(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0019379
(43) 공개일자 2025년02월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08F 251/00 (2006.01) *C08B 37/08* (2006.01)
C08F 2/38 (2006.01) *C08J 11/10* (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01) *C08K 5/20* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08F 251/00 (2013.01)
C08B 37/003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0100432
(22) 출원일자 2023년08월01일
심사청구일자 2023년08월01일

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
주식회사 마린바이오리소스
부산광역시 남구 신선로 365, 7공학관 222호 (용당동)
(72) 발명자
임성인
부산광역시 해운대구 센텀중앙로 145, 109동 1608호(재송동,더샵센텀파크1차아파트)
권혁택
부산광역시 남구 분포로 111, 126동 1603호(용호동, 엘지메트로시티)
울라, 아지즈
부산광역시 남구 유엔로201번길 18, 101호(대연동, 아름빌)
(74) 대리인
김정수

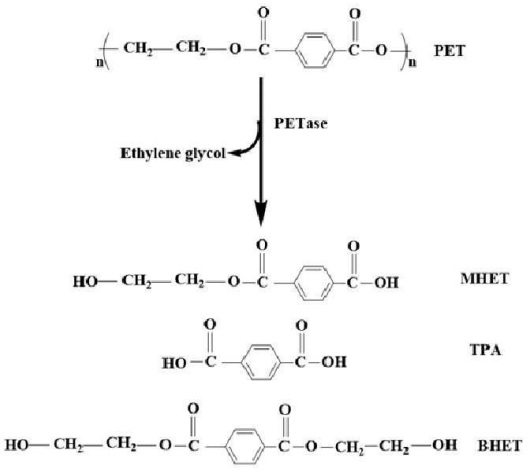
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **제어된 PETase 전달을 위한 하이드로겔 및 이를 이용한 미세플라스틱 분해**

(57) 요 약

본 발명은 제어된 플라스틱 분해 효소 예를 들어 PETase 전달을 위한 하이드로겔 및 이를 이용한 미세플라스틱 분해에 관한 것으로, 구체적으로 세리신-키토산 기반 pH 반응성 하이드로겔 및 상기 하이드로겔을 포함하는 플라스틱 분해 효소 예를 들어 PETase 전달용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C08F 2/38 (2013.01)
C08J 11/105 (2013.01)
C08J 3/075 (2013.01)
C08K 5/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525014448
과제번호	20220258
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 산업소재 국산화 기술개발
연구과제명	석유화학 소재 대체 친환경 해양바이오 플라스틱 소재개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	부경대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

세리신 (sericin), 키토산 및 아크릴산이 중합되어 형성된 하이드로겔.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세리신은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.2 내지 0.7 중량%로 포함되는 하이드로겔.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 키토산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.1 내지 0.5 중량%로 포함되는 하이드로겔.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 아크릴산은 8 내지 15 중량%로 포함되는 하이드로겔.

청구항 5

제1항에 있어서, 가교제 및/또는 중합개시제를 추가로 포함하여 형성된 하이드로겔.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 가교제는 N, N-메틸렌 비스-아크릴아미드인 하이드로겔.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 가교제는 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.1 내지 0.6 중량%로 포함되는 하이드로겔.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 중합개시제는 과황산암모늄인 하이드로겔.

청구항 9

제5항에 있어서, 상기 중합개시제는 0.3 내지 0.4 중량%로 포함되는 하이드로겔.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 하이드로겔을 포함하는 플라스틱 분해 효소 전달용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 제어된 플라스틱 분해 효소 예를 들어 PETase 전달을 위한 하이드로겔 및 이를 이용한 미세플라스틱 분해에 관한 것으로, 구체적으로 세리신-키토산 기반 pH 반응성 하이드로겔 및 상기 하이드로겔을 포함하는 플라스틱 분해 효소 예를 들어 PETase 전달용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 마이크로 플라스틱이라는 용어는 2000년대 초반 과학 문헌에서 해양 및 기타 수역에서 발견되는 작은 플라스틱 입자를 설명하기 위해 처음 도입되었다. 적합하게는 "마이크로 플라스틱은 규칙적 또는 불규칙한 형상을 가지며, 크기가 1 μm 내지 5 mm의 합성 고체 입자 또는 중합체 매트릭스이며, 1차 또는 2차 제조의 기원이며 물에 불용성이다". 마이크로 플라스틱은 전세계를 이동할 수 있고, 깨지기 어렵고, 뜨고, 경량 플라스틱 소재의 특징을 가진다. 플라스틱 폐기물의 생산량이 서서히 증가하면 음식 사슬에 들어갈 가능성도 높아져 인간의 건강에 위험을 초래한다. 마이크로 플라스틱이 인간의 식품 사슬 공급에 들어갈 수 있는 방법은 자연 환경에서의 동물 소비, 식품 제조 공정 중 오염 및 플라스틱 용기로부터 음료 및 식품에 침출되는 경우를 포함한다. 마이크로 플라스틱은 새우, 조개, 생선, 설탕, 소금, 맥주, 꿀 등 다양한 식품에서 발견된다. 분석 도구를 통해 샘물, 수돗물, 병 음료수 등 거의 모든 종류의 수원에서 마이크로 플라스틱을 검출했다. 마이크로 플라스틱이 기계적, 화학적 추가 분해되면 1 μm 이하 크기의 나노 플라스틱이 생성된다. 나노 플라스틱은 해양 생물과 다른 유기체에 의해 쉽게 섭취될 수 있어 동물과 그들이 서식하는 생태계 모두에 잠재적으로 해를 끼칠 수 있다. 마이크로 플라스틱과 나노 플라스틱이 궁극적으로 인체에 도달할 수 있는 세 가지 중요한 경로는 섭취, 흡입 및 피부 접촉이며, 가장 중요한 경로는 음식물로부터의 섭취이다. 일반적으로 마이크로 플라스틱은 주로 크기가 1.5 nm인 타이트 접합으로 인해 이웃 세포에 침투할 수 없지만, 림프 조직, 세포내이입 등의 생물학적 작용을 통한 침입 가능성이 있다. 괴사, 세포 사멸, 신체적 스트레스, 면역 반응, 산화 스트레스 등 마이크로 플라스틱과 나노 플라스틱이 인간에 미치는 다양한 해로운 영향이 여러 연구에서 밝혀졌다. 마이크로 플라스틱은 장세포벽을 투과할 수 없다는 오랜 믿음에도 불구하고, 암스테르담 자유 대학과 암스테르담 대학 의료 센터 연구자에 의해 마이크로 플라스틱이 처음으로 인간의 순환계에서 발견되었다. 평균적으로, 혈액 1 mL 당 1.6 μg 마이크로 플라스틱이 피검사자의 혈액 샘플에서 검출되었다.

[0003] 일반적으로 플라스틱 재료의 수명은 사용기한이 종료된 후에도 수백 년에서 수천 년에 이를 수 있으며 플라스틱 재료의 구조적 특성과 환경 조건에 따라 가변성이 매우 크다. 마이크로 플라스틱은 비생물학적, 광분해, 열적, 기계적, 생물학적 분해 등 다양한 다른 분해 메커니즘에 의해 분해될 가능성이 있다. 특히, 주요 생물학적 분해 기전으로서 일부 미생물은 플라스틱의 주성분, 즉 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET)를 에틸렌 글리콜과 테레프탈산을 포함하는 단량체 단위로 분해할 수 있다. *Ideonella sakaiensis*에서 분리된 "PETase"라고도 불리는 PET 분해 효소는 실온에서 PET를 분해할 수 있는 가장 효율적인 효소 중 하나이다.

[0004] 이러한 기술적 배경하에서, 본 출원의 발명자들은 세리신, 키토산 및 아크릴산으로부터 자유 라디칼 중합을 통해 합성된 안정화된 하이드로겔 시스템을 통해 플라스틱 분해 효소 예를 들어 PETase를 특정 pH 의존적으로 방출시킬 수 있고, 경구 섭취를 통해 위산에 의한 손상 없이 PETase를 소/대장으로 능률적으로 전달할 수 있는 운반체 체계의 의도한 기능을 보여줄 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 제어된 플라스틱 분해 효소 방출이 가능한 하이드로겔 시스템을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 하이드로겔을 이용하여 플라스틱 분해 효소 전달용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 세리신 (sericin), 키토산 및 아크릴산이 중합되어 형성된 하이드로겔에 관한 것이다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 하이드로겔을 포함하는 플라스틱 분해 효소 전달용 조성물에 관한 것이다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따른 하이드로겔은 FTIR, PXRD, SEM 및 열분석(TGA/DSC)으로 특성을 분석하였으며, 안정화된 하이드로겔 시스템의 개발이 확인되었다. 하이드로겔은 pH 7.4에서 가장 큰 팽윤과 누적 PETase 방출 (96%)을 보였다. 하이드로겔 시스템에서 PETase 방출의 메커니즘은 다양한 수학적 모델에 의해 결정하고 비정상적인 운송 메커니즘과 함께 방출 Higuchi 패턴을 보였다. PETase의 방출 후 구조적 무결성은 보존된 단백질 구조를 확인하는 SDS-PAGE 기술에 의해 확인되었다. 방출된 PETase의 마이크로 플라스틱 분해 활성은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 (PET) 분말을 pH 9.0의 글리신 NaOH 배지에 첨가하여 시험 관내에서 평가되었으며 PET 농도와 시간 의존 분해가 나타났다. 화학적으로 가교된 개발한 하이드로겔 체계는 마이크로 플라스틱 분해 효소 (PETase)의 결장에 전달에 능률적으로 사용될 수 있는, 자극에 민감한 운반체 체계의 의도한 기능을 보여주었다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1. PETase에 의한 PET의 효소 가수 분해의 결과로서 얻어진 생성물의 구조.

