



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0029217
(43) 공개일자 2010년03월16일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) Int. Cl.
A61K 35/24 (2006.01) A61K 38/25 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 11/10 (2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2009-7027152</p> <p>(22) 출원일자 2008년05월29일
심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2009년12월28일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2008/065076</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2008/150861
국제공개일자 2008년12월11일</p> <p>(30) 우선권주장
60/940,554 2007년05월29일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
트러스티즈 오브 터프츠 칼리지
미국 매사추세츠 보스턴 해리슨 애브뉴 136 (우:02111)</p> <p>(72) 발명자
왕, 샤오킨
미국 02148 매사추세츠주 말덴 마운틴 애비뉴 아파트먼트 63 200
클루지, 존
미국 01772 매사추세츠주 사우쓰보로 디어풋 로드 51
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
김영, 양영준</p> |
|---|--|

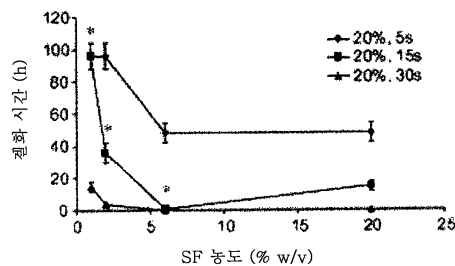
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 음파 처리를 이용한 실크 피브로인 겔화 방법

(57) 요약

본 발명은 초음파 처리를 통해 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법을 제공한다. 적절한 조건 하에, 겔화는 초음파 처리 후 2 시간 이내에 형성되도록 조절될 수 있다. 생존가능한 세포를 포함하는 생물학적 물질, 또는 치료제가 본 방법에서 형성된 하이드로겔에 캡슐화되어 전달 운반체로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

라이스크, 개리, 지.

미국 01887 매사추세츠주 윌밍턴 에버그린 드라이브 1212

카플란, 데이빗, 엘.

미국 01742 매사추세츠주 콩코드 폰드 스트리트 46

특허청구의 범위

청구항 1

실크 피브로인을 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안 초음파 처리를 포함하는 처리에 노출시키는 것을 포함하고, 여기에서 실질적인 실크 피브로인 겔화가 초음파 처리 후 24 시간 미만에 형성되는, 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 실크 피브로인 겔화가 초음파 처리 후 2 시간 미만에 형성되는 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 실크 피브로인이 초음파 처리 후 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 겔화되는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 처리가 염 용액을 더 포함하는 방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 염 용액이 칼륨, 칼슘, 나트륨, 마그네슘, 구리, 아연 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 이온을 포함하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 실크 피브로인이 약 pH 4 이하 또는 약 pH 7.5 이상인 pH를 갖는 수용액의 형태인 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서, 상기 염이 칼륨이고, 염 농도가 100 mM 미만이며, 염 농도의 pH가 약 pH 4 이하인 방법.

청구항 8

실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안 초음파 처리와 접촉시킴으로써 상기 실크 피브로인이 약 2 시간 내에 실질적으로 겔화되는, 실크 피브로인의 겔화 시간을 조절하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 실크 피브로인이 초음파 처리 후 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 겔화되는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 상기 겔화 시간이 초음파 처리의 진폭 및 실크 피브로인 용액의 농도에 의해 조절되는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서, 상기 처리가 염 용액을 더 포함하는 방법.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 겔화 시간이 실크 피브로인 용액의 농도 및 염 용액의 농도에 의해 조절되는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 실크 피브로인의 농도가 4 중량% 이하이고, 염 용액이 칼륨 이온을 포함하며, 상기 칼륨 염 용액의 농도가 20 mM 내지 100 mM의 범위인 방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 겔화 시간이 상기 염 용액의 농도 및 pH에 의해 조절되는 방법.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 염 용액이 칼륨 이온을 포함하고, 상기 칼륨 염 용액의 농도가 20 mM 내지 100 mM의 범위이며, 상기 용액의 pH가 pH 4 이하인 방법.

청구항 16

실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기 위한 일정 시간 동안 초음파 처리와 접촉시키고;

실크 피브로인 용액에서 실질적인 겔화가 일어나기 이전에 실크 피브로인 용액에 1종 이상의 작용제(들)을 도입하여

실크-피브로인 캡슐화된 작용제를 형성하는

것을 포함하는, 실크 피브로인 내에 1종 이상의 작용제를 캡슐화하는 방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서, 상기 작용제가 치료제 또는 생물학적 물질, 또는 그 양자인 방법.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 상기 작용제가 세포, 단백질, 펩티드, 핵산, PNA, 압타머 (aptamers), 항체, 호르몬, 성장 인자, 시토킨, 효소, 항균 화합물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 생물학적 물질인 방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서, 상기 세포가 줄기 세포인 방법.

청구항 20

제 18 항에 있어서, 세포 성장 배지가 생물학적 물질과 함께 실크 피브로인 내에 도입되는 방법.

청구항 21

제 17 항에 있어서, 상기 작용제가 작은 분자, 약물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 치료제인 방법.

청구항 22

제 16 항에 있어서, 상기 실크-피브로인 캡슐화된 생물학적 물질이 생체전달 장치에 적합한 방법.

청구항 23

제 16 항에 있어서, 실질적인 겔화가 약 2 시간 내에 일어나는 방법.

청구항 24

제 16 항에 있어서, 실질적인 겔화가 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간 내에 일어나는 방법.

청구항 25

제 16 항에 있어서, 상기 처리가 염 용액을 더 포함하는 방법.

청구항 26

제 16 항에 있어서, 실크 피브로인이 약 pH 4 이하 또는 약 pH 7.5 이상의 pH를 갖는 수용액의 형태인 방법.

청구항 27

1종 이상의 작용제(들)을 실크 피브로인 용액에 도입하고;
 실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기 위한 일정 시간 동안 초음파 처리와 접촉시켜
 실크-피브로인 캡슐화된 작용제를 형성하는
 것을 포함하는, 실크 피브로인 내에 1종 이상의 작용제를 캡슐화하는 방법.

청구항 28

제 27 항에 있어서, 상기 작용제가 작은 분자, 약물, 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 치료제인 방법.

청구항 29

제 27 항에 있어서, 실질적인 겔화가 약 2 시간 내에 일어나는 방법.

청구항 30

제 27 항에 있어서, 실질적인 겔화가 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 일어나는 방법.

