



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0008279
(43) 공개일자 2024년01월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/1658 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0089911

(22) 출원일자 2023년07월11일

심사청구일자 2023년07월11일

(30) 우선권주장

1020220085304 2022년07월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

홍진기

서울특별시 서대문구 연세로 50

김지유

서울특별시 서대문구 연세로 50

박소현

서울특별시 서대문구 연세로 50

(74) 대리인

특허법인충현

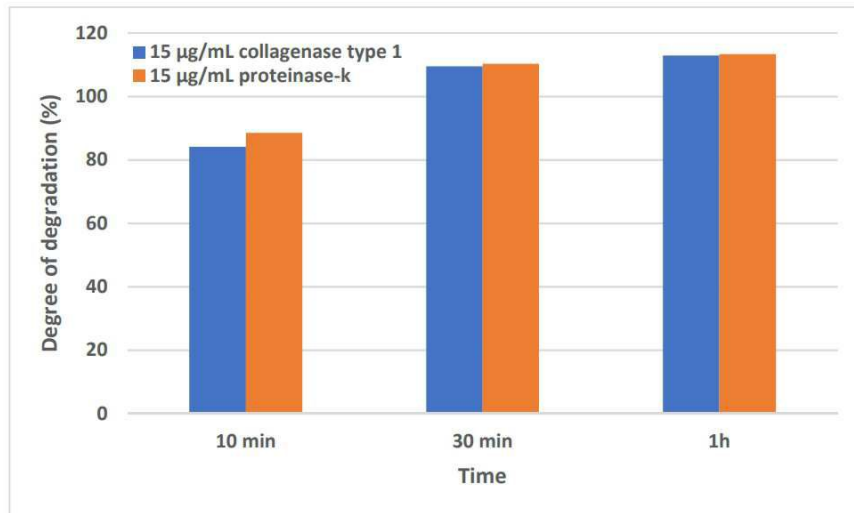
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 젤라틴 입자의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 젤라틴 입자의 제조방법에 관한 것으로서, 입자 제조 시, 단백질 분해효소를 첨가하여 생체 내에서 젤라틴 입자의 신속하고 강한 분해를 유도할 수 있고, 이를 통해 원하는 표적에서의 분해 거동을 조절할 수 있어 약물 전달 시스템으로서 효과적으로 활용될 수 있다.

대표도 - 도10



명세서

청구범위

청구항 1

젤라틴을 제1용매에 용해시켜 제1젤라틴 용액을 제조하는 단계;
상기 제1젤라틴 용액에 단백질 분해효소를 첨가하여 제2젤라틴 용액을 제조하는 단계;
제2용매에 상기 제2젤라틴 용액을 첨가하여 에멀전을 형성하는 단계; 및
상기 에멀전을 유기용매와 혼합하고 여과하는 단계;를 포함하는 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 제1용매 및 제2용매는 수상 또는 유상이며, 상이한 상을 형성하는, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 유기용매는 아세톤, 에탄올, 및 시클로헥산에서 선택되는 적어도 하나인, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 단백질 분해효소는 단백질 분해효소-K (proteinase-K), 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1), 트립신(trypsin) 및 이의 혼합물에서 선택되는, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 에멀전은 유중수(water-in-oil)형인, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 6

제 1항에 있어서,
상기 단백질 분해효소는 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 함유되는, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 7

제 1항에 있어서,
상기 젤라틴 입자는 평균 입경이 50 내지 500 μm 인, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 8

제 1항에 있어서,
효소 활성 안정제를 더 포함하는, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 9

제 1항에 있어서,
상기 젤라틴 입자는 수중에서 분산되어 비가역적으로 분해되는, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 젤라틴 입자는 수중에서 완전히 분해되기까지의 소요 시간이 1시간 이내인, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 제2젤라틴 용액 및 제2용매의 중량비는 1:2 내지 1:20인, 젤라틴 입자 제조방법.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의해 제조된 젤라틴 입자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 젤라틴 입자의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 젤라틴은 콜라겐과 같은 천연 고분자를 산 또는 알칼리 가수분해하여 얻은 변성 단백질로서, (Gly-X-Pro)_n으로 표시된 특정 아미노산의 반복 서열으로 삼중 나선 구조를 이루고 있다. 이러한 아미노산의 반복 서열 중 라이신, 아르기닌과 같은 아미노산에 의해 13%는 양전하를 띠고, 글루탐산, 아스파르트산과 같은 아미노산에 의해 12%는 음전하를 띠며, 류신, 이소류신, 메티오닌, 발린 등에 의해 나머지 사슬은 소수성을 띠게 된다.

[0003] 젤라틴은 상기와 같이 양이온, 음이온, 소수성 그룹을 약 1:1:1의 비율로 갖는 다중 양극성 물질이며, 높은 생체 적합성과 생분해성을 갖는다. 젤라틴의 단백질 분자에 존재하는 다중 결합 부위로 인해 다양한 약물에 대해 높은 로딩 용량을 가지기 때문에, 다양한 약물 분자를 전달하는 약물 전달 시스템에 활용될 수 있다.

[0004] 그러나 젤라틴을 의료 분야에 사용하기 위해서는 생체 내에서 젤라틴의 분해 거동을 조절할 수 있고, 약물을 원하는 표적에 효율성 있게 전달할 수 있는 기술 개발이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 의료용도로 사용되는 젤라틴 입자에 관한 것으로서, 체내 표적 부위에 도달하였을 경우 1시간 안에 빠르게 분해될 수 있는 젤라틴 입자를 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0006] 또한 본 발명은 약물을 원하는 표적에 효율적으로 전달할 수 있는 약물 전달 시스템으로서 젤라틴 입자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 상술한 기술적 과제 해결을 위하여, 젤라틴을 제1용매에 용해시켜 제1젤라틴 용액을 제조하는 단계; 상기 제1젤라틴 용액에 단백질 분해효소를 첨가하여 제2젤라틴 용액을 제조하는 단계; 제2용매에 상기 제2젤라틴 용액을 첨가하여 에멀전을 형성하는 단계; 및 상기 에멀전을 유기용매와 혼합하고 여과하는 단계;를 포함하는 젤라틴 입자 제조방법을 제공할 수 있다.

