명세서

발명의 명칭: 표피성장인자와 리포좀의 하이브리드형 다중층 나노구조체 및 그 제조방법

기술분야

[1] 본 발명은 표피성장인자(epidermal growth factor, EGF)와 리포좀의 하이브리드형 다중층 나노구조체 및 그 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 양이온성 지질로 형성된 공-소포체와 음이온성 표피성장인자 단백질 간의 다가성 정전기적 상호작용(multivalent electrostatic interactions) 및 소수성 상호작용의 조합에 의해 만들어지는 새로운 형태의 단백질-지질 하이브리드형 다중층 나노구조체(protein-lipid hybrid multi-lamellar nanostructures) 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 미용에 대한 관심이 증가하면서 작용 기작이 특이적이며 효능이 좋은 생리활성 단백질이 기능성 화장품의 재료로서 각광받고 있다. 그러나 생리활성 단백질은 큰 분자량, 짧은 반감기 및 구조적인 불안정성으로 인해 피부 침투가 쉽지 않기 때문에, 이들 생리활성 단백질의 피부 전달에 대한 관심이 급증하고 있다.

[3] 생리활성 단백질 중에서, 표피성장인자는 피부 재생에 핵심적 역할을 담당한다고 알려짐으로써 기능성 화장품 성분으로서 응용되고 있다. 표피성장인자는 현재 미국 화장품협회(CTFA)의 국제 화장품 원료집(ICID)에 등재되었을 뿐만 아니라, 한국 식품의약품안전청(MDFS)에서도 화장품 원료로 승인함으로써 국내외에서 공식적인 화장품 원료로서 사용할 수 있게 되었다 (식품의약품안전청 고시 제2006 — 12호, 2006. 4.12).

[4] 그러나 표피성장인자와 같은 생리활성 단백질 성분을 피부로 전달하는 경우 가장 큰 문제점은 피부 흡수율(투과율)이 낮다는 점인데, 통상적으로 이를 극복하기 위한 대표적인 방법은 리포좀을 전달체로 사용하여 표피성장인자와 같은 생리활성 단백질을 피부 내로 전달하는 것이다. 리포좀은 양친매성 지질의 생체세포막의 구성성분인 인지질(phospholipid)을 주성분으로 하여 형성된 지질-이중막(lipid-bilayer) 구조의 소포체(vesicle)로서 그 내부의 수상(aqueous compartment)에 수용성 물질을 봉입시키거나 지질-이중막에 소수성 약물을 담지시킬 수 있다. 이러한 리포좀의 막 구조는 세포막의 구조와 비슷하여 독성이 적고 세포와의 융합이나 세포 내 이입을 통해 물질 전달이 가능하다. 특히 생체적합성이 우수하기 때문에 전달체로서 연구가 활발히 진행되고 있다 (Bangham, A. D.; Torchilin, V. P., 2005, Nat. Rev. Drug Discov., 4: 145).

[5] 그러나 이러한 장점에도 불구하고 리포좀은 몇몇 문제점으로 인해 널리 활용되기가 어려운 점이 있다. 리포좀의 문제점 중 하나는 리포좀 내부로의 봉입 효율이 높지 않다는 점이다. 특히 친수성 물질의 경우에는 리포좀의 내부

수상으로만 봉입이 가능할 뿐 아니라 내부 수상의 용적이 크지 않으므로 봉입 효율이 낮을 수밖에 없다. 일반적으로 약 10 ~ 20% 봉입 효율을 보이며, 리포좀의 전체무게 대비 봉입된 단백질의 양은 지극히 낮은 값을 갖는 심각한 기술적 한계를 보인다 (Martins, Susana et al, 2007, Int. J. Nanomed., 2. 4,595). 반면 지용성 물질의 경우에는 지질 이중막에 가용화되므로 봉입 효율은 비교적 좋은 편이지만, 경우에 따라서는 지질 이중막을 불안정화시켜 리포좀의 안정성이 불량해질 수 있다. 따라서, 리포좀 기술은 일부 지용성 물질에 대해서 상업적으로 적용되고 있지만, 수용성 성분에 대해서는 그 사용이 매우 미미한 상황이다.

