x-ray diffraction) 분석을 수행하였다.
- [0139] 구체적으로 PXRD 패턴은 24 $^{\circ}\text{C}$ 에서 Cu K α 방사선을 사용하여 Rigaku Ultima IV 회절계를 사용하여 40 kV 및 40 mA에서 0.02 $^{\circ}$ 의 단계 크기로 수집하였다. 5 $^{\circ}$ ~ 55 $^{\circ}$ 범위에서 측정되었고, 5 $^{\circ}$ /분의 스캔 속도로 분석하였다.
- [0140] FT-IR(Vertex 70; Bruker, Germany)에 의한 투과 스펙트럼을 얻기 위해 4000 cm^{-1} ~ 400 cm^{-1} 의 파장 범위와 약 4 cm^{-1} 해상도를 갖는 32개 스펙트럼의 감쇄 전반사율을 평균하여 분석하였다.
- [0141] 도 9A는 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대한 PXRD 분석이다.
- [0142] 도 9B는 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대한 FT-IR 분석이다.
- [0143] 도 9에 나타난 바와 같이, 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)의 구조 및 화학 결합 분석을 수행하였다.
- [0144] 도 9A에 따르면 PXRD를 통해 키토산(CS), 피틴산(PA), 저분자 콜라겐(collagen)(CP), 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에 대한 회절패턴을 확인할 수 있고, 결과를 살펴보면 키토산(CS)에서는 10 $^{\circ}$, 20 $^{\circ}$, 피틴산(PA)에서는 8 $^{\circ}$ 와 23 $^{\circ}$, 저분자 콜라겐(collagen)(CP)에서는 21 $^{\circ}$ 에서 특징적인 피크가 확인되었다.
- [0145] 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(CP-CS)이 형성되면, 8 $^{\circ}$ 와 22 $^{\circ}$ 에서 두 개의 주요한 피크가 관찰되었다. 키토산(CS)의 특징적인 피크는 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)의 회절패턴에서는 관찰되지 않았다. 상술한 결과를 통해 수용액 상에 용해되고 PA와 함께 가교결합될 때, 키토산(CS) 결정 구조의 재배치가 유도된 것으로 여겨진다. 22 $^{\circ}$ 피크의 확장은 키토산(CS)의 농도에 관계없이 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(CP-CS)에서 세가지 조성이 모두 존재한다는 것을 의미한다.
- [0146] 도 9B에 나타난 바와 같이 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)의 화학 결합 식별을 위해 FT-IR 분석을 수행하였다. 두 적외선 스펙트럼은 키토산(CS)의 OH와 NH, 피틴산(PA)의 OH, 저분자 콜라겐(collagen)(CP)의 아미드 A(amide A)에 해당하는 넓은 범위의 피크가 3400 cm^{-1} 에서 관찰되었다. 또한 키토산(CS), 피틴산(PA) 및 저분자 콜라겐(collagen)(CP)으로부터 CH, O-P=O 및 아미드 B의 피크가 관찰되었고, 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)에서 상기 피크에 해당하는 넓은 범위의 피크가 2900 cm^{-1} 에서 관찰되었다.

- [0147] 또한, 키토산(CS)(1630 cm^{-1} for NH and $900\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$ for saccharide), 피틴산(PA)(1630 , 1250 , and 1060 cm^{-1} for O-P-O, P=O, and P-O-C, respectively), 및 저분자 콜라겐(collagen)(CP)(1725 , 1630 , and $1050\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ for amide I, II, and III, respectively)의 여러 피크가 2.5CS, 3.5CS에서 관찰되었다.
- [0148] 상술한 결과를 통해 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(2.5 CS) 및 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)은 키토산(CS), 피틴산(PA) 및 저분자 콜라겐(collagen)(CP)으로부터 형성된 것임을 확인하였다.
- [0149] **실험예 6. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 생체 안정성 분석**
- [0150] 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐에 대한 세포 독성 여부를 장내 상피세포인 Caco-2, 장 상피 세포 HT-29, 피부 각질세포 HaCaT에 각각 처리한 후, 상기 세포의 세포 생존율 분석을 통해 확인하였다. 즉, 세포를 분주하고 16 시간 동안 배양 한 후, 본 발명의 실시예 8의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(시료, microcapsules) 또는 저분자 콜라겐(대조군, collagen)을 농도별로 처리하고 24 시간 동안 배양한 후, 세포 생존율을 MTT 분석을 통해 확인하였다.
- [0151] 도 10은 Caco-2 세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이고, 도 11은 HT-29세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.
- [0152] 도 10 내지 11에 나타난 바와 같이, 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)은 세포 독성을 나타내지 않는 안전한 물질이라는 것을 알 수 있다.
- [0153] **실험예 7. 생체 외(*in vitro*), 인공 소화액 조건 하에서 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 방출 거동 분석**
- [0154] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 장내까지 안전하게 도달한 후, 서서히 분해되기 시작하면서 저분자 콜라겐이 방출되어 장벽을 통해 흡수되게 된다. 따라서 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐이 높은 체내 흡수율을 갖기 위해서는 위액 조건에서는 안전하고, 장내 조건에서는 마이크로캡슐의 외벽이 깨져 포집된 저분자 콜라겐이 서서히 방출되어야 한다.
- [0155] 따라서 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 장내 조건에서 방출 거동을 확인하기 위하여, 인공 위액(HCl 0.7%(v/v), NaCl 0.2%(w/v), pH 1.2)과 인공 장액(NaOH 0.9%(w/v)와 KH_2PO_4 6.8%(w/v), pH 6.8)을 제조하였다. 상기 인공 위액과 인공 장액 혼합물(인공 소화액)에 상기 FITC/Cy5.5로 표지된 실시예 8 및 실시예 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐을 각각 넣고, 37°C 에서 90 rpm 조건 하에서 진탕배양기로 각각 인공 위액에 2 시간 인공 장액에 6시간 배양하여 총 8시간 진탕한 후, 형광 세기를 측정함으로써 인공 소화액으로 방출된 저분자 콜라겐 양을 분석하였다.
- [0156] 도 12는 생체 외(*in vitro*), 인공 소화액 조건 하에서 실시예 8(2.5 CS) 및 실시예 14(3.5 CS)로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 시간에 따른 방출량(%)을 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [0157] 도 12에 나타난 바와 같이, 인공 소화액 조건에서 실시예 8의 마이크로캡슐(2.5 CS)은 2시간부터 누적 방출량(%)이 40% 이상이고, 8시간 후 80%로 서서히 저분자 콜라겐이 방출되었다. 실시예 14의 마이크로캡슐(3.5 CS)은 2시간부터 누적 방출량(%)이 10% 이상이고, 8시간 후 40%로 서서히 저분자 콜라겐이 방출되었다.
- [0158] 상기의 결과를 통해 인공 소화액 조건 하에서 실시예 8(2.5 CS)의 마이크로캡슐보다 실시예 14(3.5 CS)의 마이크로캡슐이 서방성 방출(pH depend controlled release) 특성을 보인다는 것을 확인하였다.
- [0159] 한편, 4%(w/v) 농도 이상의 키토산 용액을 사용한 경우에는, 키토산의 과포화로 마이크로캡슐 자체가 형성되지 않을 뿐만 아니라, 저분자 콜라겐의 포집도 전혀 이루어지지 않으므로, 방출량 평가가 불가능하였다.
- [0160] **실험예 8. 생체 내(*in vivo*) 소화 환경 모방 생체 외(*in vitro*) 체내 흡수율 평가 모델에서 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 흡수율 분석**
- [0161] 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 서방성 특성과 흡수율을 확인하기 위하여, 인공 소화 모방 환경에서 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 생체 외(*in vitro*) 체내 흡수율을 평가하였다.
- [0162] 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 장내까지 안전하게 도달한 후, 서서히 분해되기 시작하면서 저분자 콜라겐이 방출되어 장벽을 통해 흡수되게 된다. 따라서 본 발명의 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의

체내 흡수율을 분석하기 위하여, 생체 내(*in vivo*) 소화 환경 모방 생체 외(*in vitro*) 체내 흡수율 평가 모델을 통해 평가하였다.