[0008] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제1용매 및 제2용매는 수상 또는 유상이며, 상이한 상을 형성하는 것일 수 있다.

[0009] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 유기용매는 아세톤, 에탄올, 및 시클로헥산에서 선택되는 적어도 하나일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 proteinase-K, collagenase type 1, 트립신 및 이의 혼합물에서 선택될 수 있다.

- [0011] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 에멀전은 유중수(water-in-oil)형일 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 10 내지 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 함유될 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 젤라틴 입자는 평균 입경이 50 내지 500 μm 일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 단백질 분해효소는 효소 활성 안정제를 더 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 젤라틴 입자는 수중에서 분산되어 비가역적으로 분해될 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 제2젤라틴 용액 및 제2용매의 중량비는 1:2 내지 1:20일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 젤라틴 입자는 수중에서 완전히 분해되기까지의 소요 시간이 1시간 이내일 수 있다.
- [0018] 또한 본 발명은 상술한 제조방법에 의해 제조된 젤라틴 마이크로입자를 제공할 수 있다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 젤라틴 입자의 제조 시, 단백질 분해효소를 첨가하여, 젤라틴의 펩타이드 결합을 분해하고, 삼중 나선 구조를 가수분해함으로써, 체내에서 1시간 이내 젤라틴 입자의 빠른 분해를 유도할 수 있다.
- [0020] 본 발명은 열 또는 가수분해 과정에 의한 경우보다 빠르고 비가역적인 강한 분해를 유도하며, 환경에 따라 젤라틴 입자의 분해 거동을 조절할 수 있는 젤라틴 입자의 제조방법을 제공함에 따라 생체 내 표적에 도달하여 약물을 효율적으로 방출할 수 있어 여러 의료 분야에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명 실시예 1에 따라 제조된 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1) 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 젤라틴 입자의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다.
- 도 2는 본 발명 실시예 2에 따라 제조된 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1) 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 젤라틴 입자의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다.
- 도 3은 본 발명 실시예 3에 따라 제조된 단백질 분해효소-K 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 젤라틴 입자의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다.
- 도 4는 본 발명 실시예 4에 따라 제조된 단백질 분해효소-K 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 포함한 젤라틴 입자의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다.
- 도 5는 본 발명 실시예 1에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산된 광학 현미경 이미지이다.
- 도 6은 본 발명 실시예 2에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산된 광학 현미경 이미지이다.
- 도 7은 본 발명 실시예 1에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산시킨 후의 입자 크기 분포를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 본 발명 실시예 3에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산된 광학 현미경 이미지이다.
- 도 9는 본 발명 실시예 4에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산된 광학 현미경 이미지이다.
- 도 10은 본 발명 실험예 2에 따라 BCA assay를 이용하여 정량화한 실시예 1 및 실시예 3의 젤라틴 입자의 분해 정도를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 첨부된 도면 및 실시예들을 참조하여 본 발명에 따른 젤라틴 입자의 제조방법에 대하여 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다.
- [0023] 이때, 사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.
- [0024] 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예 또는 도면에 한정되지 않는다.