[6] 리포좀을 단백질의 전달체로 사용할 때의 또 다른 문제점은 일반적인 리포좀 제조 공정에서는 생리활성 단백질에 심한 변성이 가해져서 단백질 고유의 생리활성을 잃어 버리게 한다는 것이다. 일반적인 리포좀 제조 방법으로는 Bangham법 (Bangham et. al., 1965 J. Mol. Biol. 13:238-252)이나 고압유화법(high-pressure homogenization)이 널리 사용된다. Bangham법은 유리기구에서 계면활성제와 용매를 섞어 녹인 후 증발시켜 유리벽에 얇은 계면활성제 즉 인지질 막을 만든 후, 봉입하려는 물질 용액을 넣고 격렬하게 교반하거나 초음파로 균질시켜 리포좀을 제조한다. 고압유화법은 리포좀 구성 성분을 혼합하여 sub-micro 크기의 미세구멍(micro-pore)을 가지는 카트리지 셀이나 밸브(또는 interaction chamber라고도 함)를 통과시키는데, 이때 통과하는 미세구멍의 사이즈는 약 50~300 ㎛이며 이때 발생하는 큰 전단 응력(shear stress)에 의하여 계면활성제에 의한 이중 지질막이 형성되며 약물이 이중 인지질막 내부에 봉입된다. 이들 방법들을 이용하여 생리활성 단백질을 포집할 경우 단백질이 높은 압력, 높은 온도, 미세구멍에서의 전단 응력에 의한 마찰열, 그리고 유기용매의 사용과 같은 혹독한 조건들에 노출되어 응집, 변성, 산화, 분해될 수 있으며 결국 이로 인하여 단백질 고유의 생리활성을 잃게 될 가능성이 매우 높다.

[7] 예를 들어, 대한민국 등록특허 제0752990호는 중성지질인 에스터화레시딘(esterified lecithin)을 포함하는 리포좀 막으로 이루어진 나노리포좀에 관한 것으로, 상기 나노리포좀에 상피성장인자가 봉입된 나노리포좀; 및 항염증 활성을 갖는 천연 추출물을 포함하는 피부 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개시한 바 있다. 대한민국 등록특허 제0962566호는 중성지질인 대두 레시틴을 이용하여 고압유화 방법으로 생산된 인간 성장호르몬을 유효성분으로 포함하는 나노리포좀을 개시한 바 있다. 그러나 상기 문헌들에 개시된 생리활성 단백질을 함유하는 리포좀은 유효성분의 봉입 효율이 극히 낮고 고온/고압에 의해 제조되므로 단백질의 생리활성을 심각하게 저하시키는 문제점이 있다.

[8] 따라서, 전달 구조체를 제조하는 과정에서 표피성장인자의 생리활성을 안정적으로 유지시킴과 동시에 높은 봉입율을 확보할 수 있는 방법을 개발하는

것이 필요하다. 종래 연구결과들을 분석한 바에 의하면, 표피성장인자와 같은 생리활성 단백질을 리포좀의 내부수상 내에 봉입시키는 효율을 높이고자, 다양한 첨가물들을 사용하거나, 새로운 공정방법을 개발하는 시도들이 많이 있었다 (Pisal, Dipak S. et al, 2010, J. Pharm. Sci., 99.6, 2557-2575). 다만, 모든 시도들이 리포좀의 내부수상에 단백질을 봉입시키는 효율을 높이는 데에 집중되어 있었다는 특징이 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 이에, 본 발명자들은 표피성장인자를 높은 생리활성을 유지하면서, 효율적으로 리포좀 내부로 병합 내지 포집시킬 수 있는 새로운 접근방법을 개발하고자 노력하였다. 특히, 리포좀의 내부수상으로 봉입시키는 접근방법의 틀을 깨고, 리포좀과 단백질의 보다 적극적인 상호작용을 유도하여 새로운 형태의 나노구조체를 만드는 방법에 대한 연구를 수행하였다. 특히, 음이온성을 지닌 생체고분자인 핵산이 양이온성 리포좀과의 결합을 통해 새로운 나노구조체를 형성시키는 연구에서 발상을 얻어 (Safinya, C. R. at al, 1997, Science, 275.5301, 810-814), 리포좀을 제조하는 과정에서 단백질을 봉입시키는 것이 아니라, 리포좀을 제조한 이후에 단백질과의 상호작용을 통해 새로운 구조체를 만드는 방법에 대한 연구를 수행하였다. 그 결과, 양이온성 지질로 형성된 공-소포체와 음이온성 단백질인 표피성장인자 간의 다가성 정전기적 상호작용(multivalent electrostatic interactions)과 소수성 상호작용의 조합을 적절한 조건에서 이용할 경우, 표피성장인자가 생리활성을 유지하면서 매우 높은 효율로 포집된 새로운 형태의 단백질-지질 하이브리형 다중층 나노구조체를 만들 수 있다는 점을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제 해결 수단