[0163] 생체 내(*in vivo*) 소화 환경 모방 생체 외(*in vitro*) 체내 흡수율 평가 모델은 소장세포(Caco-2, HT-29, 9 : 1의 비율)를 이용한 투과실험으로 수행하였다. Caco-2 세포와 HT-29 세포는 한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 배양액은 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acid, 100 units/ml penicillin과 0.1 mg/ml streptomycin을 함유한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's medium)을 사용하였다. 37 °C에서 5% CO₂와 95% humidity 조건을 항상 유지하도록 하여 75 cm² T-flask에서 각각 배양하였으며 80-90%의 confluency에 도달하면 0.02% EDTA와 0.05% trypsin을 사용하여 1:3의 비율로 subculture 하였다. Caco-2 세포와 HT-9 세포를 9:1의 비율로 24 transwell의 폴리카보네이트 분리막(polycarbonate membrane)에 분주하여(총 밀도 : 1.0 × 10⁵ cells/cm²) CO₂ 배양기에서 2주 동안 배양하였다. 배양기간 동안 2일마다 배양액을 갈아주었다.

[0164] 상기 Caco-2, HT-9 cell monolayer를 사용하여 실험하였다. 실험을 위해 PBS로 세척하고, apical side와 basal side의 배양액을 모두 transport media인 Hank's balanced salt solution(HBSS) buffer(각각 200 μL, 600 μL)로 교체하였다. 이후 apical side에 캡슐용액(실시에 8 또는 실시에 14로부터 제조된 마이크로캡슐) 500 μg/ml를 포함하는 HBSS buffer를 첨가한 다음, 37 °C 항온조에서 30분 동안 배양하였다. 30분이 지난 시점에 basal side에서 시료를 채취하여 저분자 콜라겐 농도를 측정한 후, volume(600 μL)으로 환산하여 처리된 콜라겐 양 대비 투과된 콜라겐 양을 계산하여 P_{app} 값을 구했다.

[0165] 측정된 저분자 콜라겐의 누적량(cumulative amounts)를 plot하고 그 기울기로부터 투과속도(transport flux, dQ/dt)를 얻었다. 겉보기 투과계수(P_{app})는 $dQ/dt \times 1/60 \times I/A \times 1/Co$ 로 계산하였고, 단위는 cm/sec로 나타내었다. 상기 식에서 A는 투과면적(cm²)을 나타내며, Co는 저분자 콜라겐의 초기농도(mmol/ml)를 나타낸다. 모든 실험은 적어도 세 번 수행하였고, 그 결과는 평균으로 계산하였다.

[0166] 도 13은 Caco-2/HT-9 세포에 대한 저분자 콜라겐(free CP), 실시에 8로부터 제조된 마이크로캡슐 및 실시에 14로부터 제조된 마이크로캡슐의 겉보기 투과계수를 측정하여 나타낸 그래프이다.

[0167] 도 13에 나타난 바와 같이, 실시에 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 겉보기 투과계수는 대조군인 저분자 콜라겐(free CP)의 2배 이상으로 현저히 높은 것을 알 수 있다. 다만 실시에 14로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐은 대조군인 저분자 콜라겐(free CP)와 대등한 수준으로 유의한 차이가 관찰되지 않았다.

[0168] **실험예 9. 생체 내(*in vivo*)에서 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 체내 흡수율 및 약동학 분석**

[0169] BALB/c 마우스 모델에 저분자 콜라겐(Free CP), 실시에 8 또는 실시에 14의 마이크로캡슐을 375 mg/kg 농도를 1회 경구를 통해 투여하였다. 투여 후 시간별(0, 0.5, 2, 4, 8, 16 및 24 시간) 경동맥으로 채혈하고 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 혈장 시료들은 분석시까지 -20 °C 냉동고에 보관하였고, 혈장 중 하이드록시 프롤린(Hydroxyproline, Hyp)의 농도를 hydroxyproline assay kit를 사용하여 분석하였다.

[0170] 상술한 과정을 통해, 저분자 콜라겐(Free CP), 실시에 8 또는 실시에 14의 마이크로캡슐에 대한 혈장농도-시간 곡선을 작성하였고, 이로부터 혈장농도-시간 곡선의 총면적(AUC; Area under the plasma concentration-time curve)을 구하여 흡수도를 비교하였다. AUC는 사다리꼴 방법(linear trapezoidal method)에 의해서 구하였다. 마지막 채혈시점인 24시간까지의 AUClast를 구하였다. 최고 혈중 농도(C_{max})와 최고 혈중 농도 도달 시간(T_{max})은 그래프 상에서 직접 읽어 구하였다. 각 군 간의 AUC, C_{max}, T_{max} 수치를 검토하였다.

[0171] 도 14는 생체 내(*in vivo*)에서 저분자 콜라겐(Free CP), 실시에 8 또는 실시에 14의 마이크로캡슐의 시간에 따른 혈중 free Hyp를 측정한 결과 그래프이다.

표 3

구분	AUC _{0-24 h} (nmole/ml)	C _{max} (nmole/ml)	T _{max} (h)
대조군 (Free CP)	36.1	6.5 ± 0.9	0.5