명세서

[0001] 본 발명은 국립 보건원(the National Institutes of Health)이 지원하는 조직 공학 연구 센터 인가 번호 P41 EB002520 하에 미국 정부 지원으로 이루어진 것이다. 정부가 본 발명에 일정 권리를 갖는다.

[0002] <관련 출원>

[0003] 본 발명은 발명의 명칭이 "음파 처리를 이용한 실크 피브로인 겔화 방법"이고, 참고문헌으로 도입되는 2007년 5월 29일자 출원된 미국 임시 특허 출원 제60/940,554호에 관계되며, 그 우선권을 주장한다.

기술분야

[0004] 본 발명은 초음파 처리에 의해 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법을 제공한다. 본 방법에 의해 형성된 하이드로겔은 예를 들면 생체전달 운반체로 유용하다.

배경기술

[0005] 생체적합성 및 생분해성 중합체 하이드로겔은, 예를 들면 조직 공학 및 조절된 약물 방출과 같은 생의학적 응용을 위한 생활성 분자 및 세포를 운반하기 위해 유용한 담체이다. 정제된 천연의 실크 피브로인은 수용액으로부터 β-시트-풍부한 가교된 하이드로겔 구조를 형성하며, 그 공정 및 겔 성질의 명세는 환경적 변수에 의해 영향을 받는다. 이전의 겔화 시간은 천연의 실크 단백질 수용액의 경우 종종, 겔화 동역학 증가의 원인이 되는 높은 온도 및 낮은 pH를 이용하여, 수 일 내지 수 주가 걸렸다. 이러한 조건은 일부 생활성 분자의 도입에 적합할지라도, 활성 세포 및 불안정한 생활성 분자의 도입을 위해서는 너무 느릴 수 있다.

[0006] 즉, 온화한 생리적 조건에서 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법에 대한 요구가 당 분야에 존재한다.

[0007] <발명의 요약>

[0008] 본 발명은 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법에 관한 것이다. 본 방법에서는 실크 피브로인을 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안 초음파 처리를 포함하는 처리에 노출시킨다. 예를 들면, 특정 조건 하에, 겔화는 초음파 처리 24 시간 이내에 일어난다.

[0009] 본 발명의 구현에는 또한 실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안 초음파 처리와 접촉시킴으로써 실크 피브로인의 겔화 시간을 조절하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 또 하나의 구현에는 작용제를 실크 피브로인 내에 캡슐화하는 방법에 관한 것이다. 본 방법은 실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기 위한 일정 시간 동안 초음파 처리에 노출시키고, 상기 실크 피브로인 용액에서 실질적인 겔화가 일어나기 전에 작용제를 상기 실크 피브로인 용액에 도입함으로써, 실크-피브로인-캡슐화된 작용제를 형성하는 것을 포함한다. 그렇지 않으면, 상기 작용제는 음파 처리 이전에 실크 피브로인에 첨가될 수도 있다.

상기 작용제는 의약과 같은 치료제, 또는 세포와 같은 생물학적 물질일 수 있다. 예를 들면, 사람의 골수에서 유래된 중간엽 줄기 세포(hMSCs)가 음과 처리 후 실크 피브로인 하이드로겔 내에 성공적으로 도입된 다음, 신속히 겔화되어 세포 기능을 유지하였다.

[0011] 본 발명의 방법에서 수득되는 하이드로겔은 양호한 기계적 성질 및 단백질 분해 프로파일을 모두 나타낸다. 예를 들면, 음과 처리된 4%, 8% 및 12%(w/v)의 실크 피브로인 용액에 hMSCs를 가하면, 0.5 시간 내지 2 시간 내에 겔화되었다. 세포는 21일에 걸쳐 4% 겔에서 성장 및 증식되었다. 또한, K^+ 의 낮은 농도 및 낮은 pH가 겔화를 촉진하기 위해 사용될 수 있다.

발명의 상세한 설명

[0018] 본 발명은 여기에 기재된 특정 방법, 프로토콜 및 시약 등에 국한되지 않으며, 이러한 것들은 변할 수 있음이 이해되어야 한다. 여기에 사용된 용어들은 단지 특정 구현예를 설명할 목적이며, 오직 청구항에 의해서만 정의되는 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다.

[0019] 본 명세서 및 클레임에 사용되는 단수 형태는, 문맥이 분명히 달리 명시하지 않는 한 복수의 관계를 포함하며, 그 반대도 성립한다. 실시예를 수행하는 것 외에, 또는 달리 명시된 곳 외에, 여기에 사용된 성분 또는 반응 조건의 양을 표현하는 모든 숫자는 모든 경우에 "약"이라는 용어에 의해 수정되는 것으로 이해되어야 한다.

[0020] 기재된 모든 특허 및 기타 간행물은 여기에, 예를 들면 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 상기 간행물에 기재된 방법론 등을 기재 및 개시할 목적으로 여기에 참고문헌으로 특별히 도입된다. 이들 간행물은 본 출원의 출원일 이전 그 개시를 위해서만 제공된다. 본 발명자들이 종전 발명의 덕분에 그 개시를 선행할 자격이 없거나 다른 어떠한 이유로도, 이와 관련하여 어떤 것도 승인되는 것으로 여겨져서는 안된다. 이들 문헌의 내용에 관한 낱자 또는 진술에 관한 모든 언급은 본 출원인에게 입수가능한 정보에 기초하며 이들 문헌의 낱자 또는 내용의 정정에 관한 어떠한 승인을 이루는 것이 아니다.

[0021] 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야에 통상의 지식을 가진 이에게 통상적으로 이해되는 것들과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 실시 또는 시험에 있어서 임의의 공지된 방법, 장치 및 물질이 사용될 수 있지만, 이와 관련된 방법, 장치 및 물질을 여기에 기재한다.

[0022] 본 발명은 실크 피브로인 겔화를 신속하게 형성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법에서는 실크 피브로인을 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안 초음파 처리를 포함하는 처리에 노출시킨다. 이러한 접근은 일시적으로 조절가능한 방식으로 줄-겔 전이를 촉진하기 위해 사용되는 초음파-기반 방법을 제공한다. 겔화 시간은 사용되는 음과 처리 변수(에너지 출력, 지속 시간, 기타) 및 생리적으로 관련된 조건 내 실크 피브로인의 농도에 근거하여 수 분에서 수 시간까지 조절될 수 있다. 음과 처리 후, 실크 피브로인은 겔화에 상응하여 랜덤 코일에서 β -시트로 신속한 구조 변화를 진행한다. 예를 들면 치료제 또는 생물학적 물질과 같은 작용제를 음과 처리 이전에, 도중에 또는 이후에 가하고, 겔화 시 캡슐화할 수 있다. 즉, 본 발명은 세포의 캡슐화가 시간에 민감한 경우와 같이 다양한 생의학적 응용에 유용한 방법을 제공한다.