[10] 따라서, 본 발명의 목적은 표피성장인자와 양이온성 지질 공-소포체의 상호작용에 의해 형성되는 하이브리드형 다중층 나노구조체를 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 목적은 표피성장인자와 양이온성 지질 공-소포체의 혼합에 의해 발생하는, 상온상압에서의 자발적인 자기조립(spontaneous self-assembly) 과정을 통해 단백질-지질 하이브리드형 다중층 나노구조체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체를 함유하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

발명의 효과

[13] 본 발명에 의하여 제공되는 새로운 형태의 하이브리드형 다중층 나노구조체는 표피성장인자의 봉입 효율이 높을 뿐만 아니라 제조 과정이 간단하여 표피성장인자의 높은 생리활성을 유지한 채 생체 내 혹은 세포 내로 전달하는

데에 용이하다.

도면의 간단한 설명

[14] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 형성 과정을 간략하게 나타낸 모식도이다.

[15] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체에 대한 입자 크기 및 표면 전하를 측정한 결과이다.

[16] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체에 대한 투과도를 측정한 결과이다.

[17] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 봉입 율을 측정한 결과이다.

[18] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 실제 구조를 Cryo-TEM으로 측정한 결과이다.

[19] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 안정성을 확인한 결과이다.

[20] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 피부 투과 특성을 측정한 결과이다(도 7a: 피부 표면, 도 7b: 피부 단면).

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[21] 본 발명은 표피성장인자와 양이온성 지질 공-소포체의 상호작용에 의해 형성되는 하이브리드형 다중층 나노구조체, 표피성장인자와 양이온성 지질 공-소포체의 자기조립 과정을 통한 단백질-지질 하이브리드형 다중층 나노구조체를 제조하는 방법 및 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체를 함유하는 화장료 조성물을 제공한다.

[22] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[23] 본 발명은

[24] (a) 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 내부가 빈 공-단일층 리포좀;

[25] (b) 상기 공-단일층 리포좀을 포위하며 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 하나 이상의 단일층 리포좀; 및

[26] (c) 표피성장인자

[27] 를 포함하며, 상기 표피성장인자는 상기 단일층 리포좀 사이에 정전기적 상호작용으로 결합하여 위치하는 것을 특징으로 하는 표피성장인자와 리포좀의 하이브리드형 다중층 나노구조체(hybrid multi-lamellar nanostructure)에 관한 것이다.

[28]

[29] 상기 양이온성 지질은 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC),

1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EPOPC),
1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC),
1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, SPC),
1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, EDPPC),
1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP),
N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA),
3ß-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol, DC-Cholesterol), 디올레오일 글루타마이드(dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드(distearoyl glutamide), 디팔미토일 글루타마이드(dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드(dioleoyl aspartamide) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)로 이루어진 군으로부터 선택된 단독 또는 2종 이상일 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[30]

[31] 상기 공-단일층 리포좀의 제타전위값(zeta potential, 또는 표면전하)은 +1 ~ 100 mV, 바람직하게는 +30 mV 이상일 수 있다.

[32]

[33] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체의 입자 크기는 50 ~ 900 ㎚, 바람직하게는 50 ~ 500 ㎚, 더욱 바람직하게는 100 ~ 200 ㎚ 일 수 있다. 상기 나노구조체의 입자 크기가 900 ㎚ 이상일 경우, 크기가 커서 피부 투과가 어려워 표피성장인자를 피부 내로 전달하기에 부적합하다. 상기 나노구조체의 입자 크기가 50 ㎚ 이하일 경우, 나노입자에 대한 인체 내 유해성이 입증되지 않아 안전성에 문제가 있을 수 있다.

[34]

[35] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체 내의 표피성장인자와 양이온성 지질 간의 중량비(w/w)는 0.001 내지 2.5:1, 바람직하게는 0.001 내지 2.3:1, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 2.0:1일 수 있다. 상기 표피성장인자와 양이온성 지질 간의 중량비(w/w)가 0.001:1 이하일 경우, 다중층 나노구조체가 형성되지 않을 수 있다. 상기 표피성장인자와 양이온성 지질 간의 중량비(w/w)가 2.5:1 이상일 경우, 다중층 나노구조체의 사이즈가 커서 피부 투과가 어려워 표피성장인자를 피부 내로 전달하기에 부적합하다.