실시에 8 (2.5 CS)	134.9	10.2 ± 3.4	2
실시에 14 (3.5 CS)	176.2	10.0 ± 3.4	4

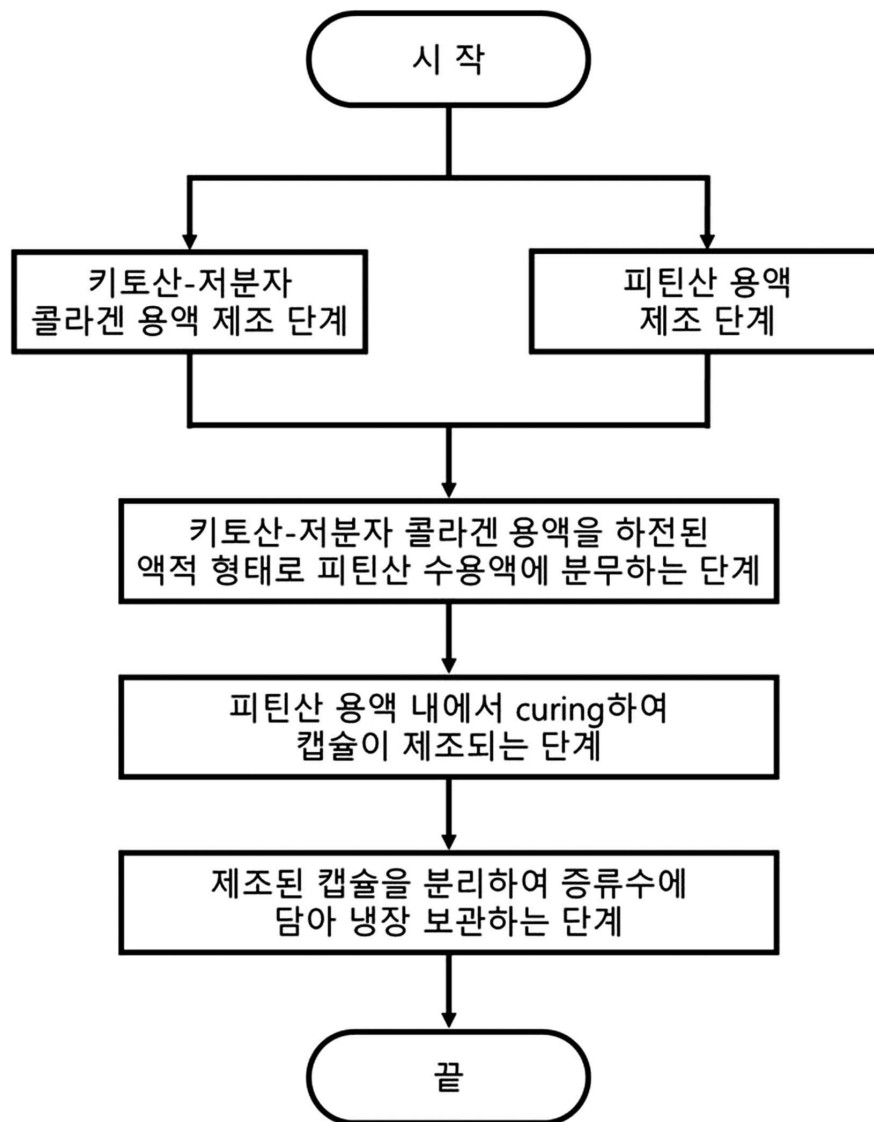
- [0173] 도 14 및 표 3에 나타난 바와 같이, 혈중 free Hyp의 AUC값과 C_{max} 값이 저분자 콜라겐(Free CP) 군과 실시에 8 및 실시에 14의 마이크로캡슐 군 간에 유의적인 차이를 보였다.
- [0174] 구체적으로, AUC값의 경우 실시에 8의 마이크로캡슐은 대조군 대비 3.7배 우수하였고, 실시에 14의 마이크로캡슐은 대조군 대비 4.8배 우수하였다.
- [0175] 또한, C_{max} 는 실시에 8의 마이크로캡슐은 대조군 대비 1.5배 우수하였고, 실시에 14의 마이크로캡슐은 대조군 대비 1.5배 우수하였다. 상술한 결과를 통해 본 발명에 따른 마이크로캡슐은 혈액에서 Hyp의 흡수율이 높다는 것을 의미한다.
- [0176] 또한, T_{max} 는 실시에 8의 마이크로캡슐이 대조군 대비 4배 우수하고, 실시에 14의 마이크로캡슐이 대조군 대비 8배 우수한 것으로 확인되었다.
- [0177] 상술한 결과를 통해 실시에 8의 마이크로캡슐을 섭취한 후 Hyp가 빠르게 생체 내로 흡수되었다는 것을 의미하며, 혈액에 흡수 후 머문 시간이 긴 것으로 보아 혈액에서 조직으로의 흡수가 24시간동안 장기간 진행된다는 것을 알 수 있다.
- [0178] 본 실험을 통하여 저분자 콜라겐을 구성하는 Hyp의 혈중 변화 추이를 살펴으로써, 이를 합성조건을 제어한 키토산 마이크로캡슐로 저분자 콜라겐을 생체 내로 전달하는 것이 저분자 콜라겐을 직접 투여하는 것에 비하여 흡수 효용성이 현저히 높다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0179] 특히, 실시에 14의 마이크로캡슐 투여군도 흡수 효용성은 저분자 콜라겐 직접 투여군(Free CP)보다 높았으나, 혈액으로 흡수 후 조직으로의 흡수가 더딘 것을 확인할 수 있었다.
- [0180] **실험예 10. 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 항광노화 효과 분석**
- [0181] Human 유래 keratinocyte cell line인 HaCaT 세포를 10% Fetal bovine serum와 Penicillin/Streptomycin(Gibco BRL Co., NY., USA) 100 unit/ml이 함유된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.
- [0182] 상기 HaCaT 세포를 96well plate에 1×10^3 cells/well이 되게 0.2 ml 분주한 다음 24시간 배양하였다. 배지를 제거한 후, PBS로 2회 세척한 다음 PBS 존재 하에 UVB(LP471 UVB probe, Delta OHM, Padova, Italy)를 이용하여 0~50 mJ/cm²(25 cm/ 300 μW/ cm²)를 조사한 뒤 24 시간동안 배양한 후, MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 분석하였다.
- [0183] 도 15는 UVB를 0~50 mJ/cm²로 처리한 HaCaT 세포의 생존율을 분석한 그래프로, 이에 따르면 HaCaT 세포는 UVB로 인한 세포 사멸이 유도된다는 것을 확인할 수 있다. 40% 이상 세포가 사멸하는 UVB를 30 mJ/cm² 조건 하에서 본 발명에 따른 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐의 항광노화 효과를 분석하고자 하였다.
- [0184] HaCaT cell을 96well culture plate에 1×10^6 cells/ml로 cell seeding 후 24시간 동안 배양하여 세포를 안정화시켰다. 배지를 제거한 후 저분자 콜라겐(Free CP), 실시에 8 또는 실시에 14의 마이크로캡슐을 100 μg로 각각에 처리하고 1시간 반응시킨 후 UVB(30 mJ/cm²)로 정상군(UVB -, Treat -)을 제외하고 세포를 자극한 뒤 24시간 동안 배양 후에 상층액을 제거하고 PBS로 3번 세척하였다. 세포를 수확하여 Radio-immuno-precipitation assay(RIPA) lysis buffer 100 μl에 세포를 용출시켜 단백질을 수확한 후 원심분리하여 얻은 상층액은 Bradford assay로 정량하고 SDS-PAGE에서 전기영동하여 분리하였다. Gel을 4시간 동안 polyvinylidenedifluoride(PVDF) membrane (Sigma-Aldrich Co.)에 옮긴 다음 4°C에서 6시간동안 5% skim milk로 blocking 하였다. Primary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA)를 1:1,000으로 희석하여 4°C에서 overnight 하고 나서 TBST로 30분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 각각의 HRP-conjugated secondary antibody(Santa Cruz Biotechnology, Inc.)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하고 다시 TBST로

10분간 교반하여 세척하는 과정을 3회 반복한 뒤 ECL 용액을 가한 후 Western imaging system(EZ-Capture MG, ATTO, NY, USA) 기기를 이용하여 밴드 확인 및 정량하였다.