[0023] 하이드로겔은, 그들의 통상적으로 >30%인 높은 수분 함량으로 인하여 [Park & Lakes, BIOMATS: INTRO. (2nd ed., Plenum Press, NY, 1992)], 조직 공학 및 세포 치료 응용과 같은 세포 및 생활성 분자의 캡슐화 및 전달을 위한 유용한 골격으로 고려된다. 이러한 유형의 응용에 사용되는 하이드로겔은 일부 조직 및 세포의 매트릭스(ECM)와 유사한 기계적 및 구조적 성질을 가지므로, 이들은 조직 회복 또는 치료적 인자의 국소 방출을 위해 이식될 수 있다. 세포를 캡슐화 및 전달하기 위해, 하이드로겔은 바람직하게는 세포를 손상시키지 않고 형성되어야 하고, 세포 및 주위 조직에 비독성이어야 하며, 생체적합성이고, 영양분 및 대사산물의 확산을 허용하도록 적합한 질량 이송 능력을 가져야 하며, 이식과 관련된 처리를 견디도록 충분한 기계적 일체성 및 강도를 가져야 하고, 조절가능한 수명을 가져야 하며, 응용에 따라 이식 후 합리적인 시간 동안 겔 부피를 유지해야 한다 [Drury & Mooney, 24 Biomats. 4337-51 (2003)].

[0024] 폴리(에틸렌 옥시드) (PEO), 폴리(비닐 알코올) (PVA), 폴리(아크릴산) (PAA), 폴리(프로필렌 푸마레이트-코-에틸렌 글리콜) (P(PF-co-EG))과 같은 각종 합성 물질, 및 아가로오스, 알기네이트, 키토산, 콜라겐, 피브린, 젤라틴 및 히알루론산(HA)과 같은 천연 유래의 물질이 하이드로겔을 형성하는 데 사용되어 왔다. 중합체 사슬이 화학 약품(예, 가교제) 또는 물리적 자극(예, pH 및/또는 온도)에 의해 유발됨으로써 화학적 또는 물리적으로 가교되어 그물구조를 이룰 때 겔화가 일어난다. 합성 중합체로부터 형성된 하이드로겔은, 특정 분자량, 블럭 구조 및 가교 방식의 사용에 의해, 겔화의 유익 및 조절가능하고 재현가능한 겔 성질을 제공한다. 일반적으로,

천연 유래 중합체는, 그들의 고분자 성질이 세포외 매트릭스에 더욱 가까이 정렬되어 있고 분해 생성물이 비독성이기 때문에, 조직 공학 및 이식가능한 의학 장치용 세포 및 생활성 분자의 담체로 유용한 경향이 있지만, 그 겔화는 조절가능성이 적다 [Lee 등, 221 Int'l J. Pharma. 1-22 (2001); Smidsrød 등, 8 Trends Biotech. 71-78 (1990)].

[0025] 천연 유래의 생체물질 중, 실크 피브로인 단백질, 천연 누에 섬유 중 자체-조립 구조 단백질이 우수한 기계적 성질, 생체적합성, 조절가능한 분해 속도 및 결정성 β -시트 구조 그물구조의 유도가능한 형성 때문에 연구되었다 [Altman 등., 24 Biomats. 401-16 (2003); Jin & Kaplan, 424 Nature 1057-61 (2003); Horan 등, 26 Biomats. 3385-93 (2005); Kim 등, 26 Biomats. 2775-85 (2005); Ishida 등, 23 Macromolecules 88-94 (1990); Nazarov 등, 5 Biomacromolecules 718-26 (2004)]. 실크 피브로인은 조직 공학 및 조절된 약물 방출 응용의 양자를 위한 필름, 3차원 다공성 골격, 전기방사 섬유 및 미소구를 포함하는 다양한 재료 형식으로 제작될 수 있다 [Jin 등, 5 Biomacromolecules 711-7 (2004); Jin 등, 3 Biomacromolecules, 1233-39 (2002); Hino 등, 266 J. Colloid Interface Sci. 68-73 (2003); Wang 등, 117 J. Control Release, 360-70 (2007)]. 또한 미국 특허 출원 일련 번호 11/020,650 호; 동 10/541,182 호; 동 11/407,373 호; 및 동 11/664,234 호; PCT/US07/020789 호; PCT/US08/55072 호를 참고하라.

[0026] 원천적으로, 실크 피브로인 수용액은 누에 분비기관의 배면부에서 생성된 다음, 30%(w/v)에 이르는 농도로 중간부에 저장되며, 높은 함량의 랜덤 코일 또는 알파 나선 구조를 포함한다. 공기 내로의 섬유 방사 도중, 높은 전단력 및 신장 유동이 자체-조립 및 β -시트 구조로의 구조적 전이를 유도하여, 고체 섬유의 형성을 초래한다 [Vollrath & Knight, 410 Nature, 541-48 (2001)]. 분비기관의 다양한 부분에서 금속 이온의 존재 및 pH 변화가 이러한 전이에 영향을 준다 [Chen 등, 3 Biomacromolecules 644-8 (2002); Zhou 등, 109 J. Phys. Chem. B 16937-45 (2005); Dicko 등, 5 Biomacromolecules 704-10 (2004); Terry 등, 5 Biomacromolecules 768-72 (2004)]. 시험관내에서, 정제된 실크 피브로인 수용액은 β -시트 구조로 자체-조립되어 하이드로겔을 형성한다. 상기 졸-겔 전이는 온도, pH 및 이온 강도[Wang 등, 36 Int'l J. Biol. Macromol. 66-70 (2005); Kim 등, 5 Biomacromolecules 786-92 (2004); Matsumoto 등, 110 J. Phys. Chem. B 21630-38 (2006)]에 의해 영향받는다. 실크 하이드로겔의 압축 강도 및 탄성율은 실크 피브로인 농도 및 온도의 증가에 따라 증가한다 (Kim 등, 2004).

[0027] 실크 피브로인 하이드로겔은 다수의 생의학적 응용에 중요하다. 예를 들면, 피브로인 하이드로겔은, 실크 겔이 폴리(D,L 락티드-글리콜리드) 조절 물질보다 더 나은 뼈 치료를 나타내는, 토끼 말단 대퇴골의 결정적인-크기 해면조직 결함을 치료하기 위한 뼈-충전 생체물질로 사용되었다 [Fini 등, 26 Biomats. 3527-36 (2005)].