- [0025] 본 명세서에서 사용되는 단수 형태는 문맥에서 특별한 지시가 없는 한 복수 형태도 포함하는 것으로 의도할 수 있다.
- [0026] 또한, 본 명세서의 용어, "포함한다"는 "구비한다", "함유한다", "가진다" 또는 "특징으로 한다" 등의 표현과 등가의 의미를 가지는 개방형 기재이며, 추가로 열거되어 있지 않은 요소, 재료 또는 공정을 배제하지 않는다.
- [0027] 본 발명은 약물 전달 시스템 등과 같이 의료용으로 활용되는 젤라틴 입자를 제조하기 위한 기술이다. 젤라틴은 단백질로서 열에 의해 변성되거나 산 또는 알칼리 조건에서 가수분해되어 체내에서 분해될 수 있다. 그러나 이는 젤라틴 구조를 이루는 삼중 나선 구조를 풀리게 하는 분해 과정이나, 본 발명에 따른 젤라틴 입자가 단백질 분해효소에 의하여 펩타이드 결합이 분해되어 삼중 나선 구조가 끊어지는 것과는 상이하다. 본 발명에 따른 경우 상기 공유 결합을 절단하여 젤라틴의 빠른 분해를 유도할 수 있다.
- [0028] 이하 본 발명에 따른 젤라틴 입자 제조방법에 대하여 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 구체적으로 젤라틴을 의료용으로 활용하기 위하여 생체 내 신속한 분해를 통해 약물을 효과적으로 전달할 수 있는 젤라틴 입자를 제공하는 것을 목적으로 한다. 이를 위해서는 생체 내 환경에서, 특히 표적 부위에서 젤라틴이 빠르게 분해되어 약물이 효과적으로 방출될 수 있어야 한다. 젤라틴은 생체 내 콜라게나아제에 의해 쉽게 분해가 일어나지만, 기질 특이성을 가지는 효소의 존재 확률이 생체 각 부위에 따라 다르기 때문에 표적 부위에서의 빠른 분해를 기대하기 어렵다.
- [0030] 이에 본 발명은 젤라틴 입자의 제조 시에 단백질 분해효소를 첨가하여, 젤라틴 입자 내 상기 효소가 공존할 수 있도록 함으로써 생체 내에서 빠른 입자의 분해를 유도할 수 있는 효과를 제공할 수 있다.
- [0031] 본 발명은 젤라틴을 제1용매에 용해시켜 제1젤라틴 용액을 제조하는 단계; 상기 제1젤라틴 용액에 단백질 분해효소를 첨가하여 제2젤라틴 용액을 제조하는 단계; 제2용매에 상기 제2젤라틴 용액을 첨가하여 에멀전을 형성하는 단계; 및 상기 에멀전을 유기용매와 혼합하고 여과하는 단계;를 포함하는 젤라틴 입자 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0032] 일 실시예에 있어서, 제1용매 및 제2용매는 수상 또는 유상으로서, 서로 다른 상을 형성하는 것이 바람직하다.
- [0033] 구체적으로 상기 제1용매는 증류수일 수 있다. 본 발명의 일 실시예로서, 젤라틴을 증류수에 용해시켜 제1젤라틴 용액을 준비할 수 있다. 이때 제1젤라틴 용액 기준으로 젤라틴은 1 내지 20 중량%, 또는 3 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 제1용매가 증류수인 경우 제1젤라틴 용액은 수상을 형성할 수 있다.
- [0034] 젤라틴은 비수용성 섬유상 단백질인 콜라겐의 변형 단백질이다. 제1젤라틴 용액을 제조하기 위하여, 젤라틴이 물에 잘 용해될 수 있도록 가온하여 교반하는 단계를 더 포함할 수 있다. 구체적으로 40 내지 65 ℃로 가온할 수 있다. 다만 이후 단계로서 단백질 분해효소를 첨가하기 전, 효소의 변성을 방지하기 위하여 40 ℃이하의 온도로 낮추는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 상기 제1젤라틴 용액에 단백질 분해효소를 첨가하여 제2젤라틴 용액을 제조할 수 있다. 단백질 분해효소는 젤라틴을 가수분해할 수 있는 것이면 크게 제한되지 않으나, 구체적으로 예를 들면 단백질 분해효소 K (proteinase-K), 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1), 또는 트립신 (trypsin)일 수 있다.
- [0036] 일 예에 있어서, 단백질 분해효소는 10 내지 50 $\mu\text{g/ml}$, 13 내지 30 $\mu\text{g/ml}$, 또는 15 내지 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 포함될 수 있다. 상술한 범위의 농도로 포함됨으로써 안정적인 젤라틴 입자가 수득될 수 있다.
- [0037] 일 실시예에 있어서, 상기 제2젤라틴 용액은 제2용매에 첨가되어 에멀전을 형성할 수 있다. 구체적으로 제1용매가 수상인 경우 제2용매는 유상이며, 제2젤라틴 용액이 유상인 제2용매에 첨가될 때, 유중수형(water-in-oil, w/o) 에멀전을 형성할 수 있다. 이때 에멀전이 안정적으로 형성될 수 있도록 제2용매를 교반하면서, 제2젤라틴 용액을 천천히 첨가하는 것이 좋다.
- [0038] 제2용매는 제한되지 않으나, 유상인 경우 일 예로서, 식물성 오일일 수 있다. 식물성 오일의 구체적인 예를 들면 땅콩 오일, 옥수수 오일, 올리브 오일, 대두유 등을 포함할 수 있다.
- [0039] 일 실시예에 있어서, 상기 제2젤라틴 용액 및 제2용매의 중량비는 1:2 내지 1:20 또는 1:5 내지 1:12일 수 있다.
- [0040] 일 실시예에 있어서, 상기 에멀전을 저온으로 냉각하여, 젤라틴의 겔화가 진행될 수 있도록 할 수 있다. 이를 위해 구체적으로 1 내지 15 ℃, 또는 3 내지 10 ℃로 낮추어 교반하는 단계를 포함할 수 있다.