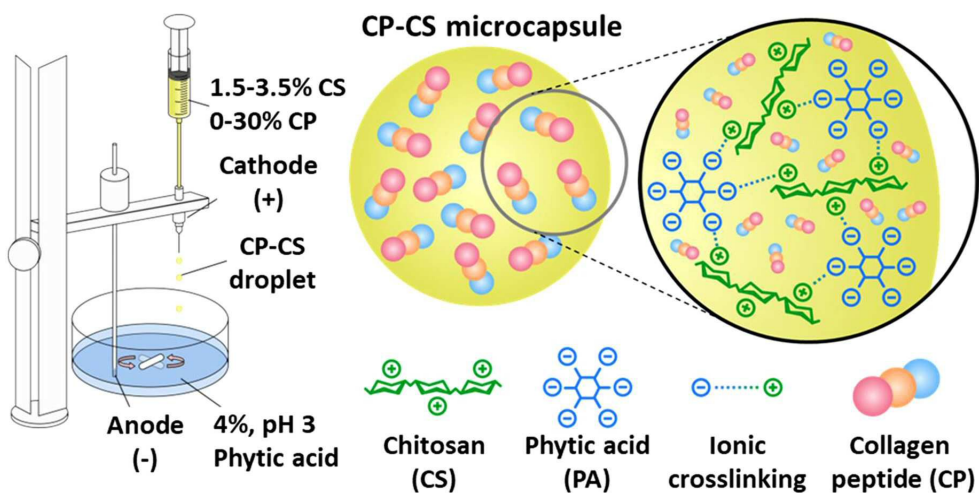
- [0185] 도 16은 HaCaT 세포에 저분자 콜라겐(collagen)과 실시예 8로부터 제조된 키토산-저분자 콜라겐 마이크로캡슐(microcapsules)의 세포 독성 분석 결과 그래프이다.
- [0186] 도 17A는 UVB 하에서, 저분자 콜라겐(Free CP), 실시예 8 또는 실시예 14의 마이크로캡슐의 처리에 따른 HaCaT 세포에서의 MMP-1 단백질 발현량을 분석한, 웨스턴 블랏 결과이다.
- [0187] 도 17B는 도 17A의 웨스턴 블랏 결과를 이미지 정량으로 분석한 그래프이다. 각 군별 상대적인 콜라겐 분해효소 MMP-1 발현량을 나타내었다.
- [0188] 세포외기질을 분해하는 단백질 분해효소인 MMP group에는 약 20여종이 있으며, collagen group(MMP-1, -8, -13), gelatinase group(MMP-2, -9), stromelysin group(MMP-3, -10, -11)이 있다. MMP-1은 주로 collagen type I과 III형을 분해하는 collagenase이고 특히 UVB에 의해 과발현될 수 있기 때문에 피부 광노화가 유발과 관련된 대표적인 지표이다. 이에 본 발명에서는 UVB에 의해 증가한 MMP-1의 발현억제효과를 확인하였다.
- [0189] 도 16 및 도 17에 나타난 바와 같이, HaCaT 세포에 대해 실시예 8 또는 실시예 14의 마이크로캡슐은 독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. 또한, UVB 30 mJ/cm²의 자극을 준 세포에 저분자 콜라겐(Free CP), 실시예 8 또는 실시예 14의 마이크로캡슐을 첨가하였을 때 MMP-1은 UVB 자극 세포에 비해 효과적으로 억제되었다.
- [0190] 특히 실시예 8의 마이크로캡슐을 첨가하였을 때, MMP-1이 매우 효과적으로 억제되는 것을 확인하였다. 구체적으로 MMP-1의 상대적 발현량을 살펴보면, 저분자 콜라겐(Free CP)(1.9)보다 실시예 8의 마이크로캡슐(0.8)의 MMP-1 발현량이 57% 가량 더욱 억제된 것을 확인할 수 있다.
- [0191] 실시예 14의 마이크로캡슐의 MMP-1 발현량(1.2)이 저분자 콜라겐(Free CP)(1.9)보다 36% 가량 더욱 억제된 것을 확인할 수 있다.
- [0192] 즉, 본 발명에 따른 구조의 마이크로캡슐을 사용하는 것이 collagen type I과 III형의 분해를 촉진하는 collagenase의 작용을 저해하여 UVB에 의한 광노화에 저분자 콜라겐을 직접 처리하는 것보다 현저한 효과가 있을 것임을 알 수 있다.