[0028] 다수의 세포-기반 응용에 있어서, 겔화는 비교적 짧은 시간 동안 (수 시간 이내) 온화한 조건 하에 유도되어야 한다. 그러나 실크 겔화 시간은 천연의 실크 피브로인 단백질에 화학적 개질이 없이 비생리학적 처리가 고려되지 않는 한 (낮은 pH, 높은 온도, 첨가제 등), 지나치게 길 수도 있다. 0.6% 내지 15%(w/v)의 실크 피브로인 농도의 경우, 실온 또는 37°C에서 졸-겔 전이를 위해 수 일 내지 수 주가 필요하였다 (Kim 등, 2004; Matsumoto 등, 2006; Fini 등, 2005). 생리적 수준보다 높은 농도로 염을 가하는 것은 겔화 동역학을 실질적으로 변화시키지 않는다 (Kim 등, 2004). pH를 낮추거나 (pH < 5) 온도를 증가시키는 것은 (> 60°C) 겔화 시간을 수 시간까지 감소시킬 수 있었지만 [Kim 등, 2004; Fini 등, 2005; Motta 등, 15 J. Biomater. Sci. Polymer. Edu. 851-64 (2004)], 상기 조건은 세포 기능을 잠재적으로 변화시키고 세포 생존능력에 영향을 줄 수 있었다.

[0029] 본 발명에서, 공정을 촉진하고 실크 피브로인 겔화를 조절하는 신규 방법은 초음파를 통해 이루어진다. 더욱 구체적으로, 신규의 초음파 처리-기반 방법은 일시적으로 조절가능한 방식으로 졸-겔 전이를 촉진하는 것으로 나타난다. 기계학적으로, 본 방법은 피브로인 단백질 사슬의 소수성 수화의 변화를 통해 물리적 β -시트 가교를 유도한다. 이는 세포 첨가 후-음파 처리에 이어 신속한 겔화를 가능하게 한다. 겔화 시간은 사용되는 음파 처리 변수(에너지 출력 및 지속 시간) 및 실크 피브로인 농도에 근거하여 수 분에서 수 시간까지 조절될 수 있다. 본 방법은 또한 겔화에 미치는 pH 및 염 농도 효과; 겔화 이후 동적인 실크 구조 변화; 및 예를 들면, 실크 겔 중 인체 골수 유래된 중간엽 줄기 세포(hMSCs)와 같은 캡슐화된 세포의 성질의 조절을 제공한다.

[0030] 임의의 종류의 실크 피브로인이 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 붐빅스 모리(*Bombyx mori*)와 같은 누에에 의해 생산된 실크 피브로인이 가장 일반적이며 토양-친화적이며 재생가능한 자원을 나타낸다. 유기적 누에 고치가 상업적으로 입수가 가능하다. 하지만, 대신 사용될 수 있는, 거미 실크, 유전자 도입 실크, 유전 공학적 실크, 및 이들의 변형물과 같은 다수의 다양한 실크가 존재한다. 실크 피브로인 수용액은 당 분야에 공지된 기술을 이용하여 누에 고치로부터 제조될 수 있다. 실크 피브로인 용액을 제조하기 적합한 방법이 예를 들면 미국 특

허 출원 일련 번호 11/247,358 호; WO/2005/012606 호; 및 PCT/US07/83605에 개시되어 있다. 예를 들면, 실크 생중합체에 사용된 실크는 봄빅스 모리(*B. mori*)의 고치로부터 세리신을 추출함으로써 수득될 수 있다.