[36]

[37] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체 내의 표피성장인자의 봉입율은 60 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상일 수 있다.

[38]

[39] 상기 표피성장인자는 셀트리온에서 재조합 단백질 형태로 제조하여 사용하거나 또는 판매처로부터 구입하여 사용할 수 있다.

[40]

[41] 본 발명의 "하이브리드형 다중층 나노구조체(hybrid multi-lamellar nanostructures)"는 양이온성 지질 공-소포체와 이와 반대되는 음전하를 갖는 표피성장인자와의 다가성 정전기적 및 소수성 상호작용을 통해 형성된 새로운 나노구조체이다. 보다 구체적으로, 도 1에서 보는 바와 같이 공-소포체들과 표피성장인자 간의 자발적인 자기조립(spontaneous self-assembly) 과정을 통해 재조합된 형태로 새로운 하이브리드형 다중층 구조체를 형성할 수 있다.

[42]

[43] 본 발명의 "공-소포체"는 내부 공간이 비어 있는 소포체로, 보다 구체적으로 이중 지질막으로 이루어진 일반적인 리포좀을 의미하며, 보다 더 구체적으로 본 발명에서는 "공-단일층 리포좀"을 의미한다.

[44]

[45] 본 발명의 "하나 이상의 단일층 리포좀"은 리포좀 입자 내에 복수 개의 비-동심원적(non-concentric) 내부 수성 챔버를 갖는 다층 소포 리포좀(multivesicular liposome; MVL), 수성층이 산재된 지질 이중층(lipid bilayer)으로 형성된 일련의 실질적으로 구형인 외피(shell)를 갖는 다층 소포 리포좀(MVL)일 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[46]

[47] 또한, 본 발명은

[48] (1) 양이온성 지질로 이루어지고 입자 크기가 균일한 내부가 빈 공-단일층 리포좀 함유 용액을 제조하는 단계;

[49] (2) 표피성장인자 함유 수용액을 제조하는 단계; 및

[50] (3) 상기 단계 (1)에서 얻어진 공-단일층 리포좀 함유 용액과 상기 단계 (2)에서 얻어진 표피성장인자 함유 수용액을 혼합하는 단계

[51] 를 포함하는 하이브리드형 다중층 나노구조체의 제조방법에 관한 것이다.

[52]

[53] 상기 단계 (1)에서 양이온성 지질은

1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC),

1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EPOPC),

1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC),

1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, SPC),
1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethyl phosphocholine, EDPPC),
1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP),
N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA),
3ß-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol, DC-Cholesterol), 디올레오일 글루타마이드(dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드(distearoyl glutamide), 디팔미토일 글루타마이드(dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드(dioleoyl aspartamide) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)로 이루어진 군으로부터 선택된 단독 또는 2종 이상일 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[54]

[55] 상기 단계 (1)에서 공-단일층 리포좀은 일반적으로 리포좀을 제조하는 방법을 통해 제조될 수 있다. 상기 리포좀 제조 방법은 Bangham 방법, 건조 필름 수화법(dry lipid hydration), 액체질소로 냉동시킨 다음 실온에서 녹이는 과정을 반복하는 동결-융해법(freeze and thawing), 압출법(extrusion method), 초음파법(sonication) 및 고압유화법(microfluidizer)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[56]

[57] 상기 단계 (1)에 따라 제조한 공-단일층 리포좀의 입자 크기는 100 ~ 300 ㎚, 바람직하게는 100 ~ 250 ㎚, 더욱 바람직하게는 100 ~ 200 ㎚일 수 있다.

[58]

[59] 상기 단계 (3)에서는 표피성장인자와 공-단일층 리포좀이 다가성 정전기적 및 소수성 상호작용을 통해 결합함으로써 새로운 단백질-지질 하이브리드형 다중층 나노구조체를 형성한다. 보다 구체적으로, 도 1에서 보는 바와 같이, 공-단일층 리포좀들과 표피성장인자 간의 다가성 정전기적 및 소수성 상호작용에 의한 자발적인 자기조립(spontaneous self-assembly) 과정을 통해 재조합된 형태로 도 5와 같이 하이브리드형 다중층 나노구조체를 형성한다.

