



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0042608
(43) 공개일자 2019년04월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/08 (2006.01) A61K 38/07 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) C07K 14/435 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 9/08 (2013.01)
A61K 38/07 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7007002
- (22) 출원일자(국제) 2017년08월12일
심사청구일자 2019년03월08일
- (85) 번역문제출일자 2019년03월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/046659
- (87) 국제공개번호 WO 2018/031973
국제공개일자 2018년02월15일
- (30) 우선권주장
62/374,532 2016년08월12일 미국(US)
(뒷면에 계속)

- (71) 출원인
실크 테크놀로지스 리미티드
미국 미네소타 55447 폴리머스 스위트 105 아나폴리스 라인 노스 3700
- (72) 발명자
로렌스, 브라이언 디.
미국 플로리다 33609 탬파 샌드파이퍼 로드 51
인펜저, 데이비드 더블유.
미국 미네소타 55311 메이플 그로브 토리 라인 노스 6236
- (74) 대리인
구현서

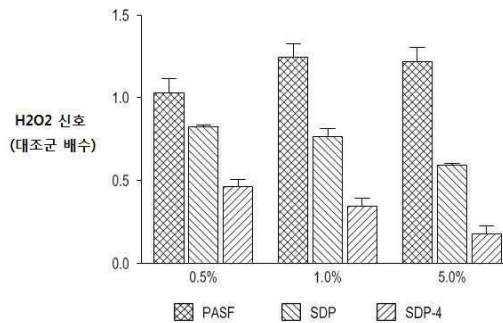
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **염증 치료용 실크 유래 단백질**

(57) 요약

염증성 이상을 갖는 대상에게 유효량의 실크-유래 단백질(SDP) 또는 이의 분획물을 투여함으로써 염증을 감소시키는 방법이 본원에 기술된다. 상기 방법은 본원에 기술된 바와 같은 유효량의 SDP 물질의 국소 투여를 포함하는 각막 상처를 포함하는 염증성 이상 및 상처의 치료를 포함한다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A61K 9/0048 (2013.01)
A61P 27/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
C07K 14/43586 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/407,863 2016년10월13일 미국(US)
62/467,697 2017년03월06일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

수용액에서 증가된 안정성을 보유하는 피브로인-유래된 단백질 조성물, 여기서:

상기 피브로인-유래된 단백질 조성물의 1차 아미노산 서열은 세린, 글리신 및 알라인의 아미노산 함량의 조합된 차이의 절대값에 대해서 천연 피브로인과 4% 이상 차이가 나고;

피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질의 시스테인 디설파이드 결합들은 감소 또는 제거되고;

상기 단백질 조성물에서 복수개의 펩타이드 체인이 아미드(-C(=O)NH₂)기들에서 종결되고;

상기 조성물은 천연 피브로인과 비교하여 세린 함량이 25% 이상 감소되고, 여기서 세린 함량은 약 5% 이상; 및 여기서 상기 피브로인-유래된 단백질 조성물의 평균 분자량은 40 kDa 이하 및 2 kDa 이상임.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물의 단백질 체인의 50% 이상이 10 kDa에서 60 kDa 범위의 분자량을 가지는 단백질 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 10% w/w까지의 농도에서 상기 단백질 조성물의 수용액의 초음파 처리시에 젤화가 되지 않는 단백질 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 8% 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함하는 단백질 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 46.5% 이상의 글리신 아미노산을 포함하는 단백질 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 30.5% 이상의 알라닌 아미노산을 포함하는 단백질 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 박막으로 건조된 후 물에 완전하게 재용해되는 단백질 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 수용액에서 베타-시트 단백질 구조가 결핍된 단백질 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 5초 이상 초음파 처리 후 수용액에서 550 nm에서 0.25 이하의 흡광도를 유지하는 단백질 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 상기 단백질 조성물, 물 및 선택적으로 하나 이상의 완충 매질, 염, 안정화제, 보존제 및 윤활제를 포함하는 안과 제제.

청구항 11

피브로인 유래 단백질 조성물을 염증 조직에 투여하는 것을 포함하는 염증 감소 방법;

여기서, 피브로인 유래 단백질 조성물의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌의 아미노산 함량의 조합된 차이의 절대값에 대해 천연 피브로인과 4% 이상 상이하고;

피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되며;

상기 단백질 조성물 중의 복수의 펩타이드 체인은 아마이드(-C(=O)NH₂)기로 종결되며;

상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 25 % 이상 감소된 세린 함량을 가지며, 여기서 세린 함량은 약 5 % 이상; 및

상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량은 60 kDa 이하 및 10 kDa 이상이고;

그것에 의하여 상기 조직의 세포핵 내 전사 인자 신호 전달을 감소시킴으로써 염증을 감소시킴.

청구항 12

제11항에 있어서, 염증 조직에 상기 투여가 하나 이상의 염증 유전자 TNF- α , MMP-9, IL-1 β 및 IL-6의 전사를 감소시키는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 투여가 각막에 투여되고, 상기 투여가 각막에서 MMP-9의 존재를 감소시키는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 투여가 눈에 투여되고, 상기 투여가 눈 표면상의 염증을 감소시키는 방법.

청구항 15

제11항에 있어서, 염증의 상기 감소가 염증의 지점에서 세포 이동 속도의 증가를 동반하는 것인 방법.

청구항 16

제11항에 있어서, 상기 단백질 조성물이 40 kDa 이하의 평균 분자량을 갖는 방법.

청구항 17

제11항에 있어서, 상기 단백질 조성물이 35kDa 이하의 평균 분자량을 갖는 방법.

청구항 18

제11항에 있어서, 상기 피브로인 유래 단백질 조성물이 완충 매질, 염, 안정 화제, 방부제 및 윤활제 중 하나 이상을 포함하는 안과 제제에 용해되는 방법.

청구항 19

제11항에 있어서, 상기 염증은 안과적 이상에 의하여 야기되고, 여기서 안과적 이상은 안구 건조증, 각막 궤양, 각막 침식, 각막 마모, 각막 변성, 각막 천공, 각막 상처, 상피 결장염, 각 결막염, 특발성 포도막염, 각막 이식, 연령 관련 황반변성, 당뇨병성 안질환, 안검염, 녹내장, 눈의 고혈압, 수술 후 눈의 통증 및 염증, 후방 신생 혈관 형성, 증식성 유리체 망막병증, 거대세포 바이러스 망막염, 안내염, 맥락막 신생혈관막(choroidal neovascular membrane), 혈관 폐색성 질환(vascular occlusive disease), 알레르기성 안 질환, 종양, 색소성 망막염(retinitis pigmentosa), 눈 감염, 공막염, 안검 하수증, 동공증(miosis), 눈 통증, 산동증(mydriasis), 신경통(neuralgia), 간질성 눈의 표면 질환(cicatrizing oclar surface disease), 눈의 감염, 염증성 안 질환, 눈의 표면 질환, 각막 질환, 망막 질환, 전신 질환의 눈의 발현, 유전성 안 질환, 안 종양, 안압 상승, 헤르페스 감염, 상아질(prigidium) 또는 공막(scleral) 종양, 눈의 표면에 지속된 상처, 광굴절형 각막절개술 후(post-photorefractive keratotomy) 안 통증 및 염증, 각막에 열 또는 화학적 화상, 공막 상처 또는 원추각막 및 결막 상처인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 염증은 안구 건조증에 의하여 야기된 방법.

청구항 21

염증 치료용 피브린 유래 단백질의 용도, 여기서 상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌의 아미노산 함량의 조합된 차이의 절대값에 대해 천연 피브로인과 4% 이상 상이하고; 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되며; 상기 단백질 조성물 중의 복수의 펩타이드 체인은 아마이드(-C(=O)NH₂)기로 종결되며; 상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 25 % 이상 감소된 세린 함량을 가지며, 여기서 세린 함량은 약 5 % 이상이고; 여기서 상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량은 60 kDa 이하 및 10 kDa 이상임.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 단백질 조성물은 35kDa 이하의 평균 분자량을 갖는 것인 용도.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 조성물은 안구 건조증의 치료를 위한 조성물인 용도.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원들

[0001]

[0002] 본 출원은 2016년 8월12일에 출원한 미국 가출원 번호 62/374,532, 2016년10월13일에 출원한 62/407,863, 및 2017년3월6일에 출원한 62/467,697에 대해서 우선권을 주장하며, 상기 우선권 출원들은 본 출원에 참고로 인용된다.

[0002]

연방정부의 지원

[0003]

[0004] 본 발명은 국립 과학 재단에 의하여 지원된 등록번호 1152561 및 미 육군에 의하여 지원된 인가 번호 A151-061-0107호 하의 정부 지원에 의하여 만들어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 가진다.

[0004]

배경 기술

[0005]

염증은 항상성을 회복시키려는 시도에서 유해한 자극 (예를 들어, 감염) 또는 국소 조직 손상에 대한 피해를 입은 세포의 협력 반응을 기술한다. 이러한 비정상적인 조건에 존재하는 세포의 노출은 염증 매개체의 생성 및 분비를 초래하는 세포 내 신호 전달 계류를 개시한다. 이러한 염증성 물질의 국부적인 침착은 간질 및 혈관계로부터 면역 세포 (예 : 호중구)를 상해 또는 손상 부위로 모집하는 역할을 한다. 그 자극의 성공적인 제거는 조직 회복을 수반하고 이것은 새로운 면역 세포 타입 (예를 들어, 마크로파지) 및 신호전달 중재자들을 도입하고 급성 염증 반응을 완결한다(Medzhitov, *Nature*, 2008. 454(7203): 428-435). 그러나 만약, 조직의 항상성이 이 기간 내에 달성되지 않으면 만성 염증 반응이 일어나서 추가적인 면역 세포들을 그것을 포함하려고 손상 상해 부위에 도입된다. 그럼에도 불구하고, 만성 염증은 영구적으로 건강한 조직 상태를 손상시킬 수 있다. 만성 염증에서 비롯된 조절되지 않은 신호 전달 경로는 안구 건조증, 자가 면역 질환, 심혈관 질환 및 암을 포함하는 수많은 질병에 연루되어 있다.

[0006]

면역 반응의 유발 원인은 숙주에 대해 외인성 일 수 있지만, 비정상적인 세포 신호 전달로 인한 국소 조직의 항상성의 붕괴도 면역 세포 모집 및 반응을 유도하는 신호 분자의 농도 구배를 생성할 수 있다. 예를 들어, 눈의 선단(apical) 표면에서 눈물 막 조성의 혼란은 급성적 및 만성적으로 면역 경로를 자극하는 전 염증성 사이토카인의 생성을 증가시킨다(Luo et al., *Eye & Contact Lens*, 2005. 31(5): 186-193). 각 결막염 (*keratocconjunctivitis sicca*) 또는 안구건조증 (DES)으로 알려진 이 이상은 세포의 기계적 스트레스(세포 위축을 통하여) 및 유전자 발현으로 변화되는 지속적인 염증성 자극으로 인해 지속된다(Brocer et al., *Biomolecular Concepts*, 2012. 3(4): 345-364). 이것은 또한 국소 미세 환경에 작용하고 급성 염증 반응의 매개 세포 유형을 모집하는 사이토카인의 생산을 야기한다. 이어서, 이동성 호중구는 안구 유분 혈관 투과성을 변화시켜 자극된 눈 표면에 활성화된 T 세포의 유입을 허용하여 만성 염증 상태로 전환시키는 추가적인 전-염증성

모르포겐들(morphogens)을 분비한다(Baudouin, *Survey of Ophthalmology*, 2001. 45(2): S211-220).

[0007] 그러한 자극의 하나의 구체적인 예는 증가된 눈물 증발 또는 눈물샘의 분비저하로 인해 유발되는 눈물 막 유체 고장액에서 발생한다. 만약 고 삼투압 자극이 면역 세포 매개체의 작용에 의해 해결되지 않으면, 항상성이 달성되지 않고 눈 표면의 조절되지 않은 조직 리모델링 메커니즘을 통해 시간이 지남에 따라 안구 표면 및 눈물샘의 파괴가 진전된다. 이 캐스케이드(cascade)는 조직 리모델링의 급격한 피드 - 포워드 (feed-포워드) 메커니즘에서 안구 표면을 분해하는 MMP-9(matrix metalloproteinase 9)의 생산 증가로 이어질 수 있다.

[0008] 염증 반응을 완화시키는 접근법은 전형적으로 전-염증성 신호 분자의 생산을 목표로 한다. 이들은 글루코코르티코이드 스테로이드의 사용을 포함하며, 이것은 수용체 세포 내에서 항염증 단백질의 생산을 증가시키면서 전염증성 단백질의 생성을 감소시키는 기능을 한다(Rhen et al., *The New England Journal of Medicine*, 2005. 353(16): 1711-1723). 그러나 글루코코르티코이드 신호 전달의 효과는 강력하고 대사 및 체액 항상성, 신경 기능 및 태아 발달에 영향을 미치며 면역 세포 신호 전달에 국한되지 않는다. 따라서, 글루코코르티코이드 신호 전달은 강하게 조절되고 만성 과민 면역계 질환으로 일반적으로 제한된다. 반대로, 아스피린, 이부프로펜 및 나프록센을 포함하는 비 스테로이드성 소염 진통제 (NSAIDs)는 염증 세포에서 많이 증가하는 프로스타글란딘 생성에 앞서 시클로옥시게나제(COX) 효소 활성을 억제하는 작용을 한다(Ricciotti et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. 31(5): 986-1000).

[0009] NSAIDs는 염증 과정의 효과적인 전투원이지만 일반적으로 전신적으로 투여되고 인체에서 COX 효소의 작용을 억제하여 위궤양 및 신장 기능 장애를 일으킬 수 있다. 전술한 치료 전략의 목표 외 부작용을 고려할 때, 항염증제는 이상적으로 손상되거나 감염된 조직(예 : 피부 또는 눈 표면)에 국한되어야 한다.

[0010] 목표한 항염증제 치료의 적용은 최소한의 부작용으로 면역 세포 반응을 약화시킬 수 있다. 예를 들어, 전염증성 매개체 (예컨대, 케모카인)에 대한 길항제 항체의 개발은 유망한 효능을 가진 염증성 질환에 사용되어 왔다 (Skov et al., *Journal of Immunology*, 2008. 181(1): 669-679). 그러나 이들 단백질의 생산 비용은 중요하며 항체 생산의 다양성은 치료 효과에 영향을 미칠 수 있다. 또한, 그들이 급성 및 결과적인 만성 염증 반응에 관여하는 면역 세포 타입의 모집을 제거하기 때문에, 케모카인 생산 및/또는 분비의 상류의 신호 전달 경로의 약리학적 억제제는 이론적으로 이상적이다. 이러한 이론적 표적 중에는 급성 전염증성 모르포겐의 생산에 크게 관여하는 NF- κ B(nuclear factor-kappa B) 전사 인자 군이 있다(Hayden et al., *Cell Research*, 2011. 21(2): 223-244). 자연적으로, NF- κ B 서브 유닛은 세포질에 존재하며 이 영역으로의 전달을 목표로 하는 단백질 잔기의 마스킹에 의해 핵 전좌가 방지된다. 그러나, 자극시 억제 단백질은 빠르게 분해되어 NF- κ B 단백질의 전좌와 DNA 결합을 허용하고 후속 유전자 전사를 허용한다.

[0011] 다수의 NF- κ B-의 천연 및 합성 억제제가 존재한다. 전자 중에는 눈에 고치에서 분리된 중쇄 및 경쇄 단백질(각각 390 kD와 26 kD)로 구성된 다이머인 실크 피브로인이다 (Altman et al., *Biomaterials*, 2003. 24 (3) : 401-416). 이러한 구형 단백질은 경쇄 및 중쇄의 디설파이드 결합에 의해 섬유상 구조로 조립되고 β 시트 2 차 구조에서 현저한 동질성을 나타낸다. 피브로인은 NF- κ B 단백질 서브유닛의 전사 및 업스트림 활성화(즉, 단백질 키나아제의 저해를 통해)를 억제하는 것으로 나타났다(Chon et al., *International Journal of Molecular Medicine*, 2012. 30(5): 1203-1210). 또한, 피브로인의 가수 분해된 펩타이드 단편은 NF- κ B의 조절하에 있는 전염증성 분자들의 전사를 억제하는 것으로 나타났다(Kim et al., *J. Neurosurg.*, 2011. 114 (2) : 485-90, *J. Microbiol.Biotechnol.*, 2012. 22 (4) : 494-500). 그러나, 실크 피브로인의 사용은 염증성 이상 및 상처에 대한 효과적인 치료를 초래하지 못했다.

[0012] 또한 안구 질환과 손상은 여전히 일반인들에게 지속적이고 심각한 관심사이다. 안구 질환과 외상은 치유 과정 전체를 확장하고 장기간의 감염, 만성 염증 및 흉터 형성으로 인한 영구 장애 또는 실명의 위험을 감수함으로써 정상적인 시력에 즉각적인 위협이 된다. 따라서 염증을 줄이고 손상되거나 염증이 있는 안구 조직의 치유를 가속화하기 위한 치료법들이 즉각적으로 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0013] **발명의 요약**

[0014] 본 발명은 염증을 감소시키는 것뿐만 아니라 상처 치유 및 조직 재생을 촉진시키는 것과 같은 치료학적 적용을 위한 변형된 실크 피브로인 단백질을 제공한다. 변형된 단백질은 각막 상피 세포 부착 및 증식을 돕는 것으로 나타났다. 본 명세서에서 기술된 실크-유래 단백질(SDP)은 높은 수용성 및 수 안정성 물질을 야기하는 감소된 베타-시트 활성을 가지는 피브로인-유래 단백질 조성물이다. SDP는 높은 농도에서 용액 기반 산물 제형으로 용이하게 포함될 수 있다. 또 다른 장점은 SDP가 일반적으로 안과 제제에 포함된 것과 같은 다른 용해된 성분들과 높은 상용성을 갖는다는 점이다. SDP의 특정 용도 중 하나는 눈 표면의 용액-습윤 특성을 향상시키는 신규한 단백질 성분으로서의 안과 제제에 그것의 함유이다. SDP는 분획 화될 수 있으며 놀랍게도 SDP의 저 분자량 분획이 항 염증 특성을 향상시킨다는 것이 발견되었다.

[0015] 따라서, 본 발명은 수용액에서 증가된 안정성을 가지는 피브로인 유래 단백질을 제공하고, 여기서 피브로인-유래 단백질의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌의 아미노산 함량에서 결합된 차이의 절대값에 대해서 적어도 4 % 천연 피브로인과 다르고; 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되며; 그 단백질 조성물 중의 복수의 펩타이드 쇠는 아미드(-C(=O)NH₂)기로 종결되며; 상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 25 % 이상 감소된 세린 함량을 가지며, 여기서 세린 함량은 적어도 약 5 % 이고; 여기서 상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량이 40 kDa 이하 및 2 kDa 보다 큼.

[0016] 일부 구체 예에서, 단백질 조성물의 단백질 사슬의 50 % 이상은 10kDa 내지 60kDa의 범위 내의 분자량을 갖는다. 다양한 구체 예에서, 단백질 조성물은 10% w/w 이하의 농도로 단백질 조성물의 수용액을 초음파 처리할 때 겔화되지 않는다.

[0017] 상기 단백질 조성물은 8 % 이하의 세린, 7 % 이하의 세린, 또는 6 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 단백질 조성물은 46 % 이상의 글리신 아미노산, 46.5 % 이상의 글리신 아미노산을 가질 수 있다. 그 단백질은 30 % 이상의 알라닌 아미노산 또는 30.5 % 이상의 알라닌 아미노산을 가질 수 있다.

[0018] 상기 단백질 조성물은 박막으로 건조된 후 물에 완전히 재용해될 수 있다. 베타-시트 단백질 구조는 수용액에서 최소한이거나 존재하지 않는다. 상기 단백질 조성물은 적어도 5 초간의 초음파 처리 후에 550 nm에서 0.25 이하의 수용액에서 광학 흡광도를 유지할 수 있다.

[0019] 본 발명은 또한 본원에 기술된 단백질 조성물 및 물, 및 선택적으로 하나 이상의 완충 매질, 염, 안정 화제, 방부제 및 윤활제를 포함하는 안과 제제를 제공한다.

[0020] 본 발명은 또한 피브로인 유래 단백질을 염증 조직에 투여하는 것을 포함하는 염증을 감소시키기 위한 방법을 제공하고; 여기서 상기 피브로인-유래 단백질의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌의 아미노산 함량에서 결합된 차이의 절대값에 대해서 적어도 4 % 천연 피브로인과 다르고; 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되며; 그 단백질 조성물 중의 복수의 펩타이드 쇠는 아미드(-C(=O)NH₂)기로 종결되며; 상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 25 % 이상 감소된 세린 함량을 가지며, 여기서 세린 함량은 적어도 약 5 % 이고; 여기서 상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량이 60 kDa 이하 및 2 kDa 보다 크고; 그것에 의하여 조직의 세포핵 내 전사 인자 신호 전달을 감소시킴으로써 염증을 감소시킨다. 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량은 또한 55 kDa 이하 및/또는 약 5 kDa 이상, 10 kDa 이상, 15 kDa 이상 또는 20 kDa 이상일 수 있다.

[0021] 염증 조직으로의 투여는 염증성 유전자 TNF- α , MMP-9, IL-1 β 및 IL-6 중 하나 이상의 전사를 감소시킬 수 있다. 그 감소는 상기 단백질 조성물의 부존재와 비교하여 20%, 40%, 50% 또는 60% 만큼 될 수 있다. 상기 투여는 각막에 있을 수 있고, 상기 투여는 각막에서 MMP-9의 존재를 감소시킬 수 있다. 상기 투여는 눈에 할 수 있고, 상기 투여는 예를 들어 눈물 막의 전염증성 마커들의 ELISA 측정에서 결정된 바와 같이 안구 표면상의 염증을 감소시킨다. 염증을 감소는 MTT 분석에 의해 결정된 바와 같이 염증 지점에서의 세포 이동 속도의 증가, 예를 들어 세포 증식의 증가를 동반할 수 있다.

[0022] 상기 단백질 조성물은 40kDa 이하 또는 35kDa 이하의 평균 분자량을 가질 수 있다. 상기 피브로인 유래 단백질 조성물은 완충화제, 염, 안정화제, 방부제 및 윤활제 중 하나 이상을 포함하는 안과 제제에 용해될 수 있다.

[0023] 상기 염증을 안과적 이상에 의하여 야기되고, 여기서 안과적 이상은 안구 건조증, 각막 궤양, 각막 침식, 각막 마모, 각막 변성, 각막 천공, 각막 상처, 상피 결장염, 각 결막염, 특발성 포도막염, 각막 이식, 연령 관련 황

반변성, 당뇨병성 안질환, 안검염, 녹내장, 눈의 고혈압, 수술 후 눈의 통증 및 염증, 후방 신생 혈관 형성, 증식성 유리체 망막병증, 거대세포 바이러스 망막염, 안내염, 맥락막 신생혈관막(choroidal neovascular membrane), 혈관 폐색성 질환(vascular occlusive disease), 알레르기성 안 질환, 종양, 색소성 망막염(retinitis pigmentosa), 눈 감염, 공막염, 안검 하수증, 동공증(miosis), 눈 통증, 산동증(mydriasis), 신경통(neuralgia), 간질성 눈의 표면 질환(cicatrizing ocular surface disease), 눈의 감염, 염증성 안 질환, 눈의 표면 질환, 각막 질환, 망막 질환, 전신 질환의 눈의 발현, 유전성 안 질환, 안 종양, 안압 상승, 헤르페스 감염, 상아질(prigidium) 또는 공막(scleral) 종양, 눈의 표면에 지속된 상처, 광굴절형 각막절개술 후(post-photorefractive keratotomy) 안 통증 및 염증, 각막에 열 또는 화학적 화상, 공막 상처 또는 원추각막 및 결막 상처이다. 일 구체예에서 상기 염증은 안구건조증에 의하여 야기된다.