- [0031] 실질적인 겔화는 초음파 처리 후 24 시간 내에 통상적으로 일어난다. 예를 들면, 실크 피브로인 겔은 초음파 처리 후 4 시간 미만에, 예를 들면 초음파 처리 후 2 시간 이내에 형성된다. 특정 구현예에서, 실크 피브로인은 초음파 처리 후 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 겔화가 진행된다. 즉, 필요에 따라, 겔화 시간은 용액의 제조에 사용된 초음파 처리에 근거하여, 수 분 내지 수 시간에 일어날 수 있다.
- [0032] 초음파 처리는 당 분야에 공지되어 있다. 상기 응용을 위해, "초음파 처리" 및 "음파 처리"라는 용어는 상호교환가능하게 사용되며 동일한 의미를 갖는다. 초음파 처리는 실크 피브로인에 초음파를 적용하는 당 분야에 공지된 임의의 방식으로 수행될 수 있다. 초음파 처리는 실크 피브로인을 음파 처리에 한 번 노출시키는 것을 포함하거나, 다수의 별도 노출을 수반할 수 있다. 음파 처리는 단백질 구조 변화의 맥락에서 연구되었으며 [Meinel 등, 71 J. Biomed. Mater. Res. A 25-34 (2004); Meinel 등, 88 Biotechnol. Bioeng. 379-91 (2004)], 대형 액체-기체 계면, 국소적 가열 효과, 기계적/전단 응력, 및 자유 라디칼 반응을 생성하기 위해 사용되었다. 반면에, 펩티드 겔화에 관련된 다른 연구들에서, 겔 중 조립된 펩티드 나노섬유는 음파 처리에 의해 더 작은 단편으로 파괴되었다 [Hung 등, 32 Ann. Biomed. Eng. 35-49 (2004)]. 중합체 졸-겔 전이의 맥락에서, 음파 처리는 겔 그물구조를 파괴하고 하이드로겔을 다시 액화시키기 위해 전형적으로 사용되어 왔다. 본 발명은 실크 졸-겔 전이를 유도하기 위해 음파 처리의 신규 사용을 제공한다.
- [0033] 초음파 처리는 겔화 공정을 개시하기에 충분한 시간 동안 지속되어야 하지만, 하이드로겔의 기계적 성질을 손상하지 않도록 한다. 전형적으로, 초음파 처리는 사용되는 실크 피브로인의 양, 용액의 농도, 및 당업자에 의해 잘 알려진 다른 요인에 의존하여, 약 5 초 내지 약 60 초 동안 지속될 수 있다. 예를 들면, 초음파 처리는 약 15 초에서 약 45 초까지 지속된다. 겔화는 전형적으로 초음파 처리의 착수 시에 시작되어 처리가 종결된 후에도 계속된다.
- [0034] 초음파 처리는 겔화 과정에 도움을 주기 위해 다른 처리들을 포함할 수 있다. 예를 들면, 처리는 염 용액을 포함할 수 있다. 염 용액은 겔화를 유도하는 데 도움을 주는 것으로 당 분야에 알려져 있다. 칼륨, 칼슘, 나트륨, 마그네슘, 구리 및/또는 아연의 이온을 함유하는 전형적인 염 용액이 사용될 수 있다. 칼륨이 이러한 맥락에서 염 용액에 유리할 수 있다.
- [0035] 처리는 또한 피브로인 수용액의 pH를 조절하는 것을 포함할 수 있다. 당 분야에 알려진 바와 같이, 수용액의 pH 조절은 겔화를 유도하는 데 도움을 줄 수 있다. 특히, pH를 더 높이 또는 더 낮게 조절하는 것이 효과적일 수 있다. 즉, 예를 들어, 약 pH 4 이하, 또는 약 pH 7.5 이상의 pH를 갖는 수용액이 사용될 수 있다.
- [0036] 특히, 낮은 농도 및 낮은 pH에서 칼륨 염 용액을 사용하는 것이 종종 효과적이다. 특정 구현예는 염 농도가 100 mM 미만이고 용액의 pH가 약 pH 4 이하인 칼륨 염의 사용을 지향한다.
- [0037] 본 발명은 또한 실크 피브로인 용액을, 겔화가 약 2 시간 내에 일어나는 조건 하에 겔화를 개시하기에 충분한 시간 동안, 초음파 처리와 접촉시킴으로써 실크 피브로인의 겔화 시간을 조절하는 방법을 제공한다. 음파 처리 방법은 실크 피브로인 사슬들 사이에 상호작용을 초래한다. 특정 구현예는 실크 피브로인이 초음파 처리 후 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 겔화를 진행하도록 겔화 시간을 조절하는 방법을 제공한다.
- [0038] 뿐만 아니라, 다양한 다른 요인이 겔화 시간을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들면, 겔화 시간은 초음파 처리의 진폭 및 실크 피브로인 용액의 농도에 의해 조절될 수 있다. 예를 들면, 상기 진폭은 약 25% 내지 약 35% 전력 출력(전형적으로 7 와트 내지 10 와트)의 범위이고, 실크 피브로인의 농도는 약 10% 내지 약 15%(w/v) 범위이다. 또 하나의 구현예에서, 진폭은 약 25% 내지 약 55% 전력 출력(전형적으로, 7 와트 내지 21 와트)의 범위이고, 실크 피브로인의 농도는 약 5% 내지 약 10%(w/v)의 범위이다. 당업자는, 본 출원에 의해, 바람직한 겔화 수준 및 겔화가 일어나는 바람직한 시간 윤곽을 수득하기 위해 초음파 처리의 진폭 및 실크 피브로인 용액의 농도를 변화시킬 수 있다.
- [0039] 겔화 시간은 염 용액을 가하고 실크 피브로인 용액의 농도 및 염 용액의 농도를 조정함으로써 조절될 수도 있다. 상기 염 용액은 칼륨 이온을 포함할 수 있지만, 다른 염 용액이 사용될 수도 있다. 특정 구현예에서, 실크 피브로인의 농도는 4% (w/v) 이하이고, 칼륨 염 용액의 농도는 20 mM 내지 100 mM의 범위이다.
- [0040] 또한, 겔화 시간은, 특히 염 용액이 칼륨 이온을 함유할 경우, 염 용액의 농도 및 pH를 조정함으로써 조절될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 염 용액은 약 pH 4 이하의 pH를 갖는 칼륨 염 용액이다. 예를 들면, 칼륨 염 용

액은 20 mM 내지 100 mM의 농도를 갖는다.