도면

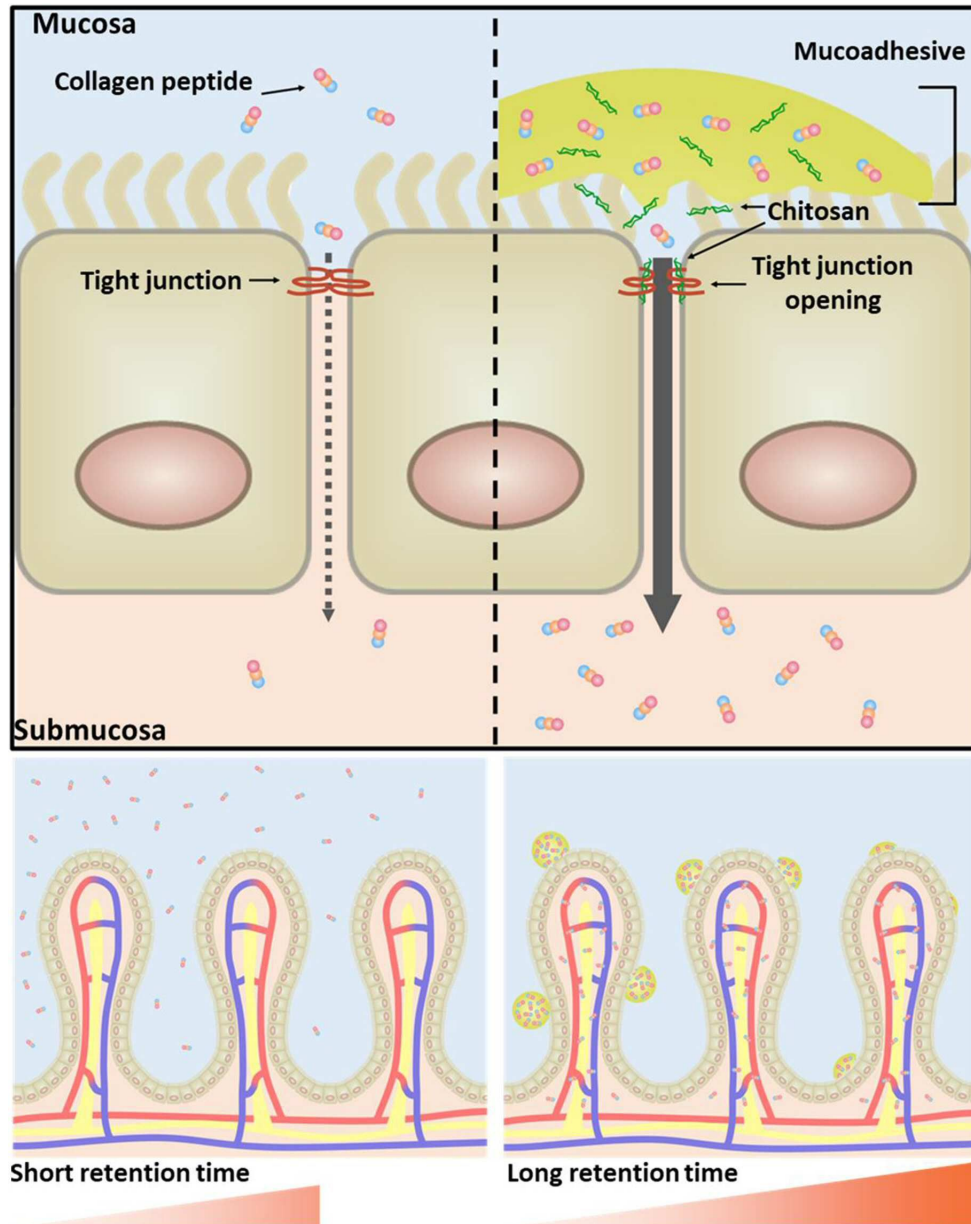
도면1



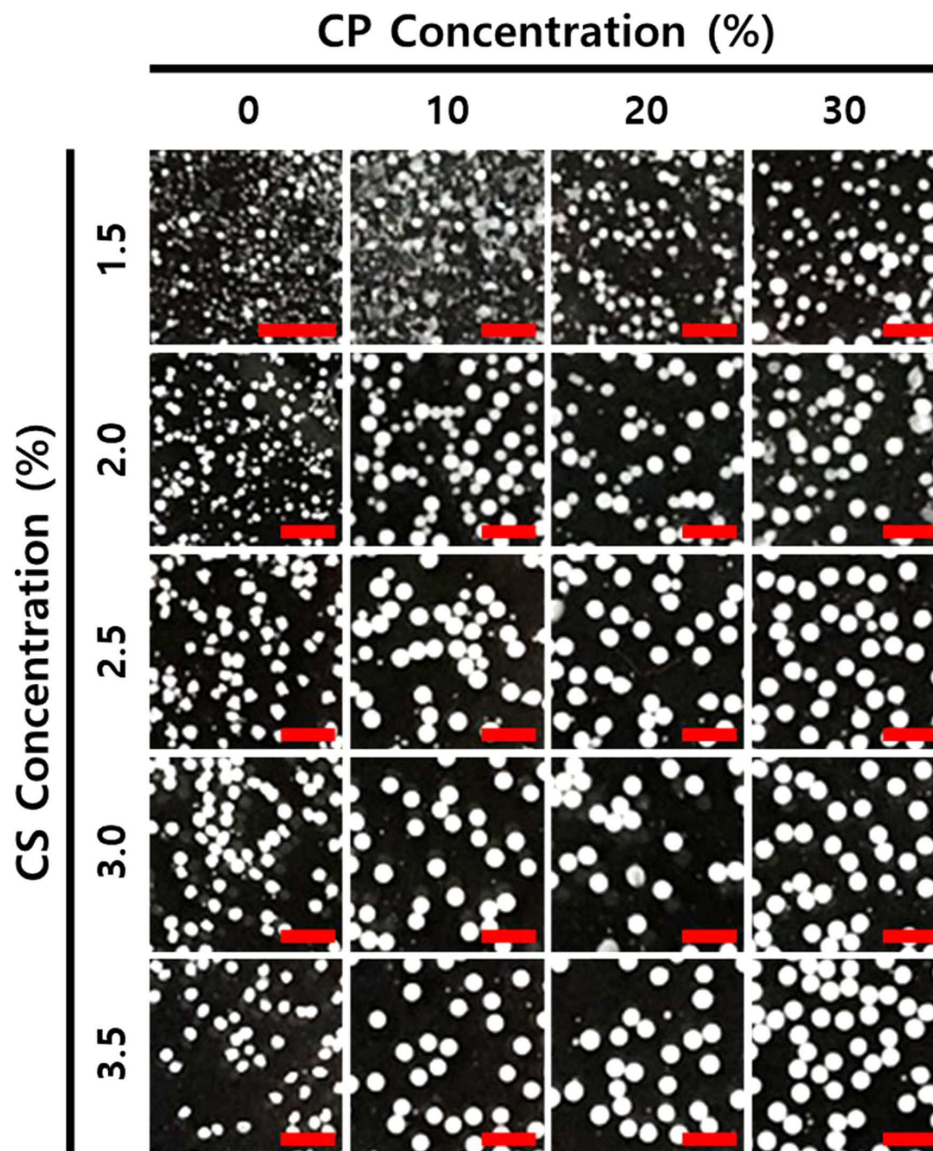
도면2



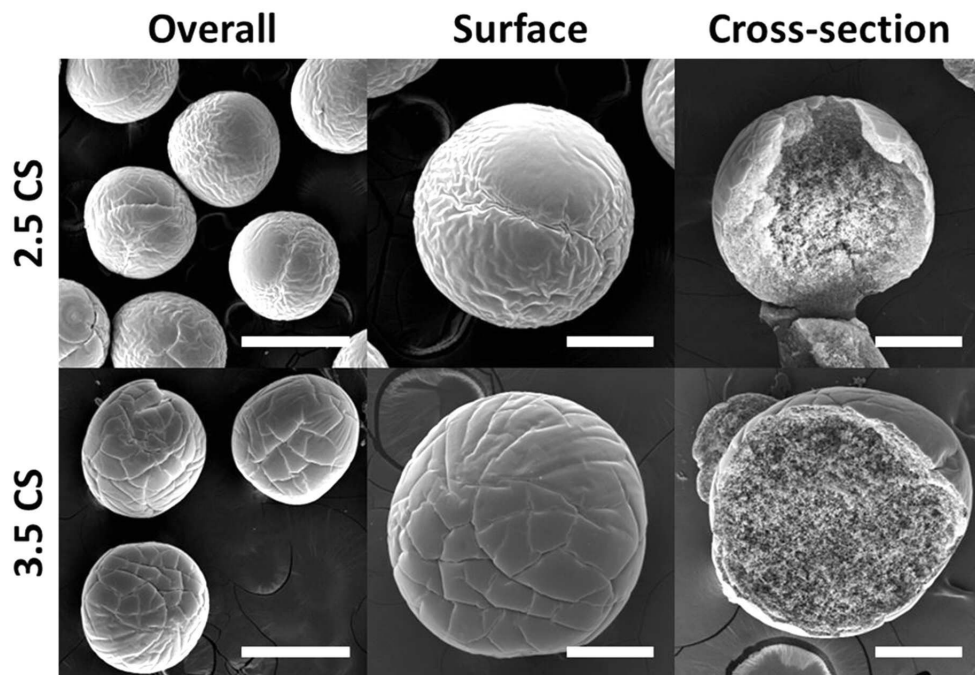
도면3



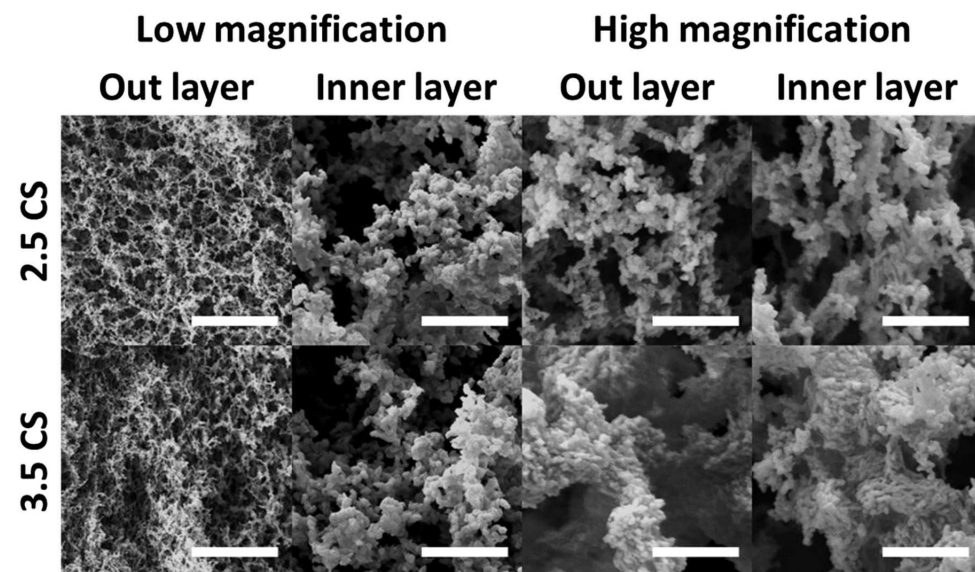