[60]

[61] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체는

[62] (a) 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 내부가 빈 공-단일층 리포좀;

[63] (b) 상기 공-단일층 리포좀을 포위하며 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 하나 이상의 단일층 리포좀; 및

[64] (c) 표피성장인자

[65] 를 포함하고, 상기 표피성장인자는 상기 단일층 리포좀 사이에 위치한다.

[66]

[67] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체의 입자 크기는 50 ~ 900 ㎚, 바람직하게는 50 ~ 500 ㎚, 더욱 바람직하게는 100 ~ 200 ㎚ 일 수 있다.

[68]

[69] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체 내의 표피성장인자와 양이온성 지질 간의 중량비(w/w)는 0.001 내지 2.5:1, 바람직하게는 0.001 내지 2.3:1, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 2.0:1일 수 있다.

[70]

[71] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체 내의 표피성장인자의 봉입율은 60 % 이상, 바람직하게는 80 % 이상, 가장 바람직하게는 90 % 이상일 수 있다.

[72]

[73] 일반적인 리포좀 제조 과정과 달리 본 발명에 따른 제조 방법은 사전에 목적하는 크기의 지질 공-소포체(공-단일층 리포좀)를 제조한 후에 생리활성 성분과 혼합하기 때문에 생리활성 성분인 표피성장인자가 리포좀 제조 과정상의 고압, 고온 혹은 강한 산성 용액에 노출되는 과정이 생략됨으로써 표피성장인자의 생리활성을 유지시킬 수 있다는 장점이 있다.

[74]

[75] 또한, 본 발명은 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체를 함유하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[76]

[77] 상기 하이브리드형 다중층 나노구조체는 피부의 진피까지 투과할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[78]

[79] 본 발명의 화장료 조성물은 그 종류가 특별히 한정되는 것은 아니며, 제조하고자 하는 제형에 따라 발명이 속하는 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 화장료 조성물 배합 성분을 포함할 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물은 화장수, 유액, 영양크림, 팩, 미용액, 에센스 등의 제형으로 제조할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형에 따라 추가로 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 선택하여 배합 첨가할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[80] 이하, 실시예, 실험예 및 제형예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 하기의 실시예, 실험예 및 제형예는 단지 본 발명의 예시적인 기재일 뿐으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예, 실험예 및 제형예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[81] <u>실시예 1. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 제조</u>

[82] **1.1 DOTAP를 포함하는 양이온성 공-단일층 리포좀의 제조**

[83] 양이온성 지질인 DOTAP(20.96 ㎎, Avanti Polar Lipid, Inc.)을 클로로포름 1 ㎖에 녹인 후 둥근 플라스크 유리 용기에서 혼합하였다. 회전증류농축장치(rotary evaporator)에서 느린 속도로 지질 용액에 질소 가스를 흘려주어 클로로포름을 제거하고 건조하여 얇은 지질 필름막을 형성하였다. 형성된 지질 필름막을 12 시간 동안 진공에서 더 건조하여 잔여 클로로포름을 완전히 제거하였다. 얻어진 지질 필름막에 정제수 1 ㎖을 첨가하고 37 ℃에서 2 시간 동안 교반하여 지질 공-소포체를 제조하였다. 얻어진 지질 공-소포체를 pore 크기가 100 ㎚인 폴리카보네이트막(polycarbonate membrane)(Avanti Polar Lipid, Inc.)을 사용하여 압출법으로 수회 반복 투과시켜 입자 크기가 균일한 DOTAP을 포함하는 양이온성 공-단일층 리포좀을 제조하였다.

[84]

[85] **1.2 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 제조**

[86] 실시예 1.1에서 제조된 DOTAP을 포함하는 양이온성 공-단일층 리포좀 용액(500 ㎕)과 EGF 용액(500 ㎕, Celltrion, Inc.)을 상온에서 정제수상에서 혼합하여 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체를 제조하였다. 제조된 나노구조체는 사용하기 전까지 4℃에서 보관하였다.

[87]

[88] **실험예** 1. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체 형성 평가

[89] **1.1** 양이온성 공-단일층 리포좀 형성 확인

[90] 실시예 1.1에서 제조된 양이온성 공-단일층 리포좀은 dynamic light scattering(DLS, ELSZ-1000, Otsuka Electronics)를 이용하여 입자 크기와 제타전위값을 각각 측정하였으며, 그 결과를 아래 표 1에 나타내었다. 측정 결과 입자 크기가 200 ㎚이고 표면 전하가 양전하인 양이온성 공-단일층 리포좀을 획득하였다.