- [0041] 본 발명은 또한 실크 피브로인 내에 1종 이상의 작용제를 캡슐화하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 (a) 실크 피브로인 용액을 겔화를 개시하기 위한 일정 시간 동안 초음파 처리에 노출시키고; (b) 실크 피브로인에서 실질적인 겔화가 일어나기 이전에 실크 피브로인에 1종 이상의 작용제를 도입하여, 실크-피브로인 캡슐화된 작용제를 형성하는 것을 포함한다. 상기 작용제는 초음파 처리 이전, 도중 또는 이후에 상기 실크 피브로인 용액 내에 도입될 수 있다.
- [0042] 상기 작용제는 실크 피브로인 겔에 캡슐화될 수 있는 임의의 물질을 나타낼 수 있다. 예를 들면, 상기 작용제는 작은 분자 및 의약과 같은 치료제, 또는 세포 (줄기 세포 포함), 단백질, 펩티드, 핵산 (DNA, RNA, siRNA), PNA, 압타머, 항체, 호르몬, 성장 인자, 시토킨 또는 효소와 같은 생물학적 물질일 수 있다. 치료제 또는 생물학적 물질을 캡슐화하는 것은 상기 캡슐화된 생성물이 생의학적 목적으로 사용될 수 있기 때문에 바람직하다.
- [0043] 치료제가 캡슐화될 경우, 상기 치료제는, 대부분의 치료제가 음파 처리에 의해 나쁜 영향을 받지 않으므로, 초음파 처리 이전, 도중 또는 이후에 실크 피브로인 용액 내에 도입될 수 있다. 반면, 생물학적 물질이 캡슐화될 경우, 생물학적 물질은 음파 처리에 의해 나쁜 영향을 받을 수 있고, 전형적으로 초음파 처리 후까지 실크 피브로인 용액 내에 도입되어서는 안된다. 이는 모든 생물학적 물질의 경우 필요한 것은 아닐 수도 있지만, 음파 처리는 살아있는 세포를 손상시키거나 파괴하는 것으로 알려져 있으므로 주의하는 것이 좋다.
- [0044] 작용제가 초음파 처리 후 도입되는 경우, 초음파 처리의 조건은 상기 초음파 처리 후 일정 시간에 겔화가 일어나도록 조절될 수 있다. 초음파 처리 도중 또는 그 직후에 겔화가 일어날 경우, 상기 작용제를 실크 피브로인 용액 내에 도입하는 데 시간이 불충분할 수 있다. 예를 들면, 상기 작용제가 초음파 처리 후 도입될 경우, 실크 피브로인은 초음파 처리 후 약 5 분 내지 약 2 시간 범위의 시간에 겔화가 진행된다.
- [0045] 상기 작용제가 초음파 처리 이전 또는 도중에 도입될 경우, 겔화는 초음파 처리 도중, 그 직후, 또는 초음파 처리 후 일정 시간에 일어날 수 있다. 그러므로, 상기 작용제가 초음파 처리 이전 또는 도중에 도입될 경우, 실크 피브로인은 초음파 처리 후 약 2 시간 이내에 겔화가 진행될 수 있다.
- [0046] 치료제 또는 생물학적 물질을 실크 피브로인 내에 도입할 경우, 당 분야에 공지된 다른 물질이 상기 작용제와 함께 첨가될 수도 있다. 예를 들면, 상기 작용제의 성장을 촉진하거나 (생물학적 물질의 경우), 상기 작용제가 캡슐화로부터 방출된 후 그의 기능을 촉진하거나, 캡슐화 시간 도중 그 효능을 보존하거나 유지하기 위한 작용제의 능력을 증가시키기 위한 물질을 첨가하는 것이 바람직할 수 있다. 세포 성장을 촉진하는 것으로 알려진 물질은 돌베코의 개질된 이글 배지 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)와 같은 세포 성장 배지, 소 태아 혈청 (FBS), 비필수 아미노산 및 항생제, 및 섬유아세포 성장 인자 (FGF), 변형 성장 인자 (TGFs), 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), 표피 성장 인자 (EGF), 인슐린-형 성장 인자 (IGF-I), 뼈 형태구성 성장 인자 (BMPs), 신경 성장 인자, 및 관련 단백질과 같은 성장 및 형태구성 인자들을 포함한다. 겔을 통한 전달을 위한 추가의 선택은 DNA, siRNA, 안티센스, 플라스미드, 리포솜 및 유전 물질의 전달을 위한 관련 계; 세포 신호 연쇄반응을 활성화하기 위한 펩티드 및 단백질; 세포로부터 무기질 침착 또는 관련 상황을 촉진하기 위한 펩티드 및 단백질; 겔-조직 계면을 개선하기 위한 접착 펩티드 및 단백질; 및 단백질 및 관련 화합물을 포함한다.
- [0047] 실크-피브로인 캡슐화된 치료제 또는 생물학적 물질이 생체전달 장치에 적합하다. 생체전달 장치로 실크 피브로인을 사용하기 위한 기술은 예를 들면 미국 특허 출원 일련 번호 10/541,182 호; 11/628,930 호; 11/664,234 호; 11/407,373 호; PCT/US207/020789 호; PCT/US08/55072 호에서 찾아볼 수 있다.
- [0048] 실크 피브로인 하이드로겔 구조는 생체전달 운반체가 조절된 방출을 가질 수 있게 한다. 조절된 방출은 시간의 경과에 따라 투여량이 조절된 방출 동역학으로 투여될 수 있게 한다. 일부 경우에, 치료제 또는 생물학적 물질의 전달이 치료가 필요한 부위에 대하여 예를 들면 여러 주에 걸쳐 지속된다. 예를 들면 여러 날 또는 여러 주, 또는 그 이상의 시간에 걸쳐 시간의 경과에 따르는 조절된 방출은 치료제 또는 생물학적 물질의 연속적인 전달을 가능하게 하여 바람직한 치료결과를 얻게 한다. 조절된 전달 운반체가 유리한데, 그 이유는 그것이 치료제 또는 생물학적 물질을 체액 및 조직에서, 예를 들면 프로테아제에 의한, 생체 내 분해로부터 보호하기 때문이다.
- [0049] 또한, 음파 처리를 이용하여 실크 겔 형성을 유도하기 위한 접근에 있어서, 1%, 2%, 6% 및 20%(w/v) 농도의 실크 피브로인 수용액 0.5 mL의 시료를 후술하는 바와 같이 음파 처리하였다. 전력 출력을 일정하게 (20% 진폭) 유지하였을 때, 실크 피브로인 겔화 시간은 음파 처리 시간이 증가함에 따라 감소하였다 (도 1). 실크 농도가 1%로부터 6%(w/v)까지 증가할 때마다, 겔화 시간은 유의하게 감소하였다 (도 1의 시료 간* p < 0.01). 20%

(w/v) 시료는 6% (w/v) 시료보다 유사하거나 훨씬 더 긴 겔화 시간을 가졌다 (도 1). 20% 시료에 있어서 이러한 결과는 용액의 높은 점도로 인한 것으로, 즉 음파가 용액에서 효과적으로 전달될 수 없었던 것으로 보인다. 30% 진폭을 초과하는 전력 출력이 사용된 경우, 음파 처리는 두꺼운 거품을 생성하였고, 실크 피브로인은 균일한 방식으로 겔화되지 않았다.

[0050] 이러한 발포는 음파 처리를 위한 부피가 5 ml로 증가된 경우에는, 55% 진폭 만큼 높은 전력 수준에서도 관찰되지 않았다. 그러나, 더 높은 농도가 5 ml를 초과하는 부피에서 음파 처리된 경우에는 불균일한 겔화가 일어났다. 작은 부피의 실크 용액(오토클레이브 처리 없음)이 음파 처리 적정화 및 겔 특성화(pH, 염 효과 및 CD 측정)에 사용되었고, 오토클레이브 처리된 실크 용액이 기계적, 분해 및 세포 캡슐화 연구에 사용되었다. 흥미롭게도, 원래 용액과 비교할 때, 오토클레이브 처리는 사용된 음파 처리 변수 및 관련된 겔화 시간을 실질적으로 변화시키지 않았으며, 이는 실크 피브로인 단백질이 그 원래 용액-상태 구조의 중요한 특성 및 오토클레이브 처리 후 겔을 형성함에 있어서 β-시트 상태로 구조 전이되는 능력을 보유하고 있음을 시사한다. 오토클레이브 처리로 인한 구조적 변화는 더 연구될 수 있겠으나, 이러한 국면은 약제학적 제품의 상업적 규모의 제조에 편의를 제공한다.

[0051] 실크 피브로인의 겔화 도중, 줄-겔 전이는 CD 측정에서 관찰된 변화에 의해 β-시트 형성의 증가와 관련되었다 (도 2A). 음파 처리 후, β-시트 구조의 신속한 형성이 관찰되었고, 이어서 217 nm에서 타원율의 증가에 근거하여 더 느린 전이가 관찰되었다 (도 2B). 이러한 전이점에서 실크 피브로인 겔화가 일어났고, 여기에서 β-시트 구조의 초기 신속한 형성이 느려졌다. 이러한 전이는 종전에 수행된 연구들과 일치하여 (Matsumoto 등, 2006), 유사한 메커니즘이 수반될 수 있음을 시사한다. β-시트 구조의 형성은 변화된 소수성 상호작용 및 이어지는 물리적 가공으로부터 결과된다. 이러한 초기의 단계는 사슬의 보다 느린 조직화 및 초기 음파 처리-유도된 변화와 비교할 때 비교적 긴 시간 윤곽 내에 겔 그물구조의 형성으로 이어진다. 상기 2-단계 실크 겔화 메커니즘을 도 2C에 개략적으로 나타낸다.