도면4



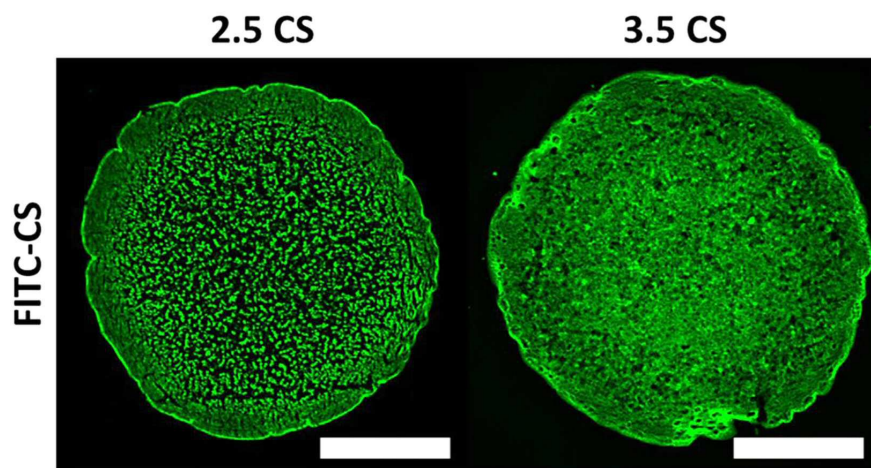
도면5



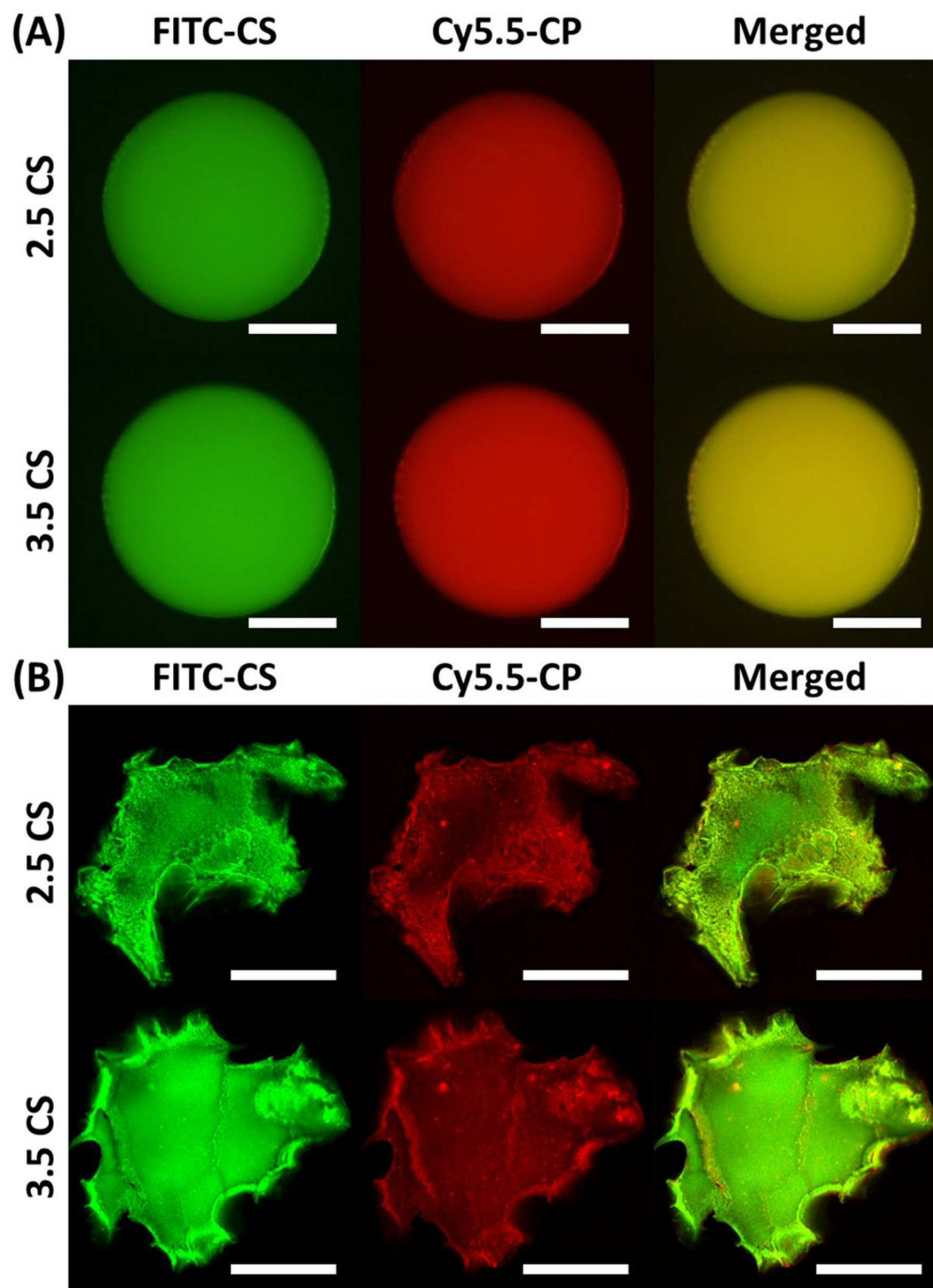
도면6



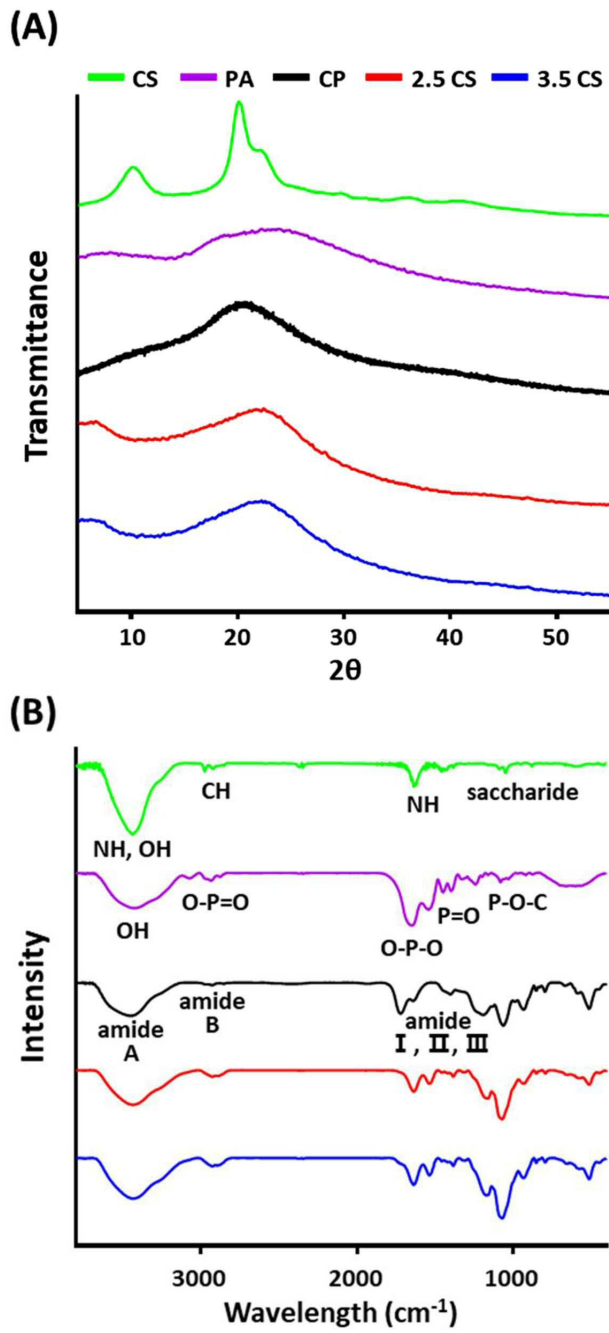
도면7



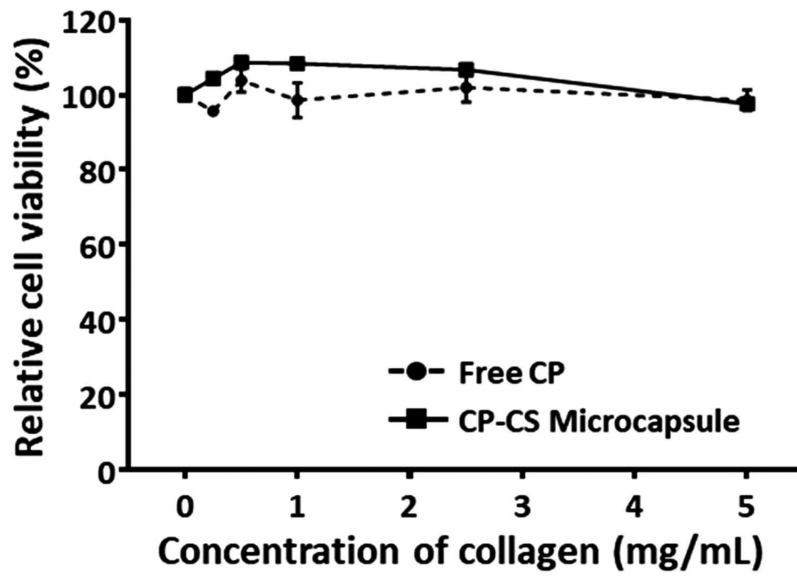