[91] [표1]

공-단일층 리포좀

공-단일층 리포좀	입자 크기 (nm)	제타전위값 (mV)
DOTAP	197.7 ± 4.9	56.5 ± 2.5

[92]

[93] **1.2 EGF**-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체 형성 확인

[94] 실시예 1.2에서 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 입자 크기와 제타전위값을 DLS를 이용하여 측정하고, 투과도를 분광분석기(spectrophotometer, Jasco-815, Jasco. Inc.)를 이용하여 500 ㎚에서 측정하였다. 그 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[95] 도 2에서 보는 바와 같이, EGF/DOTAP의 중량비율이 2 이하인 범위에서는 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 입자 크기는 DOTAP 공-단일층

리포좀 의 입자 크기와 비슷한 200 ㎚ 정도의 크기를 유지하는 반면, EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 표면 전하는 공-단일층 리포좀에 비해 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 음전하를 띄는 EGF가 양이온성 공-단일층 리포좀과 정전기적 상호작용에 의해 결합함으로써 새로운 형태의 구조체를 형성하기 때문인 것으로 예상된다.

[96] 도 3에서 보는 바와 같이, EGF/DOTAP의 중량비율이 2 이하인 범위에서는 투과도가 일정하게 유지되는 반면, 그 이상의 범위에서는 투과도가 감소하는 것을 알 수 있다. 이는 EGF의 농도가 높아짐에 따라 양이온성 공-단일층 리포좀과 결합하지 못하고 응집되는 EGF의 양이 증가하기 때문인 것으로 예상된다.

[97]

[98] 실험예 2. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 봉입 효율 평가

[99] EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체 내 봉입된 EGF의 양을 측정하기 위하여, 실시예 1.2에서 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체(1 ㎖)를 초원심분리기(200,000 x g, 2시간, 4 ℃, Beckman)를 사용하여 봉입되지 않은 free EGF를 분리하였다. 마이크로 BCA 정량분석(micro BCA assay)과 ELISA 분석(ELISA assay)을 이용하여 분리된 free EGF의 양을 측정하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[100] 도 4에서 보는 바와 같이, EGF의 정량 방법에 따라 약간의 차이는 보이지만 대부분의 EGF/DOTAP 중량비율에서 60 % 이상의 높은 봉입 효율을 보였다. 일반적인 리포좀 내의 봉입 효율이 10 ~ 20 %에 그치는 것에 비해 본 발명에 따른 구조체의 봉입 효율은 월등함을 확인할 수 있다.

[101]

[102] 실험예 3. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 다중층상 구조 형성 확인

[103] EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 다중층상 구조 형성을 확인하기 위해, 수용액 상에 존재하는 입자성 물질을 원형 그대로 관찰할 수 있게 해주는 에탄 급속동결법(plunge-dipping method)을 이용하여 동결전자현미경법(Cryo-TEM)으로 관찰하였다. 실시예 1.2에서 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체 4 ㎕를 전용 그리드(lacey grid)에 옮겨 얇은 필름막이 형성되도록 준비하였다. 얇은 수용액상의 필름막은 용매가 증발 되지 않도록 적정 온도와 97~99 % 습도가 유지되게 한 뒤, 급속도로 액체 에탄(약 -170 ℃)에 낙하시켜 단일층의 동결 시료를 만들었다. 이를 통해 만들어진 동결 시료를 가속전압(300 kV) 하에서 투과전자현미경(JEM-3011, JEOL Ltd.)으로 관찰하고, Gatan Digital Micrograph program으로 데이터를 분석하였다.

[104] 도 5에서 보는 바와 같이, EGF와 DOTAP의 정전기적 인력을 통해 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 다중층상 구조 형성을 확인하였다.

[105]

[106] 실험예 4. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 안정성 확인

[107] EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체 상에서 EGF의 구조적 변화를 통해 단백질의 안정성을 확인하기 위해, 원편광 이색성(Circular Dichroism, CD)을 180~260nm 범위에서 Jasco-815 CD 분광편광계(spectropolarimeter, Jasco-815, Jasco. Inc.)로 측정하였다. 실시예 1.2에서 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체를 0.5 ㎜ 경로 길이 셀(path length cell)에 넣어 분석하였다. 대조군으로 나노구조체에 포집하지 않은 free EGF를 사용하였고, 온도에 따라 100일 간의 EGF 구조적 변화를 비교해 보았다. CD 데이터는 도 6에 나타내었다.