도 2. (A) 세리신, 키토산, 아크릴산으로부터 형성된 하이드로겔의 추정 구조, 및 (B) 성분에 기초한 색의 변화를 나타내는 합성된 하이드로겔 (아크릴산에서는 황색, 폴리머 공급 비율의 증가에 의한 암갈색).

도 3. 로딩되지 않은 하이드로겔, PETase 로딩, 방출 후 하이드로겔 시스템의 FTIR 스펙트럼.

도 4. 로딩되지 않은 하이드로겔과 PETase가 로딩된 하이드로겔 시스템의 XRD 회절 이미지.

도 5. (A, B) 변형없는 하이드로겔 디스크의 SEM 현미경 사진 및 (C, D, E, F) 2.5kx, 6.50kx 및 10 kx 배율로 다공성 구조를 나타내는 분말 하이드로겔의 단면 뷰.

도 6. 로딩되지 않은 또는 PETase 로딩된 하이드로겔 시스템의 TGA 온도 이미지.

도 7 로딩되지 않은 또는 PETase 로딩된 하이드로겔 시스템의 DSC 온도 이미지.

도 8. 하이드로겔 시스템의 졸-겔 분획에 대한 중합체, 단량체 및 가교제 농도의 영향.

도 9. 고분자, 단량체 및 가교제의 농도를 변화시킨 하이드로겔 시스템의 PETase 포획 효율(EE%). EE% 계산은 4 ℃ 용액에서 PETase의 초기 농도에 대한 하이드로겔 내의 PETase의 양에 기초하였다. 각 기준점은 세 번의 반복 평균을 나타낸다.

도 10. 하이드로겔의 팽윤 지수 및 누적 퍼센트 PETase 방출에 대한 중합체 공급 비율 (A, A1), 단량체 공급 비율 (B, B1) 및 가교제 공급 비율 (C, C1)의 영향. 각 기준점은 세 번의 반복 평균을 나타낸다.

도 11. 방출 후 PETase의 SDS-PAGE 분석. 레인 1은 분자량 사다리에 해당하고, 레인 2-7은 대조군의 PETase 용액 (μg)을 나타내고, 레인 8-10은 시험관 방출 후 04, 08 및 72 시간 경과 시 관찰된 PETase.

도 12. 방출된 PETase에 의한 PET의 농도 및 시간 의존성 분해시험을 30℃, pH 9.0의 글리신 -NaOH 버퍼 조건에서 수행한 결과.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0012] 본 발명을 통해 자유 라디칼 중합 기술을 사용하여 키토산, 세리신, 아크릴산의 새로운 pH 반응성 하이드로겔 네트워크를 합성한 것을 입증하였다. 준비된 하이드로겔은 FTIR, PXRD, SEM 및 열 분석 (TGA/DSC)을 특징으로 했다. 하이드로겔은 중합체와 단량체의 농도 증가에 비례하여 팽윤, %EE 및 in-vitro 방출의 증가를 나타내었지만, 가교제의 농도 증가에 반비례하였다. 최대 농도의 아크릴산 함량을 갖는 제형(ID, F6)에 대해, 최대 % EE, 팽윤 및 PETase 방출이 기록되었다. 젤 네트워크에서 PETase의 방출은 Fickian diffusion과 비정상적인 수송 메커니즘에 의해 촉진하는 Higuchi 패턴의 방출을 따랐다. 단백질의 캡슐화 효율과 방출은 하이드로겔 조성에 의존하였다. SDS-PAGE 분석은 방출된 PETase의 구조적 무결성을 확인하고 치료 단백질의 경구 전달에 대한 하이드로 겔 시스템의 적합성을 확인했다. 방출된 PETase는 농도 및 시간에 따른 in-vitro 마이크로플라스틱 분해의 가능성을 나타내며 PETase 효소의 제어 방출과 일치하였다. 하이드로겔 시스템은 경구 단백질 치료에 어려움을 극복할 가능성을 보여주며 PETase 효소의 pH 의존성 제어 전달 플랫폼으로 사용할 수 있다. PETase 전달 시스템은 결장에서 인간에 의해 투여된 PET 입자의 PETase 트리거 분해를 이용하기 위한 잠재적인 플랫폼으로 사용할

수 있다.

[0013] 이를 바탕으로 본 발명은 일 관점에서, 세리신 (sericin), 키토산 및 아크릴산이 중합되어 형성된 하이드로겔에 관한 것이다.

[0014] 상기 "하이드로겔"은 충분한 양의 수분을 보유하고 있는 친수성 고분자의 3차원적 구조를 의미한다. 본 발명에 따른 하이드로겔은 특히, 세리신 (sericin), 키토산 및 아크릴산이 중합되어 형성된 것이다.

[0015] Bombyx mori (누에)에 의해 생성된 접착제 질감 단백질 중합체인 세리신은 주요 구조 요소로 세린(32 %)을 포함하여 필수 아미노산을 포함하는 18 개의 다른 아미노산으로 구성된다. 다양한 아미노산 측쇄에 존재하는 카르복실기, 아미노기, 히드록실기 등의 다양한 극성기는 세리신과 다른 단량체 및 중합체의 중합에 관여한다. 세리신은 생체적합성과 생분해성의 폴리머로, 지능적인 생체재료의 개발에 단독으로 또는 다른 폴리머 부분과 조합하여 사용할 수 있다. 유사하게, 세리신, 키토산은 키틴의 탈아세틸화의 결과로서 얻어지는 천연 양이온성 중합체이며, 점막 접착성, 항균 활성, 생분해성, 생체적합성과 같은 흥미로운 특성을 가지고 있어, 생물 의학 응용 프로그램의 훌륭한 후보이다.

[0016] 상기 세리신은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.2 내지 0.7 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 세리신은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.25 내지 0.7 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 세리신은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.29 내지 0.69 중량%로 포함되었다.

[0017] 키토산은 세포 외 기질과 매우 유사하기 때문에 생물학적 제제의 전달, 세포의 조직화, 성장 및 이동에 생산적으로 사용된다. 또한, 키토산은 생물의학 응용의 필요성과 목적에 따라 화학적으로 쉽게 조정할 수 있으며, 매크로 및 나노입자, 필름, 스펀지, 하이드로겔 등의 많은 형상을 채용할 수 있다.

[0018] 상기 키토산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.1 내지 0.5 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 키토산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.15 내지 0.5 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 키토산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.19 내지 0.49 중량%로 포함되었다.

[0019] 프로피온산이라고도 불리는 아크릴산은 대장에 맞는 하이드로겔 시스템의 제조에 일반적으로 사용되는 pH 반응성, 생체접착성, 친수성, 기계적 강도 부여 단량체를 제공한다. 카르복실산 말단에 존재하는 아크릴산의 비닐기는 중합체 시스템을 형성하기 위해 중합될 수 있다. 또한, 아크릴산은 다성분 하이드로겔 시스템의 합성에 단독으로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0020] 상기 아크릴산은 8 내지 15 중량%로 포함될 수 있다. 구체적으로, 상기 아크릴산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 8 내지 14.5 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 아크릴산은 하이드로겔 총 중량을 기준으로 8.25 내지 14.25 중량%로 포함되었다.

[0021] 본 발명에 따르면, 세리신, 키토산 및 아크릴산의 pH 반응성 하이드로겔을 합성하였다. 합성된 하이드로겔은 매일 식품에서 인간이 섭취한 플라스틱 재료의 분해를 위한 플랫폼을 고안할 목적으로 결장에 맞춘 효소의 전달을 위한 자유 라디칼 중합(FRP) 기술에 의해 제조되었다.

[0022] 추가로, 세리신, 키토산 및 아크릴산의 pH 반응성 하이드로겔은 가교제로서 N,N-메틸렌 비스 아크릴아미드 (MBA), 개시제로서 과황산암모늄 (APS)을 사용하여 합성되었다.

[0023] 상기 가교제는 예를 들어, N, N-메틸렌 비스-아크릴아미드일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 가교제는 예를 들어, 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.1 내지 0.6 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 가교제는 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.19 내지 0.59 중량%로 포함되었다.

[0024] 상기 중합개시제는 예를 들어, 과황산암모늄일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 중합개시제는 예를 들어, 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.3 내지 0.4 중량%로 포함될 수 있다. 본 발명에 따른 구체적 실시예에서, 상기 중합개시제는 하이드로겔 총 중량을 기준으로 0.39 중량%로 포함되었다.

[0025] 자유 라디칼 중합 기술을 사용하여 키토산, 세리신, 아크릴산의 새로운 pH 반응성 하이드로겔 네트워크를 합성한 것을 입증하였다. 준비된 하이드로겔은 FTIR, PXRD, SEM 및 열 분석 (TGA/DSC)을 특징으로 했다. 하이드로겔은 중합체와 단량체의 농도 증가에 비례하여 팽윤, %EE 및 in-vitro 방출의 증가를 나타내었지만, 가교제의 농도 증가에 반비례하였다. 최대 농도의 아크릴산 함량을 갖는 제형(ID, F6)에 대해, 최대% EE, 팽윤 및 PETase 방출이 기록되었다. 젤 네트워크에서 PETase의 방출은 Fickian diffusion과 비정상적인 수송 메커니즘에 의해 촉진하는 Higuchi 패턴의 방출을 따랐다. 단백질의 캡슐화 효율과 방출은 하이드로겔 조성에 의존하였다. SDS-

PAGE 분석은 방출 된 PETase의 구조적 무결성을 확인하고 치료 단백질의 경구 전달에 대한 하이드로 겔 시스템의 적합성을 확인했다. 방출된 PETase는 농도 및 시간에 따른 in-vitro 마이크로플라스틱 분해의 가능성을 나타내며 PETase 효소의 제어 방출과 일치하였다. 하이드로겔 시스템은 경구 단백질 치료에 어려움을 극복할 가능성을 보여주며 PETase 효소의 pH 의존성 제어 전달 플랫폼으로 사용할 수 있다. PETase 전달 시스템은 결장에서 인간에 의해 투여된 PET 입자의 PETase 트리거 분해를 이용하기 위한 잠재적인 플랫폼으로 사용할 수 있다.