- [0041] 또한 상기 에멀전을 유기용매와 혼합하고 여과하는 단계를 포함할 수 있다. 유기용매는 크게 제한되지 않으나, 본 발명의 비제한적인 일 예로서 아세톤, 에탄올, 및 시클로헥산에서 선택할 수 있다. 상기 유기용매는 상기 단계에서 냉각된 온도와 유사한 온도로 냉각되어 처리되는 것이 바람직하다.
- [0042] 일 예로서, 2 내지 5 °C로 냉각된 유기용매를 에멀전과 혼합하여 30분 내지 5시간 동안 교반할 수 있다. 상기 교반하는 과정에서 냉각된 유기용매를 추가할 수 있다.
- [0043] 유기용매와 혼합되어 입자가 형성되면 감압 여과 단계를 통해 젤라틴 입자를 수득할 수 있다. 이후 세척하는 단계를 수행하여 잔류된 제2용매를 제거할 수 있다.
- [0044] 상기 세척하는 단계 이후, 유기용매를 증발시켜, 최종적으로 효소가 포함된 젤라틴 입자를 수득할 수 있다.
- [0045] 상기 효소가 포함된 젤라틴 입자는 평균 입경이 50 내지 500 μm , 100 내지 400 μm 인 마이크로 사이즈의 구형의 입자일 수 있다.
- [0046] 도 1 내지 도 4를 참조하면, 효소가 포함된 젤라틴 마이크로스피어 입자를 확인할 수 있다. 전반적으로 구형을 나타내고, 표면이 주름진 형태를 관찰할 수 있다. 효소의 농도가 특정 수치범위를 초과하는 경우 큰 입자에 작은 입자들이 달라붙어, 집합체를 형성하는 양상을 보이기도 한다.
- [0047] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 단백질 분해효소 외 효소 활성 안정제를 더 포함할 수 있다. 구체적 일 예로서, 효소 활성 안정제는 상기 단백질 분해효소가 단백질 분해효소-K인 경우, 칼슘 이온이 바람직할 수 있다.
- [0048] 상기 단백질 분해효소는 최적화된 환경 설정을 통해 작용 효과를 효과적으로 구현할 수 있다. 일 예로서 단백질 분해효소-K의 경우 20 내지 60 °C, pH 4 내지 12 조건에서 젤라틴의 펩티드 결합 분해를 효과적으로 수행할 수 있다. 다른 일 예로서 콜라겐 분해효소 유형 1의 경우 35 내지 37 °C, pH 6 내지 7.5 조건에서, 젤라틴 삼중 나선 구조를 효과적으로 분해할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 젤라틴 입자는 상기 단백질 분해효소를 포함하여 수중에서 비가역적으로 분해될 수 있다. 구체적으로 도 5, 6, 8, 및 9를 참조하면 단백질 분해효소를 포함한 젤라틴 입자의 수중에서의 분산 및 분해 모습을 확인할 수 있다. 이를 구체적으로 살펴보면, 젤라틴 입자는 수화되어 입자의 평균 입경이 300 내지 400 μm 로 커지고, 이어서 입자가 빠르게 분해된다. 특히 도 8에서는 단백질 분해효소-K를 포함하는 젤라틴 입자가 수중에 분산되어 입자 형태를 보이나, 1시간 이내에 대부분 분해되고, 이미지 내 표시된 부분과 같이 입자가 터지면서 분해되는 것을 관찰할 수 있다.
- [0050] 도 10은 단백질 분해효소를 포함하는 젤라틴 입자가 분해 조건을 가한 경우 1시간 이내에 완전히 분해된 결과를 나타내는 그래프이다. 단백질 분해효소가 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 함유된 경우 분해가 시작된 지 10분만에 80% 이상의 분해가 진행되었고, 30분 이내로 완전히 분해된 것으로 나타났다. 이러한 결과를 통해 본 발명에 따른 단백질 분해효소를 함유한 젤라틴 입자는 생체 내 환경에서 표적 부위에 도달하는 경우 신속히 분해되어 약물 방출에 용이하게 작용할 것으로 기대할 수 있다.
- [0051] 이러한 측면에서 본 발명은 상술한 제조방법에 따라 제조된 젤라틴 입자를 제공할 수 있다.
- [0052] 아울러 본 발명은 상기의 젤라틴 입자를 포함하는 약물 전달 시스템을 제공할 수 있다.
- [0053]
- [0054] 이하 실시예를 통해 본 발명에 대해 더욱 상세히 설명한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명을 상세히 설명하기 위한 하나의 참조일 뿐 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니며, 여러 형태로 구현될 수 있다.

[0056] **실시예 1. 콜라겐 분해효소 유형 1 을 포함한 젤라틴 입자의 제조**

- [0057] 젤라틴 (Gelatin, (주)삼미산업)을 3차 증류수에 녹여서 5.55 wt% 농도의 젤라틴 수용액을 준비하였다. 젤라틴이 물에 잘 녹을 수 있도록 60°C, 500rpm로 미리 녹인 후, 모두 녹고 난 후에는 효소의 활성 온도를 벗어나지 않게 하기 위하여 젤라틴 수용액의 온도를 40°C로 낮추어서 500rpm으로 교반하였다.
- [0058] 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1) (Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich) 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 젤라틴 수용액에 첨가하여 젤라틴 용액을 준비하였다. 이후, 올리브 오일 (Olive oil, 대정화금)을 500rpm으로 교반하면서 제조한 젤라틴 용액을 파이펫으로 한 방울씩 떨어뜨렸다. 이 때 젤라틴 용액과 올리브

오일의 비율은 1:10으로 설정하였다. 10분 동안 교반한 후 젤라틴의 겔화가 진행되어 젤라틴 입자가 생성될 수 있도록 4℃, 500rpm에서 30분 동안 교반하였다. 이후 냉각된 아세톤을 혼합하여 1시간 동안 4℃, 500rpm에서 1시간 동안 교반한 뒤, 냉각된 아세톤을 추가로 넣어서 10분 동안 4℃, 1000rpm에서 5분 동안 교반하였다. 생성된 젤라틴 입자를 감압 여과 과정을 통해 얻어 내고 아세톤으로 여러 번 세척하여 잔류 올리브 오일을 제거하였다. 젤라틴 입자의 아세톤이 증발할 수 있도록 자연건조 하여 최종적으로 콜라겐 분해효소 유형 1 효소가 포함된 젤라틴 입자를 수득하였다.

[0059] 도 1은 제조된 콜라겐 분해효소 유형 1 (collagenase type 1)를 포함한 젤라틴 입자의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다. 입자 크기는 50~500 μm 이고, 평균 입경은 200 μm 이상인 큰 크기의 입자들이 주로 관찰되며, 전반적으로 구형의 표면이 주름진 형태들을 확인할 수 있다.

[0060] **실시예 2. 콜라겐 분해효소 유형 1 을 포함한 젤라틴 입자의 제조**

[0061] 콜라겐 분해효소 유형 1 30 $\mu\text{g/mL}$ 을 젤라틴 수용액에 첨가하여 젤라틴 용액을 준비한 것을 제외하면, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 젤라틴 입자를 제조하였다.