도면8



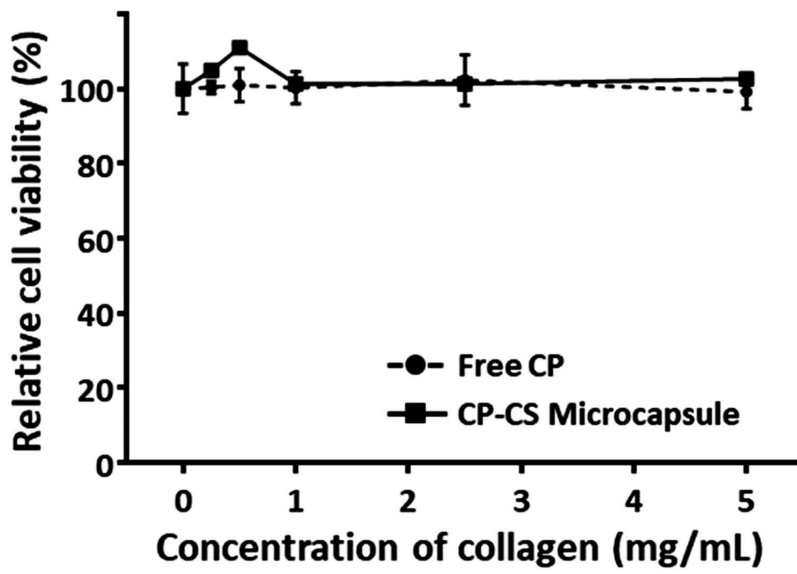
도면9



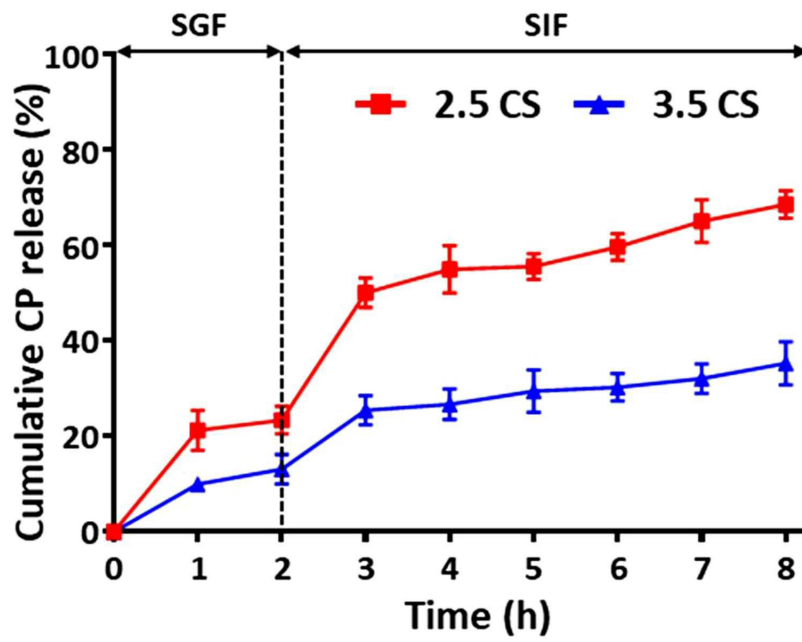
도면10



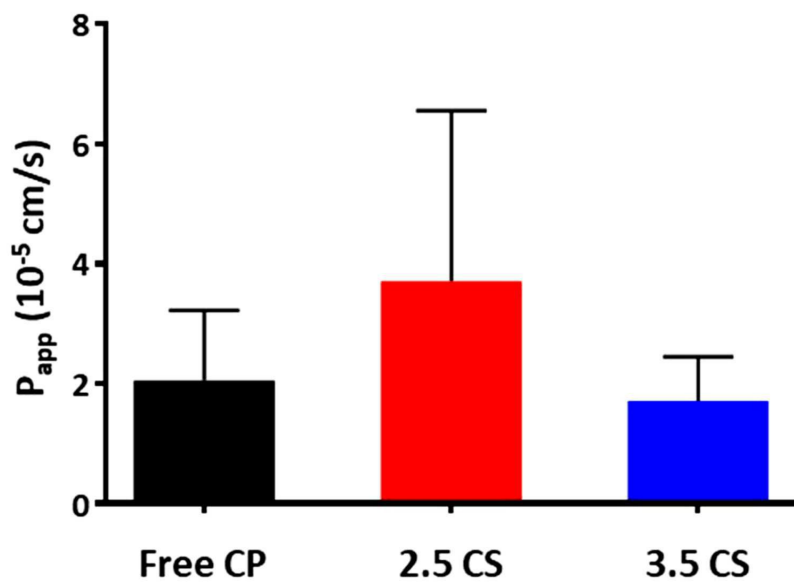
도면11



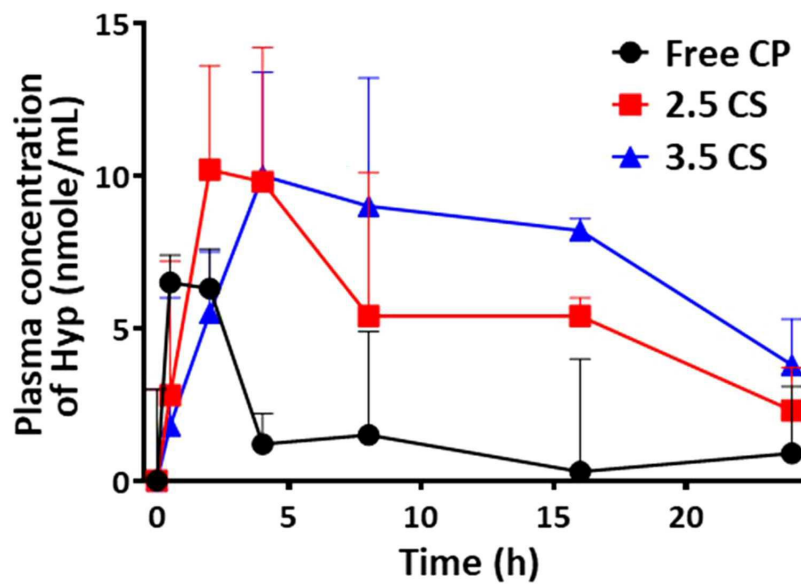