[0024] 본 발명은 또한 염증을 치료하기 위한 본원에 기술된 피브로인 유래 단백질 조성물의 용도를 제공하며, 여기서 상기 피브로인-유래 단백질의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌의 아미노산 함량에서 결합된 차이의 절대값에 대해서 적어도 4 % 천연 피브로인과 다르고; 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되며; 그 단백질 조성물 중의 복수의 펩타이드 쇠는 아미드(-C(=O)NH₂)기로 종결되며; 상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 25 % 이상 감소된 세린 함량을 가지며, 여기서 세린 함량은 적어도 약 5 % 이고; 상기 피브로인 유래 단백질 조성물의 평균 분자량은 60 kDa 이하고 10 kDa 이상이다. 상기 단백질 조성물은 35kDa 이하의 평균 분자량을 가질 수 있다. 상기 조성물은 안구 건조증 치료를 위한 조성물 일 수 있다.

[0025] 따라서, 천연 피브로인의 1 차 아미노산 서열이 천연 실크 피브로인으로부터 변형되고, 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거된 수용액에서 안정성이 향상된 SDP 조성물을 제공하고, 여기서 상기 조성물은 천연 피브로인 단백질에 비해 40% 이상 감소된 세린 함량을 가지고; 여기서 상기 SDP의 평균 분자량은 약 60 kDa 이하이다.

[0026] **발명의 상세한 설명**

[0027] 본 발명은 염증을 치료하고 상처를 치료하기 위한 SDP로부터 유도된 단백질 조성물을 제공한다. 증거는 누에 고치에서 분리된 단백질이 각막 세포의 성장을 촉진하고 상처 치유와 염증에 관여하는 유전자의 발현을 변화시킨다는 것을 지지한다 (그림 1-5). 본원에 기술된 상기 단백질 조성물은 또한 수용액에서 향상된 용해도 및 안정성을 갖는다. 상기 단백질 조성물을 제조하는 방법은 천연 피브로인의 일차 아미노산 서열을 변형시켜 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사슬 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되도록 하는 단계를 포함한다. 또한, 상기 단백질 조성물의 세린 함량은 천연 피브로인 단백질에 비해 40 % 이상 감소되고, 상기 단백질의 평균 중량 분자량은 약 60 kDa 이하이다. 일부의 경우, 본원에 기술된 단백질 조성물은 미국 특허 제 9,394,355 호에 기재된 단백질 조성물을 포함하거나 이로부터 유도되며, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 저 분자량 분획은 분리될 수 있고, 더 큰 분자량 분획 또는 SDP 조성물 전체와 비교하여 전-염증성 유전자의 발현을 감소시키는 그의 향상된 능력으로 인하여 항염증 활성이 향상된 조성물을 제공한다.

[0028] 별개의 SDP 서브군(subpopulation)은 인체에서 치유를 더욱 강화하고 특히 각막 조직에서 염증을 감소시킨다. 선택된 SDP 분획은 세포 이동 반응 및 염증에 대한 SDP의 효과적인 효능을 향상시키는 것으로 나타났다. 상기 SDP 분획은 Bombyx mori 누에 고치 섬유를 95 °C에서 0.3 % 탄산나트륨에서 추출한 다음, 그 피브로인 섬유를 54 % LiBr 용액에 용해시켰다. 그 용해된 용액을 오토클레이브하고, 거친 여과를 한 후, 정용여과(diafiltration)로 정제하였다. 이어서, 그 물질을 폴리 프로필렌 필터를 통해 여과하여 최종 SDP 용액을 제조하였다. 상기 SDP 용액은 특정 실험에 따라 두 가지 방법 중 하나를 사용하여 분자량 (MW)에 의해 분리되었다. 첫 번째 방법에서는 분자량 컷오프 필터 (MWCO)를 사용한 원심분리를 분자량 컷오프 (MWCO) 크기에 의하여 SDP 단백질 분획물을 분리하였다. 예를 들어, 샘플이 초기 부피의 10 %로 감소될 때까지 (예를 들어, 본원에 기술된 특정 실험에 대해, 1.5 mL로 농축된 초기 부피 15 mL) SDP를 5000 xg에서 원심 분리될 수 있다. 상기 필터를 통하여 통과된 단백질들은 특정 필터의 분자 MWCO보다 더 작다. 남아있는 단백질들은 일반적으로 동등하거나 더 큰 분자량을 갖는다. 두 번째 방법에서 시료 SDP 분획을 크기 배제 크로마토 그래피 (SEC)로 분리되어 별개의 단백질 서브군 또는 분획들을 생산할 수 있다. 평균 분자량이 감소하는 4 개의 분획물이 생성되었고 이것을 SDP-1, SDP-2, SDP-3 및 SDP-4로 명명한다(도 6).

[0029] 2 개의 가장 작은 분자량 SDP 분획인 SDP-3 및 SDP-4는 증가된 세포 이동 및 증식 효과를 통해 hCLE 배양물의 염증을 현저히 감소시키고 상처 치유를 향상시킨다 (그림 7-12). 이들 SDP 분획물은 염증성 신호를 억제하여 상처 치유를 향상시키고 장기간 환자의 결과를 향상시킬 수 있다. 따라서 SDP에서 유래된 상기 단백질 분획물들은

염증 및 그 관련된 이상을 치료하는데 사용될 수 있다. 하나의 특정 치료학적 적용은 SDP에 의해 저해되는 NF- κ B 신호 전달 경로에 의해 부분적으로 유도되는 염증 관련 질환으로 알려진 안구 건조증의 치료에 있다. 다른 특정 치료적 적용에서, SDP는 굴절 안과 수술 또는 백내장 제거 동안 생성된 손상과 같은 염증을 감소시키고 및/또는 세포 증식 및/또는 이동을 증가시키고, 및/또는 각막 상피가 포함된 우발적인 손상을 감소시킴으로써 증강된 치유 결과를 유도하기 위한 수술 후 상해를 치료하기 위해 이용될 수 있다.

[0030] 정의

[0031] 다음의 정의는 명세서 및 청구 범위의 명확하고 일관된 이해를 제공하기 위해 포함된다. 본원에서 사용된, 인용된 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다. 이 명세서에서 사용된 다른 모든 용어 및 문구는 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이 그들의 통상적인 의미를 갖는다. 이러한 통상적인 의미는 Hawley 's Condensed Chemical Dictionary 제 14 판, R.J. Lewis, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 2001와 같은 기술 사전을 참고하여 얻을 수 있다.

[0032] 명세서에서 "일 실시예", "실시 예" 등은 기술된 실시 예가 특정 양상, 특징, 구조, 부분 또는 특성을 포함할 수 있음을 나타내지만, 모든 실시 예는 반드시 그 양태, 특징, 구조, 모이어티 또는 특성을 포함하는 것은 아니다. 또한, 이러한 문구는 본 명세서의 다른 부분에서 언급된 동일한 실시 예를 의미할 수 있는 것은 아니다. 또한, 특정한 양상, 특징, 구조, 모이어티 또는 특성이 일 실시 예와 관련하여 설명될 때, 당업자의 지식 범위 내에서 명시적 또는 비 명시적으로 기재되었는지 다른 실시예와 이러한 양상, 특징, 구조, 모이어티 또는 특성과 영향을 미치거나 연결시킬 수 있다.

[0033] 단수 형태인 "일", "그(the)"는 문맥상 명확하게 다르게 지시하지 않는 한 복수 기준을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "구성 요소"에 대한 참조는 복수의 그러한 구성 요소를 포함하므로, 구성 요소 X는 복수의 구성 요소 X를 포함한다. 청구 범위는 임의의 구성 요소를 배제하도록 기재될 수 있다. 이와 같이, 이 기재는 본 명세서에 기술된 요소 및/또는 본원에 기술된 모든 요소와 관련하여 "단독으로", "유일한", "이외에" 및 이 명세서에 기재된 일부 요소 및/또는 청구항 요소의 인용 또는 "부정적인" 제한의 사용 등과 같은 배타적인 용어의 사용을 위한 선행 기준으로 제공하기 위한 것이다.

[0034] "및/또는"이라는 용어는 항목들의 어느 하나, 항목들의 어느 조합, 또는 이 용어가 관련된 항목들의 모두를 의미한다. "하나 이상의" 및 "적어도 하나"라는 표현은 통상의 기술자에게 손쉽게 이해되는데, 특히 이 표현의 맥락에서 읽혀질 때 그러하다. 예를 들어, 이 표현은 하나, 둘, 셋, 넷, 다섯, 여섯, 열, 100, 또는 기재된 하한치보다 대략 10, 100 또는 1000배가 더 큰 어떠한 상한치를 의미할 수 있다.

[0035] "약"이라는 용어는 특정된 수치의 $\pm 5\%$, $\pm 10\%$, $\pm 20\%$ 또는 $\pm 25\%$ 의 변동을 의미할 수 있다. 예를 들어, "약 50" 퍼센트는 몇몇 양태에서 45 내지 55퍼센트의 변동을 수반할 수 있다. 정수 범위에서, "약"이라는 용어는 범위의 각 말단의 기재된 정수보다 크거나 및/또는 작은 하나 또는 둘의 정수를 포함할 수 있다. 여기서 달리 표기되지 않는 한, "약"이란 용어는, 예를 들어, 개별 구성성분, 요소, 조성물 또는 양태의 기능성 측면에서 동등한 기재 범위에 근접한 중량 퍼센트와 같이, 수치들을 포함하는 것이다. "약"이란 용어는 또한 본 단락에서 상술한 것처럼 기재 범위의 말단점을 변화시킬 수 있다.

[0036] 통상의 기술자에게 이해될 것처럼, 성분의 양, 분자량과 같은 성질, 반응 조건 및 이와 같은 것을 표현하는 것들을 포함한 모든 숫자는 근사값이며, 모든 경우에서 용어 "약"에 의하여 선택적으로 변경될 수 있는 것으로 이해된다. 이들 수치는 본 명세서의 기재 활용하는 통상의 기술자가 얻고자 하는 바람직한 성질에 따라 달라질 수 있다. 또한, 이러한 수치는 이들 각각의 시험 측정에서 확인되는 표준 편차에 기인하는 필연적인 변동성을 본질적으로 포함하는 것으로 이해된다.

[0037] 통상의 기술자에게 이해될 것처럼, 어떠한 그리고 모든 목적을 위하여, 특히 명세서 기재를 제공하는 측면에서, 여기에 기재된 모든 범위는, 그 범위를 형성하는 개별적인 수치, 특히 정수 수치뿐만이 아니라, 어떠한 그리고 모든 가능한 하부 범위와 그 하부 범위의 조합을 망라한다. 기재된 범위(예를 들어, 중량 퍼센트 또는 탄소기)는 그 범위 내에서 각각의 특정한 수치, 정수, 소수 또는 항등함수를 포함한다. 어떤 열거된 범위는 적어도 1/2, 1/3, 1/4, 1/5 또는 1/10로 세분되는 동일 범위를 충분히 기재하고 또한 실시가능하게 하는 것으로 용이하게 인정될 수 있다. 비제한적인 예로서, 여기서 논의된 각 범위는 3등분의 아랫부분, 중간부분 및 위부분 등으로 세분될 수 있다. 또한 통상의 기술자에게 이해될 것처럼, "까지", "적어도", "이상하는", "이하인", "보다 큰", "이상의" 및 이와 같은 모든 표현들은 기재된 숫자를 포함하고, 이와 같은 용어들은 상술한 바와 같이 결과적으로 하부 범위들로 세분될 수 있는 범위를 참조한다. 동일한 방식으로, 여기서 기재된 모든 비율은 그 더

큰 비율 내에 있는 모든 하부 비율들을 포함한다. 따라서, 라디칼, 치환기 및 범위에 대하여 기재된 특정 수치들은 설명을 위한 것일 뿐이며, 다른 정의된 수치나 또는 라디칼과 치환기에 대해 정의된 범위 내에 있는 다른 수치를 배제하지 않는다.

- [0038] 통상의 기술자라면, 요소들이 통상적인 방식으로 마쿠쉬 그룹과 같이 그룹화된 경우, 발명이 전체적으로 열거된 모든 그룹뿐만 아니라, 그룹의 각 요소와 메인 그룹의 모든 가능한 하부 그룹도 아우르는 것으로 이해할 것이다. 덧붙여, 모든 목적에 있어서, 발명은 메인 그룹만이 아니라 하나 이상의 그룹 요소가 결합된 메인 그룹도 아우른다. 따라서 발명은 기재된 그룹의 어떠한 하나 이상의 요소를 명시적으로 배제하는 것으로 된다. 따라서, 기재된 요소, 종(種) 또는 양태의 하나 이상이, 예를 들어 명시적인 부정적 표현의 사용으로 그러한 카테고리 또는 양태로부터 제외될 수 있는 경우, 단서조건이 어떠한 기재된 카테고리 또는 양태에 적용될 수 있다.
- [0039] "접촉"이란 용어는 만지기, 접촉하기, 또는 바로 옆의 또는 가까운 근접지로 다가가는 행위를 의미하는데, 예를 들어, 용액에서, 반응 혼합물에서, 시험관 내에서(*in vitro*) 또는 생체 내에서(*in vivo*) 생리학적 반응, 화학적 반응, 또는 물리적 변화를 일으키는 세포 또는 분자적 수준에서의 것을 포함한다.
- [0040] 치료적 적용에 있어서, "유효량"은 질병, 장애 및/또는 질환을 치료하거나 또는 기재된 효과를 달성하기에 효과적인 양을 의미한다. 예를 들어, 유효량은 치료될 장애 또는 증상의 진행 또는 심각도를 감소시키기에 효과적인 양일 수 있다. 치료적으로 유효한 양의 결정은 통상의 기술자의 능력 내에 있다. "유효량"이란 용어는 여기에 기재된 조성물의 양, 또는 여기서 기재된 펩티드의 조합의 양을 포함하는 것으로 의도되며, 예를 들어, 개체에서, 질병 또는 장애를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양, 또는 질병 또는 장애의 증상을 치료하기에 효과적인 양을 포함한다. 따라서, "유효량"은 원하는 효과를 제공하는 양을 일반적으로 의미한다.
- [0041] 공정 및 제법의 적용에 있어서, "유효량"은, 반응 혼합물에서 제품을 생성하기에 필요한 양과 같이, 기재된 효과를 달성하기에 효과적인 양을 의미한다. 유효량의 결정은, 특히 여기서 제공되는 상세한 설명에 근거하여, 통상의 기술자의 능력 내에 일반적으로 있다. "유효량"이란 용어는, 여기서 기재된 화합물 또는 시약의 양, 또는 여기서 기재된 화합물 또는 시약의 조합의 양, 또는, 예를 들어 반응 혼합물에서 목적으로 하는 제품을 생성하기에 효과적인, 여기서 기재된 공정과 관련한 조건을 포함하는 것으로 의도된다. 따라서 "유효량"은 기재된 목적으로 하는 효과를 제공하는 양을 일반적으로 의미한다.
- [0042] 피브로인은 누에(*Bombyx mori*)의 고치로부터 유래한 단백질이다. 피브로인 단백질은 분자량이 약 350-400 kDa인 중쇄와 분자량이 약 25 kDa인 경쇄를 포함하는데, 중쇄와 경쇄는 디설피드 결합에 의해 서로 연결되어 있다. 중쇄 및 경쇄의 1차 서열은 해당 분야에 알려져 있다. 피브로인 단백질 사슬은, 소수성의 N 및 C 말단 도메인과, 용액 내의 주변 분자들과 입체적 및 정전기적 혼합적 상호작용을 할 수 있는 소수성/친수성 아미노산 서열이 번갈아 있는 블록을 갖는다. 낮은 농도의 희석(1% 이하)에서, 피브로인 단백질 분자는 신장된 단백질 사슬로 되고 용액에서 바로 응집하지 않는다고 알려져 있다. 피브로인 단백질은 HA, PEG, 글리세린 및 CMC와 같은 수화성 분자와 혼화성이 높고, 생체 적합성이 높은 것으로 밝혀졌으며, 효소 작용을 통해 생체 내에서 자연적으로 동화되거나 분해된다. 천연 피브로인, 또는 종래기술의 실크 피브로인(PASF)이 해당 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 다이텐카르 등(Daithankar et al.)의 문헌(*Indian J. Biotechnol.* 2005, 4, 115-121) 및 국제 공개공보 번호 WO 2014/145002 (Kluge et al.)에 개시되어 있다.
- [0043] "실크 유래 단백질"(silk-derived protein; SDP) 및 "피브로인 유래 단백질"이라는 용어는 여기서 상호교환적으로 사용된다. 이들 물질은 열, 압력 및 고농도의 중염 용액을 포함하는 여기서 기재된 공정에 의하여 제조된다. 따라서 "실크 유래" 및 "피브로인 유래"는 여기서 기재된 구조적, 화학적 및 물리적 성질을 가진 단백질 조성물이 되도록 실크 피브로인 단백질을 변화시키는 공정의 출발물질을 의미한다. 상기 SDP 조성물은 수용액에서 향상된 용해도 및 안정성을 갖는다. SDP는 누에 실크(예를 들어, *Bombyx mori*), 거미 실크 또는 유전적으로 조작된 실크로부터 유래 될 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 용어 "분자량" 및 "평균 분자량"은 NuPAGE™ 4% - 12% 비스 트리스(Bis-Tris) 단백질 겔(ThermoFisher Scientific, Inc.)로 수행되는 표준 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴 아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE) 방법과 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health)와의 조합 분석에 의해 결정된 중량 평균 분자량을 지칭한다. ImageJ는 샘플에서 주어진 분자량의 단백질의 상대적 양을 결정하는 데 사용된다. 상기 소프트웨어는 겔에 대한 염색(즉, 단백질의 양)을 정량적 신호 강도로 변환함으로써 이를 수행한다. 그런 다음 그 사용자는 이 신호를 알려진 분자량의 중들로 구성된 표준(또는 사다리)과 비교한다. 사다리 상의 각 마커 사이의 신호 양은 전체 신호로 나누어진다.

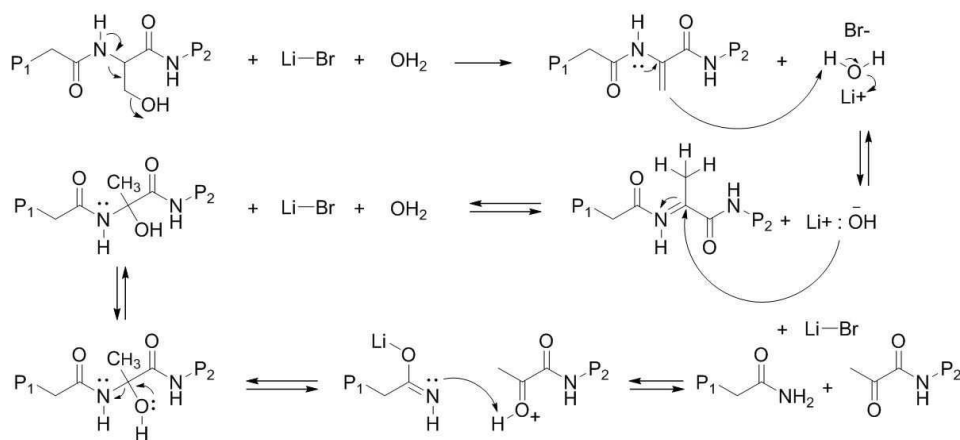
[0045] 본원에서 분획으로도 불리우며 또한 단편이라고도 불리는 각 단백질 하위 집단의 누적 합계는 사용자로 하여금 본원에서 평균 분자량으로 지칭되는 중간 분자량을 결정하게 한다. 실제로, 전기영동 겔은 염색되어 그레이 스케일 이미지로 스캔되고 ImageJ를 사용하여 히스토그램으로 변환된다. 각 겔 라인 내 총 픽셀 강도는 ImageJ (즉, 히스토그램 아래의 총 면적)에 의해 정량화되고, 이어서 겔 상에서 염색된 단백질 분자량 표준에 의해 구분된 집단으로 분획화된다. 임의의 2개의 분자량 표준 사이의 히스토그램 픽셀 영역은 단백질의 총 히스토그램 면적으로 나뉘어, 이들 분자량 내에 있는 총 단백질의 분획물을 제공한다. 다른 방법에 의한 분석은 SDS-PAGE 방법으로 설명되지 않는 특정 펩타이드를 설명하는 다른 값을 제공 할 수 있다. 예를 들어, HPLC를 사용하여 평균 분자량을 분석할 수 있는데, 이 방법은 SDS-PAGE로 결정한 값보다 낮은 일반적으로 약 10-30 %의 값을 제공한다(분자량이 감소함에 따라 차이가 커짐).

[0046] **SDP 조성물의 제조**

[0047] 여기서 기재된 SDP 조성물은 수용액에서 천연 피브로인에 비해 향상된 안정성을 갖는다. 여기서 실크 유래 단백질(SDP)로도 칭해지는 피브로인 유래 단백질 조성물에 의해 달성되는 향상된 안정성은, 천연의/종래기술의 실크 피브로인 단백질(여기서 PASF로 칭해짐)보다 그 물질이 용액에서 현저하게 더 오래 유지되도록 한다. SDP 물질의 향상된 안정성은 또한 응집, 침전 또는 겔화가 없이 고농도의 SDP 용액을 제조할 수 있도록 한다. 식품, 음료, 안약 또는 단백질이 용액에 용해될 수 있기를 요구하는 응용과 같은 상업적 응용에 있어서, 향상된 안정성은 단백질 응집을 감소시킴으로써 적절히 긴 저장수명과 제품 질의 증가를 제공할 수 있다. 용액에서 단백질의 잠재적 응집은 특정한 응용에 있어서 제품의 바람직한 작용에 부정적인 영향을 준다. 용액에서 SDP를 고농도 (50%(w/v)를 이상 또는 >500mg/mL)로 농축하는 능력은 어떠한 응용에서도 있는 그대로 또는 희석하여 사용될 수 있는 유용한 작업 용액을 개발하는 데에 분명하게 유리하다. 이러한 용도의 예는 단백질 보충제 또는 첨가제로서 본원에서 제공된 것과 같은 안약 제제의 성분으로서의 SDP의 사용이다.

[0048] 본원에 기재된 바와 같이, 천연 피브로인 단백질의 1 차 아미노산 서열을 SDP 물질로 형질전환시키는 것은 분자의 응집성을 감소시킴으로써 수용액에서의 안정성을 향상시켰다. 응집은 결국 겔 형성을 유도한다. 천연 피브로인의 형질 전환에서, 세린 및 시스테인 아미노산은 고열 및 탈수 조건 하에서 절단된다. 유사하게, Patchornik et al. (J. Am. Chem. Soc., 1964, 86, 1206)은 용액에서 세린 및 시스테인으로부터 디하이드로알라닌 (DHA) 중간체가 형성됨을 보여 주었다. 아미노산 분해는 본원에 기술된 바와 같은 50-55 % w/v LiBr 용액과 같은 강한 탈수 용매 시스템의 존재하에, 하이드라이드(hydride) 이동이 일어나서 물의 제거를 유도할 때 추가로 유도된다. 분해 반응은 수산화 이온 (예를 들어, pH 7.5 내지 pH 11)의 존재하에 발생할 수 있으며, 이는 DHA 중간체의 절단을 추가로 유도한다. 이 절단은 아마이드, 피루보일(pyruvoyl) 펩티드 및 LiBr을 형성한다. 하나의 가능한 화학적 메카니즘은 세린 및 시스테인 아미노산에 대해 도식 1에 개략되어 있으며, 이 반응식은 시스테인 아미노산에도 적용 가능하다. PASF 단백질의 세린 및 시스테인 아미노산을 추가 가수 분해 절단으로 DHA 중간체로 화학적으로 변형시키면 SDP 생성물의 용액 안정성이 향상된다.