[0062] **비교예 1. 콜라겐 분해효소 유형 1 을 포함한 젤라틴 입자의 제조**

[0063] 콜라겐 분해효소 유형 1 60 $\mu\text{g/mL}$ 을 젤라틴 수용액에 첨가하여 젤라틴 용액을 준비한 것을 제외하면, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 여과 과정에서 걸려져 젤라틴 입자가 형성되지 않았다.

[0064] **실시예 3. 단백질 분해효소-K를 포함하는 젤라틴 입자 제조**

[0065] 단백질 분해효소-K (proteinase-K) 를 첨가한 것을 제외하면, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 효소를 포함하는 젤라틴 입자를 제조하였다.

[0066] 도 2는 제조된 단백질 분해효소-K의 크기와 형태를 보여주는 FE-SEM 이미지이다. 입자 크기는 10~200 μm 이고, 전반적으로 구형의 표면이 주름진 형태들을 확인할 수 있다.

[0067] **실시예 4. 단백질 분해효소-K를 포함하는 젤라틴 입자 제조**

[0068] 단백질 분해효소-K (proteinase-K) 30 $\mu\text{g/mL}$ 을 젤라틴 수용액에 첨가하여 젤라틴 용액을 준비한 것을 제외하면, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하여 젤라틴 입자를 제조하였다.

[0069] **비교예 2. 단백질 분해효소-K를 포함하는 젤라틴 입자 제조**

[0070] 단백질 분해효소-K 60 $\mu\text{g/mL}$ 을 젤라틴 수용액에 첨가하여 젤라틴 용액을 준비한 것을 제외하면, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 수행하였다. 여과 과정에서 걸려져 젤라틴 입자가 형성되지 않았다.

[0072] **실험예 1. 효소를 포함한 젤라틴 입자의 수중 분산 관찰**

[0073] 실시예 1 내지 실시예 4에 따라 제조한 젤라틴 입자를 물에 분산시킨 후 광학 현미경으로 수중 분산 정도를 관찰하였다.

[0074] 도 3은 실시예 1에 따라 제조된 젤라틴 입자의 분산 정도를 보여주는 광학 현미경 이미지이다. 평균 입경 300 μm 정도의 입자 형태를 보이며, 수중에서 응집 없이, 안정적으로 분산된 입자의 형태를 유지하는 것을 확인할 수 있다.

[0075] 도 4는 실시예 1에 따라 제조된 젤라틴 입자의 수중에서 분산시킨 후의 입자 크기 분포를 나타낸 그래프이다. 입자들의 평균 크기는 약 343 μm 이고, 최대값은 678.88 μm , 최소값은 85.87 μm 인 것으로 측정되었다.

[0076] 도 8은 실시예 3에 따라 제조된 젤라틴 입자의 분산 정도를 보여주는 광학 현미경 이미지이다. 수중에서 분산이 되어 입자 형태를 보이거나, 입자가 물에서 분해되는 형태를 보인다. 분해되지 않은 입자들의 크기는 약

[0077] 50~100 μm 로 관찰되었다.

[0078] **실험예 2. BCA assay를 이용한 젤라틴 입자의 분해 정도 정량화**

[0079] BCA assay는 용액의 단백질 농도를 측정하는 방법으로, 다양한 시점에서 상층액으로 방출되는 단백질의 양을 측정하여 정량화 하는 방법이다. 젤라틴 입자가 분해되면 단백질 농도가 높아지므로 이에 따른 분해 정도를 정량화 할 수 있다. 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조한 젤라틴 입자를 BCA reagent와 혼합하여 1XPBS에 넣은 후,

인큐베이터에 10분, 30분, 1시간 및 24시간 보관하였다. 특정 시점에서의 1XPBS를 마이크로튜브로 옮긴 후, 원심분리기로 남아있는 젤라틴 입자가 분리된 상층액의 용액을 떠서 BCA assay를 진행하였다. 24시간 후 젤라틴 입자가 완전히 분해될 것으로 가정하고, 24시간 후의 분해도를 100%로 설정한 후 분해 정도를 평가하였다.

[0080]

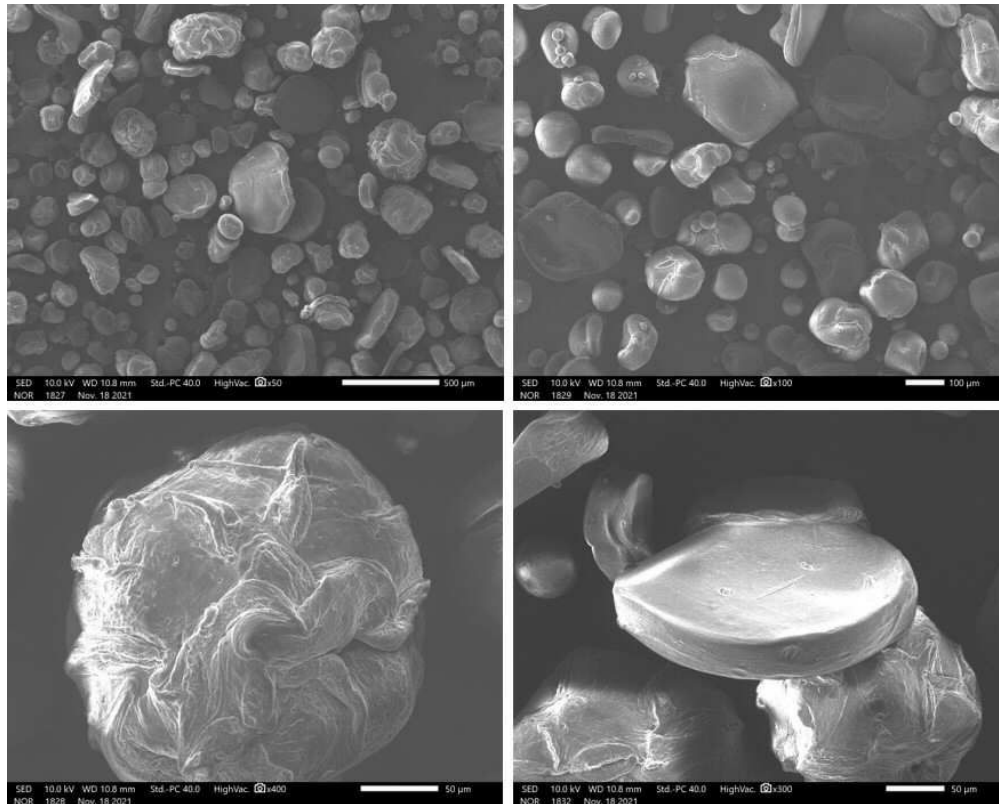
도 10은 BCA assay를 이용하여 정량화한 각 젤라틴 입자의 분해 정도를 나타내는 그래프이다. 이를 참조하면, 실시예 1에 따라 제조된 젤라틴 입자는 분해가 시작된 지 10분만에 약 84%의 분해가 진행되었으며, 30분 이내로 완전히 분해되었음을 확인할 수 있다. 실시예 3에 따라 제조된 젤라틴 입자는 분해가 시작된 지 10분만에 약 88%의 분해가 진행되었으며, 30분 이내로 완전히 분해되었음을 확인할 수 있다.