[0026] 합성된 하이드로겔은 매일 식품에서 인간이 섭취한 플라스틱 재료의 분해를 위한 플랫폼을 고안할 목적으로 결장에 맞춘 효소의 전달을 위한 자유 라디칼 중합(FRP) 기술에 의해 제조되었다. 이 연구의 결과는 효율적이고 제어된 방식으로 기능성 마이크로 플라스틱 분해 효소 (PETase)를 소/대장에 전달할 수 있는 안정적인 pH 반응성 하이드로 겔 시스템이다.

[0027] 이를 바탕으로, 본 발명은 다른 관점에서 하이드로겔을 포함하는 플라스틱 분해 효소 전달용 조성물에 관한 것이다. 특히, pH 반응성 하이드로겔에 탑재된 조성물은 산성인 위를 지나 중성인 소/대장에 도달 시 하이드로겔로부터 방출된 후 안정적으로 플라스틱 분해활성을 나타낼 수 있다.

[0028] 상기 전달은 플라스틱 분해 효소를 담지 혹은 화학적으로 결합시켜 생체 내로 전달할 수 있음을 의미한다. 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 화학적으로 가교된 하이드로겔 체계는 마이크로 플라스틱 분해 효소 (PETase)의 소/대장 전달에 능률적으로 사용될 수 있는, 자극에 민감한 운반체 체계의 의도한 기능을 보여주었다.

[0029] 상기 플라스틱 분해 효소는 예를 들어, "PETase"라고도 불리는 PET 분해 효소일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] PETase는 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 플라스틱을 모노머의 모노-2-하이드록시에틸 테레프탈레이트(MHET) 및 비스(2-하이드록시에틸)테레프탈레이트(BHET)로 가수분해할 수 있는 효소의 에스테라아제 클래스를 제공한다 (도 1).

[0031] 치료 그룹의 적절한 투여 경로는 효능을 증가시킬 뿐만 아니라 환자의 편의성 및 순응도를 증가시킨다. 대부분의 경우 단백질 기반 제형은 정맥 내, 근육 내 또는 피하 주사에 의해 투여되어 간단하고 효과적인 치료 방법을 제공한다. 한 연구에서 인슐린 사용자의 절반 이상이 어느 시점에서 의도적으로 주사를 건너 뛰었다고 보고했으며 20%가 정기적으로 주사를 건너 뛰었다고 보고하여 치료의 위험한 경과로 이어졌다. 게다가, 주사제로 장기 치료를 필요로 하는 병리학적 합병증은 복약 어드히어런스, 바늘의 크기에 의존하는 국소 자극, 주사에 대한 혐오감 및 통증 측면에서 과제를 초래한다. 많은 과학자 그룹은 경피, 뺨, 코 및 경구 경로와 같은 대체 전달 경로를 통해 투여 할 수 있는 단백질 제제의 개발을 시도해 왔다. 특히 경구 경로는 더 높은 정도의 편의성 및 안전성에 의해 선호되고, 매력적인 경로로 고려되고, 내인성 단백질의 생리적 운명을 모방하고, 환자의 삶의 질을 개선하여 치료 결과를 높인다.

[0032] 불행히도, 단백질 치료제의 경구 전달은 가혹한 위 환경에서 효소 절단 및 산 촉매 변성과 같은 심각한 장애에 의해 방해되어 왔다. 또한, 단백질은 소장의 효소에 의해 더 소화되어 장 상피를 통과하여 신체 순환에 흡수되기 어렵다. 보호되거나 변형되지 않은 단백질은 경구 경로에 의한 생체이용률이 매우 적다.

[0033] 위장관을 통과할 때 단백질을 보호할 수 있는 경구 전달 담체는 단백질의 안정성 한계를 극복하고, 경구 생체이용률을 개선하고, 보다 환자에게 허용되는 단백질 투여 수단을 제공할 수 있다. pH 반응성 하이드로겔은 단백질 치료제의 경구 전달을 가능하게 하는 큰 가능성을 나타낸다. 전체 위장관의 pH 구배는 신체 순환으로 수송을 위한 의도 된 부위에서 페이로드 방출의 적절한 트리거 메커니즘을 제공한다. 이와 관련하여, 키틴, 알긴산염, 히알루론산, 키토산 및 세리신계 하이드로겔 시스템과 같은 다양한 천연 중합체가 다양한 생물의학적 용도에 맞추어 사용되어 왔다.

[0034] 본 발명에 따른 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 비경구 투여인 경우에는 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 내피 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여 및 직장내 투여 등으로 투여할 수 있다. 경구 투여시, 단백질 또는 펩타이드는 소화가 되기 때문에 경구용 조성물은 활성 약제를 코팅하거나 위에서의 분해로부터 보호되도록 제형화될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0035] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토즈, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크와 같은 윤활제가 사용될 수 있다.

[0036] 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0037] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 한편, 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여된다. 여기에 사용된 용어 "약학적으로 유효한 양(pharmaceutically effective amount)"은 모든 의학적 치료에 적용가능한 합당한 이익과 위험 비율(benefit/risk ratio)로 충분한 질환 치료용 약학적 조성물의 양을 가리킨다. 유효량은 치료해야 할 질환의 중증도, 환자의 나이 및 성별, 질환의 종류, 약제의 활성도, 약제에 대한 민감도, 투여시간, 투여경로, 분비속도, 치료기간, 약제의 공투여 및 본 분야에서 알려진 다른 파라미터를 포함한 다양한 요인에 따라서 달라진다. 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 다른 치료법과 조합하여 투여될 수 있다. 이와 같은 경우에, 종래의 치료법과 함께 순서대로 또는 동시에 투여될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 1회량 또는 다회 용량으로 나누어서 투여될 수 있다. 이들 요인들을 완전하게 고려할 때, 부작용 없이 최대의 효과를 얻기에 충분한 최소량을 투여하는 것이 중요하며, 이 복용량은 분야의 전문가에 의하여 용이하게 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 복용량은 특별하게 한정되지는 않으나, 환자의 건강 상태 및 체중, 질환의 중증도, 약의 종류, 투여경로 및 투여시간을 포함한 다양한 요인에 따라 변경된다. 조성물은 하루에 1회량 또는 다회 용량으로 랫, 쥐, 가축, 인간 등을 포함하는 포유류 내로 전형적으로 허용된 경로, 예를 들면, 경구로, 직장으로, 정맥으로(intravenously), 피하로(subcutaneously) 투여될 수 있다.

[0039] 약학 조성물에서 플라스틱 분해 효소의 농도는 흡수, 불활성화 및 배출율 및 당 기술분야의 숙련자에게 알려진 다른 인자에 의해 결정될 수 있다. 투여량은 증상/질환의 심각도에 따라 달라질 수 있다. 또한 어떤 특정 환자에 대한 투여량 및 투여요법은 환자의 증상/질환의 정도, 필요성, 나이, 약물에 대한 반응성 등을 종합적으로 고려하여 투여 감독자의 직업적 판단에 따라 조정될 수 있으며, 본 발명에서 제시된 농도 범위는 단지 예시일 예이며 청구된 조성물의 실시양태를 이로 한정하는 것을 의도하지 않는다. 또한 활성 성분은 1회 투여될 수 있거나, 보다 적은 투여량을 수 회 나누어 투여할 수도 있다.

[0040] 실시예

[0041] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0042] 제조예

[0043] 자유 라디칼 중합(FRP free radical polymerization) 기술의 개념을 이용하여 표 1에 나타낸 바와 같이 다양한 농도의 세리신, 키토산, 아크릴산 및 가교제를 포함하는 일련의 제형을 제조하였다.

[0044] [표 1] 하이드로겔 제조 성분 함량

Formulation Code	% weight		Acrylic acid	MBA	APS
	Sericin	Chitosan	% weight	% weight	% weight
F1	0.29	0.19	9.9	0.39	0.39
F2	0.49	0.29	9.9	0.39	0.39
F3	0.69	0.49	9.9	0.39	0.39
F4	0.49	0.29	8.25	0.39	0.39
F5	0.49	0.29	11.25	0.39	0.39
F6	0.49	0.29	14.25	0.39	0.39
F7	0.49	0.29	9.9	0.19	0.39
F8	0.49	0.29	9.9	0.39	0.39
F9	0.49	0.29	9.9	0.59	0.39

[0045] * MBA for N, N-methylene bis-acrylamide * APS for Ammonium persulfate

[0046] 특정량의 키토산을 1% 아세트산에 용해시키고, 세리신, 과황산암모늄 및 MBA를 칭량한 양의 탈이온수에 용해시키고, 투명한 용액이 얻어질 때까지 연속적으로 교반하였다. 하이드로겔 시스템의 다양한 성분들의 혼합 순서는 다음과 같다. 개시제(initiator APS Ammonium persulfate) 용액을 연속적으로 교반하면서 아크릴산 용액에 서서히 첨가하였다. 이어서, 세리신 용액을 천천히 첨가한 후, 키토산 용액을 충분히 교반하면서 서서히 첨가하였다. 가교제(MBA N, N-methylene bis-acrylamide) 용액을 누적 용액에 적가하였다. 마지막으로, 탈이온수를 사용하여 다성분 혼합 용액의 중량을 100g으로 올리고, 10분간 충분히 교반한 후, 실온에서 10분간 초음파 처리하였다. 최종 용액을 미리 라벨이 붙은 병에 채우고 수조에 넣었다. 온도 처리를 55℃에서 4시간 동안 시작한 다음 60℃에서 밤새 배양하면 투명한 겔 시스템이 형성되었다. 생성물을 병에서 꺼내어 물과 에탄올의 혼합물(1:1)로 세척하고 약 8mm의 디스크로 절단하였다. 생성된 디스크를 먼저 실온에서 건조시킨 다음 항량 건조 디스크가 달성 될 때까지 45 ℃의 오븐에 넣었다. 건조된 디스크를 실온에서 기밀 용기에 보관하였다. 각 제제의 세척되지 않은 하이드로겔 디스크는 또한 졸겔 분획을 추정하기 위해 별도로 저장되었다.