[0049] **도식 1. 세린 및 시스테인의 분해에 대한 화학반응을 도식적으로 설명함.**



[0050]

[0051] 탈수시키는 고농도의 염 환경에서 수소화물 시프트로부터 형성되는 DHA 중간체의 생산에 의하여 분해가 추동된다. 그리고 나서 DHA의 분해는 염기성 용매 환경 내에서 SN₂ 반응을 통해 달성된다.

[0052] 위에서 논의한 절단 반응은 결과로 만들어지는 펩티드의 거대분자 성질에 현저하게 영향을 주는데, 이는 안정화

된 SDP 물질의 수용액으로 귀결된다. 그레빙 등(Greving et al.)의 문헌(*Biomacromolecules* 2012, 13(3): 676-682)에 기재된 바와 같이, 피브로인의 최초의 단백질 응집은 천연 피브로인의 중쇄 및 경쇄가 시스테인 아미노산에서 상호작용하여 시작되는 것으로 여겨진다. 피브로인 중쇄 및 경쇄 내의 시스테인 아미노산은 디설피드 연결을 통해 서로 상호작용한다. 이들 디설피드 연결은 피브로인 단백질 겔화 및 겔 네트워크 침전에 참여한다. 천연 피브로인 경쇄가 없으면, 그 단백질은 응집에 대하여 현저하게 낮은 감수성을 갖는다. 따라서 여기서 기재된 공정은 시스테인 함량을 감소시키고 이에 따라 디설피드 결합 형성 능력을 감소 또는 제거시킴으로써 천연 피브로인 경쇄의 디설피드 결합 형성 능력을 효과적으로 감소시킨다. 이 메커니즘을 통하여, 여기에 기재된 변이 공정은 시스테인에 의한 응집이 형성되는 능력을 감소 또는 제거하여 얻어지는 용액 내의 SDP 결과물을 기능적으로 안정화시킨다.

[0053] 메이언 등(Mayen et al.)의 문헌(*Biophysical Chemistry* 2015, 197:10-17)에 기재된 바와 같이, 응집에 의해 유도되는 디설피드 결합에 더하여, 실크 피브로인이 더 응집하여 침전된 구조가 되는 감수성은 또한 단백질의 아미노산 화학에 의하여 유도된다. 실크 피브로인의 세린, 알라닌 및 글리신 아미노산 서열에 대한 분자 모델링은, 세린의 존재가 인접한 피브로인 단백질 사슬기 간의 수소 결합을 일으키는 경향을 더 크게 함으로써 최초의 단백질-단백질 상호작용을 강화시킨다는 것을 보여준다. 모델에서는 감소한 세린 및 증가한 알라닌과 글리신이 단백질 응집에 대한 처음의 경향을 감소시킨다고 보여준다. 분자 모델링 실험은 피브로인 단백질의 천연 아미노산 화학을 변경함으로써 수용액에서 더 안정한 물질이 만들어질 수 있음을 보여준다.

[0054] 향상된 안정성을 달성하는 하나의 전략은, 히드록실과 같은 전하를 띤 기능기를 단백질로부터 제거하는 것이다. 히드록실기의 상대적으로 높은 전기음성도로 인해, 이 화학은 수소가 가용한 수소 원자와 결합하는 것과 양전하로 하전된 아미노산과의 비특이적 전하의 상호작용을 추동할 수 있다. 천연 피브로인 단백질의 함량의 약 12%가 세린으로 구성되어 있는데, 세린은 히드록실 기능기를 갖고 있다. 따라서, 수소결합을 촉진하는 히드록실기의 가용성을 감소시킴으로써, 용액에서 전체적인 단백질 안정성이 향상될 수 있다. 여기에 기재된 공정은 세린 함량을 효과적으로 감소시키고 알라닌 및 글리신의 상대적인 함량을 증가시키는데, 이는 수소결합을 만들 수 있는 가용 히드록실기의 갯 수를 제거한다. 이 메커니즘을 통해, 여기에 기재된 공정은 용액에 만들어지는 SDP를 연장된 기간 동안 안정화시킨다(예를 들어 적어도 6-8개월, 및/또는 적어도 1.5 년; 연장된 연구가 진행 중이고, 안정성은 적어도 2 년, 적어도 3 년 이상 동안 유지될 수 있다).

[0055] 시스테인 및 세린의 감소에 더하여, 용매 전하 상호작용이 단백질 용액의 안정화에 중요하다. 최초 단백질 침전 후에, 겔화 과정이 계속 진행되어 천연 피브로인 중쇄 사이에 더 가까운 연결을 유도하는 것으로 보여지며, 이는 중쇄의 수소성 블록 간의 분자내 및 분자간 베타-병풍(sheet)의 형성으로 이어진다. 일단 베타-병풍 형성이 뚜렷하게 일어나면, 피브로인 용액은 겔로 전환된다. 용액이 겔로 전환함에 따라, 피브로인은 비용해성이 되고 용액에 기반한 제품으로서는 더 이상 쓸모가 없게 된다. 겔화를 방지하기 위하여, SDP 용액의 pH는, 예를 들어 pH 7.5 이상처럼, 안정성을 향상시키기 위하여 고염기성으로 상승되어질 수 있다. 결과적으로, 증가한 pH는 용액에서 SDP 분자 주변에 원자가 방패(valence shield)를 형성하는 추가의 자유 히드록실기를 생성한다. 형성된 원자가 방패는, 수소 결합 또는 비특이적으로 하전된 및/또는 소수성의 상호작용으로부터 기인하는 단백질-단백질 상호작용을 감소시킴으로써 단백질을 안정시키는 제타 포텐셜을 생성하는 역할을 한다. 피브로인 변이 공정은, 이러한 메커니즘과 다른 메커니즘을 통해 가공된 SDP를 용액에서 기능적으로 안정화시킨다. 상기 SDP는 *Bombyx mori* 실크 피브로인 또는 *Bombyx* 속 유래 다른 피브로인 또는 다른 실크 단백질로부터 유래될 수 있다.

[0056] SDP 물질은 하기의 공정에 의해 제조될 수 있다.

[0057] 1. 번데기 물질을 제거하고 따뜻한 물에 미리 행구어 실크 고치를 준비한다.

[0058] 2. 통상적으로 95°C 이상인 높은 수온과 알칼리성 pH에서 고치를 물에서 세척하여, 천연 피브로인 단백질 섬유를 검(gum) 유사 세리신 단백질로부터 추출한다.

[0059] 3. 추출된 피브로인 섬유를 건조시킨 다음, 베타-병풍 간의 수소 결합을 중화시키는 용매 시스템을 사용하여 섬유를 용해시킨다. 20%(w/v) 실크 피브로인 단백질의 54% LiBr 수용액이 이 중화 단계에 효과적이다.

[0060] 4. LiBr 용액에 용해된 피브로인 단백질을 오토크레이브 환경(~121°C(~250°F), ~15-17PSI 압력, 약 30분)에서 처리한다.

[0061] 5. 열처리된 피브로인 단백질 및 LiBr 용액을 투석하여 용액으로부터 리튬과 브로미드를 제거한다. 공정의 이 시점에서 물질은 화학적으로 SDP로 변환된다.

- [0062] 6. 투석된 SDP를 여과하여 용해되지 않은 응집체와 오염시키는 오염물을 제거한다.
- [0063] 현행의 실크 피브로인 용액 제조에 사용되는 공정과 분명하게 다른 공정을 사용하여 SDP 용액을 제조한다. 뚜렷하게, 실크 피브로인 단백질을 오토클레이브 처리하면, 실크 피브로인 단백질이 용액에서 LiBr과 조합되어 있으면서도 안정화된 SDP 물질을 생성하는 화학적 전환을 촉발시킨다. 피브로인 단백질은 LiBr 용액에 용해되어 있는데, 그것은 용해된 천연 피브로인 단백질의 수소 결합 및 정전기적 상호작용을 중화시킨다. 이는 단백질이 용액에서 특정한 2차 구조를 형성하지 않도록 한다. 결과적으로, 피브로인 단백질 내에서 공유결합을 가수분해하는데 필요한 열역학적 에너지가 가수분해를 시작하는 최소의 에너지 요구에 있다.
- [0064] 한 양태에서, 30분의 15-17PSI 오토클레이브 조건에서 온도를 121°C로 설정한다. 그러나, 다양한 양태에서, SDP 물질을 다양한 정도로 안정화하기 위하여 처리조건이 변경될 수 있다. 다른 양태에서, 추가적인 단백질 안정화제가 공정에 사용될 수 있는데, 이는 칼슘 클로리드 및 소듐 티오시아네이트와 같은 추가의 또는 다른 할라이드 염; 우레아, 구아니딘 히드록클로라이드 및 1,1,1,3,3,3-헥사플루오로이소프로판올과 같은 유기제; 칼슘 니트레이트 및 1-부틸-3-메틸이미다졸륨 클로리드와 같은 추가적인 강이온 수용액 첨가제, 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0065] **SDP 조성물들**
- [0066] 본 발명은 SDP 조성물을 제공하는데, 상기 조성물은 수용액에서 향상된 용해도 및 안정성을 가진다. 상기 조성물은 염증을 치료하고 감소시키는데 사용될 수 있다. 한 구체 예에서, 상기 SDP 및/또는 그의 분획물은 세린, 글리신, 및 알라닌의 조합된 아미노산 함량에 대해 천연 피브로인과 4 % 이상 상이한(차이의 절대 값의 총합을 통해) 1 차 아미노산 서열을 갖는다. 복수의 SDP의 단백질 단편은 아마이드 (-C(=O)NH₂) 그룹에서 중결될 수 있다. SDP는 천연 피브로인과 비교하여 40 % 이상 감소된 세린 함량을 가질 수 있으며, 세린 함량은 적어도 약 5 %이다. 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합은 감소되거나 제거될 수 있다. 본원에서 제공된 상기 SDP 조성물은 수용액에서 향상된 안정성을 보유한다. 특정 실시 양태에서, 단백질 단편의 75 % 이상은 약 60 kDa 이하의 분자량을 가지며 상처를 봉합하기 위한 세포 이동 및 증식을 촉진시키는 항염증제로서 작용한다. 상기 조성물은 8.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 일부 구체 예에서, SDP의 평균 분자량은 55 kDa 이하이다.
- [0067] 일부 경우, 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 고압에서 피브로인 수용액을 가열하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된다. 수성 피브로인 용액은 적어도 8M 농도의 브롬화 리튬을 포함한다. 수성 피브로인 용액은 적어도 약 10 PSI의 압력하에 적어도 약 105°C (221°F)로 적어도 약 20분 동안 가열되어 단백질 조성물을 제공한다. 이러한 공정 조건의 결과로서, 단백질 조성물의 폴리펩티드는 8.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함하고, 복수의 단백질 단편은 아마이드(C(=O)NH₂) 그룹에서 중결된다.
- [0068] 일부 경우, 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 고압에서 수성 피브로인 용액을 가열하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조되며, 수성 피브로인 용액은 9-10M 농도의 브롬화 리튬을 포함하며, 피브로인 수용액은 적어도 약 20분 동안 약 15 PSI 내지 약 20 PSI의 압력 하에서 약 115°C (239°F) 내지 약 125°C (257°F) 범위의 온도; 단백질 조성물을 제공한다. 단백질 조성물은 6.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함 할 수 있다
- [0069] SDP 조성물은 수용액에서 향상된 안정성을 보유할 수 있고, 여기서: 상기 SDP 조성물의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌 함량의 조합된(절대 값) 차이에 대해 천연 피브로인과 적어도 4% 차이가 있고(SDP 대 PASF); 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되고; 상기 조성물은 천연의 피브로인 단백질에 비해 25% 이상 감소 된 세린 함량을 갖는다. 상기 SDP 조성물의 평균 분자량은 투석막의 MWCO 및 SDS-PAGE 분석에 의해 측정된 바와 같이 약 60 kDa 이하 및 약 2 kDa 이상, 또는 약 10 kDa 이상 일 수 있다.
- [0070] SDP 조성물은 수용액에서 향상된 안정성을 보유할 수 있고, 여기서: 상기 SDP 조성물의 1 차 아미노산 서열이 세린, 글리신 및 알라닌 함량의 조합된(절대 값) 차이에 대해 천연 피브로인과 적어도 6 % 차이가 있고; 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거되고; 상기 조성물은 천연의 피브로인 단백질에 비해 40 % 이상 감소 된 세린 함량을 갖는다. 상기 SDP 조성물의 평균 분자량은 투석막의 MWCO 및 SDS-PAGE 분석에 의해 측정된 바와 같이 약 55 kDa 이하 및 약 10 kDa 이상 일 수 있다.
- [0071] 일부 경우, 본원에서 제공된 상기 SDP 조성물은 수용액에서 향상된 안정성을 보유하며, 상기 SDP 조성물의 1차 아미노산 서열은 천연 실크 피브로인으로부터 변형되고; 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인

인 디설파이드 결합이 감소되거나 제거된다; 상기 SDP 조성물의 평균 분자량은 약 60 kDa 이하 및 약 10 kDa 이상이고; 및 상기 SDP 조성물의 5 % w/w 수용액은 5 초의 초음파 처리 후 적어도 2 시간 동안 0.25 이하의 550 nm에서 광학 흡광도를 유지한다.

- [0072] 일부 경우에, 본원에서 제공된 SDP 조성물은 수용액에서 향상된 안정성을 보유하며, 상기 SDP 조성물의 1차 아미노산 서열은 본래의 실크 피브로인으로부터 변형되어 본래의 피브로인과 적어도 5%의 세린, 글리신 및 알라닌 함량의 결합된(절대값) 차이가 다르다. 일부 실시 양태에서, 상기 차이는 천연 피브로인에 비해 적어도 6 %, 8 %, 10 %, 12 % 또는 14 %이다. 피브로인 중쇄 및 피브로인 경쇄 단백질 사이의 시스테인 디설파이드 결합은 감소되거나 제거된다; 상기 SDP 조성물의 평균 분자량은 약 60 kDa 이하 및 약 15 kDa 이상이고; 상기 SDP 조성물은 5 초의 초음파 처리 후 적어도 2시간 동안 550 nm에서의 광학 흡광도를 0.2 이하로 유지한다.
- [0073] 일부 구체 예에서, 본원에서 제공된 SDP 조성물은 예를 들어, 투석 및/또는 여과에 의하여, 건조분말 또는 필름으로 분리 및/또는 정제될 수 있다. 다른 방안으로, 일부 구체 예에서, 본원에서 제공된 SDP 조성물은 안정한 수용액으로 분리 및/또는 정제될 수 있고, 안과 제제와 같은 치료제 제제로 사용할 수 있게 변형될 수 있다.
- [0074] 다양한 양태에서, 본원에서 제공된 SDP 조성물에서 발견된 SDP의 아미노산 조성은, 세린, 글리신 및 알라닌의 혼합된 함량에 있어서, 천연 피브로인의 아미노산 조성과 적어도 4%, 적어도 4.5%, 적어도 5%, 또는 적어도 5.5%, 또는 적어도 6%가 다르다.
- [0075] 일 구체 예에서, 상기 SDP 조성물은 천연 피브로인 단백질의 세린 함량과 비교하여, 25%를 이상하여, 30%를 이상하여, 35%를 이상하여, 40%를 이상하여, 또는 45%를 이상하여 감소된 세린 함량을 가질 수 있다.
- [0076] 본원에서 제공된 SDP 조성물의 평균 분자량은 약 80 kDa 이하, 약 70 kDa 이하, 약 60 kDa 이하, 또는 약 55 kDa 이하, 약 50 내지 60 kDa, 또는 약 51-55 kDa일 수 있다. 다양한 구체 예에서, SDP 조성물의 평균 분자량은 약 2kDa 이상, 약 10kDa 이상, 약 15kDa 이상, 약 20kDa 이상, 약 25kDa 이상, 약 30kDa 이상, 약 35kDa 이상, 약 40kDa 이상, 또는 약 50kDa 이상이다. 따라서, 본원에서 제공된 SDP 조성물의 (중량 평균) 평균 분자량은 약 5 kDa 내지 약 80 kDa, 약 10 kDa 내지 약 65 kDa, 약 15 kDa 내지 약 60 kDa, 약 15 kDa 내지 약 60 kDa 약 20 kDa 내지 약 65 kDa, 약 20 kDa 내지 약 55 kDa이다. 다양한 구체 예에서, 상기 SDP 조성물의 평균 분자량은 약 45 kDa 내지 약 65 kDa, 약 45 kDa 내지 약 60 kDa, 약 50 kDa 내지 약 65 kDa, 또는 약 50 kDa 내지 약 60 kDa이다.
- [0077] SDP 단백질 조성물은 육안으로 관찰될 수 있는 침전물 없이 40% w/w의 물에 용해될 수 있다.
- [0078] 일부 구체 예에서, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 8 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 경우, 본 명세서에서 제공되는 단백질 조성물은 7.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기, 7 % 이하의 세린 아미노산 잔기, 6.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기 또는 6 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함한다. 상기 펩타이드 조성물의 세린 함량은 일반적으로 약 4 % 이상, 또는 약 5 % 이상, 또는 약 4 ~ 5 %이다.
- [0079] 일부 구체 예에서, 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 단백질 조성물의 전체 아미노산 함량에 비해 46.5% 이상의 글리신 아미노산을 포함한다. 일부 경우, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 47% 이상의 글리신 아미노산, 47.5% 이상의 글리신 아미노산, 또는 48% 이상의 글리신 아미노산을 포함한다.
- [0080] 일부 실시 양태에서, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 단백질 조성물의 전체 아미노산 함량에 대해 30% 이상의 알라닌 아미노산을 포함한다. 일부 경우, 본 발명에서 제공되는 단백질 조성물은 30.5% 이상의 알라닌, 31% 이상의 알라닌 또는 31.5 % 이상의 알라닌을 포함한다.
- [0081] 일부 구체 예에서, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 박막으로 건조 후 완전히 재용해될 수 있다. 다양한 실시 양태에서, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 수용액에서 베타-시트 단백질 구조를 결여할 수 있다. 상기 단백질 조성물은 적어도 5 초간의 초음파 처리 후에 550 nm에서 0.25 이하의 수용액에서 광학 흡광도를 유지할 수 있다.
- [0082] 일부 구체 예에서, 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 물과 혼합될 수 있다. 일부 경우, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 10 % w/w의 농도, 또는 15 % w/w, 20 % w/w, 25 % w/w, 30 % w/w, 35 % w/w 또는 40 % w/w와 같은 높은 농도로 물에 완전하게 용해될 수 있다. 일부 구체 예에서, 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 예를 들어 투석, 여과 또는 이들의 조합에 의해 분리되고 정제될 수 있다.
- [0083] 다양한 실시 양태에서, 본원에서 제공된 단백질 조성물은 단백질 조성물 및 안과 제제 성분을 포함하는 수용액의 확산을, 예를 들어 단백질 조성물을 포함하지 않는 상응하는 조성물의 확산과 비교하여 향상시킬 수 있다.

이러한 증진된 확산은 수용액의 표면적이 2 배 이상, 또는 3 배 이상 증가할 수 있다.

- [0084] 다양한 구체 예에서, 상기 SDP 단백질 조성물은 20 % w/v 이하, 30 % w/v 이하 또는 40 % w/v 이하의 농도에서 겔을 형성하지 않는다. 일부 구체 예에서, 본원에서 제공된 SDP 조성물은 SDP 조성물의 아미노산의 적어도 약 47.5 %를 글리신 - 알라닌 - 글리신 - 알라닌 (GAGA) (서열 번호 1) 부분을 가질 수 있다. 일부 경우, 본원에서 제공된 SDP 조성물의 아미노산의 약 48% 이상, 약 48.5% 이상, 약 49% 이상, 약 49.5% 이상 또는 약 50% 이상을 GAGA (서열 번호 1) 부분을 포함한다.
- [0085] 다양한 실시 양태에서, 본원에서 제공된 SDP 조성물은 SDP 조성물의 아미노산의 적어도 약 59%를 글리신 - 알라닌 (glycine-alanine, GA) 부분을 가질 수 있다. 일부 경우, 본원에서 제공된 SDP 조성물의 아미노산의 은 약 59.5 % 이상, 약 60 % 이상, 약 60.5 % 이상, 약 61 % 이상, 또는 약 61.5 % 이상을 GA 아미노산 부분을 가질 수 있다.
- [0086] 본원에서 제공되는 단백질 조성물은 고압에서 수성 피브로인 용액을 가열하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조될 수 있으며, 상기 수성 피브로인 용액은 8M 이상의 농도의 리튬 브로마이드를 포함하고, 수성 피브로인 용액은 약 105 적어도 약 20 PSI의 압력 하에서 적어도 약 20 분 동안; 상기 단백질 조성물은 8.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함하는 단백질 조성물을 제공한다. 따라서, SDP 조성물을 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 본원에서 제공된 SDP 조성물을 제조하는 방법은 본원에 기재된 하나 이상의 공정 단계를 포함 할 수 있다.
- [0087] 일부 경우, 본원에서 제공된 제조 방법은 약 8.0M 내지 약 11M 농도의 브롬화 리튬을 사용할 수 있다. 일부 구체 예에서, 브롬화 리튬의 농도는 약 9M 내지 약 10M, 또는 약 9.5M 내지 약 10M이다.
- [0088] 일부 구체 예에서, 브롬화 리튬을 함유하는 수성 피브로인 용액은 약 107°C (225°F), 약 110°C (230°F) 이상, 약 113°C(235°F) 이상, 약 115°C(239 °F) 이상, 또는 약 120 °C(248 °F) 이상이어야 한다.
- [0089] 일부 구체 예에서, 브롬화 리튬을 함유하는 수성 피브로인 용액은 약 12 PSI 이상, 약 14 PSI 이상, 약 15 PSI 이상, 또는 약 16 PSI 이상, 약 18 PSI 이하 또는 약 20 PSI의 압력 하에서 가열된다 .
- [0090] 일부 구체 예에서, 브롬화 리튬을 함유하는 수성 피브로인 용액은 적어도 약 20 분, 적어도 약 30 분, 적어도 약 45 분, 또는 적어도 약 1 시간, 수 (예를 들어, 12-24) 시간까지 가열된다.
- [0091] 일부 구체 예에서, 단백질 조성물은 관측 가능한 침전없이 40 % w/w의 물에 용해 될 수있다.
- [0092] 일부 구체 예에서, 피브로인은 세리신(sericin)으로부터 분리된다.
- [0093] 일부 구체 예에서, 정제된 단백질 조성물을 제공하기 위해 브롬화 리튬이 단백질 조성물로부터 제거되었다. 다양한 실시 양태에서, 단백질 조성물은 예를 들어 투석, 여과 또는 이들의 조합에 의해 분리되고 정제된다.
- [0094] 추가의 실시 양태에서, 단백질 조성물은 전술한 바와 같은 특성 및 세린, 글리신 및 알라닌 함량에 관해 상기 기술된 바와 같은 아미노산 조성을 가진다.
- [0095] 다양한 구체 예에서, 단백질 조성물은 건조 후에 천연 피브로인에서 발견되지 않는 특성인 박막인 필름으로 건조 후 재용해된다. 상기 단백질 구성은 용액에서 베타-시트 단백질 구조가 부족할 수 있다. 상기 단백질 조성물은 적어도 5 초간의 초음파 처리 후에 550 nm에서 0.25 이하의 용액에서의 광학 흡광도를 유지할 수 있다.
- [0096] 하나의 특정 양태에서, 본 발명은 고압에서 수성 피브로인 용액을 가열하는 것을 포함하는 방법에 의해 제조된 단백질 조성물을 제공하며, 상기 수성 피브로인 용액은 9-10M 농도의 브롬화 리튬을 포함하고, 상기 피브로인 수용액은 적어도 약 30 분 동안 약 15 PSI 내지 약 20 PSI의 압력 하에서 약 115 °C(239 °F) 내지 약 125 °C (257 °F) 범위의 온도로 가열되고; 상기 단백질 조성물은 6.5 % 이하의 세린 아미노산 잔기를 포함하는 단백질 조성물을 제공하고, 상기 단백질 조성물은 물에서 15 % w/w 용액으로서 10 cP 이하의 수성 점도를 갖는다.
- [0097] SDP 조성물은 아미노산 함량 및 말단 아미드 그룹의 형성에서 변형을 야기하는 제조 공정의 결과로서 천연 실크 피브로인 단백질과 화학적으로 구별된다. 생성 된 SDP는 수용액에서 향상된 용해도 및 안정성을 갖는다. SDP는 예를 들어, 본 명세서에 기술된 단백질 조성물, 예를 들어 단백질 조성물의 수용액을 갖는 안과 제형을 형성하는 방법에 사용될 수 있다. 상기 용액은 약 0.01 % 내지 약 92 % w/v SDP를 포함할 수 있다. 상기 용액은 약 8% 내지 약 99.9% w/v 물일 수 있다.
- [0098] 일부 실시 양태에서, 방법들은 피브로인 단백질의 가수분해, 아미노산 분해 또는 이들의 조합을 유도하여 단백질의 평균 분자량이 종래 기술의 방법을 사용하여 제조된 실크 피브로인에 대해 약 100-200kDa에서 본원에 기술

된 SDP 물질에 대해서 약 30-90 kDa, 또는 약 30-50 kDa으로 감소된 방법을 제공한다.