[108]

[109] 도 6에서 보는 바와 같이, 대조군(EGF)과 비교했을 때, 4℃에 보관된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체(EGF-DOTAP, 4℃)와 상온에 보관된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체(EGF-DOTAP, 상온) 상에서 EGF는 물리적으로 크게 변화되지 않는 것을 확인하였다.

[110]

[111] 실험예 5. EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 피부 투과 확인

[112] EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체의 피부투과 능력을 확인하기 위해, 무모 마우스(SKH-1 Hairless, 5주, Orientbio, Korea)를 이용하였다. PDMS 몰드(직경 0.8 ㎝, 높이 0.5 ㎝)를 마우스 등에 고정 시키고, 형광 물질(FITC)과 EGF, DOTAP 또는 실시예 1.2에서 제조된 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체을 반응시킨 샘플 50 ㎖를 PDMS 몰드에 로딩하여, 마우스 피부와 1시간 동안 반응시켰다. 마우스로부터 분리한 피부를 냉동조직절편기(Leica CM1850, Leica Microsystems)로 절개한 뒤, 형광 현미경(Leica DMI 3000 B, Leica Microsystems)로 관찰하였다.

[113] 도 7a에서 보는 바와 같이, EGF와 DOTAP을 단독으로 처리한 것은 표피를 통과하지 못하고 피부 표면에 침착되는 경향을 보이나, EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체는 피부 표면에 남아 있지 않음을 확인하였다.

[114] 또한, 도 7b에서 보는 바와 같이, 마이크로톰(Microtome)을 이용하여 피부 단면을 관찰한 결과, EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체는 피부 표피에서 진피까지 투과되고 있음을 확인하였다.

[115]

[116] 앞선 실험예들의 결과를 근거로 하여 본 발명의 EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체를 함유하는 화장료 조성물의 제형을 제시한다. 그러나 본 발명의 조성물이 하기의 제형예들로 제한되는 것은 아니다.

[117]

[118] 제형예 1. 유연화장수(스킨로션)

[119] 하기 표 2에 나타난 바와 같이 통상의 방법에 따라 유연화장수를 제조하였다.

[120] [표2]

유연화장수의 조성

배합 성분	함량 (중량부)
EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체	0.5
1.3-부틸렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
올레일알코올	0.1
폴리솔베이트 20	0.5
에탄올	15.0
벤조페논-9	0.05
향, 방부제	미량
정제수	to 100

[121]

[122] **제형예** 2. 영영화장수(밀크로션)

[123] 하기 표 3에 나타난 바와 같이 통상의 방법에 따라 영양화장수를 제조하였다.

[124] [표3]

영양화장수의 조성

배합 성분	함량 (중량부)
EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체	1.0
프로필렌글리콜	6.0
글리세린	4.0
트리에탄올아민	1.2
토코페닐아세테이트	3.0
유동파라핀	5.0
스쿠알란	3.0
마카다이아너트오일	2.0
폴리솔베이트 60	1.5
솔비탄세스퀴올레이트	1.0
카르복시비닐 폴리머	1.0
비에치티이	0.01
EDTA-2Na	0.01
향, 방부제	미량
정제수	to 100

[125]

[126] **제형예** 3. 에센스

[127] 하기 표 4에 나타난 바와 같이 통상의 방법에 따라 에센스를 제조하였다.

[128] [표4]

에센스의 조성

배합 성분	함량 (중량부)
EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체	2.0
시토 스테로	1.7
폴리글리세릴 2-올레이트	1.5
세라마이드	0.7
세테아레스-4	1.2
디세틸포스페이트	0.4
농글리세린	0.5
카르복시비닐폴리머	0.2
산탄검	0.2
향, 방부제	미량
정제수	to 100

[129]

[130] **제형예 4.** 영양크림

[131] 하기 표 5에 나타난 바와 같이 통상의 방법에 따라 영양크림을 제조하였다.