[0047] 실시예 1. 합성 겔의 합성과 물리적 외관

[0048] 다성분 pH 반응성 겔 시스템은 자유 라디칼 중합 기술에 의해 제조되었다. 겔 구성 요소의 다양한 기능 사이의 가교 및 결합의 추정 합성 체계는 도 2A에 나와있다. 겔화 과정은 혼합물을 55℃에서 30분 동안 인큐베이션한 직후에 시작되었다. 개시제는 성분의 화학 골격에 자유 라디칼의 생성을 유도하여 아크릴산 단량체를 폴리 (아크릴산)으로 전환시킨 다음 세리신으로 화학 이식시켰다. 또한, 키토산 부분의 NH_2기와 폴리(아크릴산)의 OH기 사이의 이온 상호작용은 중합체 네트워크를 안정화시킬 것이다. 얻은 젤은 투명하고 도 2B와 같이 완전히 건조하고 나서 노란색이면서 어두운 갈색을 나타내었다. 컴포넌트 비율의 변화로 인해 얻은 겔 네트워크의 형태학적 거동도 바뀌었다. 중합체 공급비의 증가는 건조 겔의 보다 어두운 착색을 초래하였다. 아크릴산 함량의 증가는 황색으로 착색되어 겔계 탄성 타입의 표면을 초래하였다. 모든 제형은 연구를 통해 형태학적으로 안정한 채로 뛰어난 겔화 특성을 보였다.

[0049] 실시예 2. 특성 확인

[0050] 2.1. 합성된 하이드로겔의 FTIR spectroscopy

[0051] 합성된 pH 반응성 네트워크는 ATR-FTIR 분광법 (FT-4100 FT-IR spectrophotometer (JASCO, Japan))을 통해 분석하였고, 안정한 반응성 겔 네트워크의 형성으로 이어지는 겔 성분의 골격에 존재하는 다양한 작용기의 상호작용에 대한 통찰력을 제공한다. 로딩되지 않은 것, PETase 로딩된 것, 방출 후 하이드로겔 시스템의 FTIR 스펙트럼을 도 3에 나타내었다. 로딩되지 않은 하이드로겔 FTIR 스펙트럼은 스펙트럼 전체에서 변경된 흡수 밴드를 나타내며 하이드로겔 성분의 상호 그래프트가 성공했음을 보여준다.

[0052] 1695 cm^{-1}로 기록된 흡수 피크는 하이드로겔 시스템 중 (-COO-)기의 신축에 의한 것이다. 합성 하이드로겔 시스템의 FTIR 결과는 세리신 기반 하이드로겔에 대해 이미 보고된 연구 (M.M. Al-Tabakha, S.A. Khan, A. Ashames, H. Ullah, K. Ullah, G. Murtaza, N. Hassan, Synthesis, characterization and safety evaluation of sericin-based hydrogels for controlled delivery of acyclovir, Pharmaceuticals 14(3) (2021) 234.)와 상응한다. 2900 ~ 3300 cm^{-1}의 범위에 기록된 광범위한 특징적인 피크는 아크릴산의 OH기와 키토산 및 세리신의 NH기 중첩에 해당한다. 또한, 키토산과 세리신의 아미드 I, II, III로 인한 피크는 각 부분의 아미노기 사이의 수소 결합에 기초한 화학 복합체 형성에 의해 감소된다. PETase 로딩된 하이드로겔 FTIR 스펙트럼의 경우, 1160 cm^{-1}에 존재하는 브로드한 이중선 피크가 감소하고, 1400 cm^{-1}과 1059 cm^{-1}에 2 개의 새로운 피크가 나타난다. 이것은 캡슐화 된 PETase 중 아미드 III와 아미드-VI에 의해 발생할 수 있다. 1695 cm^{-1}에 존재하는 강한 피크는 PETase의 아미드-I 알파-나선, 아미드-II의 영향으로 더 낮은 파수(1548cm-1)로 이동하였다. 또한, 2927-3560 cm^{-1} 영역에 기록된 수정된 흡수 밴드는 로드된 하이드로겔 시스템에 PETase 아미드 A 및 아미드 B가 있음을 나타낸다. 하이드로겔 시스템은 pH 자극에 반응하는 동안 96% PETase를 방출했다. PETase를 로드한 하이드로겔 FTIR과 마찬가지로, 방출 후 하이드로겔 FTIR은 1059~1548cm^{-1}의 영역에서 강도가 낮은 유사한 패턴의 피크를 나타내며, 방출되지 않은 PETase가 4% 남아 있음을 보여준다. 또한 2700-3360 cm^{-1}의 영역에서도 변형 패턴이 관찰되었다.

[0053] 2.2 분말 X선 회절

[0054] X선 회절 패턴 (PANalytical X'Pert^3-Powder, Netherlands analysis system)을 실행하여 하이드로겔과 그 성분의 결정화도를 확인하였다. 로딩되지 않은, 및 PETase 로딩된 하이드로겔에 대한 회절 이미지는 도 4에 나와 있다. 분말에 의한 X 선 회절은 강력하고 일반적으로 사용되는 물질 분석용 접근법 중 하나이다. 공백 하이드로겔 시스템은 얻은 하이드로겔 중 비정질 특성을 나타내는 2Θ = 20° 에서 광범위한 피크를 보였다. PETase를 로딩한 하이드로겔계는 2Θ～23° 에서 넓고 강도가 낮은 피크를 나타내고, 로딩된 하이드로겔 시스템 중 비정질 특성의 발달로 인해 PETase의 흡착이 나타나고 있다.

[0055] 2.3. 주사 전자 현미경 (SEM)

[0056] 하이드로겔 시스템의 표면 형상 평가를 위해 scanning electron microscope TESCAN (VEGA Ⅱ LSU, Czech Republic)를 사용하였다. 하이드로겔 시스템의 형태와 미세구조는 EE%, 팽윤 지수, 방출 프로파일 및 전반적인 자극 반응성을 결정하는데 매우 중요한 역할을 한다. 동결건조된 온전한 하이드로겔 (A, B) 및 분말화된 하이드로겔의 전자 현미경 사진 (C, D, E, F)을 도 5에 나타내었다. 변형없는 하이드로겔 시스템의 표면 형태는 미세하게 크랙되고, 샤프한 에지를 포함하며, 거친 표면을 보였으며, 배율을 올리면 다공질 구조가 확인되었다. 분말 하이드로겔 시스템의 단면 이미지는 명확하게 정의된 다공성 구조를 나타냈다.

[0057] 2.4 열 분석

[0058] TA Instruments (TMA Q400, Japan)을 이용하여 분석하였다. 열중량 분석(TGA Thermogravimetric analysis)을 하이드로겔과 그 성분에 적용하여 열 안정성과 온도가 일정 속도로 상승함으로써 휘발성 분자의 증발에 의한 질량 손실에 의한 중량 변화를 결정했다. 로딩되지 않은 것 및 PETase 로드 하이드로겔의 TGA 써모그램은 도 6에 나와 있다. 물 분자 손실에 의해 로딩되지 않은 하이드로겔의 TGA 써모그램은 200℃에서 9% 손실을 보였다. 390℃에서의 두 번째 온도 변화는 하이드로겔 네트워크에 존재하는 화학적 가교의 분해로 인한 질량의 50% 손실의 원인이었고, 이어서 450℃에서 하이드로겔이 완전히 분해되었다. PETase를 로딩한 하이드로겔 TGA 써모그램은 150℃에서 이동을 보였고 결합된 물 분자의 증발로 인한 질량의 10% 손실을 초래했다. 두 번째 전이는 190℃에서 관찰되며 280℃까지 계속되며 키토산 기반 글리코시드 결합과 세리신의 펩티드 결합이 서서히 분해되어 질량이 23% 감소한다. 세 번째 열 이동은 290℃에서 관찰되었고, 420℃까지 계속되고, 65% 기여한 다음, 500℃에서 잔류물이 형성되어, 하이드로겔 네트워크의 완전한 분해를 나타낸다.

[0059] 로딩되지 않은 것 및 PETase 로드 하이드로겔 시스템의 하이드로겔 성분의 열 특성을 밝히는 DSC 써모그램은 도 7에 나와있다. 하이드로겔 시스템의 DSC 써모그램은 첫 번째는 200℃, 두 번째는 298℃, 세 번째는 400℃에서 급격히 나타난다. 첫 번째 피크는 결합된 물 분자의 손실로 인한 반면, 두 번째 피크는 글리코 시드와 다른 단백질 결합의 절단으로 인한 반면, 세 번째 피크는 500℃까지 계속되는 하이드로겔 네트워크의 완전한 분해를 나타내며 하이드로겔 네트워크의 향상된 열 안정성을 보여준다. PETase를 로드한 하이드로겔 DSC 서모그램은 여러 개의 흡열 피크를 보였다. 첫 번째 피크는 140℃에서 나타나고 물에 결합된 분자의 손실에 할당되며 200℃와 250℃에서 관찰된 두 번째와 세 번째 시프트는 글리코시드, 단백질 결합 및 PETase 효소의 2 차 구조의 열전이를 보여준다. 네 번째 전이는 420℃에서 관찰되며 500℃까지 계속된다. 이것은 완전한 잔기 형성을 가진 PETase를 로딩한 하이드로겔 네트워크의 완전한 분해를 보여준다.