[0099] 또한 아미노산 화학은 표준 분석 절차로 시스테인 함량을 검출할 수 없는 수준으로 감소시킴으로써 변경될 수 있다. 예를 들어, 세린 함량은 표준 분석 절차로 결정된 것으로 천연 피브로인에서 발견되는 수준에서 50 % 이상 감소시킬 수 있어서 이것은 전체 알라닌 및 글리신 함량이 5 % (상대 아미노산 함량) 증가를 야기할 수 있다. 상기 SDP 물질은 약 8 % 이하의 상대적 아미노산 함량의 세린 함량 또는 약 6 % 이하의 상대 아미노산 함량의 세린 아미노산 함량을 가질 수 있다. 상기 SDP 물질은 약 46.5 % 이상의 글리신 함량 및/또는 약 30.5 % 이상의 알라닌 함량, 또는 약 30.5 % 이상의 알라닌 함량을 가질 수 있다. 상기 SDP 물질은 예를 들어, 단백질 조성물의 가수 분해된 폴리펩타이드의 HPLC 분석에 의해 결정된 것과 같은 검출될 수 없는 정도의 시스테인 함량을 가질 수 있다. 상기 SDP 물질은 예를 들어 FTIR 분석에 의해 결정된 것과 같은 천연 실크 피브로인 단백질에 비해 90% 이하, 95 % 이하 또는 98 % 이하의 베타-시트 이차 단백질 구조를 형성할 수 있다.

[0100] 안정성 평가. 단백질 용액의 안정성은 여러 가지 다른 방법으로 평가할 수 있다. 하나의 적합한 평가는 아래의 실시예 1에 기재된 로렌스 안정성 시험이다. 또 다른 적절한 평가는 단백질 용액에 초음파 처리를 가한 다음 광학 흡광도 분석을 수반하여 계속된 광학 투명도(및 응집, 베타 시트 형성 및/또는 겔화의 결핍)를 확인하는 것이다. 상기 SDP 용액의 안정성을 테스트하기 위해 표준 초음파 처리 또는 초음파 처리(20 kHz 이상의 음향 주파수)를 사용할 수 있다. SDP 용액은 초음파 처리 한 후 안정적이다. 상기 SDP 조성물은 5초의 초음파 처리 후 적어도 2시간 동안 0.25 이하의 550 nm에서 광학 흡광도를 유지한다. 예를 들어, 상기 단백질 조성물의 5 % w/w 용액은 ~ 20 kHz에서 5초의 초음파 처리 후 550 nm에서 0.1 이하의 광학 흡광도를 유지할 수 있으며, 여기에 기술된 초음파 처리에 사용되는 표준 조건이다. 다양한 구체 예에서, SDP 조성물 수용액은 10 % w/w 이하의 농도에서 초음파 처리시 겔화되지 않는다. 추가의 실시 양태에서, SDP 조성물 수용액은 15 % w / w 이하, 20 % w / w 이하, 25 % w / w 이하, 30 % w / w 이하, 35 % w / w 또는 이하의 농도에서 초음파 처리시 겔화되지 않는다.

[0101] 낮은 점도. SDP는 제조 과정과 펩타이드 사슬의 화학 구조 변화로 인하여 SDP는 천연 실크 피브로인 (PASF)보다 점도가 낮다. 천연 실크 피브로인은 25°C에서 5 % w/w 용액으로 점도가 약 5.8 cP 인 반면 동일한 조건에서 SDP는 약 1.8 cP의 점도를 가지며 SDP-4는 점도가 약 2.7 cP이다. SDP는 고농도에서도 PASF에 비해 점도가 낮다. 상기 SDP 조성물은 물 중에서 10 % w/w 용액으로서 5 cP 이하 또는 4 cP 이하의 수성 점도를 가질 수 있다. 다양한 구체 예에서, SDP는 적어도 9.8 cP의 점도까지 용액 상태로 유지된다. SDP는 또한 물에서 15% w/w 용액으로서 10 cP 이하의 수성 점도를 갖는다. SDP는 또한 물에서 24% w/w 용액으로서 10 cP 미만의 수성 점도를 가질 수 있다.

[0102] 본원에 기술된 공정은 가공 후 시료를 NuPAGE™ 4 % -12 Bis-Tris 단백질 겔 (ThermoFisher Scientific, Inc.)로 착수된 표준 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS-PAGE)을 사용하여 러닝할 때 피브로인 경쇄 단백질이 식별될 수 없는 단백질을 제공한다. 예를 들어, 일 구현 예에서, 상기 SDP 물질은 천연 실크 피브로인 단백질과 비교할 때 50 % 이상 제거된 피브로인 경쇄를 가질 수 있다. 또한, 상기 생성된 SDP 물질은 베타-시트 단백질 2 차 구조를 형성하지 않는 후-가공을 최소화하는 반면, 종래 기술 방법을 사용하여 제조된 실크 피브로인 용액은 상당한 양의 베타-시트 2차 구조를 형성한다. 일 구현 예에서, 상기 SDP 물질은 40-60 % w/v 브롬화 리튬의 존재하에 고압 증기 멸균 또는 오토 클레이브 유사 조건(예를 들어, 약 40 °C에서 약 120 °C 및 14-18 PSI) 하에서 실크 피브로인을 가용하여 제조될 수 있다.

[0103] **SDP 조성물 분획물들**

[0104] 실크 테크놀로지 (Silk Technologies, Ltd.)는 염증을 줄이고 상처 치유 과정을 개선하기 위해 안과용 제제에 용이하게 포함시킬 수 있는 실크 유래 단백질 (SDP) 생산물을 개발했다. 상기 SDP 산물은 항염증 및 상처 치유 특성을 향상시키기 위해 분자량에 기초한 더 작은 단백질 분획 또는 서브군으로 분리될 수 있다. 분획 또는 단편으로 지칭되는 SDP 단백질 서브군은 예를 들어 크기 배제 크로마토 그래피 또는 막 투석과 같은 임의의 적절한 효과적 방법으로 분리될 수 있다. 예를 들어, 상기 분획물들은 감소하는 평균 분자량에 기초하여 2-4 개의 상이한 그룹으로 분리될 수 있다. 실시예 6은 동일한 전체 아미노산 함량 및 말단 아미드 함량을 가지나 상이한 평균 분자량을 갖는 4 개의 상이한 분획물들을 제조하는 한 방법을 기술한다. 상이한 분획물들은 예를 들어 상이한 분획물들의 세포 흡수의 차이의 결과로서 인체 및 다양한 조직에서 염증을 감소시키는 상이한 생물학적 성질을 가지는 것을 발견하였다.

[0105] 따라서, 본 개시는 SDP의 낮은 평균 분자량 분획물들을 포함하는 SDP를 사용하여 염증을 감소시키고 및/또는 상처 치유를 향상시키는 방법을 제공한다. 또한, 안구 건조증, 및/또는 각막 상처를 포함하는 상해와 같은 안 질환

환의 치료에서 염증을 감소시키기 위한 조성물이 기술되어 있지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 치료는 SDP 또는 저 분자량 SDP 서브군을 포함하는 제제의 투여를 포함할 수 있다. 특정 실시 양태에서, 본 발명은 저 분자량 SDP(예: SDP-3 또는 SDP-4)를 포함하는 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 질병 상태 및/또는 상처 치료 방법을 제공한다.

- [0106] 상기 방법은 SDP 분획물의 조성물을 병 또는 손상된 조직에 적용하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 단백질 분획물은 세린, 글리신 및 알라닌의 결합된 아미노산 함량에 대해 천연 피브로인과 4 % 이상의 차이 (절대 값 차이의 합계를 통해)를 갖는 일차 아미노산 서열을 가질 수 있다. 다수의 단백질 단편은 아미드(C(=O)NH₂) 그룹에서 종결될 수 있다. 본원에서 제공된 조성물은 천연 피브로인과 비교하여 40 % 이상 감소된 세린 함량을 가질 수 있으며, 세린 함량은 적어도 약 5%이다. 피브로인의 피브로인 중쇄 및 피브로인 경질 단백질 사슬 사이의 시스템인 디설파이드 결합은 감소되거나 제거될 수 있다. 일부 구체 예에서, 단백질 단편의 75 % 이상은 약 100 kDa 이하의 분자량을 갖는다. 이러한 조성물은 염증을 감소시키고, 질병 상태를 치료하고 및/또는 상처의 봉합을 강화시키기 위해 조직에서 세포 이동 및/또는 증식을 촉진시킨다. 상기 SDP 조성물은 수용액에서 향상된 용해도 및 안정성을 갖는다.
- [0107] SDP 조성 분획은 약 2 kDa 내지 60 kDa의 평균 분자량을 가질 수 있다. 일 구체 예에서, 25-38 kDa, 32-35 kDa 또는 약 34 kDa ± 5 %의 평균 분자량을 갖는 저 분자량 분획물이 분리되고, 이 분획은 본원에서 SDP-4로 명명한다.
- [0108] 일부 실시 양태에서, 단백질 조각의 60 % 이상은 상처를 봉합하기 위해 조직에서의 세포 이동 및 증식을 촉진하기 위해 약 60kDa 이하, 또는 약 55kDa 이하의 분자량을 갖는다. 또 다른 실시 양태에서, 단백질 단편의 90% 이상은 약 100 kDa 이하의 분자량을 가지며 상처를 봉합하기 위한 세포 이동 및 증식을 촉진한다.
- [0109] 일부 구체 예에서, 단백질 단편의 80 % 이상은 약 10 kDa 내지 85 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시 양태에서, 단백질 단편의 적어도 50%는 약 20 kDa 내지 60 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 구체 예에서, 단백질 단편의 적어도 85%는 약 10 kDa 이상의 분자량을 갖는다. 일부 구체 예에서, 단백질 단편의 90% 이상은 약 5 kDa 이상의 분자량을 갖는다.
- [0110] 특정 구체 예에서, 본 발명은 저 분자량 SDP 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 SDP 조성물을 제공한다. 상기 저 분자량 SDP는 60kDa 이하의 평균 분자량을 가질 수 있다. 일부 구체 예에서, 상기 저 분자량 SDP는 40 kDa 이하이고, 상기 분획물은 염증을 감소시키고 및/또는 세포 이동 및/또는 증식을 향상시킨다.
- [0111] 일 구체 예에서, 상기 저 분자량 SDP, 예를 들어 SDP-4는 조성물 중 전체 SDP의 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 % 이상이다. 일부 구체 예에서, 상기 조성물은 고 분자량 SDP를 포함하지 않으며, 예를 들어, 그 샘플은 약 35 kDa 이하의 평균 분자량을 갖는다.
- [0112] 일 구체 예에서, SDP-4 분획은 상기 기술한 바와 같이 SDS-PAGE/ImageJ 분석에 의하여 결정된 것과 같이 33 내지 35 kDa의 평균 분자량 및 pH 8.1-8.3, 삼투압이 약 23 mOsm, 각각 물에서 50 mg/mL 용액으로 25°C서 약 1.5-3 cP의 점도를 가진다.
- [0113] 다양한 조성물은 저 분자량 단백질 단편 또는 고 분자량 단백질 단편 또는 이들의 조합을 포함하도록 제조될 수 있다. 저 분자량 단백질 단편은 질환이 있는 조직 표면 및/또는 상처에서 염증을 감소시키고 및/또는 세포 이동 및/또는 증식을 향상시킬 수 있다. 저 분자량 단백질 단편은 또한 활성 질환 상태 및/또는 상처 또는 상처들의 존재로 인한 염증 조직 표면을 치료하는데 유용하다. 일부 경우에는 상처 치유 과정을 향상시키기 위해 저 분자량 단백질 단편의 조성물을 적용하는 것이 유용할 수 있다. 이러한 경우에는 전쟁 중 전장에서 얻은 상처, 빠른 치유를 원하는 환자의 수술 상처, 예를 들어 감염 또는 통증 완화를 포함할 수 있다. 상처 치유 과정은 세포 수의 증가, MMP-9와 같은 염증 분자의 감소 및/또는 상피 세포 증식의 증가에 의해 향상된다.
- [0114] 고 분자량 단백질 단편들은 기저막으로의 세포 부착을 증가시키거나 기저막 형성을 돕는다. 일부 경우에는 당뇨병성 궤양이나 피부 화상과 같이 치유가 곤란한 상처나 만성 상처에 고 분자량 단백질 단편들을 적용하는 것이 유용할 수 있다. 저 분자량 단백질 단편들이 상처 봉합율에 관여할 수 있는 반면, 고 분자량 단백질 단편은 상처 봉합 품질과 관련될 수 있다. 일부 경우에, 최적의 상처 치유 속도 및 품질을 위하여 신중하게 선택된 양의 저 분자량 단백질 단편 및 고 분자량 단백질 단편의 조성물을 적용하는데 사용될 수 있다. 상처 치유 과정은 ZO-1(zollula occluden) 구조와 같은 세포들 간의 타이트 점선 및/또는 FAK (focl adhesin kinases)과 같은 구조 단백질들을 증가시킴으로써 향상된다.

- [0115] SDP-4와 같은 저 분자량 분획물들은 SDP 및 고 분자량 분획물들과 구별되는 특정 성질을 갖는다. 예를 들어, SDP 세포 흡수는 펩티드 사슬의 분자량에 의존한다. 약 60kDa보다 작은 SDP 펩티드 분자는 배양에서 세포, 구체적으로는 인간 각막 윤부 상피 세포 (hCLE)에 의하여 용이하게 흡수된다. 크기가 약 60 kDa보다 큰 SDP 분자는 대부분 세포 배양에 의하여 흡수되는 것으로부터 배제된다. 또한 SDP 분자가 리소좀성 엔도사이틱 분해 경로의 마커인 LAMP-1(lysosomal-associated membrane protein 1)과 공존하지 않는다는 점에 주목하는 것이 중요하다. 그 결과, 상기 SDP 분자는 약 60 kDa 이하의 분자가 hCLE 세포에 흡수되는 비특이적 세포막 수용체와 결합하는 것으로 보인다. 더 중요한 것은, 상기 SDP 분자가 리소좀 분해 경로를 통해 흡수되지 않기 때문에 생물학적으로 이용 가능하고 생물학적 활성을 이끌어 낼 수 있다는 것이다.
- [0116] **SDP 제형들**
- [0117] 본원에 기재된 SDP 조성물 및 서브-분획물들은 물 및/또는 약제학적 담체로 제제화될 수 있다. 상기 약학적 담체는 예를 들어, 인산 완충 식염수, 필름, 섬유, 발포체, 하이드로 겔, 단백질 또는 중합체 매트릭스, 3 차원 지지체, 미립자, 나노 입자, 중합체 또는 매트릭스 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 단백질 단편들은 각막 이식편, 상처 드레싱, 콘택트 렌즈, 조직, 조직-이식편 또는 분해 가능한 물질과 같은 기질에 부착될 수 있다. 특정 구현 예에서, 상기 담체는 예를 들어 안구 제형에서 인산 완충 식염수이다.
- [0118] 일부 구체 예에서, 안과적 조성물은 인간 또는 포유동물에서 안구 건조 증후군을 치료하기 위해 제공된다. 본원에서 제공된 조성물들은 건성 안구 증후군을 치료하는데 유효한 양의 SDP를 포함하는 수용액일 수 있다. 예를 들어, 수용액 중의 상기 SDP의 유효량은 약 0.01 중량 % 내지 약 80 중량% SDP일 수 있다. 다른 구체 예에서, 상기 수용액은 약 0.1 중량% 내지 약 10 중량%, 또는 약 0.5 중량 % 내지 약 2 중량%의 SDP를 포함할 수 있다. 특정의 특정 실시 양태에서, 안과 조성물은 약 0.05 % w/v SDP, 약 0.1 % w/v SDP, 약 0.2 % w/v SDP, 약 0.25 % w/v SDP, 약 0.5 % w/v SDP, 약 0.75 % w/v SDP, 약 1 % w/v SDP, 약 1.5 % w/v SDP, 약 2 % w/v SDP, 약 2.5 % w/v SDP, 약 5 % w/v SDP, 약 8 % w/v SDP 또는 약 10 % w/v SDP를 포함할 수 있다.
- [0119] 다양한 구체 예에서, 상기 안과 제제는 완화제, 완충제 및/또는 안정화제와 같은 수용액 내 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 완화제는 히알루론산 (HA), 히드록시 에틸 셀룰로오스, 히드록시 프로필 메틸 셀룰로오스, 텍스트란, 젤라틴, 폴리올, 카르복시 메틸 셀룰로스 (CMC), 폴리에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜(PG), 하이프로멜로오스, 글리세린, 폴리소르 베이트 80, 폴리비닐 알콜 또는 포비돈이다. 상기 완화제는 예를 들어, 약 0.01 중량 % 내지 약 10 중량 %, 또는 약 0.2 중량 % 내지 약 2 중량%로 존재할 수 있다. 하나의 특정 실시 양태에서, 상기 완화제는 HA이다. 다양한 실시 양태에서, 상기 HA는 제제의 약 0.2 중량 %로 존재할 수 있다.
- [0120] 안과 제형의 완충제 또는 안정화제는 인산 완충 식염수, 붕산 완충 식염수, 시트르산 완충 식염수, 염화나트륨, 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화칼륨, 중탄산나트륨, 염화아연, 염산, 수산화나트륨, 에데트산 나트륨(edetate disodium), 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0121] 안과 제제는 유효량의 항균 방부제를 추가로 포함할 수 있다. 항균 보존제는 예를 들어 과붕산나트륨, 폴리쿼터늄 -1(예를 들어 Polyquad® 방부제), 벤잘코늄 (BAK) 클로라이드, 아염소산나트륨, 브리모니딘, 브리모니딘 푸리트, 폴렉시토늄(pollexitonium) 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0122] 안과 제형은 또한 유효량의 혈관 수축제, 항-히스타민 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 혈관 수축제 또는 항히스타민제는 나프아졸린 하이드로클로라이드, 에페드린 하이드로클로라이드, 페닐에프린 하이드로클로라이드, 테트라하이드로졸린 하이드로클로라이드, 페니라민 말레이트 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0123] 일 구체 예에서, 안과 제제는 물 및 하나 이상의 안과용 성분과 조합하여 본원에 기재된 바와 같은 유효량의 SDP를 포함할 수 있다. 안과용 성분은 예를 들면, a) 폴리비닐 알콜; b) PEG 및 히알루론산; c) PEG 및 프로필렌 글리콜, d) CMC 및 글리세린; e) 프로필렌 글리콜 및 글리세린; f) 글리세린, 하이프로멜로오스 및 PEG; 또는 선행 구성 요소 중 하나 이상의 조합을 포함할 수 있다. 안과 제제는 HP-구아, 붕산염, 염화칼슘, 염화마그네슘, 염화칼륨, 염화아연 등과 같은 하나 이상의 불활성 성분을 포함할 수 있다. 안과용 제형은 또한 소듐클로라이드(Purite® 보존제 (NaClO₂), 폴리쿼드, BAK, EDTA, 소르브산, 벤질 알코올 및 그 유사체와 같은 하나 이상의 안과 보존제를 포함할 수 있다. 안과용 성분, 불활성 성분 및 방부제는 약 0.25 %, 0.3 %, 0.4 %, 0.5 %, 1 %, 2 %, 2.5 % 또는 5 %와 같은 약 0.1 % 내지 약 5 % w/v, 또는 상기 언급된 임의의 2개 사이의 범위 값들로 포함될 수 있다.
- [0124] 인간 또는 포유동물에서 안과 질환의 치료를 위한 안과 제형이 제조될 수 있으며, 상기 안약 제형은 물 및 전술

한 바와 같은 유효량의 SDP를 포함한다. 상기 안과 조성물은 안과 조성물이 물, 하나 이상의 완충제 및 안정화제, 및 유효량의 SDP 또는 그의 서브-분획물을 포함하는 인간 또는 포유동물에서 눈 치료제로서 사용될 수 있다.

[0125] 상기 SDP는 물에서 매우 안정하며, 저장 수명 안정성은 용액 내 안정성이 천연 실크 피브로인의 2 배 이상이다. 예를 들어, 상기 SDP는 물에서 매우 안정하며, 유효기간 동안 용액 안정성이 용액에서 천연 실크 피브로인에 비해 10 배 이상 높다. 상기 SDP 물질은 수용액에서 5%(50mg/mL) 농도의 용액을 초음파 처리할 때 겔화되지 않는다. 다른 구체 예에서, 상기 SDP 물질은 수용액에서, 10%(100 mg/mL) 농도에서 용액의 초음파 처리시 겔화되지 않는다.

[0126] **치료 방법들**

[0127] 본 발명은 염증, 예를 들어 인간 각막 위 또는 각막 안의 염증을 감소시키기위한 제형에서 SDP의 용도를 제공한다. 이러한 염증을 감소는 in vitro 및 in vivo 실험 모델 모두에서 입증되었다. 특히, SDP가 인체의 염증을 유발하는 것으로 알려진, 그것의 특별한 한가지 예가 안구 건조증인 NF-κB 관련 세포 신호 전달 경로를 억제함으로써 인간 각막 모델의 염증을 감소시키는 작용을 한다는 것을 입증하기 위한 연구가 수행되었다(그림 1 및 2 참조). 이러한 경로의 억제가 궁극적으로 건성 안과 눈 염증을 알려진 추진자인 MMP-9의 유전적 발현 및 조직 체류를 감소시켰다(그림 4 참조). 여기에 나열된 연구들은 각막 염증에 특이적이지만, 영향을 받는 생물학적 과정은 신체의 다양한 조직에도 존재한다. 결과적으로, 각막에 관한 본원에 개시된 결과들은 상피 표면을 포함하는 다른 조직 시스템으로 확장될 수 있고, 그것의 하나의 예가 피부이다.