[0052] 겔화의 속도에 영향을 주도록 연구된 변수들은 천연 누에 방사 공정을 재현하기 위한 방법으로 볼 수 있다. 주요 공정 변수는 누에 분비샘의 앞신경 갈래에서 경험되는 증가된 전단력을 모방하는 음파 처리 효과, 양이온 종류 및 농도, 및 pH를 포함한다.

[0053] 음파 처리에서, 기계적 진동이 버블의 형성 및 파괴를 일으키는 것이 허용된다. 이러한 공동화의 결과, 매질은 열 (10,000 K), 고압 (200 bar) 및 높은 변형 속도(10^7 s^{-1})와 같은 극도의 국소적 효과를 경험할 수 있다 [Paulusse & Sijbesma, 44 J. Polym. Sci.-Polym. Chem. 5445-53 (2006); Kemmere 등, 290 Macromol. Mater. Eng. 302-10 (2005)]. 이러한 물리적 현상은 N-이소프로필아크릴아미드/아크릴산 공중합체의 자체-조립 및 겔화 [Seida 등, 90 J. Appl. Polym. Sci. 2449-52 (2003)], 금속화된 펩티드를 갖는 유기 유체 [Isozaki 119 Angew Chem. 2913-15 (2007)], 및 합성 자체-조립 펩티드[Yokoi 등, 102 Proc Nat Acad Sci USA 8414-19 (2005)]를 포함하는 다양한 응용에서 활용되어 왔다. 펩타이드 외에, 인체 혈청 알부민 및 미오글로빈과 같은 단백질도 질병 상태에 관련된 응집 및 자체-조립을 특성화하기 위한 접근방법으로 음파 처리와 함께 연구되었다 [Stathopoulos 등, 13 Protein Sci. 3017-27 (2004); Mason & Peters, PRACTICAL SONOCHEM: USES & APPL. ULTRASOUND (2nd ed., Chichester, West Sussex, UK (2002)].

[0054] 음파 처리에 반응하는 중합체 계의 성질에서 볼 때, 국소적 온도 증가, 기계적/전단력, 및 증가된 공기-액체 계면을 포함하는, 음파 처리에 관련된 여러 물리적 요인이 실크 피브로인의 신속한 겔화 공정에 영향을 주는 것으로 보인다. 특히, 소수성 수화에서 음파 처리-유도된 변화는 β-시트 형성에 관련된 초기 사슬 상호작용과 같은 물리적 가공의 형성을 촉진하는 결과를 가져올 것이다. 본 연구에서는, 음파 처리 공정 도중, 용액 온도가 짧은 시간 (5 분 - 6 분) 동안 실온에서 40°C 내지 71°C까지 증가되었으며, 이는 국소적 온도에서 일시적인 스파이크를 반영한다. 과거의 연구에서, 벌크 시료가 60°C로 유지된 경우, 음파 처리 없이, 겔화는 몇 일을 필요로 하였다 (Kim 등, 2004). 그러므로, 국소적 온도 효과는 증가된 겔화 동역학에 기여하는 것으로 보이지만, 발견된 단시간 반응에 대해 단독으로 원인이 되는 것은 아니다. 일시적 온도 증가에 의해 영향을 받은, 국소화된 사슬 동역학 및 소수성 사슬의 수화 상태의 변화가 상기 소수성 물리적 가공의 형성에 원인을 제공하는 것으로 보인다.

[0055] 실크 피브로인 사슬 중 독특한 소수성 블럭 서열 특성은 사슬-내 및 사슬-간 상호작용의 조절에서 물의 결정적인 역할로 인하여 이러한 유형의 기술에 특히 적합하다 (Jin 등, 2003). 상기 기술을 다른 생중합체 계까지 확장하는 것이 사슬 화학이 사슬 조립의 음파 처리 조절된 공정에 미치는 영향을 결정하는 데 유용할 수 있다. 제조법의 연구를 용이하게 하도록 사슬을 절단하기 위한 방법으로, 음파 처리 관련된 콜라겐 분해가 보고되어

있다 [Giraud-Guille & Besseau, 113 J. Struct. Biol. 99-106 (1994)]. 본 접근방법은, SDS-PAGE 분석에 근거할 때, 사용된 단시간 음파 처리 공정으로 인해 실질적인 사슬 분해를 초래하지 않았음에 주목해야 한다.