[0060] 실시예 3. 졸겔 함량 분석

[0061] Soxhlet apparatus를 사용하여 졸-겔 분석을 수행하여 반응 겔 성분의 가교 부분과 비가교 부분의 비율을 설명하는 반응 및 미 반응 겔 함량을 결정하였다. 졸-겔 함량은 다음의 식에 의해 결정되었다.

$$Sol\ fracion\ (\%) = \frac{Mi-Me}{Me} \times 100 \quad \text{..... (1)}$$

$$Gel\ fraction\ (\%) = 100 - sol\ fraction \quad \text{..... (2)}$$

[0062]

[0063] "*Mi*", "*Me*" represents the initial unwashed dried hydrogel weight, and final washed hydrogel weight respectively.

[0064] swelling coefficient (Q)는 다음의 식에 의해 결정되었다.

$$Q = \frac{Wh}{Wd} \quad \text{..... (3)}$$

Where "W_h" represents the weight of swollen hydrogel disc at any time interval t, while "W_d" represents the weight of dried hydrogel disc.

[0065]

[0066] 폴리머, 단량체 및 가교제 농도의 영향은 도 8에 나와 있다. 중합체 함유 농도가 점차 증가함에 따라 겔 분율이 증가하고 있음이 분명하다. 단량체(아크릴산)의 경우, oxaliplatin 및 acyclovir 의 결장 전달에 사용된 하이드로겔에 기초한 연구 결과에 의해 뒷받침되는 바와 같이, 단량체 농도가 증가함에 따라 겔 분율도 증가하였다. 가교제의 농도가 증가하면 겔 분율의 향상도 관찰되고, 가교 부분의 농도가 증가하면 가교 밀도가 증가하여 겔 구조를 형성하는 점점 많은 폴리머 사슬이 관여한다는 사실이 뒷받침되었다.

[0067] 실시예 4. PETase의 흡착 및 포착 효율

[0068] 대장균에서 발현된 PETase는 합성된 하이드로겔의 포획 효율 및 방출 프로파일을 결정하기 위한 모델 단백질로서 사용되었다. 4℃에서 72시간이 경과한 후 폴리머, 단량체 및 가교제의 농도를 변화시킨 다양한 하이드로겔 제제의 포획 효율(EE%)을 도 9에 나타내었다.

[0069] PETase의 percent encapsulation or entrapment efficiency (EE%)는 다음의 식에 의해 결정되었다.

$$EE\ (\%) = \frac{Co - Cf}{Co} \times 100 \quad \text{..... (4)}$$

Where C_o is the initial concentration of PETase in solution, while C_f is the final concentration of protein in solution.

[0070]

[0071] 성분은 각각 36%, 39%, 41%로 유지되었다. EE%는 아크릴산, F4(42%), F5(49%) 및 F6(61%)의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. 이러한 거동은 pH 7.4에서 더 높은 팽윤으로 인한 것일 수 있으며, 그 결과 폴리머 사슬의 완화 현상이 발생하여 기공이 확대되어 단백질 분자의 유입이 촉진된다. 또한 PETase의 등전점 (PI)은 ~9.65이다. 따라서, pH 7.4에서 PETase는 양으로 하전되지만 전체 하이드로겔 시스템은 아크릴산 카르복실기의 탈양성자화에 의해 음으로 하전되어 강한 이온 상호 작용이 생성된다. 유사한 pH-기반 상호작용 및 결과 단백질(리소자임)의 로드 증가는 pH 7.4의 셀룰로오스-기반 하이드로겔에 대해 보고되었다. F7, F8 및 F9 제형의 EE%는 가교제 농도가 증가함에 따라 감소하여 각각 53%, 48% 및 29%가 되었다. 이는 겔 네트워크의 소형화로 이어지는 가교 밀도의 증가 때문이다. 하이드로겔 시스템의 %EE는 큰 단백질 캡슐화에 사용되는 다른 하이드로겔 시스템(%EE 45-55)과 동등했다.

[0072] 실시예 5. 팽윤 및 PETase 방출에 대한 중합체 함량의 영향

[0073] 일련의 하이드로겔 제제 중, 키토산과 세리신의 함량을 변화시킨 ID(F1, F2, F3)의 3가지 제제를 조제하였다. 상응하는 제형의 팽윤 및 PETase 방출 프로파일을 도 10A 및 10A1에 나타내었다. 두 폴리머 그룹 모두 골격에 아미노기를 가지고 있다. 고분자 함량의 농도가 증가하면 아미노기의 수가 증가하고 주변 pH 변화에 반응한다. 팽윤 및 방출 프로파일은 모두 중합체 부분의 농도가 증가함에 따라 증가하였다. pH 1.2에서, 아미노기가 양성자화되어 양전하를 띤 시스템이 생성되고, 양성자화된 아미노기가 미치는 반발력에 의해 중합체 사슬이 완화된다. 반발은 기공을 생성하고 겔 네트워크에서 더 많은 용매를 유입시켜 겔 시스템의 pH 유도 반응을 증가시킨다.

[0074] 0 차 모델, 1 차 모델, Peppas 모델 및 Higuchi 모델을 시험관내 PETase 방출 실험에서 얻은 데이터에 적용했다. 이와 관련하여 다음 식이 사용되었다.

Zero Order Kinetics Equation $Q_t = Q_o K_o t$ ..... (5)

Where Q_0 represents the amount of PETase released at the time "t_o", Q_t is the amount of PETase released at a particular "t", while K_o denotes the zero-order rate constant.

First Order Kinetics Equation $\ln M_t = -K_1 t + \ln M_o$ ..... (6)

M_t represents the amount of remaining PETase at time "t", M_o denotes the initial PETase amount, K_1 is the first-order rate constant.

Korsmeyer-Peppas Model $\ln\left(\frac{Mt}{M\infty}\right)^n = \ln Kp + n \ln t$ ..... (7)

(M_t/M_∞) shows the amount of PETase released at the time 't' and n shows the slope defining the type of polymer matrix diffusion process.

Higuchi Equation $M = K_H t^{1/2}$ ..... (8)

[0075]

[0076] 전반적으로, PETase의 팽윤과 방출은 고분자 부분의 농도가 증가함에 따라 더 높은 pH에서 증가하는 것으로 관찰되었다. 양이온성 중합체로부터 형성된 하이드로겔 시스템의 동일한 pH 반응성은 다른 연구에서도 보고되어, 다양한 생리활성 분자의 전달에 사용되고 있다. 폴리머 농도가 증가함에 따라 팽윤이 증가하면 폴리머 사슬의 이온화가 증가하여 세리신과 같은 폴리머 부분에 0의 순 음전하가 생성된다. 고분자 농도의 증가는 고분자 골격에 존재하는 극성 작용기의 친수성 발현을 증가시켜 pH 1.2에서 용해 매질과 접촉하는 신속한 습윤, 흡수 및 용해 패턴을 초래하였다.

[0077] 실시예 6. 팽윤과 PETase 방출에 대한 아크릴산 함량의 영향

[0078] SDS-PAGE를 이용하여 하이드로겔 시스템의 pH-기반 팽윤 및 PETase 방출에 대한 아크릴산의 영향을 평가하기 위해, 3가지 제형 ID(F4, F5 및 F6)는 다른 제형 변수를 일정하게 유지하면서 다양한 농도의 아크릴 산으로 제형화했다. 아크릴산은 비닐 단량체의 일종으로, 골격에 불포화 카르복실기를 많이 가지고 있다. 비닐기는 카르복실 말단에 결합된다. 아크릴산 공급 비율의 증가는 키토산과 세리신의 매크로 라디칼 근처의 카르복실기 농도의 증가로 인해 중합체 부분의 그래프트율을 증가시켰다. 아크릴산 농도의 증가는 잠재적으로 강화된 가교를 초래하고, 키셀로겔에서 pH 반응성 탄성 중합체 사슬의 발달로 이어졌다. 가교에서의 동일한 증강은 다른 연구에서도 마찬가지로 보고되었다. pH 1.2에서, 하이드로겔은 카르복실기의 양성자화에 의해 붕괴되어, 팽윤 및 PETase의 방출을 감소시킨다.

[0079] 그러나 매체의 pH가 아크릴산의 pka를 초과하면 카르복실기는 시간이 지남에 따라 탈양성자 화되어 더 친수성으로 바뀐다. 이온화에 의한 친수성의 증가와 탈양성자화된 불포화 카르복실기의 정전 반발에 의한 확대된 기공의 작성은 용매 분자의 유입을 촉진하여 pH 7.4에서의 팽윤을 촉진한다. 겔 네트워크 내의 삼투압은 더 많은 용매 분자의 침투에 따라 증가하여 가용화가 일어나고 PETase 분자가 지속적으로 방출된다. pH 1.2에서의 팽윤 및 방출 감소, pH 7.4에서의 팽윤 및 PETase 방출의 증가는 약물, 다면적 의학적으로 중요한 화합물 및 단백질 분자의 pH 의존성 방출과 관련된 이온 조건에서 수행된다. 제형 F6은 pH 7.4로 캡슐화 된 PETase의 96 % 방출을 나타내며 고등전점을 나타내는 단백질 전달을 위해 수행된 다른 보고된 연구와 비교하여 하이드로겔 시스템 방출 프로파일이 양호하다는 것을 나타낸다.