도면12



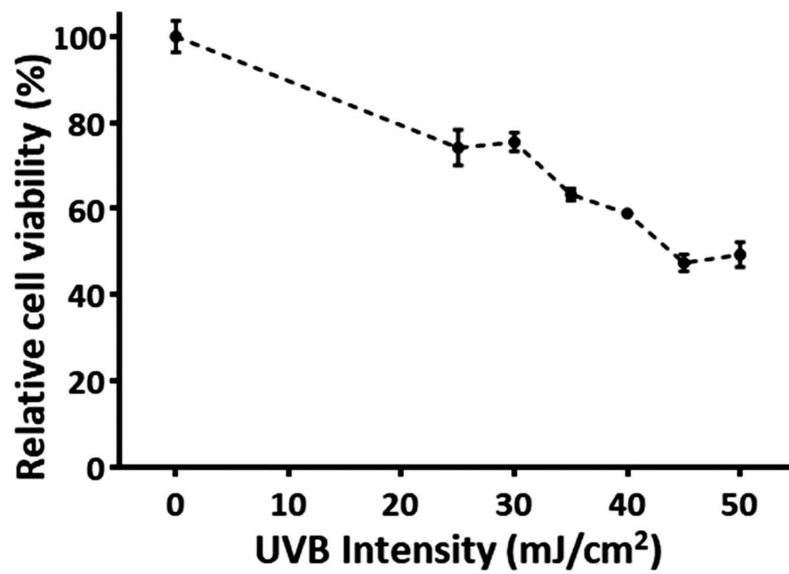
도면13



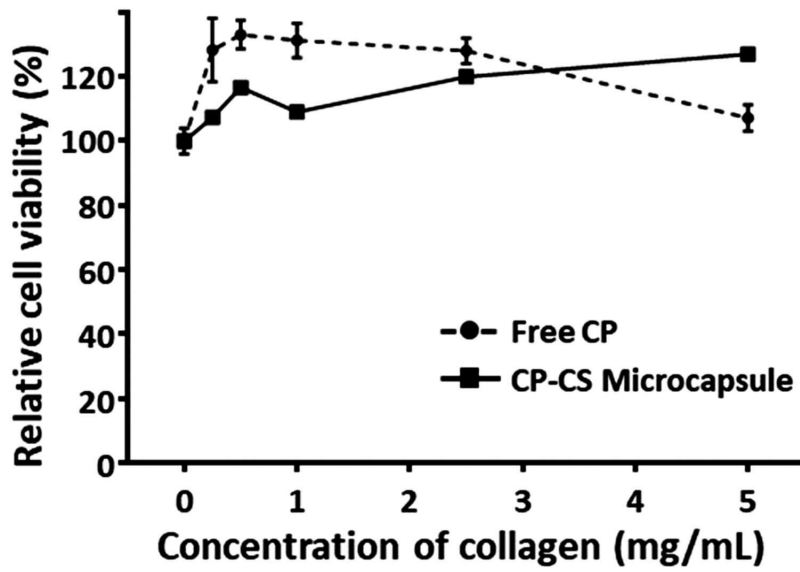
도면14



도면15

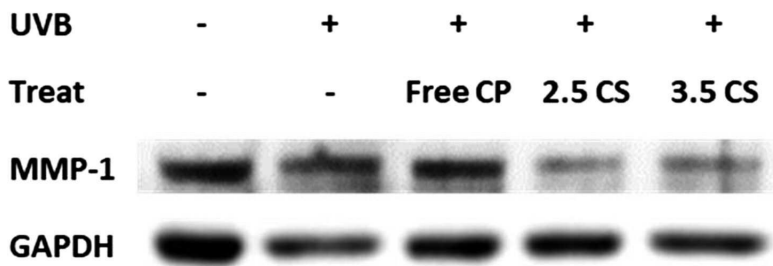


도면16



도면17

(A)



(B)