[132] [표5]

영양크림의 조성

배합 성분	함량 (중량부)
EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체	2.0
세토스테아릴알콜	2.0
글리세릴스테아레이트	1.5
트리옥타노인	5.0
폴리솔베이트 60	1.2
솔비탄스테아레이트	0.5
스쿠알란	5.0
유동 파라핀	3.0
싸이클로메치콘	3.0
비에이치티이	0.05
델타-토코페롤	0.2
농글리세린	4.0
1,3-부틸렌글리콜	2.0
산타검	0.1
EDTA-2Na	0.05
향, 방부제	미량
정제수	to 100

[133]

[134] **제형예 5. 팩**

[135] 하기 표 6에 나타난 바와 같이 통상의 방법에 따라 팩을 제조하였다.

[136] [표6]

팩의 조성

배합 성분	함량 (중량부)
EGF-DOTAP 하이브리드형 다중층 나노구조체	1.0
프로필렌글리콜	2.0
글리세린	4.0
카르복시비닐 폴리머	0.3
에탄올	7.0
피이지-40 히드로게네이티드 캐스터 오일	0.8
트리에탄올아민	0.3
비에치티이	0.01
EDTA-2Na	0.01
향, 방부제	미량
정제수	to 100

[137]

청구범위

[청구항 1] (a) 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 내부가 빈 공-단일층 리포좀;
(b) 상기 공-단일층 리포좀을 포위하며 양이온성 지질 이중막 구조로 구성된 하나 이상의 단일층 리포좀; 및
(c) 표피성장인자
를 포함하며, 상기 표피성장인자는 상기 단일층 리포좀 사이에 정전기적 상호작용으로 결합하여 위치하는 것을 특징으로 하는, 표피성장인자와 리포좀의 하이브리드형 다중층 나노구조체(hybrid multi-lamellar nanostructure).

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 양이온성 지질이
1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDOPC),
1-팔미토일-2-올레오일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EPOPC),
1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDMPC),
1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, SPC),
1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린(1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, EDPPC),
1,2-디올레오일-3-트리메틸암모늄-프로판(1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane, DOTAP),
N-[1-(2,3-디올레일옥시)프로필]-N,N,N-트리메틸암모늄클로라이드(N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride, DOTMA),
3ß-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(3ß-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol, DC-Cholesterol), 디올레오일 글루타마이드(dioleoyl glutamide), 디스테아로일 글루타마이드(distearoyl glutamide), 디팔미토일 글루타마이드(dipalmitoyl glutamide), 디올레오일 아스파르타마이드(dioleoyl aspartamide) 및 디메틸디옥타데실암모늄 브로마이드(dimethyldioctadecylammonium bromide, DDAB)로 구성된 군으로부터 선택된 단독 또는 2종 이상인 것을 특징으로 하는 나노구조체.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 하이브리드형 다중층 나노구조체의 입자 크기가 50 ~ 500 nm인 것을 특징으로 하는 나노구조체.

[청구항 4] 제 1항에 있어서,

상기 공-단일층 리포좀의 제타전위값이 +1 ~ 100 mV인 것을 특징으로 하는 나노구조체.

[청구항 5] 제 1항에 있어서,
상기 표피성장인자와 양이온성 지질의 중량비(w/w)가 0.001 내지 2.5 : 1인 것을 특징으로 하는 나노구조체.

[청구항 6] 제 1항에 있어서,
상기 하이브리드형 다중층 나노구조체 내 표피성장인자의 봉입율이 60 % 이상인 것을 특징으로 하는 나노구조체.

[청구항 7] (1) 양이온성 지질로 이루어지고 입자 크기가 균일한 내부가 빈 공-단일층 리포좀 함유 용액을 제조하는 단계;
(2) 표피성장인자 함유 수용액을 제조하는 단계; 및
(3) 상기 단계 (1)에서 얻어진 공-단일층 리포좀 함유 용액과 상기 단계 (2)에서 얻어진 표피성장인자 함유 수용액을 혼합하는 단계;
를 포함하는 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 하이브리드형 다중층 나노구조체의 제조방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서,
상기 단계 (1)에 따라 제조한 공-단일층 리포좀의 입자 크기가 100 ~ 300 nm인 것을 특징으로 하는 나노구조체의 제조방법.

[청구항 9] 제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항의 하이브리드형 다중층 나노구조체를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물.

[청구항 10] 제 9항에 있어서,
상기 하이브리드형 다중층 나노구조체가 피부의 진피까지 투과하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.