[0080] 실시예 7. 팽윤 및 PETase 방출에 대한 가교제 공급 비율의 영향

[0081] 화학적으로 가교된 겔의 중요한 요소인 가교제는 획득된 제품의 안정성, 내구성 및 조절 능력에서 매우 중요한 역할을 한다. 팽윤 및 방출에 대한 가교제 농도의 영향을 평가하기 위해 다양한 농도의 가교제(MBA)를 포함하는 ID(F7, F8, F9)를 가진 3가지 제제를 준비했다.

[0082] 인덱스 및 하이드로겔 시스템의 누적 방출 거동은 도 10C 및 10C1에 나와 있다. 가교제의 역할은 중합체 사슬을 서로 가교하는 것이다. 따라서, 가교제 농도가 증가함에 따라 가교 밀도와 겔 구조의 콤팩트함이 증가한다. 가교 밀도의 증가는 겔 시스템의 팽윤, 포획 및 후속 방출 프로파일의 감소를 초래한다. 가교 밀도가 높을수록 폴리머 매트릭스의 메쉬 크기가 작아진다. 팽윤 및 단백질 방출에 대한 가교제 농도의 증가의 효과의 결과는 생물

학적으로 활성인 분자의 방출을 위해 수행된 다른 하이드로겔 기반 연구의 결과에 해당한다.

[0083] 실시예 8. PETase 방출 속도

[0084] 시험관 내 용해는 의약품의 투여 형태를 개발하는 과정에서 중요한 요소 중 하나이며, 조건에 따라 생물학적 동등성 시험을 대체하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 전달 시스템을 설계할 때, 폴리머 매트릭스의 침식 능력, 페이로드의 용해도 및 확산능과 같은 몇 가지 요인을 미리 고려해야 한다. 중합체 매트릭스로부터의 페이로드의 방출은 확산 및 침식 공정에 의해 지원된다. 최적의 회귀값 (R2)을 1에 가깝게 하기 위해 다양한 수학적 모델이 적용되었다. Higuchi 모델의 R2는 1에 가깝고 (표 2), 하이드로겔 시스템으로부터의 PETase의 방출은 Fickian diffusion에 확산에 의해 촉진되는 Higuchi 방출 패턴을 따르는 것으로 밝혀졌다. 그라디언트 페퍼스 모델 (n)의 값은 0.5보다 크지만 1보다 작기 때문에 방출의 비정상적인 운송 메커니즘을 따른다.

[0085] [표 2] 방출 실험 중 PETase 방출 메커니즘

Formulation code	Zero-order R^2	First-order R^2	Higuchi model R^2	Peppas model R^2	n
F1	0.8372	0.9288	0.9608	0.6641	0.5598
F2	0.8268	0.9302	0.9582	0.6671	0.5736
F3	0.8041	0.9309	0.9442	0.5975	0.5384
F4	0.8824	0.9629	0.9778	0.6625	0.5595
F5	0.8697	0.9691	0.9743	0.6163	0.5462
F6	0.8338	0.9603	0.9696	0.5776	0.5424
F7	0.8998	0.9597	0.9763	0.6573	0.5664
F8	0.9323	0.9514	0.9689	0.7163	0.7163
F9	0.9303	0.9455	0.9659	0.7625	0.7625

*n, slope of Peppas model

[0086]

[0087] 실시예 9. PETase 방출 후 구조적 무결성 확인

[0088] PETase의 구조적 무결성은 로드 및 방출 프로세스 중에 영향을 받을 수 있으므로 SDS-PAGE 기술을 사용하여 결정되었다. 가능한 불리한 영향은 가수분해, 변성 및 응집을 포함한다. SDS-PAGE 실험은 하이드로겔 시스템으로부터의 방출 과정 3일 후에 수행되었고, 상이한 희석에 사용된 표준으로서 원래의 PETase 용액과 비교되었다. 분자량 래더는 레인 1에 표시된다. 레인 2-6은 대조군 PETase 용액 (μg)을 나타내고, 레인 7-10은 in-vitro 방출 실험 04, 08 및 72 시간 후에 수집된 방출 후 샘플에서 PETase의 존재를 나타낸다. 방출된 PETase 밴드는 28.6 kDa 표준 PETase 용액과 정확하게 일치하여 안정성과 구조적 무결성이 확인되었다 (도 11). 이것은 단백질 활성을 유지하기 위한 전제이다.

[0089] 실시예 10. 방출 PETase 마이크로 플라스틱 (PET) 분해 활성:

[0090] 효소 분해는 현재 PET 분해의 이상적인 방법 중 하나로 간주된다. 최근, 미생물 및 미생물 컨소시엄은 합성 생물학에서 중요한 연구의 방향성을 제공하고 있다. 미생물 컨소시엄은 단독 또는 조합하여 대사 산물을 방출하여 바이오버든 (bioburden)의 생분해를 보장한다. 대장균에서 발현된 방출 PETase의 마이크로 플라스틱 (PET) 분해 활성을 도 12에 나타내었다. 방출된 PETase는 기질에 대해 pH 9.0, 온도 30℃에서 농도 및 시간 의존적 활성을 나타내었고, 이를 단량체 단위로 전환시켰다. PET의 표면에 효소의 흡착은 관련된 가수분해 과정의 중요한 매개변수이다. 효소의 흡착은 PETase의 표면에 나타나는 소수성 아미노산 잔기와 PET 분자의 소수성 상호 작용 때문이다. 이 외에도 PETase 기반 PET 가수 분해의 성공은 PET 폴리머 사슬의 유연성에 따라 달라진다. PET 분자의 배향과 결정화도는 PET의 효소 가수분해에서 빌딩 블록에 중요한 역할을 한다. PETase 효소는 무질서한 비정질 영역에서 우선적으로 PET 사슬의 가수분해를 일으킨다. 일반적으로 PET 사슬의 결정화도가 증가하면 폴리머 사슬의 움직임과 유연성이 제한되어 효소에 의한 가수분해의 가능성이 감소한다. 그럼에도 불구하고, 비정질 영역의 효소 가수분해는 결정 영역에도 영향을 미치고, 두 영역을 결국 분해시킨다. 인간은 주로 인간의 음식 사슬로 들어가 다양한 해로운 영향을 미치는 PET 입자의 방출에 의해 영향을 받는다. 이러한 PET 입자는 일반적으로 PETase의 효소 가수분해를 받기 쉬운 다양한 수준의 결정화도를 나타내는 일상 생활에 사용되는 포장 재료 및

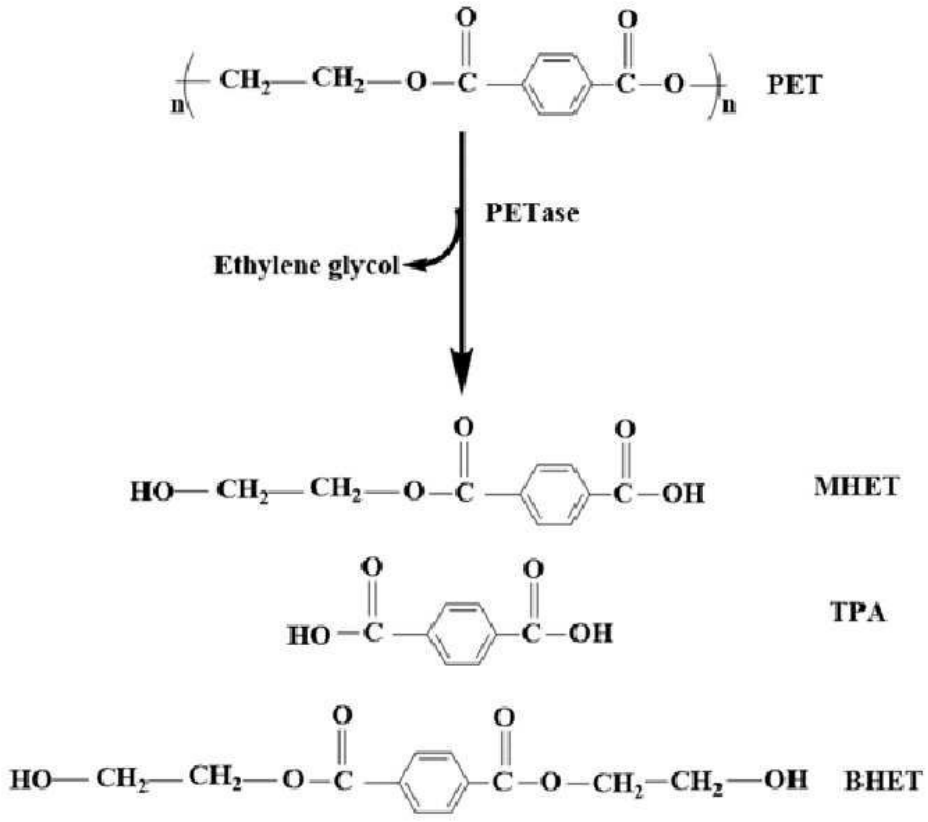
소모품에서 방출된다. 방출된 PETase의 효소 활성은 254 nm의 파장에서 집합적으로 검출할 수 있는 MHET, BHET, TPA 및 EG를 포함하는 단량체 생성물이 생성되도록 하는 소수적으로 상호작용하는 PETase 분자가 더 많을수록 PETase 농도의 증가와 관련된 시간이 증가함에 따라 증가한다.

[0091] 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다.