[0082]

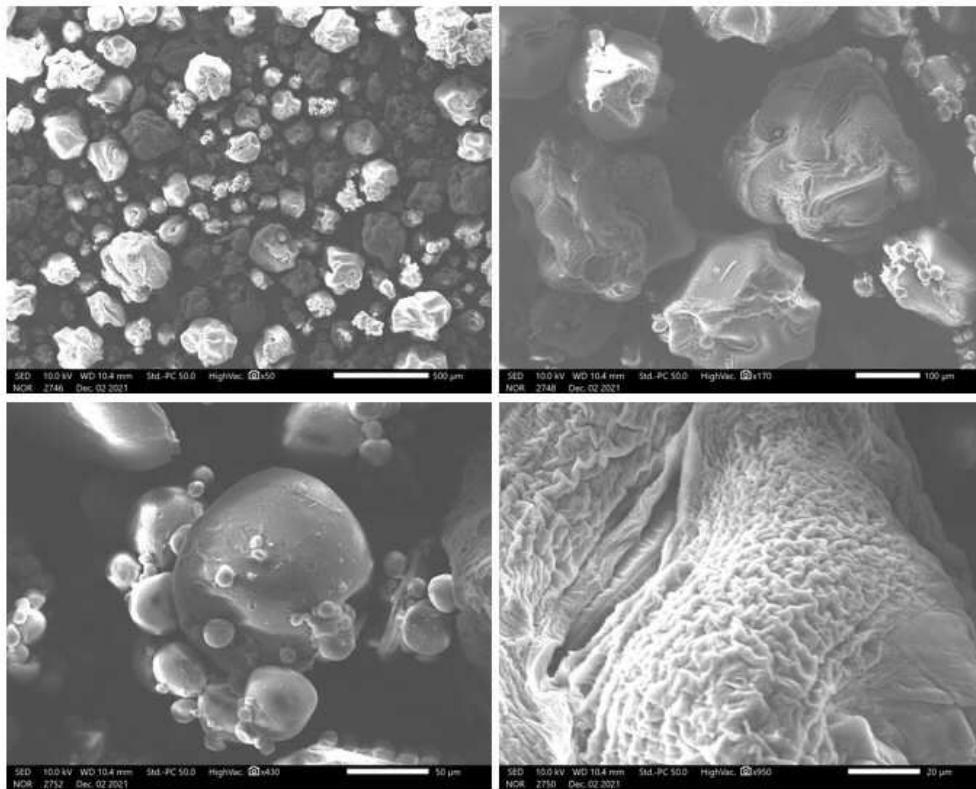
이상 설명한 것은 본 발명에 의한 젤라틴 입자의 제조방법을 실시하기 위한 일부 예에 불과하며, 이에 한정되지 않고, 이하의 청구범위에서 청구하는 바와 같이 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변경 실시가 가능한 범위까지 본 발명의 기술적 사상이 있다고 할 것이다.