[0128] 따라서, 본 발명은 관심 부위에 SDP를 투여하는 것을 포함하는, 염증을 감소시키고 각막 상처를 포함하는 상처 치료 방법을 제공한다. 상기 방법은 실크-유래 단백질(SDP) 또는 그것의 분자 분획물들의 조성물을 포함하는 제제를 염증 조직, 예를 들어 상처의 살아있는 동물 조직에 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구체 예에서, 환자는 예를 들어 안구 건조증에서와 같이 염증 조직을 초래하는 안구 이상을 갖는다. 일부 구체 예에서, 상기 상처는 안구 상처, 수술 상처, 절개 또는 마모이다. 안구 상처는 예를 들어, 각막 상처일 수 있다.

[0129] 따라서 SDP는 상처, 감염 또는 질병과 같은 이상에 의해 유발된 염증을 치료 및/또는 감소시키는데 사용될 수 있다. 이러한 이상의 예에는 안구 상처, 수술 상처, 절개 또는 찰과상이 포함된다. 일부 경우, 상기 염증은 안구 건조 질환 또는 증상, 각막 궤양, 각막 침식, 각막 마모, 각막 변성, 각막 천공, 각막 상처, 상피 결장염, 각 결막염, 특발성 포도막염, 각막 이식, 연령 관련 황반변성(AMD, 습성 또는 건성), 당뇨병성 안질환, 안검염, 녹내장, 눈의 고혈압, 수술 후 눈의 통증 및 염증, 후방 신생 혈관 형성, 증식성 유리체 망막병증, 거대세포 바이러스 망막염, 안내염, 맥락막 신생혈관막(choroidal neovascular membrane), 혈관 폐색성 질환(vascular occlusive disease), 알레르기성 안 질환, 중양, 색소성 망막염(retinitis pigmentosa), 눈 감염, 공막염, 안검하수증, 동공증(miosis), 눈 통증, 산동증(mydriasis), 신경통(neuralgia), 간질성 눈의 표면 질환(cicatrizing oclar surface disease), 눈의 감염, 염증성 안 질환, 눈의 표면 질환, 각막 질환, 망막 질환, 전신 질환의 눈의 발현, 유전성 안 질환, 안 중양, 안압 상승, 헤르페스 감염, 상아질(prigidium) 또는 공막(scleral) 중양, 눈의 표면에 지속된 상처, 광굴절형 각막절개술 후(post-photorefractive keratotomy) 안 통증 및 염증, 각막에 열 또는 화학적 화상, 공막 상처 또는 원추각막 및 결막 상처이다. 일 구체예에서 상기 염증 및/또는 안과 이상은 노화, 자가 면역 이상, 외상, 감염, 퇴행성 장애, 내피 영양 장애 및/또는 수술에 의해 유발된다. 하나의 특정 예에서, SDP는 건성안 증후군을 치료하기 위한 제제에 사용된다.

[0130] 따라서, 다양한 구체 예에서, SDP 및/또는 SDP-4와 같은 그의 분획물은 눈 주위 환경의 세포 내에서 반응성 산소종(ROS) 예를 들어 과산화수소의 소거를 통해 표준 NF-κB 경로의 산화 환원 조절된 활성화의 매개체를 저해하여 안구 건조증을 유발하는 염증을 감소시키는데 사용될 수 있다. 감소된 안구 건조증 증상의 증거는 NF-κB 신호 전달 경로의 활성화에 의해 유도되는 MMP-9 및 TNF-α 유전자 전사의 감소일 수 있다. 또한, 각막 조직에서의 MMP-9 효소 존재 또한 감소될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0131] 하기의 도면은 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양태 또는 다양한 양태를 추가로 예시하기 위해 포함된다. 몇몇 경우들에서, 본 발명의 실시 예들은 본 명세서에 제공된 상세한 설명과 함께 첨부된 도면들을 참조함으로써 가장 잘 이해 될 수 있다. 상세한 설명 및 첨부 도면은 본 발명의 특정한 특정 예 또는 특정 측면을 강조할 수 있다. 그러나 당업자는 예시 또는 양태의 일부가 본 발명의 다른 예 또는 측면과 조합하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다.

도 1A-D. NF- κ B 활성화에 대한 hCLE 배양의 p65 단백질 면역 염색(백색). (A) PBS로 처리한 음성 대조 배양물은 천연 NF- κ B 비활성을 나타내는 세포질 p65 염색을 보였다. (B) 1ng/mL TNF- α 를 함유한 PBS로 처리 한 양성 대조 배양물은 단백질 전좌를 나타내는 점상의 p65 핵 염색을 나타내었고, 따라서 높은 수준의 NF- κ B 활성화를 나타내었다. (C 및 D) PBS, TNF- α 및 0.1 % SDP 또는 1% SDP로 처리한 배양물은 더 높은 SDP 농도가 NF- κ B 활성화를 더 많이 억제한다는 것을 나타내는 핵 p65 염색에서 용량 의존적인 감소를 나타내었다. (스케일 바 = 20 μ m).

도 2. PBS, PBS + 0.5 % SDP, PBS + 1 ng/ml TNF - α 사이토카인, PBS + 1 ng/ng TNF- α 사이토카인 + 0.5 % SDP로 처리된 hCLE 배양에 대한 TNF- α 와 MMP - 9에 대한 상대적 유전자 발현 배수의 qPCR 결과 요약. TNF- α 와 MMP-9는 NF- κ B 활성화의 유전자 마커로 알려져 있다. TNF- α 로 자극하고 0.5 % SDP로 처리한 배양 물은 TNF- α 사이토카인 자극 대조군에 비해 유전자 발현이 6배 감소한 것으로 나타났다 (각각의 GOI에 대해 PBS와 비교하여 $\Delta p < 0.01$, $\Theta p < 0.01$ vs. 각각의 GOI에 대한 SDP 및 #p < 0.05 대 기재된 그룹; n = 3).

도 3A-E. (A) MMP - 9에 대해 면역염색된 네이티브 토끼에서 얻은 각막 조직의 대표적인 단면 이미지. (B-D) 다양한 처리군에 대해 수술 후 72 시간 동안 수확 한 토끼로부터 얻은 각막 단면의 대표적인 면역조직화학적 이미지. MMP-9 염색은 PBS-처리된 동물 (B)과 비교할 때 SDP 처리된 그룹(C 및 D) 모두에서 감소하였다. (스케일 바 = 50 μ m). (E) PBS, 0.5 % SDP 또는 2 % SDP로 처리한 각막에서의 MMP-9의 측정된 염색 강도 (형광 강도)의 요약 그래프 (* p < 0.01 대 대조군, 0.5 % SDP와 비교하여 #p < 0.01, n = 3).

도 4. 상피 표면의 수술적 박리를 수반하는 PBS, PBS + 0.5 % SDP 및 PBS + 2 % SDP로 72시간 처리된 토끼 각막에 대한 IL-1 β 및 IL-6의 상대적 유전자 발현 배수의 qPCR 결과. IL-1 β 및 IL-6은 각막 조직 환경 내 염증의 공지된 유전자 마커이다. 두 마커 모두의 발현은 SDP 처리 하에서 유의하게 감소되었다(* p < 0.01 대 각 GOI에 대한 PBS, n = 6).

도 5. 정의된 농도의 용해된 단백질(PASF, SDP 또는 SDP-4)의 존재하에 EPR(electron paramagnetic resonance) 분광법으로 측정된 H₂O₂ 수준의 요약 그래프. H₂O₂ (20 μ M)를 PASF, SDP 또는 SDP-4 (각각 0.5 %, 1% 또는 5 %)의 존재 또는 부재(대조군)하에서 배양한 다음 H₂O₂-특이적 스핀 프로브에 도입시켰다. 각 샘플에 대하여 산화된 스핀 프로브에 의해 생성된 EPR 신호를 측정하고 대조군 샘플 (즉, 단백질이 없는)에 대해 표준화하였다. PASF는 단백질 농도가 증가함에 따라 EPR 신호 진폭을 증가시켰다. 대조적으로, SDP는 EPR 신호 진폭에서 농도-의존성 감소를 유발하여 SDP 단백질이 H₂O₂를 제거한다는 것을 나타낸다. H₂O₂ 소거는 SDP-4 단백질의 존재 하에서 더욱 왕성하였다. 에러 막대는 S.D.로 표시된다, N = 3.

도 6. SDS-PAGE 라인 2-5는 생물학적 영향을 평가하기 위하여 SEC-분획화된 SDP 집단의 각각의 분자량(MW)을 나타낸다(SDP-1, SDP-2, SDP-3, SDP-4 및 SDP). 라인 6은 분획물이 유도된 분획화되지 않은 SDP 분포를 예시한다. MW 표준은 라인 1에 표시됨.

도 7. 인 비트로 상처 치유 분석에서 얻은 대표적인 이미지는 5-mg/mL SDP-3 또는 SDP-4 존재 하에서 흰색 아웃라인된 무 세포 영역(상처)로 세포 성장 및 세포 이동이 현저하게 증가되는 것을 나타낸다.

도 8. 스크래치 상처 검사 동안 표시된 시점에서의 상처 봉합율을 보여주는 요약 막대 그래프(* p < 0.05 대 대조군), (#p < 0.05 대 SDP-1, n = 3), († p < 0.05 대 SDP-2, n = 3).

도 9. 분획화된 SDPs 또는 (식염수 완충액) 대조군의 5-mg/ml로 처리된 hCLE 배양의 상피 세포 생존 능력의 MTT 분석. SDP-3 및 SDP-4 처리는 대조군 세포에 비해 세포 증식을 유의적으로 증가시켰다. SDP-1 또는 SDP-2 처리는 대조군에 비해 세포 증식을 변화시키지 않았다 (* p < 0.05 vs. 대조군, n = 3, SDP-1, n = 3, p < 0.05 vs. SDP-2, n = 3).

도 10. 염증성 신호를 개시하기 위해 TNF- α 로 자극되거나 처리하지 않고(천연), 1mg/mL의 분획화된 SDP로 처리된 hCLE 세포에서 TNF- α , MMP-9 및 인터루킨-1 α/β , -6 및 -8 전사의 qPCR 요약. SDP-3 및 SDP-4 처리는 PBS로 처리한 대조군 세포와 비교하여 염증 유전자들의 전사를 현저히 감소시켰다. († p < 0.05 vs 네이티브, n = 3, * p < 0.05 vs 대조군, n = 3).

도 11. 염증성 신호를 개시하기 위해 TNF- α 로 자극되거나 처리하지 않고(천연), 1mg/mL의 분획화된 SDP로 처리된 hCLE 세포에 의한 TNF- α 사이토카인 분비의 ELISA 분석. SDP-3 및 SDP-4로 처리는 전염증성 사이토카인 TNF- α 의 분비가 유의하게 감소하는 반면, SDP-2는 PBS로 처리된 대조군 세포에 비해 분비를 유의적으로 증가시

켰다. († p <0.05 vs 네이티브, n = 3), (* p <0.05 vs 대조군, n = 3).

도 12. TNF- α 처리는 처리되지 않은(천연) 배양과 비교하여 HL-60 염증 세포 이동을 유의하게 증가시켰음을 나타내는 Transwell 이동 분석의 요약. SDP-4 (1 mg/mL)의 첨가는 TNF- α 에 의한 HL-60 세포 이동의 유의한 감소를 가져왔다 († p <0.05 vs 대조군, n = 3, * p <0.05 vs 네이티브, n=3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0132] 다음의 실시예들은 상기 발명을 설명하기 위한 것으로 그 범위를 좁게 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 통상의 기술자라면 실시예들이 본 발명이 실시될 수 있는 많은 다른 방법들을 제시하고 있음을 이해할 것이다. 다양한 변화와 변이가 본 발명의 범위 내에 있으면서도 만들어질 수 있다고 이해되어야 한다.

[0133] **실시예 1. 실크 유래 단백질의 제조 및 로렌스 안정성 시험**

[0134] **재료.** 누에 고치를 일본의 타지마 쇼지 사(Tajima Shoji Co., Ltd.)로부터 입수하였다. 리튬 브로미드(LiBr)을 에프엠씨 리튬 인코포레이티드(FMC Lithium, Inc., NC)로부터 입수하였다. 오토클레이브 장치를 투트나우어 사(Tuttnauer Ltd., NY)로부터 입수하였다. 3.5KDa의 분자량 컷오프(MWCO) 투석 멤브레인을 써모사이언티픽 사(ThermoScientific, Inc., MA)로부터 입수하였다. 오크톤 브로미드(Br⁻)의 겹겹축 이온-선택적 전극을 아이에스 이 오크톤 인스트루먼트(ISE, Oakton Instruments, IL)로부터 입수하였다.

[0135] **공정.** 두 시료인 SDP 및 종래기술의 실크 피브로인(PASF)을 제조하였다. 간략히 설명하면, SDP를 번데기가 없는 절단된 누에 고치(고치당 3-5 절단)를 95℃로 가열된 0.3 중량%의 NaCO₃를 함유한 탈이온수(diH₂O)로 고치의 그램당 233mL 물이 되도록 담그어 제조하였다. 고치를 이 용액에서 75분간 교반하여 세리신을 용해함으로써, 이를 실크 섬유로부터 분리하였다. 고치를 평균 당 20분 동안 diH₂O의 희석액에 4번 세척하여, 세척된 실크 섬유로부터 잔류 세리신을 제거하였다. 섬유를 60℃에서 2시간 동안 대류식 오븐에서 건조하고, 무게를 재고, 추출된 섬유의 그램 당 4X LiBr 부피의 비율로 54 중량%의 물 내의 LiBr에 용해시켰다. 이 용액을 덮은 다음, 60℃에서 2시간 동안 대류식 오븐에서 따뜻하게 하여, 추출된 섬유의 용해를 촉진하였다. 용액을 오토클레이브 장치에 위치시키고, 오토클레이브 조건(121℃, 17 PSI, 90-100% 습도)에 30분 동안 노출시켜, 피브로인 변이를 촉진하였다. 얻어진 용액을 실온으로 냉각시킨 다음, diH₂O로 5% 피브로인이 되도록 희석하고, 3,500 달톤 MWCO 멤브레인으로 투석하여 LiBr 염을 제거하였다. 오크톤 브로미드(Br⁻)의 겹겹축 이온-선택적 전극에서 가수분해된 피브로인 용액으로 측정하였을 때 Br⁻ 이온이 1 ppm 미만이 될 때까지, diH₂O에서 여러 번 교환하였다. 용액을 1-5 μ m 공극 필터로 여과한 다음, 0.2 μ m 연마 필터로 여과시켰다.

[0136] "대조군" 실크 피브로인 용액을 제조하여 "종래기술의 실크 피브로인 용액(PASF)"을 제공하였다. 오토클레이브 단계를 제외하고는, 상기에 기재된 동일한 공정을 수행하였다. 각 시료로부터 시험 부피(5mL)를 분리된 20mL 유리 비이커에 놓고, 비이커를 호일로 밀봉하였다. 시료를 로렌스 안정성 시험에 투입하였다.

[0137] 로렌스 안정성 시험은, 단백질 시험 수용액(5%(w/v), 50mg/mL)을 오토클레이브 장치의 챔버에 위치시킴으로써 수행한다. 오토클레이브를 121℃, 17 PSI의 사이클로 30분간 97-100% 습도로 진행한다. 사이클이 완료된 후에, 용액을 냉각시키고 오토클레이브 챔버로부터 제거한다. 그 다음 용액을 흔들어서 용액의 겔화 거동을 관찰한다. 용액을 ~10초 동안 흔들어서 겔화되면, 시료는 로렌스 안정성 시험에 불합격한 것이다. 시험의 불합격은 물질이 본질적으로 단백질 용액으로서 불안정하다는 것을 의미한다.

[0138] 로렌스 안정성 시험을 SDP 용액 및 종래기술의 실크 피브로인 용액(PASF)에 대하여 수행하였다. 상기 PASF 용액 시료는 바로 겔화되었고, 따라서 로렌스 안정성 시험에 불합격하였다. 반대로, SDP 용액은 무한히 용액으로 유지되었고, 따라서 로렌스 안정성 시험을 통과하였다. 겔화가 없는 것은 SDP 용액 생산이 상기 기재된 조건들 하에서 오토클레이브 단계를 채택한 사실에 따른 것일 수 있다.

[0139] **실시예 2. SDP 분자량 특성**

[0140] 용해된 단백질의 분자량 분포에 대한 공정의 영향을 평가하기 위하여, SDP 용액 및 PASF 용액을, 단백질을 분자량에 따라 분리하는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE)에 적용하였다. 구체적으로, 각 시료의 15 μ g을 소듐 도데실 설페이트 및 디티오프레이톨(바이오라드 사(Biorad Inc., CA)을 함유한 런닝 완충액과 혼합하여, 각각 2차 폴딩 구조 및 디설피드 결합을 제거하였다. 그 다음 혼합물을 70℃로 5분간 가열하였다. 미리 캐스트된, 비스-트리스(Bis-Tris) 완충 염(라이프 테크놀로지스(Life Technologies, CA))를 함유한 4-12% 폴리아크릴아미드 구

배 겔에 혼합물을 2.5-200 kDa 분자량 래더(라이프 테크놀로지스)와 나란히 적재한 다음, 바이오래드 파워팩 파워 서플라이(바이오래드 인코포레이티드(Biorad Inc., CA)) 상의 120V 전기장에 90분 동안 노출시켰다. 그 다음 겔을 제거하고, 코마시 블루 염색액에 12시간 동안 위치하여 단백질을 염색하고, diH₂O에서 6시간 동안 세척하였다. 그 다음 겔을 바이오래드 GS-800 캘리브레이티드 덴시토미터(바이오래드 인코포레이티드)로 스캔하였다.

[0141] 그 결과는 상기 SDP 용액을 제조하기 위해 사용된 프로세싱이 평균 분자량을 천연 피브로인 (PASF)의 97kDa에서 SDP의 약 53kDa로 현저히 이동시키는 것을 보여준다. 분자량의 이동은 원래의 천연 피브로인의 1차 및/또는 2차 구조가 변하고 말단 아미드 형성 절단을 통하여 펩타이드의 절단을 명확하게 의미한다. 더하여, 피브로인의 피브로인 경쇄가 오토클레이브 공정 후의 SDP에서는 나타나지 않는데(종래기술의 피브로인에 관한 2번 라인에서는 23-26 kDa에서 관찰됨), 이것은 단백질의 피브로인 경쇄 부분이 공정에 의해 분해되거나 또는 제거되었음을 의미한다. 이러한 결과는 오토클레이브 공정이 천연 피브로인 단백질을 천연 피브로인 단백질보다 더 작은 펩티드 절편을 갖는 새로운 물질로 변형시켰음을 보여준다. 그 공정은 피브로인 경쇄를 더 분해/변형시킨다. 이러한 변형은 이러한 화학적 변화의 결과로서 향상된 용액 안정성을 갖는 SDP 물질을 만들어낸다.

[0142] SDP의 추가 분석은 상기 조성물의 평균 분자량이 약 53 kDa임을 보여준다. 또한, 상기 SDP의 펩티드 사슬의 약 77%가 10-100 kDa의 범위 내에 있고, 상기 SDP의 펩타이드 사슬의 약 73%가 10-85 kDa의 범위 내에 있으며, 상기 SDP의 펩타이드 사슬의 약 66%가 15-85 kDa의 범위 내에서 있으며, 상기 SDP의 펩티드 사슬의 약 49%는 20-60 kDa의 범위 내에 있고, 상기 SDP의 펩타이드 사슬의 약 31%는 25-50 kDa의 범위 내에 있다.

[0143] **실시예 3. SDP 안정성 연구**

[0144] 종래기술의 피브로인의 안정성과 비교하여 오토클레이브 공정이 수득된 SDP의 안정성에 끼치는 기능적 영향을 더 알아보기 위하여, 실크 피브로인 단백질 겔화의 잘 연구된 모델을 모방한 것인 모델 왕 등(Wang et al.)의 문헌(*Biomaterials* 2008, 29(8):1054-1064)의 방법을 사용하여, 시료들을 분석하였다. 두 시료의 일정 부피 (0.5mL, SDP 및 PASF)를 1.7mL의 투명 원심분리 튜브에 가하고, 초음파 처리하였다(20% 진폭, 10Hz, 15초). 그 다음에 겔화를 가려내기 위하여 용액을 함유한 투명 튜브를 겔 형성에 대하여 육안으로 모니터링하였다.

[0145] 상기 SDP 용액 시료는 겔을 형성하지 않았다. 심지어 음파처리 후 3개월 후에도, SDP 시료는 여전히 용액이었고 육안 검사에서 확인되는 단백질 응집이 없었다. PASF 용액 시료는 음파 처리 후에 재빨리(2시간 내에) 겔화하였다. 이러한 결과는, 오토클레이브 공정이 천연 분리된 피브로인을 새로운 물질로 변화시키고 얻어지는 SDP 물질에 안정성을 부여함을 의미한다.

[0146] **실시예 4. 인간 각막 유폴 상피 세포 (hCLE) 배양에서 NF-κB 세포 시그널링 경로의 인 비트로 분석**

[0147] Lan 등(*Nuclear Factor-κB: Central Regulator in Ocular Surface Inflammation and Diseases, The Ocular Surface*, 10, 137-148 (2012))에 기재된 것과 같이 p65는 hCLE 세포 배양에서 SDP의 항염증 활성을 평가하기 위하여 이용하였다. 앞에서 설명한 것처럼 핵 전사 인자 p65는 TNF-α 및 MMP-9를 포함하는 전염증성 유전자 발현을 촉진하기 위해 활성화시 세포핵으로 이동하는 NF-κB 복합체의 일부이다. 시험관 내에서 p65 활성을 평가하기 위해, 컨푸루언트 hCLE 배양물을 NF-κB 경로의 오토크라인 매개체인 강력한 염증성 사이토카인 TNF-α를 함유하는 PBS 또는 PBS로 처리하였다. 이어서, 세포를 각각 0.1 % PBS 또는 1.0 % SDP를 함유하는 PBS로 처리하였다. p65의 염색은 비 염증성 상태의 세포에 대해 예상되는 미처리 대조군에 대해 주로 세포질에 국한되었다(그림 1A). 그러나 p65 염색은 세포 배지에서 TNF-α로 챌린지된 핵에 대해서 핵에 국한되었고, 이것은 NF-κB 염증 경로의 활성화가 일어났다는 것을 나타낸다(그림 1B). 흥미롭게도, SDP 처리 세포에 대한 p65 염색은 주로 세포질에 국한되고 용량 의존적 처리를 나타내고, 그것에 의하여 더 높은 SDP 농도로 투여된 세포에서는 핵 위치가 덜 나타났다(그림 1C-D). 이러한 결과는 SDP 단백질이 인 비트로에서 인간 각막 상피의 NF-κB 염증 반응을 억제한다는 것을 나타낸다.