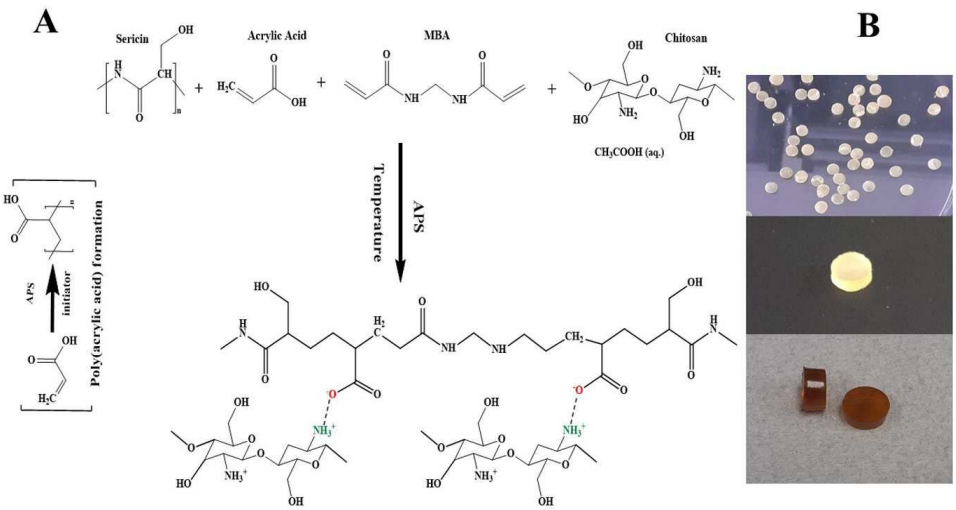
[0092] 본 발명은 '재)부산테크노파크'에서 주관하는 '2023년 지산학 협력 기업R&D 지원사업'에 의해 수행되었다.

도면

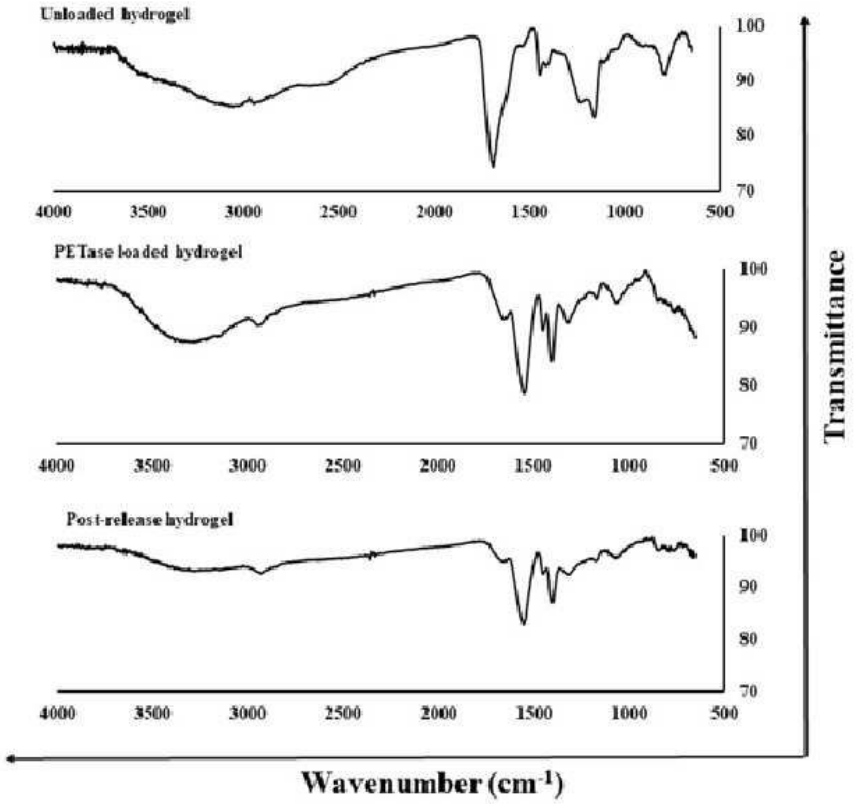
도면1



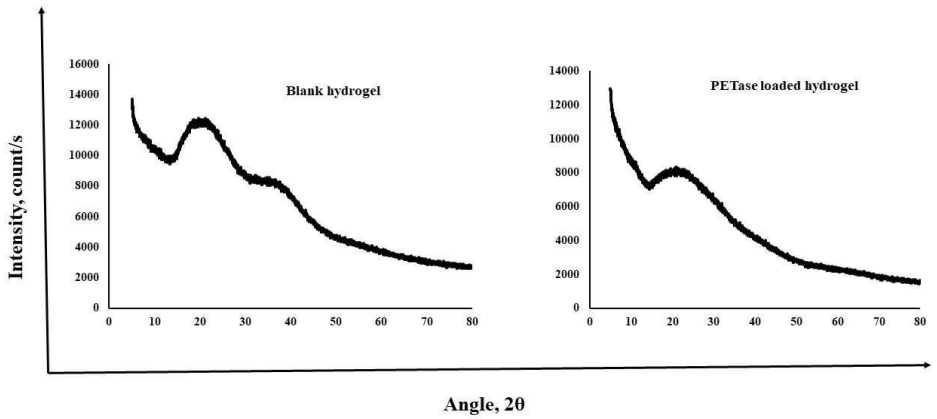
도면2


A
B
Sericin
Acrylic Acid
MBA
Chitosan
CH3COOH (aq.)
Temperature
APS
initiator
Poly(acrylic acid) formation

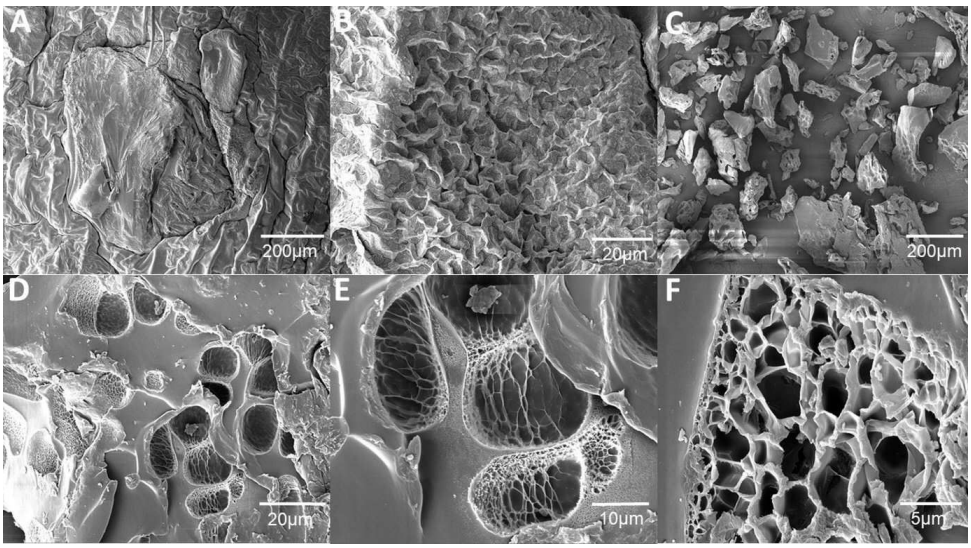
도면3


Unloaded hydrogel
PETase loaded hydrogel
Post-release hydrogel
Transmittance
Wavenumber (cm-1)