도면

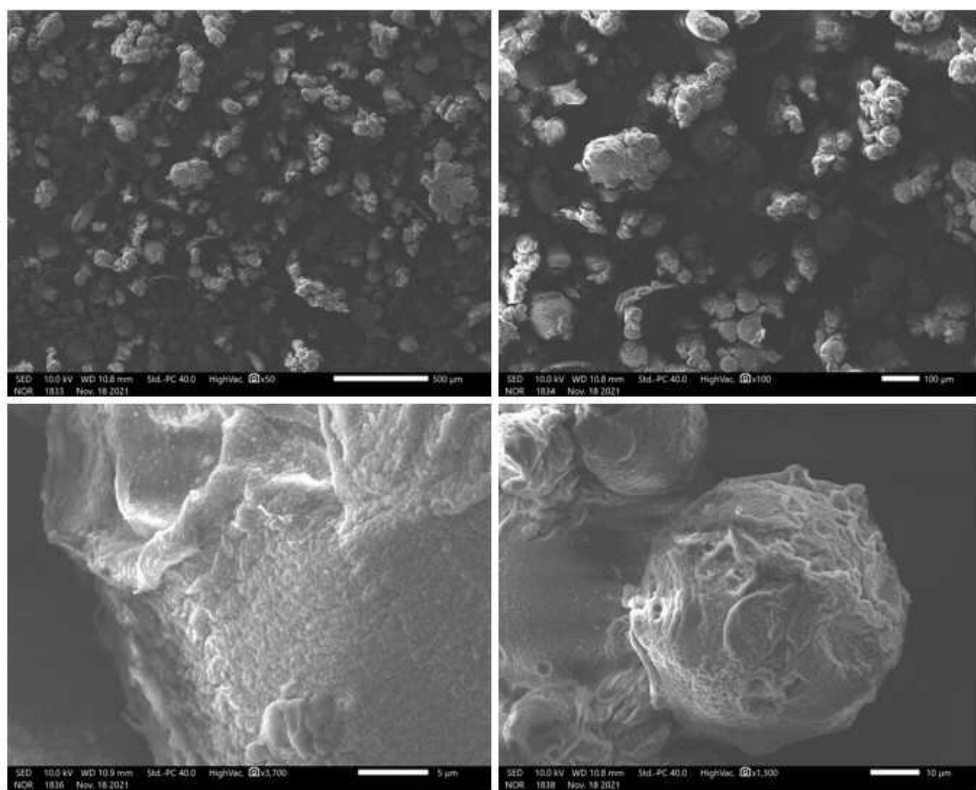
도면1



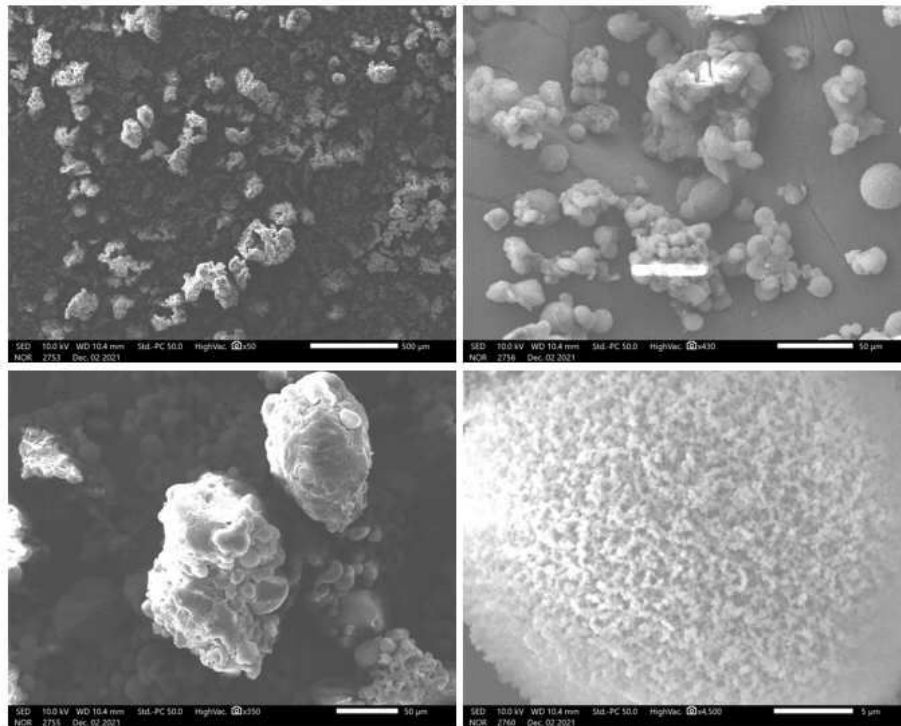
도면2



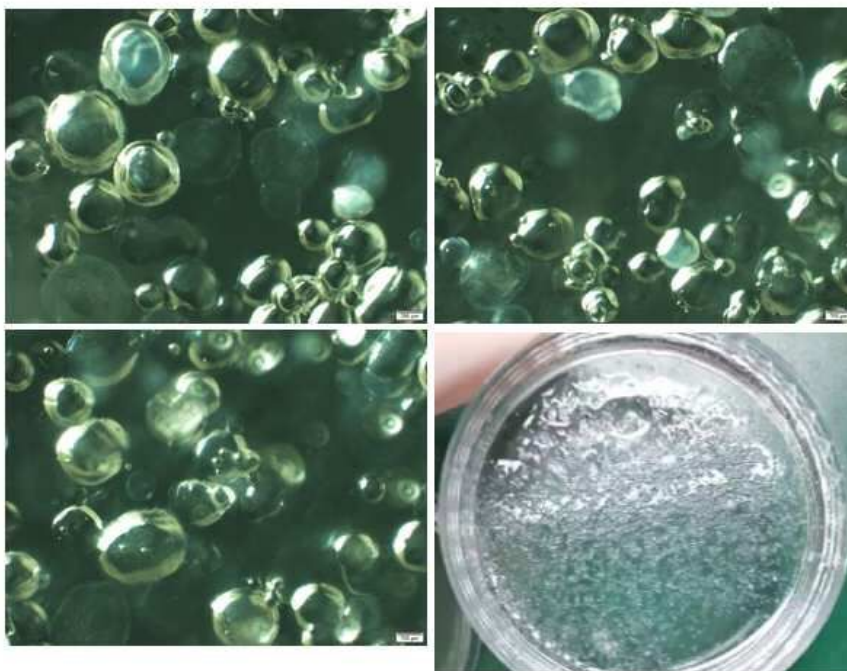
도면3



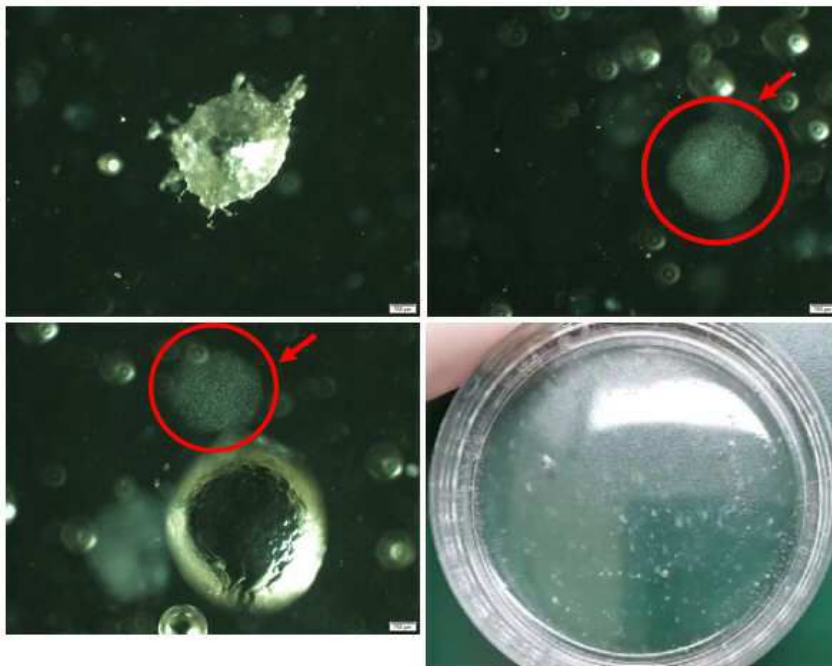