[0148] SDF에 의한 NF-κB 염증 신호 전달 경로의 억제는 NF-κB 유도 염증 과정 동안 상향 조절되는 것으로 알려져 있는 TNF-α와 MMP-9 유전자 발현을 특성화함으로써 더 연구되었다. 보다 구체적으로, TNF-α 및 MMP-9의 증가된 유전자 발현은 NF-κB의 활성화에 의해 매개되고 염증 세포 신호 전달 경로에 대한 바이오마커이다. 유전자 발현은 상기 기재된 것과 같이 PBS 및 TNF-α 사이토카인과 미리 인큐베이션하고 0.5 % wt /vol SDP를 처리하거나 또는 처리하지 않은 hCLE 배양물에서 qPCR을 사용하여 측정하였다. SDP의 첨가는 TNF-α 및 MMP-9의 기본 유전자 발현에 변화를 일으키지 않는 것으로 관찰되었다(도 2). 그러나 TNF-α에 의한 자극은 인간 NF-κB에 의해 유도된 염증 캐스케이드를 복제하는 두 유전자들의 발현의 현저한 증가를 유발하였다(도 2). 중요한 것은 TNF-α 자극시 SDP를 처리하면 TNF-α와 MMP-9 발현이 약 6 배 감소되어 TNF-α 매개된 NF-κB에 대한 SDP의 강력한

항염증 효과가 있음을 보여 주었다. 이러한 결과들은 이전의 p65 분석 결과와 일치하며, SDP가 NF- κ B 활성화를 억제하고 결과적으로 전염증성 유전자 발현 (즉, TNF- α 및 MMP-9)을 억제한다는 것을 종합적으로 뒷받침한다.

[0149] 다음으로, 토끼 각막 상피 손상 모델에서 SDP의 항염증 효과가 인 비보에서 연장될 수 있는지 여부를 평가하기 위한 연구가 수행되었다. 토끼는 급성 염증 경로를 촉진하기 위해 각막 상피의 수술적 박리(denudement)를 실시한 후 완전한 상피 치유가 일어날 때까지 약 50 μ L 부피에서 6 시간 투약 빈도로 72 시간에 걸쳐 PBS, PBS+0.5 % 또는 PBS + 2 % SDP의 점안액으로 처리하였다. 그 후 외식된 조직을 절제하고 MMP-9 단백질에 대한 항체로 면역염색하였다. 천연, 상처입지 않은 토끼 각막은 예상된 것과 같이 최소 MMP-9 발현을 나타내었고(그림 3A), 감소된 염색의 존재는 카우프만(*The Practical Detection of MMP-9 Diagnoses Ocular Surface Disease and May Help Prevent Its Complications*, Cornea, 32(2), p 211-216 (2013))에 기재된 것과 같이 최소 염증이 발생하였다는 것을 시사한다. 그러나 PBS로 처리한 각막 박리는 전체 상피 세포층에 강력한 MMP-9 발현을 보였으며 이것은 높은 염증이 발생하였다는 것을 시사한다(그림 3B).

[0150] 흥미롭게도, SDP를 함유한 점안액의 사용은 토끼 각막 MMP-9 발현의 용량 의존적인 감소가 관찰되었다(도 3C 및 3D). 특히, MMP-9 면역 염색은 2 % SDP로 처리 한 각막에서 4 배까지 현저히 감소했다(그림 3E). 중요하게도, 약화된 MMP-9 발현은 보호적 각막 상피층의 완전성을 손상시키지 않았고 SDP 처리로 견고한 증화된 각막 상피가 입증되었다. 이러한 데이터는 SDP 처리가 손상 후 각막 상피 조직 내에서 염증을 감소시킨다는 영향을 나타낸다, 이러한 결과는 살아있는 동물 조직 환경 내에서 SDP의 효과적인 항염증 능력을 입증하고 이전의 인 비트로 연구를 뒷받침한다.

[0151] SDP의 인 비보 항염증 효과를 보장하기 위해, 손상 후 72 시간에 토끼 각막 상피로부터 추출한 총 RNA에서 역전사된 qPCR을 수행하였다. 특히, 염증 신호의 두 주요 바이오마커인, 사이토카인 인터루킨 (IL) -1 β 및 IL-6를 평가했다. IL-1 β 및 IL-6 모두의 발현은 SDP 처리의 존재 하에서 현저하게 감소되었다(도 4). PBS- 처리된 대조 동물과 비교할 때 SDP 농도 모두에 대해 유전자 발현이 각각 75 % 및 95 % 감소했다. 이러한 결과는 SDP가 생체 내에서 염증 유전자 발현을 억제할 수 있는 능력을 입증하고, 상지에서 생체 내 및 시험관 내 자료를 입증한다. 함께, 실험 증거는 SDP가 인 비보에서 염증 과정을 억제하고 이것은 SDP의 존재에 의해 NF- κ B 염증 신호 경로 활성화의 억제와 직접 관련이 있는 것으로 나타낸다.

[0152] 물질들 및 방법들

[0153] SDP 생산. Bombyx mori 누에 고치는 Tajima Shoji Co. (Yokohama, Japan)에서 구입했다. 실크 용액은 각각 3 개로 절단한 누에고치 5g의 배치로부터 제조하였다. 고치를 2L의 0.03M Na₂CO₃(Sigma-Aldrich)에서 45분 동안 끓여서 세리신 단백질을 제거하였다. 탈 이온수에서 4번 세척한 후, 추출된 실크 피브로인 섬유를 실온에서 밤새 건조시켰다. 건조된 실크 피브로인 섬유를 9.7 M LiBr 용액 (Sigma-Aldrich)의 농축 용액에 60 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 용해시켰다. 그 후, 용액을 15 PSI하에 121 $^{\circ}$ C에서 30 분 동안 오토 클레이브하여 SDP 화학적 변환을 수행하였다. 오토 클레이브된 SDP 용액을 48시간 동안 3,500 분자량 컷오프 (MWC0)를 갖는 Snake-Skin 투석 튜빙 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 사용하여 약 200x 부피의 물에 대해 투석하였고, 4, 8, 12, 12 및 12시간 간격으로 물을 교환하였다. 다음에, 투석된 용액을 매회 10,000Xg에서 20분간 두 번 원심 분리하여 상등액을 매회 디캔팅여 불순물을 제거하였다. 단백질 농도는 SDP 용액 (n = 3)의 1 mL 시료의 건조시 중량 손실을 측정하여 계산되었다. 용액을 최종적으로 5 중량/부피% (50mg / mL) 농도로 멸균 수를 사용하여 희석시켰고 4 $^{\circ}$ C에서 사용할 때까지 보관하였다.

[0154] 인간 각막 상피 세포 배양. 인간 각막 윤부 상피 세포 (hCLE)를 액체 질소 저장 후 해동시키고 0.2 ng/mL 마우스 EGF(epithelial growth factor, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 보바인 뇌하수체 추출물(BPE, Thermo Fisher Scientific, Inc.), 1 % 페니실린-스트렙토마이신(P / S, VWR, Inc.) 및 0.1 % CaCl₂·2H₂O (Thermo Fisher Scientific, Inc.)를 첨가한 케라티노사이트-SFM 배지 (K-SFM, Thermo Fisher Scientific, Inc.)에서 72시간 동안 배양하였다. 일반적인 세포 배양 조건 (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂, 95 %이상의 습도)이 일상적으로 사용되었다.

[0155] NF- κ B 활성화에 대한 hCLE p65 염색 및 형광 현미경 분석

[0156] hCLE 세포는 웰당 25,000개의 세포 시딩 밀도로 ~ 80 %의 컨플루언스로 성장시켰다. hCLEs는 유리 바닥 24-웰 플레이트에서 DMEM/F12 배지로 배양하였다. 인간 재조합 TNF- α (PeproTech, London, UK)는 자극된 배양에 대해 12시간 웰린지 동안 10 ng /mL 및 100 ng/mL로 보충되었다. SDP를 1mg/mL 및 10mg/mL 농도로 선택된 배양물에 첨가하였다. 실험 완료시, 인산 완충 식염수(PBS)에서 새로 만든 4% 파라 포름알데히드를 사용하여 고정시켰

다. 1% BSA와 PBS 중 0.1 % Tween에 1 : 200 희석하여 인간 p65 항체 (Anti-NF-κB p65, ab16502, Abcam, Cambridge, UK)를 첨가하고 4 ° C에서 밤새 배양했다. 항 토끼(Alexa Fluor 546, Thermo Fisher Scientific, Inc.)에 반응하는 2차 항체를 PBS에 1:500으로 희석하여 첨가하였다. 또한 DAPI 핵 염색(Thermo Fisher Scientific, Inc.)을 PBS에 1:10,000으로 희석하여 첨가하였다.

[0157] 형광 이미지는 1.6 Optivar 광을 사용하는 63x 대물 렌즈를 사용하여 촬영되었다. Z-스택 영상(10-25 층 범위)은 Texas Red 필터 채널을 사용하여 0.25 μm 슬라이스로 캡처되었다. 배경 형광을 줄이기 위해 3D Huygens Deconvolution Software (Scientific Volume Imaging BV, 네덜란드)를 사용하여 각 z 스택에서 이미지 디콘볼루션을 수행했습니다. 반복 횟수를 늘리면 이미지 품질을 개선하는데 최소한의 영향을 미쳤으므로 각 z 스택에 대한 소프트웨어의 고전적인 최대 우도 추정 알고리즘을 사용하여 총 40 회의 반복이 수행되었습니다. 다른 모든 설정은 제조업체의 기본 설정으로 유지된다. 각막에 대한 상대적인 형광 강도 임계 값을 설정하기 위해 각막 제어 조직을 위한 기본 제조업체의 설정에 의해 MIP 임계값이 처음 결정된 소프트웨어에 포함된 최대 강도 투영 (MIP) 알고리즘을 사용하여 이미지를 만들었다.

[0158] TNF-α 자극된 염증 분석 및 정량적 중합효소 연쇄반응(qPCR)에 의한 유전자 발현 분석.

[0159] hCLE 세포를 35mm 접시에 시딩하고 PBS 또는 PBS와 1 ng / mL의 재조합 인간 TNF-α를 투여하기 전에 ~ 80 %의 밀도로 성장시켰다. 배양물은 37°C에서 6 시간 동안 배양되었다. 이어서, 배지를 흡인하고 세포를 따뜻한 1X PBS로 세척한 후 5 mg/mL 농도에서 농도-매치된 SDP 분획물들로 6시간 동안 처리하고 대조군에는 동일한 부피의 PBS를 투여하였다. 정의된 시간이 경과 한 후 Qiagen RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 세포에서 수확하고 RNA 완전성 및 양을 전기영동 및 유동 세포 계측법 (2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 및 자외선 흡수 (Nanodrop Spectrophotometer, Thermo Scientific)로 입증하였다. 그 후, High Capacity cDNA 리버스 Transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY)를 사용하여 450ng의 total RNA를 cDNA로 역전사시켰다.

[0160] 정량적 PCR (qPCR)은 SYBR Select Master Mix 키트 (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY)를 사용하여 StepOne Plus 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY)에서 수행되었다. 염증성 자극 (네이티브)에 대한 음성 대조군으로서 TNF-α로 자극되지 않은 세포로부터 수확된 총 RNA에 대해 유전적 발현을 수행하였다. 후보 유전자들의 발현은 내인성 대조 유전자인 β-베타-액틴에 대해 정상화되었다. 상대 정량은 2(-Δ ΔCt) 방법을 사용하여 수행하였고, 각 조건에 대해서 3 실험이 수행되었고, 각각의 조건에 대해 3 회의 실험을 수행하였다(N = 3, n = 3). 모집단 평균은 각 실험으로부터의 평균을 구하여 얻었고, 모아진 표준 편차는 각 그룹에 대해 계산되었다. 통계적 비교는 dCt 값을 사용하여 일원 분산 분석을 수행한 후 Excel 소프트웨어 (버전 14.6.7, Microsoft, Inc.) 및 StatPlus:mac LE 소프트웨어 (버전 6.1.5.1, AnalystSoft, Inc., Walnut, CA)를 사용하여 p- 값을 결정하기 위한 사후 검증 t- 테스트를 수행하였다. 하기의 특이 프라이머 세트를 β- 액틴, TNF-α 및 MMP-9 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA로부터 입수)에 사용하였다:

표 1

[0161] h베타-액틴 - 포워드: 5'-AATGTGGCCGAGGACTTTGATTGC-3'	(SEQ ID NO: 2)
h베타-액틴 - 리버스: 5'-AGGATGGCAAGGGACTTCCTGTAA-3'	(서열번호 3)
hTNF-알파- 포워드: 5'-GAGGCCAAGCCCTGGTATG-3'	(서열번호 4)
hTNF-알파- 리버스: 5'-CGGGCCGATTGATCTCAGC-3'	(서열번호 5)
hMMP-9 - 포워드: 5'-TGTACCGCTATGGTTACTACTCG-3'	(서열번호 6)
hMMP-9 - 리버스: 5'GGCAGGGACAGTTGCTTCT-3'	(서열번호 7)

[0162] 토끼 각막 손상 모델, 면역 조직 화학 형광 이미징 분석 및 qPCR 유전자 전사 분석.

[0163] 모든 동물은 기관 동물 관리 및 사용위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee)가 승인 한 프로토콜에 따라 안과 및 시각 연구에서 동물 사용을 위한 ARVO 선언문에 따라 처리되었다. 8-10 주령 뉴질랜드 흰 토끼 12마리를 사용하여 생체 내에서 MMP-9 생산을 감소시키는 SDP의 능력을 평가하였다. 토끼는 35-50 mg/kg 케타민, 5-7.5 mg/kg 크실라진 및 0.75 mg/kg 아세프로마진의 근육 내 주사로 마취시켰다. 국소 proparacaine 0.5 wt. /vol.% 점안액은 보조 마취제로 사용되었다. # 15 Bard-Parker 블레이드를 사용하여 7mm의 중앙 각막 상피를 제거하여 상피 표면에 공극을 만들었다.

- [0164] 이어서 토끼들을 3개의 처리군으로 나누어 각막 표면을 200 μl 의 PBS(pH 7.4, 비히클 처리), 5 mg/mL (0.5 %) 또는 20 mg/mL (즉, 2 %) SDP 용액을 PBS에 넣었다. 이 치료법은 국소적으로 moxifloxacin 항생제 방울 (Vigamox, Alcon, Inc.)과 함께 상처 입은 눈에 국소적으로 수술 직후와 상피 봉합이 완료될 때까지 6시간 간격으로 투여했다. 치유 과정 전체에서 토끼는 고통이나 감염의 증거를 면밀히 관찰하고 손상된 각막에 50 μL 의 국소용 플루오레세인 용액(Sigma-Aldrich)을 도포하고 코발트 블루 조명 아래서 슬릿 램프 사진을 사용하여 상처를 이미징하여 6시간마다 상피 상처 봉합을 검사하였다 .
- [0165] 귀 정맥 내로 투여된 과량의 펜토바르비탈(150 mg/kg)을 사용하여 상처 치료가 완료된 직후(수술 후 72시간)에 각 처리군의 동물을 희생시키고, 각 처리군의 각막을 적출하고 절제하였다. 처음 3 마리 토끼의 경우 치유된 상피 표면을 제거하고 Trizol-chloroform 방법 (ThermoFisher Scientific, Inc.)을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다. High Capacity cDNA 리버스 Transcription 키트(Applied Biosystems, Life Technologies, Grand Island, NY)를 사용하여 각 시료의 총 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 그런 다음 cDNA를 사용하기 전까지 -80°C 에서 동결시켰다.
- [0166] 나머지 3 마리의 토끼는 즉시 2 중량/부피% 파라포름알데히드로 40분간 고정된 각막을 추출하였다 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). 수술적 박리를 겪지 않은 반대쪽 눈의 각막도 수확 및 고정하여 창상 치유 과정에 대한 음성 대조군 역할을 수행하였다. 이어서 고정된 각막을 각각 5분 동안 PBS로 3회 세척 한 다음 Tissue-TEK O.C.T (Sakura Finetek USA Inc., Torrance, CA, USA)에 충전 전에 4°C 에서 밤새 30% 중량/부피 sucrose에 위치시키고, -80°C 에서 동결 절편을 위해 동결시켰다. 각막 중심부를 통과하는 10 마이크로톤 두께의 단면을 채취하여 면역 조직 화학 염색 및 분석을 위하여 Superfrost-plus 유리 슬라이드 (Thermo Fisher Scientific, Inc.)에 장착하였다. 샘플을 PBS로 3회 세척 한 다음, 1X PBS에서 1중량/부피 % BSA (Sigma-Aldrich), 0.25 중량/부피 % Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) 및 2.5 중량/부피 % 염소 혈청을 포함하는 블러킹 버퍼에서 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 블러킹 후, 샘플을 4°C 에서 밤새 MMP-9 (ab58803, Abcam PLC, Cambridge, UK)에 대한 쥐 1차 항체 용액 (1:100)로 배양하였다.
- [0167] 이어서, 샘플을 PBS로 완전히 헹구고, Alexa Fluor 488 그린 염소 항 마우스 이차 항체 (ab150113, Abcam PLC, Cambridge, UK)와 1:500 희석하여 실온에서 1 시간 동안 광으로부터 보호하여 배양하였다. 샘플은 또한 Alexa Fluor® 568 phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Inc.)으로 실온에서 20 분간 1:200으로 희석하여 염색하고 액틴의 세포 골격 구조에 대한 염색을 위하여 빛으로부터 보호하였다. PBS로 세척한 후, 샘플을 세포 핵을 염색하기 위해 DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 VECTASHIELD 마운팅 배지로 장착하고 이미징 전에 유리 커버 슬립으로 덮었다.
- [0168] 형광 이미지는 1.6 Optivar 광을 사용하는 63x 대물 렌즈를 사용하여 촬영되었다. Z- 스택 영상 (10-25 층 범위)은 녹색 형광 단백질 (GFP) 필터 채널을 사용하여 0.25 μm 슬라이스에서 캡처되었다. 배경 형광을 줄이기 위해 3D Huygens Deconvolution Software (Scientific Volume Imaging BV, 네덜란드)를 사용하여 각 z 스택에서 이미지 디콘볼루션을 수행하였다. 반복 횟수를 늘리면 이미지 품질을 개선하는 데 최소한의 영향을 미쳤으므로 각 z 스택에 대한 소프트웨어의 고전적인 최대 우도 추정 알고리즘을 사용하여 총 40 회의 반복이 수행되었다. 다른 모든 설정은 제조업체의 기본 설정으로 유지된다. 각막에 대한 상대적인 형광 강도 임계 값을 설정하기 위해 각막 제어 조직을 위한 기본 제조업체의 설정에 의해 MIP 임계 값이 처음 결정된 소프트웨어에 포함된 최대 강도 투영(MIP) 알고리즘을 사용하여 이미지를 만들었다. 그런 다음 천연 및 SDP 처리된 각막 그룹은 형광 이미지 강도의 그룹 비교 ($N = 3, n = 3$)를 허용하기 위해 이러한 동일한 임계 설정을 사용하여 이미징되었다.
- [0169] 다음으로, 배경을 제거하기 위하여 ImageJ 소프트웨어 (NIH, 버전 1.48, NIH)를 사용하여 추적된 형광 영역으로부터 비-형광 영역의 평균 통합된 칼라 강도를 빼서 각 이미지의 형광 강도를 측정하였다. 이어서, 상이한 그룹들 사이의 형광 강도 값을 계산하였다. 그런 다음 Excel 소프트웨어 (Microsoft, Inc., 버전 14.6.7) 및 StatPlus : mac LE 소프트웨어 (AnalystSoft, Inc., 버전 6.1.5.1)을 사용하여 p 값을 결정하기 위하여 ad hoc t-테스트에 의하여 수반된 일원 분산 분석 (a one-way ANOVA analysis)을 통해 통계적으로 비교하였다.
- [0170] SYBR Select Master Mix 키트 (Applied Biosystems, Life Technologies)를 사용하여 정량적 PCR (qPCR)을 ABI 7000 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Life Technologies)에서 수행하였다. 토끼의 각막 상피로부터 채취한 cDNA에서 유전적 발현을 수행하였다. 후보 유전자의 발현은 내인성 대조 유전자인 β -베타-액틴에 대해 정상화되었다. 상대적 정량은 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 방법을 사용하여 수행하였다. 통계적 비교는 ΔCt 값을 사용하여 일원 분산 분석을 수행한 후 Excel 소프트웨어 (Microsoft, Inc., 버전 14.6.7) 및 StatPlus: mac LE 소프트웨어 (AnalystSoft, Inc., 버전 6.1.5.1)를 사용하여 p-값을 결정하기 위한 사후 검증 t- 테스트를 수행하였다. 하기

의 특이 프라이머 세트를 β- 액틴, IL-1β 및 IL-6 유전자 (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA로부터 입수)에 사용하였다:

표 2

[0171]

r베타-액틴 - 포워드: 5'-GCTATTTGGCGCTGGACTT-3'	(서열번호 8)
r베타-액틴 - 리버스: 5'-GCGGCTCGTAGCTCTTCTC-3'	(서열번호 9)
rIL-1베타- 포워드: 5'-TTGAAGAAGAACCCGTCCTCTG-3'	(서열번호 10)
rIL-1베타- 리버스: 5'-CTCATACGTGCCAGACAACACC-3'	(서열번호 11)
rIL-6 - 포워드: 5'-CTACCGCTTCCCACTCAG-3'	(서열번호 12)
rIL-6 - 리버스: 5'-TCCTCAGCTCCTTGATGGTCT-3'	(서열번호 13)

[0172]

실시예 5. SDP 및 SDP-4는 과산화수소-매개된 산화환원 신호전달을 저해함

[0173]

EPR (Electron Paramagnetic Resonance) 분광법을 사용하여 용액에서 과산화수소 (H₂O₂)의 농도를 선택적으로 정량화하였다. 구체적으로, 0, 0.5, 1.0 또는 5.0 % PASF, SDP 또는 SDP-4를 함유하는 수용액에 20 μM의 H₂O₂를 첨가하고 실온에서 24시간 동안 배양했다. 배양 후 남아있는 H₂O₂ 수준을 정량하기 위해 200 μM의 H₂O₂ 특이적 스핀 프로브 1-하이드록시-3-메톡시카보닐-2,2,5,5-테트라메틸피롤리딘(CMH)을 분석 시약 4-아세트아미도페놀 (AAP, 1 mM), 디에틸렌트리아민펜타아세트산 (DTPA, 200 μM), 양고추냉이 퍼옥시다아제(HRP, 1 U/mL)과 함께 첨가하였다. 그 후, 이 혼합물을 37 °C에서 30분 동안 배양하고, 이 시간 동안 AAP는 HRP의 존재하에서 H₂O₂에 의해 산화되어 페녹시 라디칼을 생성한 다음 CMH 스핀 프로브와 반응하여 CM 라디칼을 생성하고, 이것은 검출되고 EPR에 의해 정량화된다.

[0174]

결과: PASF는 단백질 농도가 증가함에 따라 제어 수준 이상으로 EPR 신호 진폭을 상승시키고, 이것은 PASF가 H₂O₂ 스핀 프로브를 직접 산화한다는 것을 시사한다. 대조적으로, SDP의 첨가는 EPR 신호 진폭에서 농도-의존성 감소를 유발하여, SDP 단백질이 5.0 % SDP에서 H₂O₂를 40% 소거한다는 것을 나타낸다. 이러한 감소는 SDP-4 단백질의 존재 하에서 더욱 강력해졌으며, 5.0 % SDP-4는 H₂O₂ 수준을 80% 이상 감소시켰다. 그림 5를 참조.

[0175]

H₂O₂를 제거하고 산화 환원 신호를 억제하는 SDP 및 더욱 SDP-4의 능력은 티로신에 의해 유도된다. 티로신은 산화 환원 시그널에 고유한 전자 셔플링을 가능하게 하는 방향족 및 하이드록실 함유 관능기로 인하여 장기간 작용하는 항산화제이다(Van Overveld et al., *Chemico-Biological Interactions*, 127 (2000), 151-161). SDP 및 SDP-4는 높은 티로신 조성(약 13 % wt/wt 이상)을 가지며, 이들 단백질은 안구 표면으로 티로신 전달을 향상시킨다. 티로신의 생리학적 용해도는 0.4 mg /mL이지만 1% wt/vol. SDP에서 티로신 용해도는 3 배 이상 (1.3 mg/mL) 더 높아서 이상 섭취하면 1 % w /vol의 SDP 당 비례적 증가를 제공한다. 또한, SDP 및 SDP-4의 수성 용해도는 다른 알려진 단백질보다 훨씬 더 높은 80 % wt/vol를 초과한다.