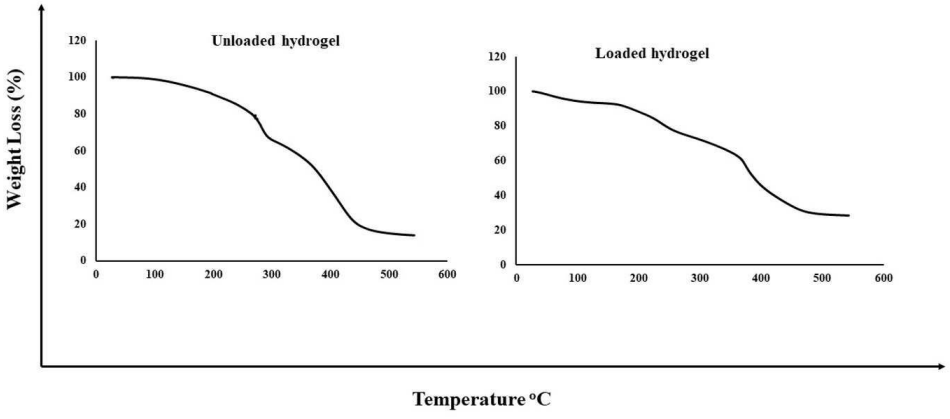
도면4


Blank hydrogel
PETase loaded hydrogel
Intensity, count/s
Angle, 2θ

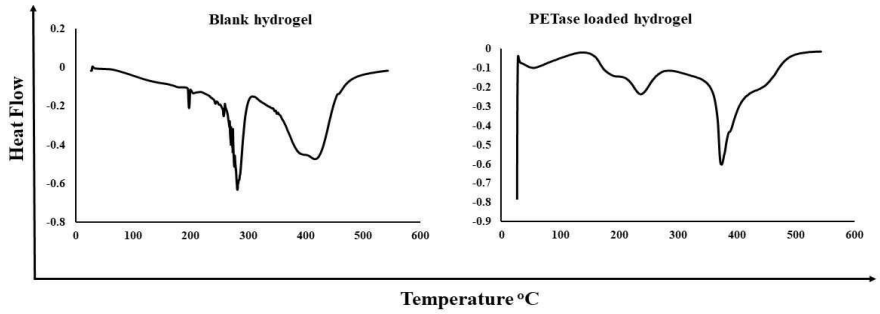
도면5


A
B
C
D
E
F
200μm
20μm
200μm
20μm
10μm
5μm

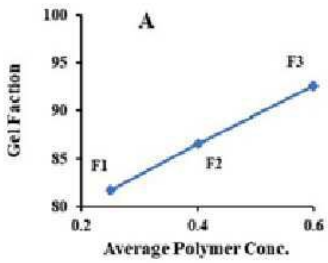
도면6

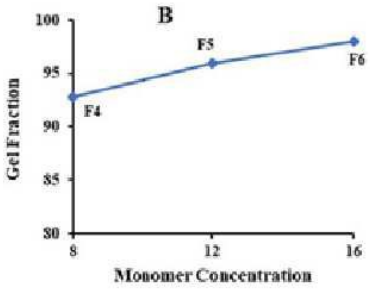

Unloaded hydrogel
Loaded hydrogel
Weight Loss (%)
Temperature °C

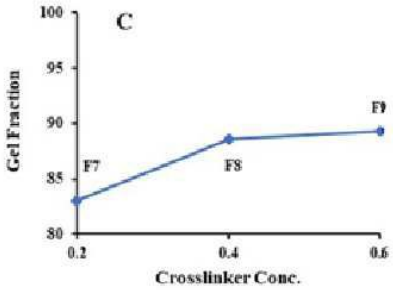
도면7


Blank hydrogel
PETase loaded hydrogel
Heat Flow
Temperature °C

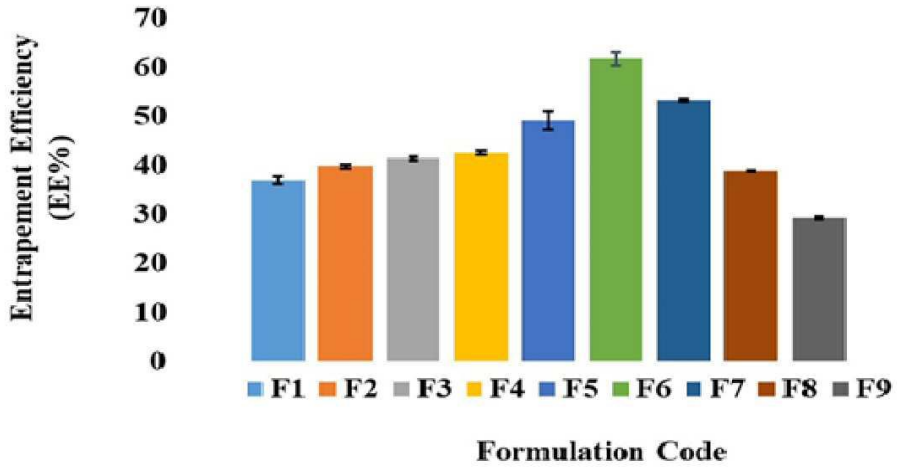
도면8


A
Gel Faction
Average Polymer Conc.
F1
F2
F3

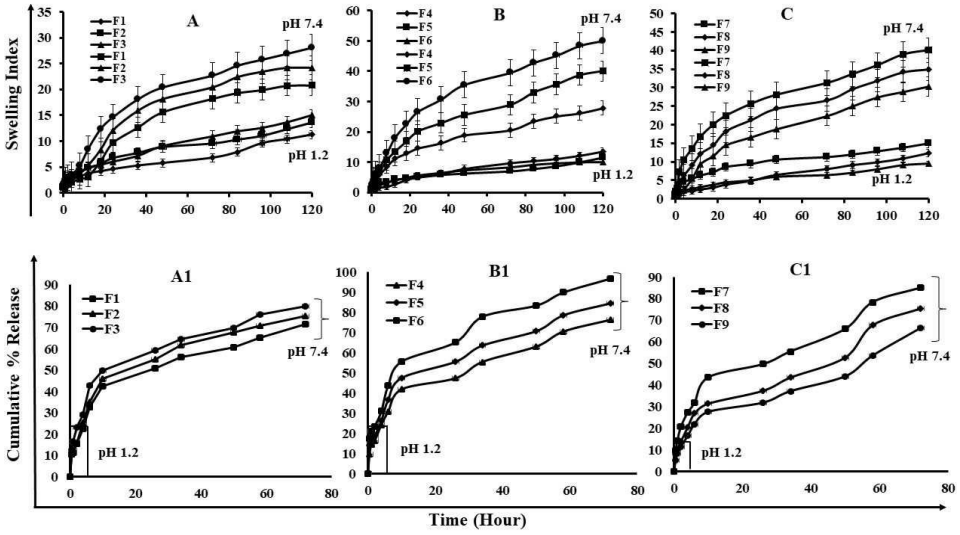

B
Gel Fraction
Monomer Concentration
F4
F5
F6


C
Gel Fraction
Crosslinker Conc.
F7
F8
F9

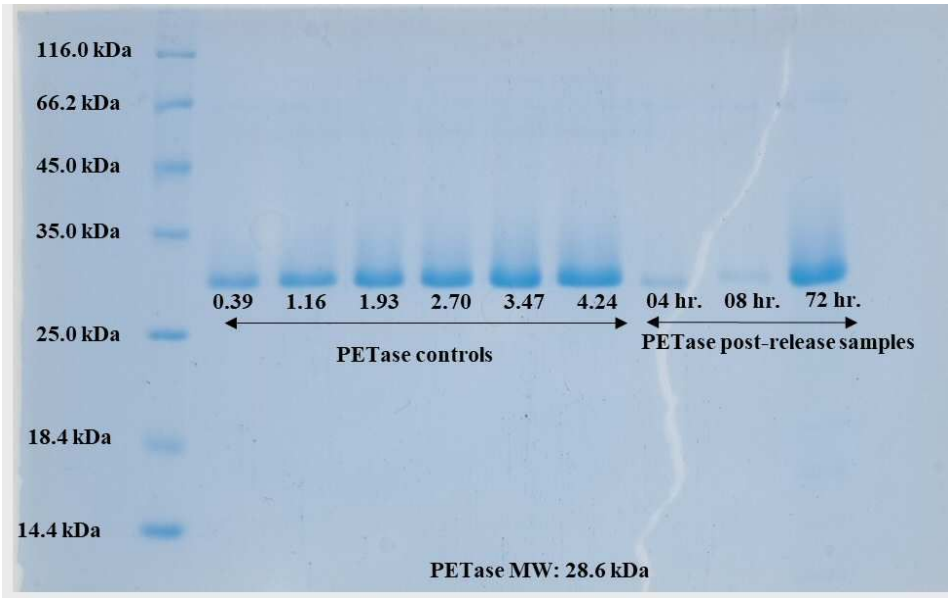
도면9


Entrapement Efficiency (EE%)
70
60
50
40
30
20
10
0
F1 F2 F3 F4 F5 F6 F7 F8 F9
Formulation Code

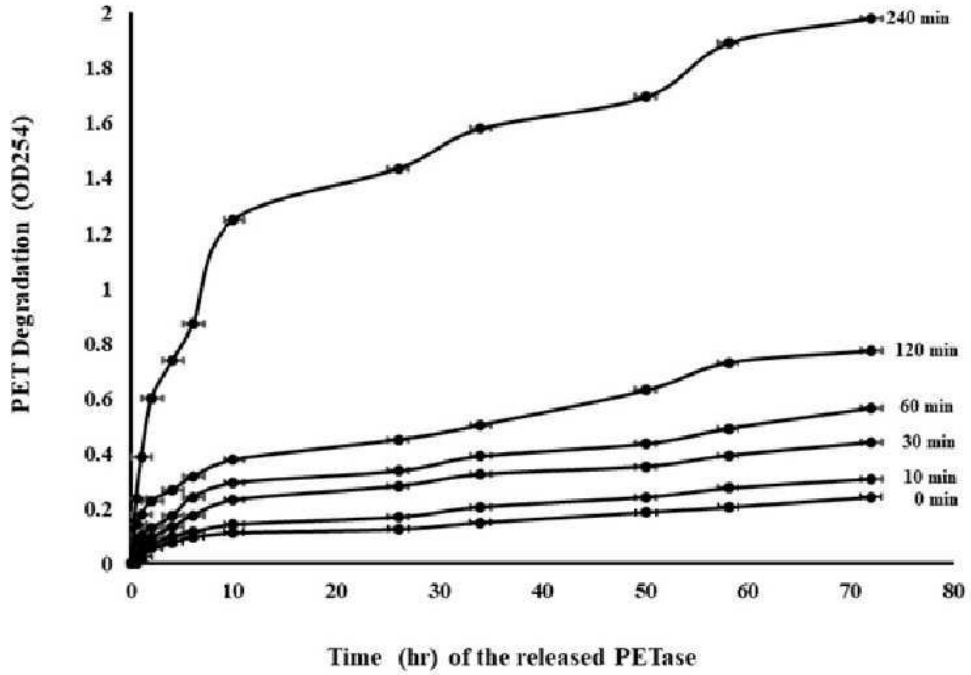
도면10


Swelling Index
A
B
C
pH 7.4
pH 1.2
F1
F2
F3
F4
F5
F6
F7
F8
F9
Cumulative % Release
A1
B1
C1
Time (Hour)

도면11


116.0 kDa
66.2 kDa
45.0 kDa
35.0 kDa
25.0 kDa
18.4 kDa
14.4 kDa
0.39
1.16
1.93
2.70
3.47
4.24
04 hr.
08 hr.
72 hr.
PETase controls
PETase post-release samples
PETase MW: 28.6 kDa

도면12


PET Degradation (OD254)
Time (hr) of the released PETase
240 min
120 min
60 min
30 min
10 min
0 min
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
2
0
10
20
30
40
50
60
70
80