도면4



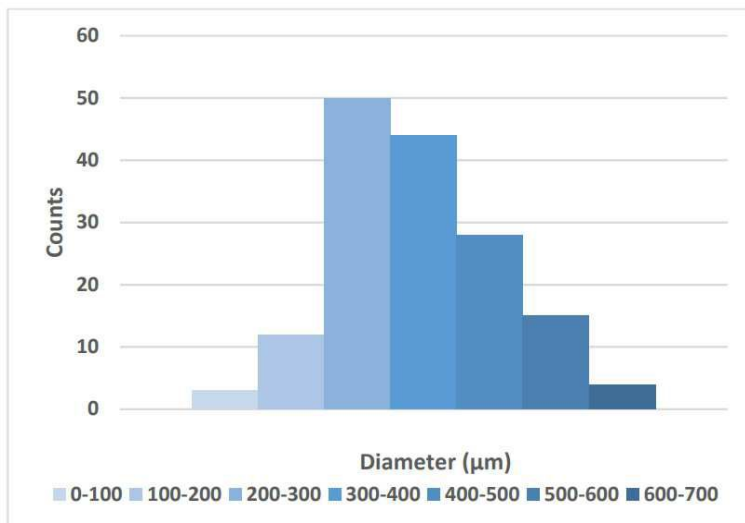
도면5



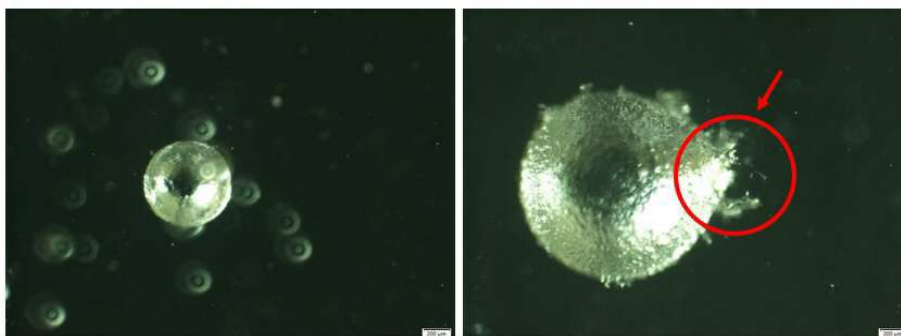
도면6



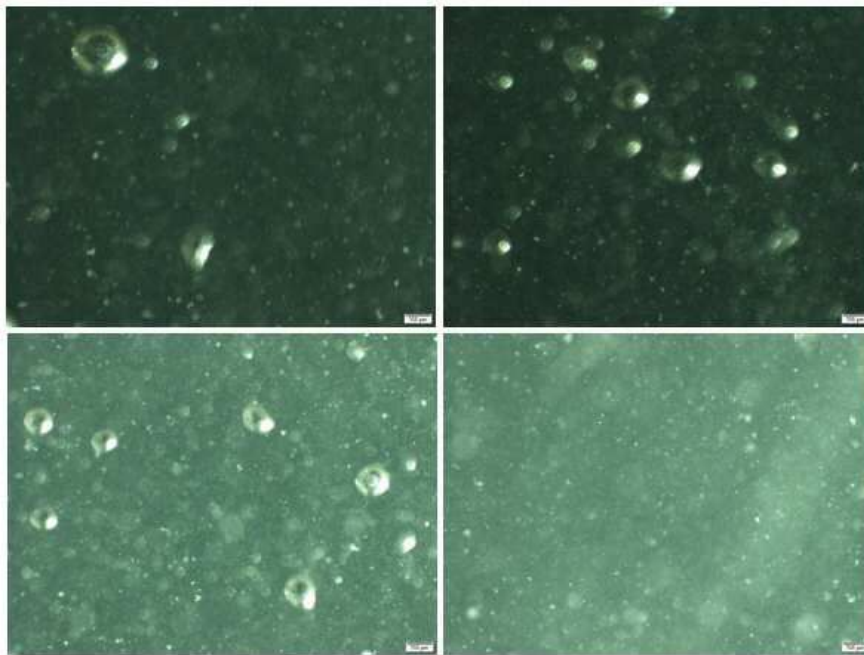
도면7



도면8



도면9



도면10