[0176]

실시예 6. 분획화 및 SDP 단백질 용액의 분자량 분포

[0177]

재생된 SDP 용액의 분획화는 100, 50, 30 및 10 kDa MW 컷오프 (EMD-Millipore, MA, USA)의 Amicon Ultra 15 mL 원심 필터를 사용하여 일련의 원심 분리 단계를 통해 달성되었다. 분획된 SDP 용액의 분자량 범위를 평가하기 위해, SDP 단백질의 전기영동 이동도를 SDS-PAGE를 사용하여 가시화하고 비분획화된 SDP 용액의 것과 비교하였다. 미분획화된 SDP의 SDS-PAGE는 대략 300 kDa와 30 kDa 분자량 범위 사이에 위치하는 큰 번지면서 위치하는 것에 의하여 입증된 것과 같이 용액 내에서 넓은 분자량 분포의 SDP 단백질을 나타내었다.

[0178]

재생된 SDP 용액의 분획화는 고 분자량에서 저분자량 범위의 SDP 단백질 (SDP-1, SDP-2, SDP-3 및 SDP-4)의 4 개의 분획물들을 생성하였다. 도 6을 참조. 비 분획화된 SDP 용액과 비교할 때, 고 분자량 용액의 SDS-PAGE는 300 kDa 내지 100 kDa 범위 (SDP-1 및 SDP-2) 사이의 대략적인 분자량 분포를 나타내는 스미어를 생성하는 반면, 저분자량 용액은 분자량 분포가 주로 30 kDa 범위(SDP-3 및 SDP-4)의 분자량 분포를 나타내는 스미어를 생성함으로써 SDP가 고 분자량 및 저 분자량 SDP 단백질 용액으로의 분획화되었음을 확인하였다.

[0179]

예를 들어, *Bombyx mori* 누에고치에서 유래된 50 mg/mL 수성 SDP 용액을 다음 연구에 사용하였다. SDP 단백질 단편의 분획화는 100, 50, 30 및 10 kDa MW 컷오프 (EMD-Millipore, MA, USA)의 Amicon Ultra 15 mL 원심 분리 필터를 사용하여 수행하였다. 요약하면, 40 mg/ml SDP 스탁 용액 15 ml를 100 kDa MW 컷오프를 갖는 원심 분리 필터에 첨가하고, 100 kDa MW 이상의 SDP 단백질 단편의 분리 하기 위하여 4,000 x g에서 30분 동안 스핀 다운

시켰다. 분리된 농축액을 수집하고 그 여과액을 50 kDa MW 컷오프를 갖는 원심 분리 필터로 옮기고 4,000 xg에서 30분 동안 다시 회전시켜 ~ 50 kDa MW의 SDP 단백질 단편을 분리하였다. 분리된 농축액을 수집하고 그 여과액을 30 kDa MW 컷오프를 갖는 원심 분리 필터로 옮기고 4,000 x g에서 30분 동안 다시 회전시켜 ~ 30 kDa MW의 SDP 단백질 단편을 분리하였다. 분리된 농축액을 수집하고 그 여과액을 10 kDa MW 컷오프를 갖는 원심 분리 필터로 옮기고 4,000 x g에서 30분 동안 다시 회전시켜 ~ 10 kDa MW의 SDP 단백질 단편을 분리하였다. 각 MW 컷오프로부터 수집된 농축물을 개별적으로 6시간 동안 5 mL의 dH₂O로 세척하고 각 농축물에 대한 각각의 MW 차단 필터 크기를 갖는 원심 분리 필터를 사용하여 4,000 × g에서 30분 동안 다시 스핀 다운시켰다. SDS 단백질 단편의 분획화는 SDS-PAGE (그림 6) 및 Coomassie blue R-250 염색 (Gibco, Invitrogen Corporation, Grand Island, NY)을 사용하여 확인되었다.

[0180] SDP-4 분획의 ImageJ 분석은 SDS-PAGE에 의해 결정된 바와 같이, SDP-4의 평균 분자량이 34 kDa임을 나타내었다. PASF의 유사한 여과물(30 kDa MWCO 필터)은 51 kDa의 평균 분자량을 갖는 저 분자량 분획물 및 별도의 더 높은 평균 분자량 분획물(90 kDa)을 제공하였다. SDP 분획 및 PASF 분획의 추가 분석은 아래 표에 요약되어 있다.

표 3

		SDP-4	SDP-1-3	SDP	PASF-4	PASF-1-3	PASF
kDa 범위	100 - 10	85.3%	76.2%	77.3%	81.1%	52.8%	50.2%
	85 - 10	83.6%	71.5%	73.0%	77.4%	48.4%	45.2%
	85 - 15	72.1%	66.7%	66.2%	71.3%	44.8%	41.6%
	60 - 20	57.7%	49.1%	48.5%	53.4%	31.6%	27.1%
	50 - 25	39.0%	31.4%	30.8%	34.6%	20.1%	15.7%
평균 MW (kDa)		34	57	53	51	90	97

[0182] 10kDa 이하의 평균 분자량을 갖는 분획은 용액에서 불안정하고 1-2 시간 내에 겔을 형성하며, 따라서 전형적으로 SDP 조성물 및 분획으로부터 제거된다.

[0183] 실시예 7. SDP-4 및 SDP-1-3의 SDP 안정성 연구

[0184] 실시예 3에서 기술된 안정성 연구는 SDP-4 및 분리된 천연 피브로인 (PASF-4)의 낮은 평균 분자량 분획물에서도 수행되었다. 초음파-유동된 2 차 구조 형성과 겔화는 초음파 켈린지 후에 SDP-4 용액에서 발견되지 않았다. SDP-4 용액은 깨끗하고 자유로운 흐름을 유지하였다. 겔화가 없다는 것은 SDP-4의 매우 큰 단백질 안정성을 시사한 반면에, PASF-4 용액은 초음파 처리 시도 후 2시간 이내에 겔화되는 것으로 나타났으며 이는 용액에서의 불안정성을 나타낸다. SDP-4는 실험의 시간 경과(96시간) 동안 용액 상태를 유지하였다.

[0185] 안정성 연구는 또한 SDP (SDP-1, SDP-2 및 SDP-3의 조합에 해당, SDP-1-3으로 명명됨)의 고 분자량 분획에서 수행되었다. SDP-1-3의 수용액은 실험의 시간 경과(24시간 이상) 동안 자유 유동 용액으로 남았다. 그러나, 분리된 천연 피브로인 (PASF-1-3)의 고 분자량 분획은 15분 이내에 겔화되어 2차 단백질 구조 형성과 따라서 불안정성을 나타낸다.

[0186] 실험 조건 : 1 mL의 4 % wt/wt. SDP-4, SDP-1-3, PASF-4 및 PASF-1-3의 용액을 20% 펄스 주파수의 60 % 진폭에서 3분 동안 초음파 처리하였다. 용액을 PASF-4 및 PASF-1-3에 대해 겔화가 일어날 때까지 실온에서 모니터링하였다. SDP-4 및 SDP-1-3은 각각 96시간 및 24시간 이상(본 연구의 시간 경과) 동안 용액 상태로 유지되었다.

[0187] 실시예 8. SDP-1 및 SDP-2의 증가된 상처 치유 성질

[0188] 상처 치유는 SDP 분획물들(10 mg/mL)의 부재 또는 존재하에 스크래치 분석을 실시한 컨푸루언트 hCLE 단층 상에서 평가하였다. 상처 봉합율은 시간 경과 현미경법을 사용하여 평가되었다. SDP 또는 PBS 대조군으로 처리된 hCLE의 증식은 MTT 분석에 의해 평가되었다.

[0189] SDP MW는 손상된 hCLE 배양물의 행동에 중요한 영향을 미쳤다. 100 kDa 미만의 낮은 평균 분자량 분획물(즉, SDP-3 및 SDP-4)은 박리된(스크래치된) hCLE 세포 대 PBS 처리된 대조군 배양물의 재증식을 6시간까지 상당히 가속시켰으며, 이는 컨푸루언시까지 지속되었다(16시간 대 대조군에 대해 20시간) (도 7 및 도 8). SDP-3 및 SDP-4는 MTT 분석 결과에 의해 증가된(> 50%) 대사 활성에 의해 입증된 바와 같이, PBS로 처리한 대조 배양물과

비교하여 hCLE 증식을 유의하게 증가시켰다. 반대로, 100 kDa 초과와 고 분자량 분획(즉, SDP-1 및 SDP-2)는 비록 SDP의 전구-증식 효과가 여전히 관찰되었지만, 재증식을 억제하였다 (도 9). 이러한 결과는 SDP-3 및 SDP-4 분획물이 인 비트로에서 hCLE 세포 이동 결과에 대해 강화된 효력 효과를 가진다는 것을 입증한다.

[0190] **실시예 9. 항염증 성질**

[0191] SDP 분획물들의 존재 또는 부재하에 전염증성 사이토카인 종양 괴사 인자 - 알파 (TNF- α , 1 ng / mL)로 자극된 hCLE 배양에서 SDP 분획물 1-4의 염증 특성을 평가하였다. 염증 유전자들의 후속 발현을 정량하기 위해 qPCR을 사용하였다. hCLE 세포에 의한 이들 단백질들의 분비는 ELISA에 의해 평가되었다. 변화된 염증 유전자 발현의 기능적 유의성은 TNF- α 자극된 hCLE 배양물 및 전골수성 면역 세포주 (HL-60)로 Transwell 동시 배양 분석을 사용하여 SDP 분획물들의 존재 또는 부재하에 수행하였다.

[0192] TNF- α 철폐된 hCLE 배양물은 TNF- α , 인터루킨 6 및 1 α / β 및 단백질 분해 효소 MMP-9 염증 유전자의 발현을 강하게 증가시켰으며, 이 발현은 낮은 MW SDP로 현저하게 약화되었다(그림 10). 이것은 8시간에 ELISA로 측정된 자극된 hCLE에 의한 TNF- α 및 MMP-9 분비의 유의한 감소로 전환되었다(그림 11). TNF- α 철폐된 hCLE는 인 비트로에서 손상된 염증 신호와 하류 면역 반응 사이의 기능적 관계를 나타내는 SDP-4의 첨가에 의해 정상화된 HL-60 세포의 현저한 동원을 유발하였다(그림 12).

[0193] **실시예 10. OTC 및 항염증 점안제 제형들의 제조**

[0194] 안약 조성물은 질환 또는 손상으로 인하여 눈의 시스템을 치료하기 위해 SDP의 치료학적 특성을 이용하도록 제조될 수 있다. SDP 분자는 선택적으로 분자량(예를 들어, SDP-1, SDP-2, SDP-3, SDP-4 또는 이들의 조합)에 기초하여 분리되거나, 전체 조성물(예: SDP)로서 사용될 수 있다. 약 40 kDa 이하와 같이 낮은 평균 분자량의 단백질 분자의 조성물이 제조될 수 있으며 이는 SDP-4로 명명된다. 약 40 kDa 이상의 SDP 조성물 또는 분자의 모든 분자량을 포함하는 단백질 분자의 제2조성물을 또한 제조할 수 있다. 각각의 조성물은 물, 하나 이상의 완충제 또는 완충제 시스템(예: 인산 완충 식염수(PBS), 구연산염, 붕산염, 트리스, 4-(2-히드록시 에틸)-1-피페라진에탄술폰산(HEPES)), 선택적으로 적어도 하나의 보존제(예:과붕산염, 염화 벤잘 코늄 (BAK)) 및 선택적으로 적어도 하나의 추가 부형제, 안정화제들 또는 염(예: sulfanilic acid, 트레할로스, 글리세린, 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 만니톨, 폴리소르베이트, 염화나트륨 (NaCl), 염화 마그네슘 (MgCl₂), 염화칼슘 (CaCl₂), 또는 브롬화 리튬 (LiBr))을 포함할 수 있다.

[0195] 상기 제 1 조성물을 함유하는 안과 제제는 건성 안질환 환자, 상처입은 환자 또는 건강한 환자의 수술 상처에 (예를 들어, 굴절 후 또는 백내장 수술을 위해) 치료 산물로 적용될 수 있다. 질병 또는 손상은 시간 경과에 따라 염증 및 상처 봉합률 및 환자의 안락 및 통증 평가에 대해 모니터링될 수 있다. 두 번째 조성물은 제제의 습윤, 퍼짐 및 환자의 편안함을 향상시키는 데 도움이 되기 위하여 단백질 부형제로서 인공 눈물 점안제와 같은 창구 판매 제품(OTC)에 사용할 수 있다.

[0196] 점안제의 예는 SDP-4 또는 SDP의 0.1 % wt/vol만큼 낮은 양 또는 10% wt/vol만큼 높은 양을 함유할 수도 있다. 상기 SDP-4 또는 SDP 물질은 정제수에 용해될 수 있는데, 여기에는 시트르산 완충액, 트리스 완충액, PBS 완충액 또는 보레이트 완충액과 같은 완충 시스템이 1 밀리몰 내지 1,000 밀리몰 농도로 생성될 수 있다. 추가의 부형제 성분이 제제에 첨가될 수 있다. 폴리소르베이트와 같은 계면 활성제는 0.01 % 내지 0.1 % wt/vol의 범위 농도로 첨가될 수 있다. 트레할로오스, 텍스트로오스 또는 수크로오스와 같은 안정화 당 분자를 10 밀리몰-500밀리몰 범위의 농도로 첨가할 수 있다. 완화제 분자는 PEG, 카르복시메틸 셀룰로오스, 하이프로 멜로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스 또는 글리세린과 같은 안 윤활제로서 0.1 % ~ 2.0 % wt/vol 범위의 농도로 첨가될 수 있다. 분자 상호 작용을 감소시키고 제제를 안정화시키기 위해 10 밀리몰 내지 500 밀리몰 범위의 농도로 NaCl, MgCl₂, CaCl₂ 또는 LiBr과 같은 염을 첨가할 수도 있다. L- 글루타민 또는 L- 아르기닌과 같은 아미노산 분자는 10 밀리몰 - 500 밀리몰 범위의 농도에서 안정화제로서 첨가될 수 있다. EDTA와 같은 킬레이트제는 0.01 % 내지 0.1 % wt/vol 범위의 농도에서 안정화제로서 첨가될 수 있다. 과붕산염, 또는 BAK와 같은 항균제를 제형에 0.015 % wt / vol 농도까지 첨가할 수 있다.

[0197] 하기는 SDP-4 및/또는 SDP 분자를 함유하여 제조된 몇 가지 예시 기본 제형의 표이며, 추가의 첨가제 또는 부형제를 첨가하여 위에서 기술한 제형의 적용을 향상시킬 수 있다:

표 4

성분	조성				
	1	2	3	4	5
SDP-4 또는 SDP	5 또는 10 g	5 또는 10 g	5 또는 10 g	5 또는 10 g	5 또는 10 g
인산	10 mmol	-	-	-	-
NaCl	137 mmol	-	-	-	-
KCl	2.7 mmol	-	-	-	-
구연산	-	82 mmol	8 mmol	-	-
삼염화 구연산	-	18 mmol	92 mmol	-	-
트리스 염산	-	-	-	7.02 g	0.76 g
Tris 베이스	-	-	-	0.67 g	5.47 g
물	1 L	1 L	1 L	1 L	1 L
pH	7.4	3.0	6.2	7.2	9.0

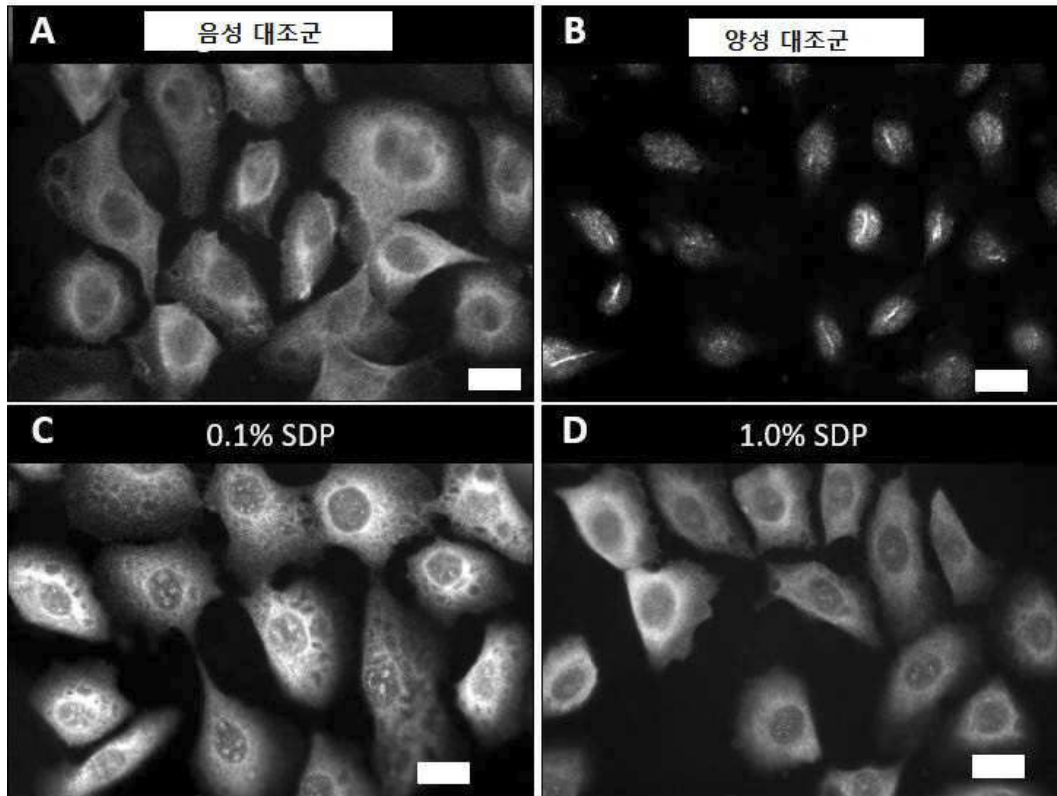
[0199] SDP 또는 SDP-4와 같은 SDP 분획물을 상업용 및 처방용 점안제 및 연고와 같은 공지된 제제에 첨가하여 습윤 및 환자의 안락감을 개선시킬 수 있다. SDP 또는 SDP-4에 첨가할 수 있는 안과용 용액의 예는 브리모니 딘 타르트레이트, 브리모니딘 타르트레이트/티몰롤 말레에이트, 알카프타딘, 비마토프로스트, 사이클로스포린, 가티플록사신, 케토로락 트로메타민 또는 리피데그라스트 안과용 용액을 포함한다. SDP 또는 SDP-4가 첨가될 수 있는 다른 제제의 예는 미국 특허 제 5,468,743; 5,880,283; 6,333,045; 6,562,873; 6,627,210; 6,641,834; 6,673,337; 7,030,149; 7,320,976; 7,323,463; 7,351,404; 7,388,029; 7,642,258; 7,842,714; 7,851,504; 8,008,338; 8,038,988; 8,101,161; 8,133,890; 8,207,215; 8,263,054; 8,278,353; 8,299,118; 8,309,605; 8,338,479; 8,354,409; 8,377,982; 8,512,717; 8,524,777; 8,541,463; 8,541,466; 8,569,367; 8,569,370; 8,569,730; 8,586,630; 8,629,111; 8,632,760; 8,633,162; 8,642,556; 8,648,048; 8,648,107; 8,664,215; 8,685,930; 8,748,425; 8,772,338; 8,858,961; 8,906,962; 및 9,248,191호 및 미국 특허 제 7,314,938; 7,745,460; 7,790,743; 7,928,122; 8,084,047; 8,168,655; 8,367,701; 8,592,450; 8,927,574; 9,045,457; 9,085,553; 9,216,174; 9,353,088; 및 9,447,077호에 기술되어 있다.

[0200] 특정 실시 예들이 개시된 실시 예 및 예를 참조하여 상기 설명되었지만, 그러한 실시 예는 단지 예시적인 것이며 본 발명의 범위를 제한하지 않는다. 본 발명을 벗어나지 않고 하기의 청구 범위에서 정의된 것보다 더 넓은 측면에서 당업자에 따라 변경 및 수정이 이루어질 수 있다.

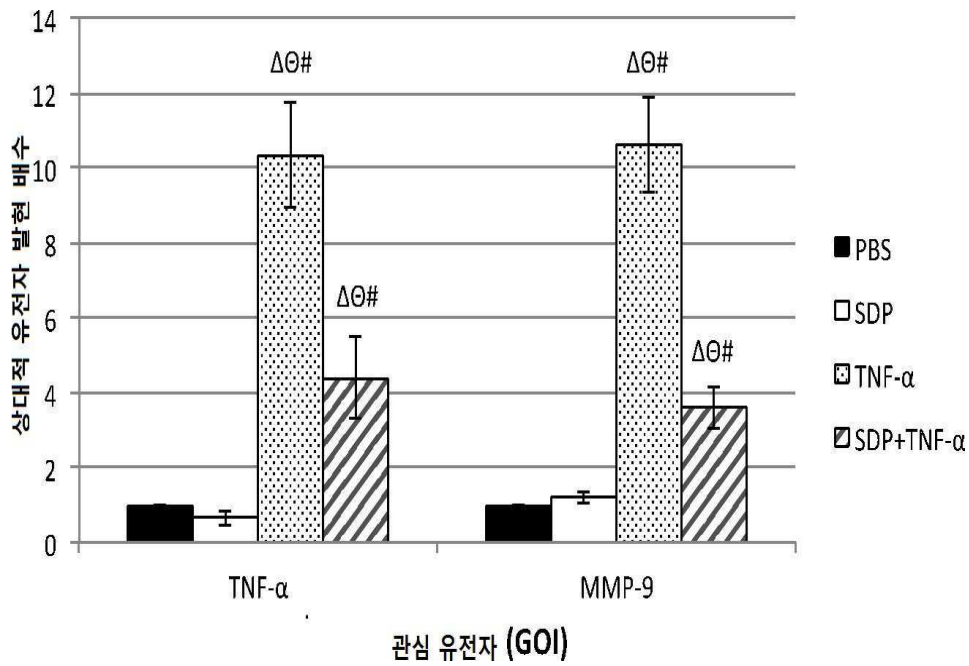
[0201] 모든 간행물, 특허 및 특허 문헌은 참고 문헌으로 개별적으로 포함된 것처럼 본원에 참고로 인용되어 있다. 이 개시 내용과 모순되지 않는 어떠한 제한도 그로부터 이해되어서는 안된다. 본 발명은 다양한 구체적이고 바람직한 실시 예 및 기술을 참조하여 설명되었다. 그러나 많은 변형 및 수정이 본 발명의 사상 및 범위 내에서 이루어질 수 있다는 것을 이해해야 한다.

도면

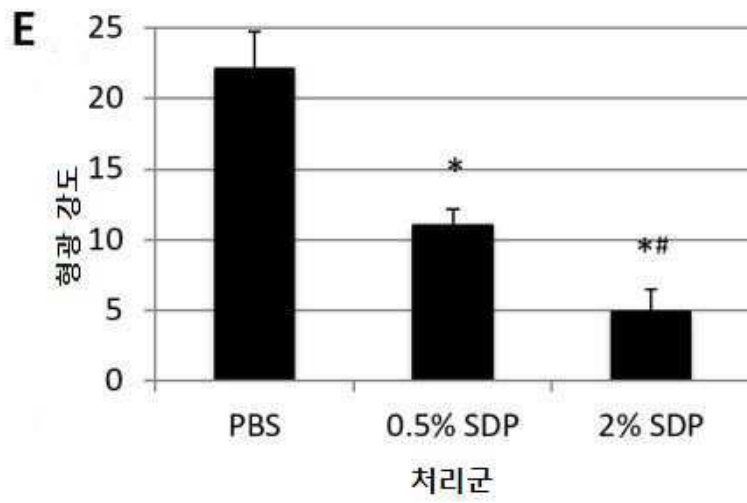
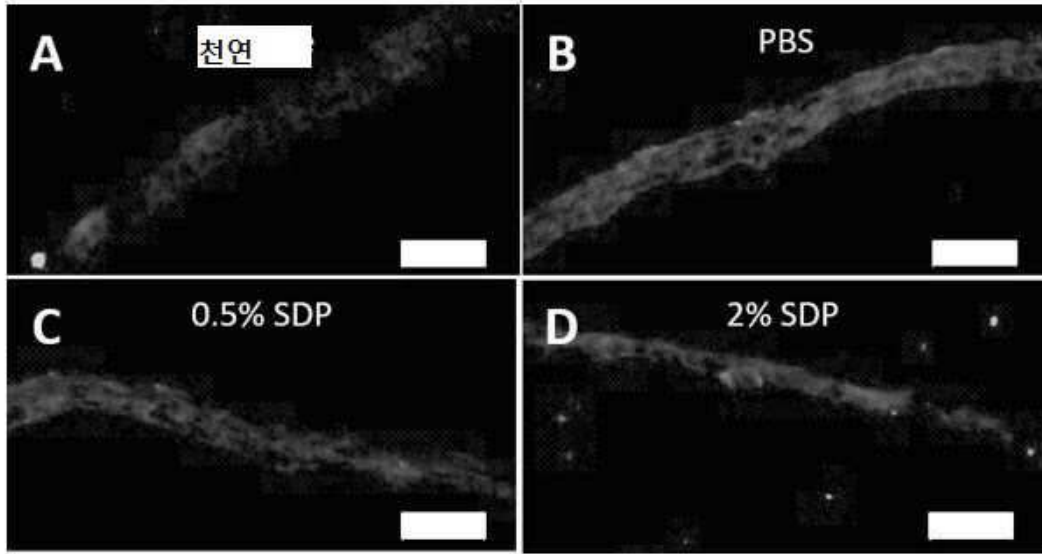
도면1



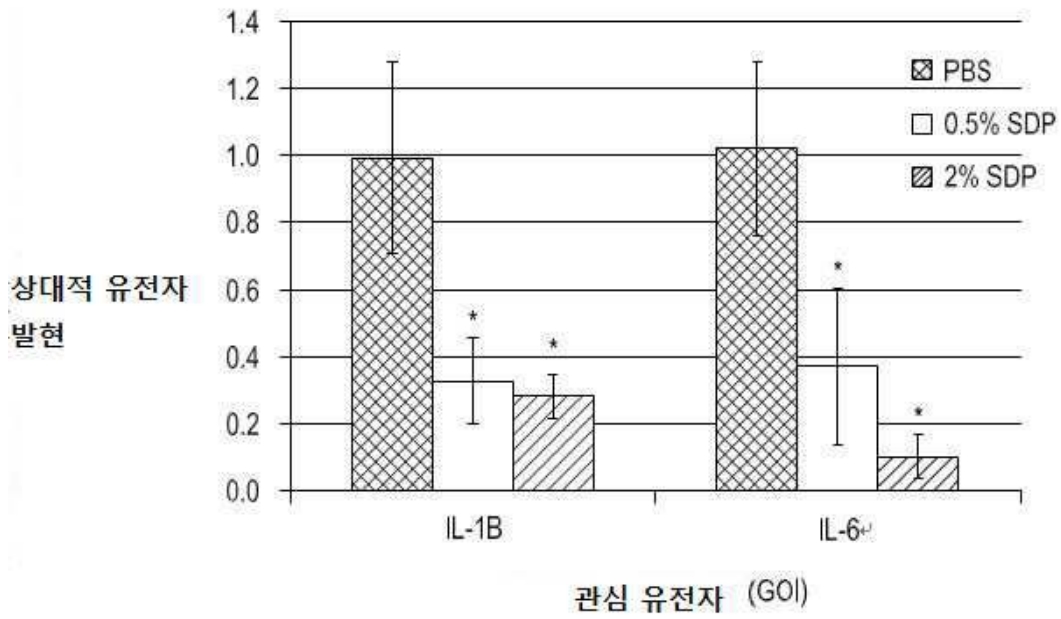
도면2



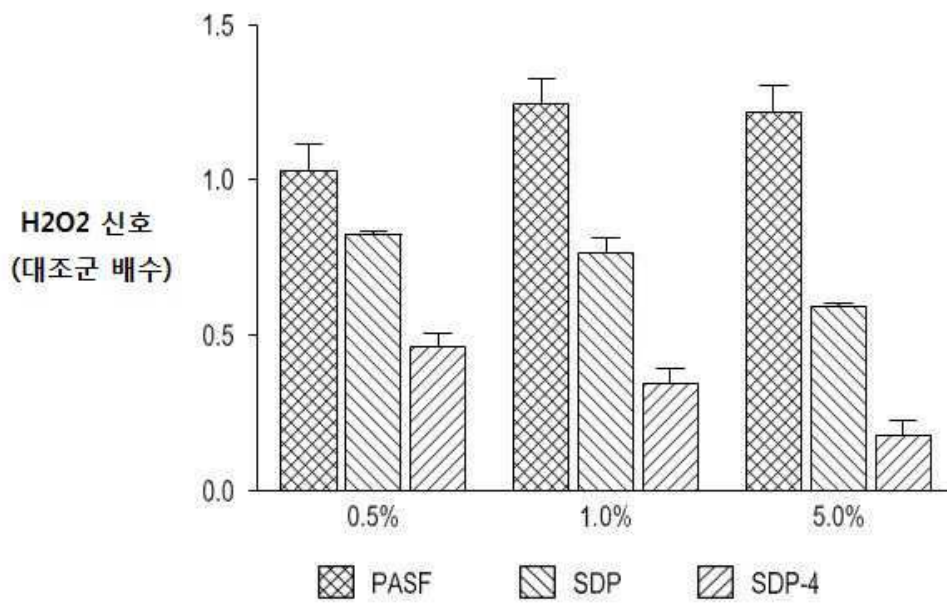
도면3



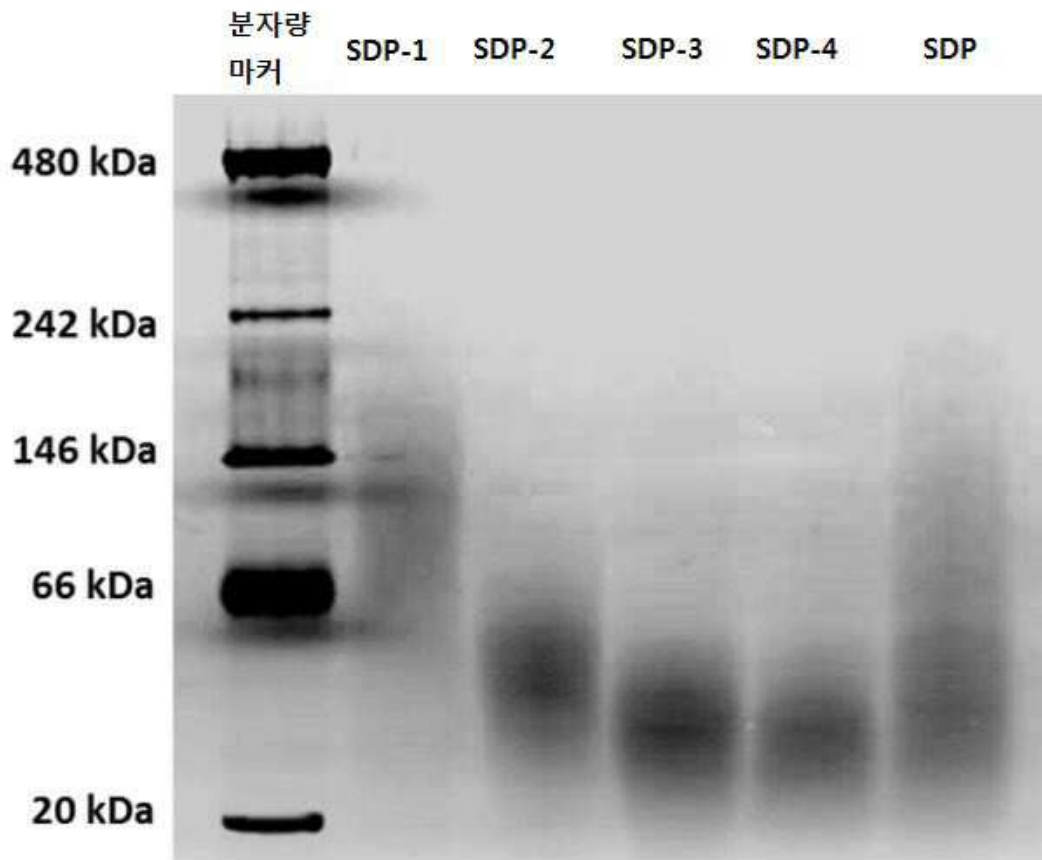
도면4



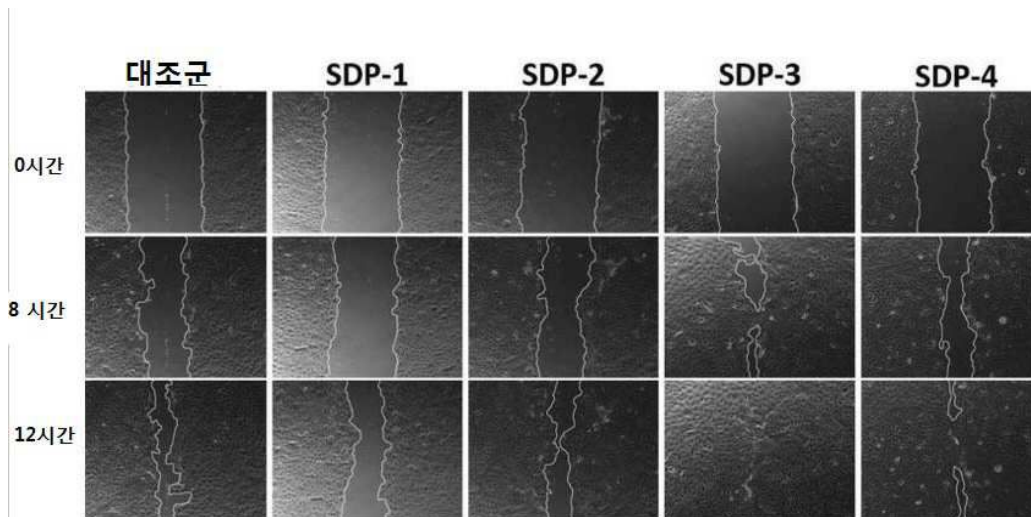
도면5



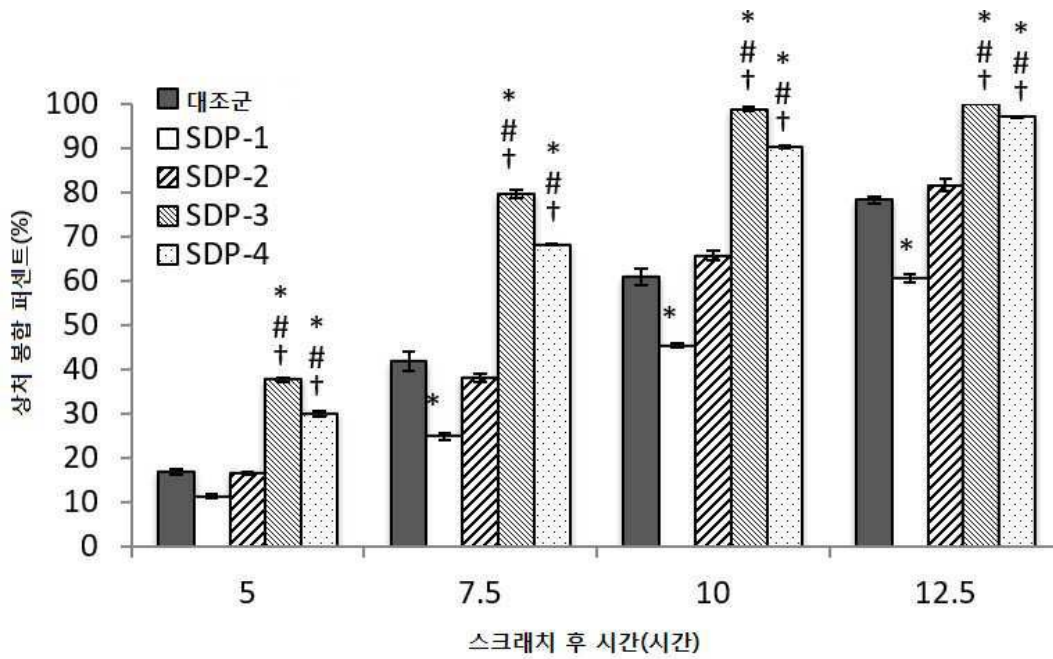
도면6



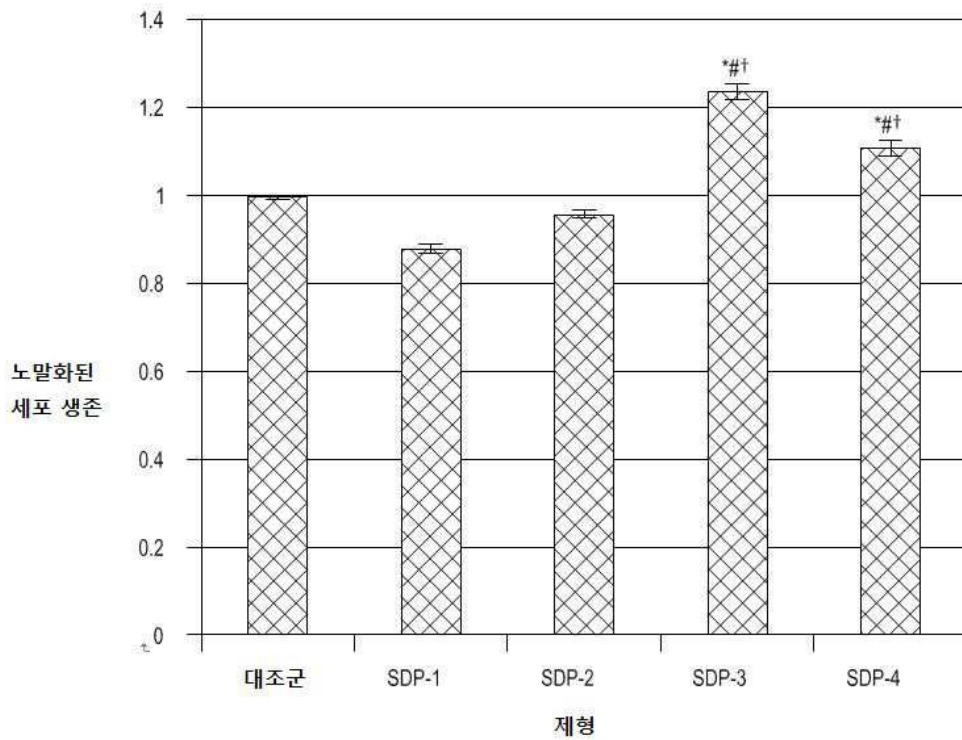
도면7



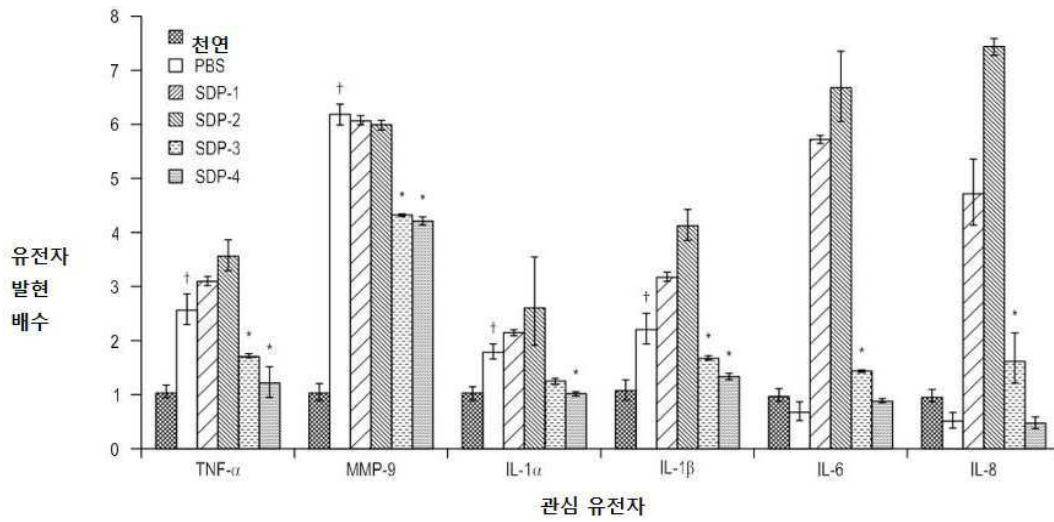
도면8



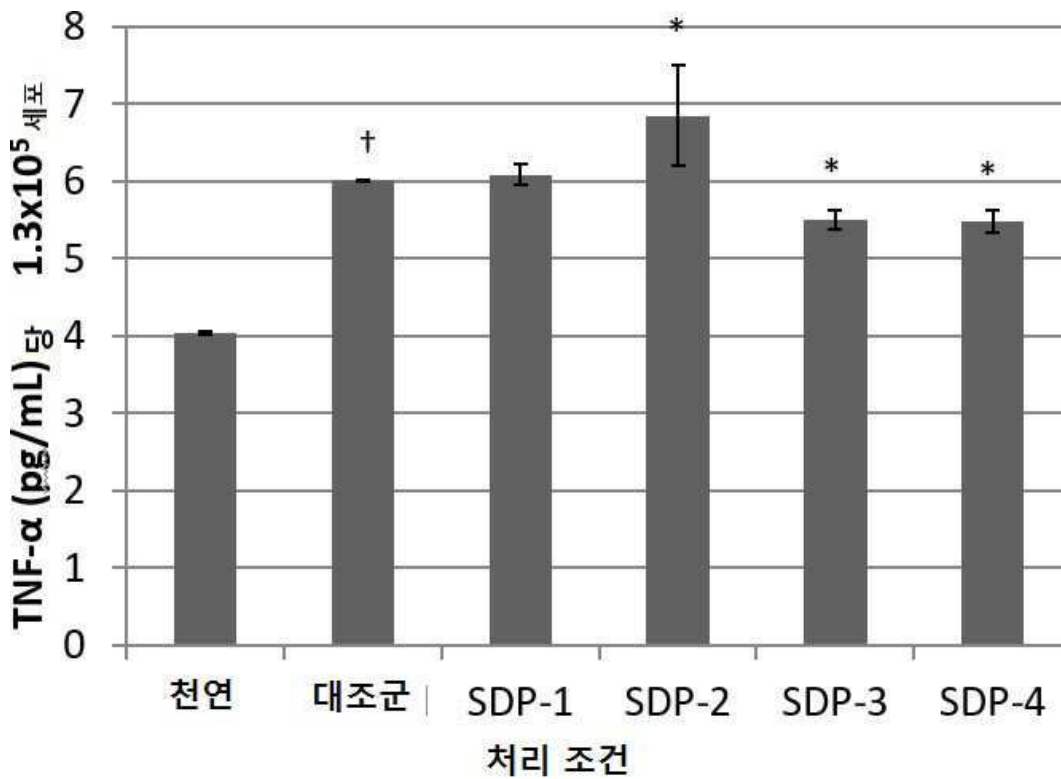
도면9



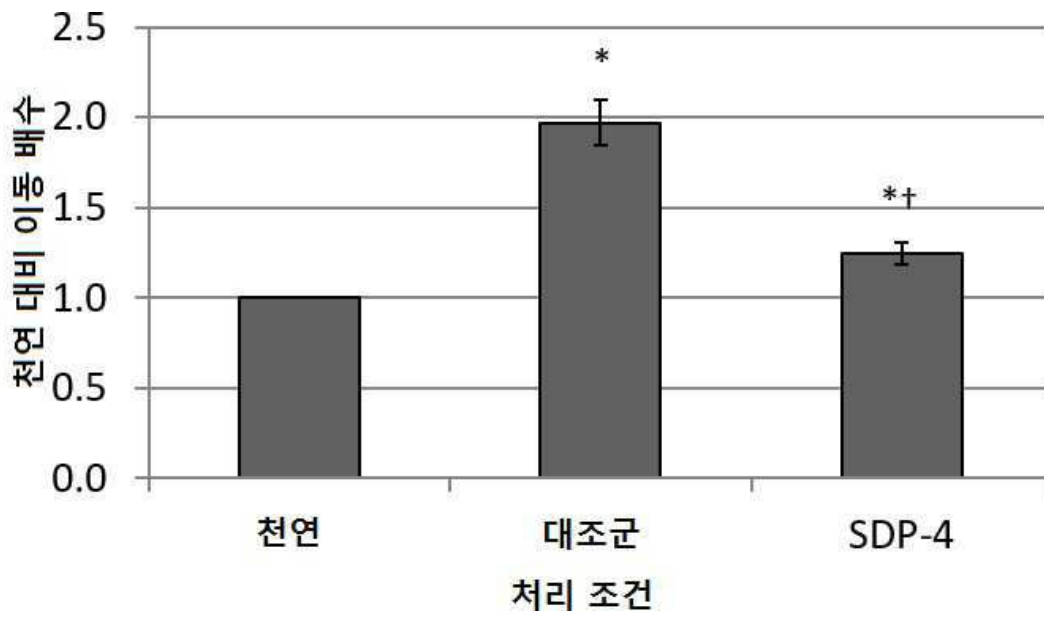
도면10



도면11



도면12



서열 목록

- <110> SILK TECHNOLOGIES, LTD.
- <120> SILK-DERIVED PROTEIN FOR TREATING INFLAMMATION
- <130> PKR19-0301
- <150> US 62/374,532
- <151> 2016-08-12
- <150> US 62/407,863
- <151> 2016-10-13
- <150> US 62/467,697
- <151> 2017-03-06
- <160> 13
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Synthetic peptide
- <400> 1
- Gly Ala Gly Ala
- 1
- <210> 2
- <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic primer
 <400> 2
 aatgtggccg aggactttga ttgc 24
 <210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 3
 aggatggcaa gggacttct gtaa 24
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 4
 gaggccaagc cctggtatg 19

 <210> 5
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 5
 cgggccgatt gatctcagc 19
 <210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 6
 tgtaccgcta tggttacact cg 22

<210> 7
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 7

ggcagggaca gttgcttct 19

<210> 8
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 8

gctatttggc gctggactt 19

<210> 9
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 9

gcggtctcgta gctcttctc 19

<210> 10
 <211> 22
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer
 <400> 10

ttgaagaaga acccgtcctc tg 22

<210> 11
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic primer

<400> 11
ctcatacgtg ccagacaaca cc 22

<210> 12
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic primer
<400> 12
ctaccgcttt cccacttca g 21

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic primer
<400> 13
tcctcagctc cttgatggtc t 21