- [0056] 실크 피브로인 수용액은 음파 처리 이전, 다양한 생리학적 관련 농도를 갖도록 K^+ 및 Ca^{2+} 로 보충되었다. 도 3A에 나타낸 바와 같이, 낮은 K^+ 농도(20 mM - 50 mM)에서, 겔화 시간은 K^+ 농도가 증가함에 따라 실질적으로 감소하였다 (*시료들 간에 $p < 0.05$). 그러나 높은 K^+ 농도(100 mM - 200 mM)에서는 겔화가 저해되었다 (도 3A). 상기 결과는 0.5% 내지 8% (w/v) 범위의 실크 피브로인 농도에 대하여 관찰되었다. 8%를 초과하면, 모든 시료에서 겔화가 신속히 일어나므로 (< 2 분) 염 효과가 관찰되지 않았다. K^+ 에 비하여, 같은 농도의 Ca^{2+} 가 더 느린 실크 피브로인 겔화를 유도하였다 (도 3A와 3B를 비교). Ca^{2+} 농도가 20 mM에서 200 mM로 증가한 경우, 실크 피브로인 겔화 시간은 상당히 감소하였다 (도 3B에서 *시료 간 $p < 0.05$). 반대로, 종전의 연구에서는 (Kim 등, 2004) 본 접근 방법에서의 관찰과 상이한 결과로서, K^+ 는 효과가 없는 한편 Ca^{2+} 가 실크 피브로인 겔화를 촉진하였다.
- [0057] 실크 피브로인 수용액의 pH는 겔화에 대한 효과를 측정하기 위해 음파 처리 이전에 조절되었다. pH의 감소 또는 증가가 겔화를 촉진하였다 (도 3C에서 *시료 간 $p < 0.05$). 더 낮은 pH(pH < 4)의 효과가 겔화를 유도함에 있어서 더 높은 pH (pH > 9)보다 더욱 현저하였으며 (도 3B에서 ◇시료 간 $p < 0.05$), 이는 종전의 연구와 일치하였다 (Kim 등, 2004; Matsumoto 등, 2006).
- [0058] 겔에 대한 기계적 시험으로부터 결과되는 응력/변형 곡선은 평탄 영역을 이끄는 직선형을 나타내어, 겔이 크고 (약 5% 내지 10% 변형) 거의 점탄성의 특성을 가지며, 그 후 균열 형성에 의해 영구적인 손상이 유도됨을 시사하였다. 본 연구에서 제작된 겔은, 상응하는 실크 피브로인 농도가 항복 강도(도 4A) 및 "전통적인" 탄성율(도 4B)의 경우 모두 유사한 값을 나타냈다는 점에서 종래 연구에서 조사된 겔과 유사한 성능을 가졌다 (Kim 등, 2004). 두 메트릭 모두 실크 겔 농도와 명확하게 상호연관된 것으로 나타났다. 조사된 바로, 실크 피브로인 농도(w/v)의 차이는, 음파 조건으로 인한 변화보다 최종 하이드로겔 기계적 성질의 더 중요한 결정요소였다 (도 4A 및 4B). 마찬가지로, 평형 탄성율 값은 실크 겔 농도와 명확하게 상호연관된 것으로 나타났다 (도 4C).
- [0059] 알기네이트, 아가로오스, 폴리에틸렌 글리콜 가교된 겔, 피브리노젠 및 다른 계과 같은 여타 분해가능한 세포-캡슐화 하이드로겔과 비교할 때 [Almany & Seliktar 26(15) Biomats. 4023-29 (2005); Kong 등, 24(22) Biomats. 4023-29 (2003); Hung 등, 2004; Bryant 등, 86(7) Biotechnol Bioeng 747-55 (2004); Kang 등, 77(2) J. Biomed. Mater. Res. A 331-39 (2006); Rowley 등, 20(1) Biomats. 45-53 (1999); Broderick 등, 72 J. Biomed. Mater. Res. B-Appl Biomater. 37-42 (2004); Zhang 등, 15 J. Mater. Sci. Mater. Med. 865-75 (2004)], 실크 하이드로겔을 신속히 형성하는 고농도가 우수한 기계적 성질을 나타냈다 (표 1). 데이터는 세포-캡슐화 및 기계적 시험 프로토콜 간의 유사성에 기초하여 수집되었고, 여기에서 "전통적인" 또는 평형 탄성율 값이 결정되었다.

표 1

세포 캡슐화에 사용된 분해가능한 중합체로부터 겔 시스템간 기계적 성질 비교

물질	전통적 탄성율 (KPa)	문헌
실크 하이드로겔	369-1712	Wang 등, 29 Biotmats. 1054-64 (2007)
피브리노겐 및 피브리노겐-PEG 공중합체 ^a	0.02-4	Almany & Seliktar, 2005
폴리(1,8-옥탄디올 시트레이트) (POC)	10.4	Kang 등, 2006
PEG 디메타크릴레이트-PLA 공중합체, (광-가교된)	60-500	Bryant 등, 2004
젤라틴	0.18	Rowley 등, 1999
젤라틴, 글루타르알데히드 가교된	8.13	Rowley 등, 1999
Dex-AL/PNIPAAm	5.4-27.7	Zhang 등, 2004
알기네이트 (칼슘-가교된) ^d	~25-125	Smith & Mooney, 2003
물질	전통적 탄성율 (KPa)	문헌
실크 하이드로겔	63-441	Wang 등, 29 Biotmats. 1054-64 (2007)
아가로스 (2% 최종 농도)	~15	Hung 등, 2004

^a 5mm 직경 x 5mm 높이. 1.5 mm/분의 변형 속도, 응력-변형 곡선의 하부(< 15%)의 평균 기울기에 근거한 탄성율.

^b 6mm 직경 x 2.4mm 높이. 2 mm/분의 변형 속도, 응력-변형 곡선의 초기부의 평균 기울기에 근거한 탄성율.

^c 5mm 직경 x 1 mm 높이. 40 내지 100 mN/분의 부하-조절된 변형 속도.

^d 12.5mm 직경 x 1.5 mm 높이. 25 mN/분의 부하-조절된 변형 속도, 초기 전부하력 0.01N 내지 0.25N 사이에서 수득된 기울기의 절대값에 해당하는 영 탄성율.

^e 6 mm 직경. 0.5 mm/분의 변형 속도, 응력-변형 곡선의 하부의 평균 기울기에 근거한 탄성율.

^f 12.7mm 직경 x 2 mm 높이. 1 mm/분의 변형 속도. 탄성율은, 변형의 처음 10%에 한정하여, 응력 대 변형 곡선의 기울기로부터 수득됨.

^g 10% 변형에서 평형 응력 및 초기 단면적으로부터 계산된 평형 탄성율.

[0060]

[0061]

실크 피브로인 막, 다공성 고체 지지체 및 실크 피브로인 양의 효소 (프로테아제 XIV) 분해가 종전에 연구되었다 (Horan 등, 2005; Kim 등, 2005; Jin 등, 2005). 동일한 농도의 프로테아제(5 U/ml)를 이용하면, 모든 실크 피브로인 하이드로겔은, 처음 4일 동안 약 80%의 질량 손실로 신속한 분해를, 그 후 훨씬 더 느린 속도의 분해를 나타냈다 (도 5). 하이드로겔의 분해는 실크 피브로인 농도에 의존하였다. 상기 농도가 4%에서 12%(w/v)로 증가했을 때, 50% 질량 손실에 도달하기 위한 분해 시간은 1.5 일에서 3 일로 증가하였다 (도 5). 프로테아제 대신 PBS 중에서 항온처리된 실크 피브로인 하이드로겔인 대조 시료는 항온 시간에 걸쳐 안정하였다 (도 5). 단백질 가수분해 공정으로 인한 실크 하이드로겔의 신속한 분해(수 이내)가, 상처 치유 시나리오 또는 신속한 의약 전달과 같은 일부 응용에 적합할 수 있다. 그러나, 여기에 논의된 단백질 가수분해의 분해 시간은 시험관내인 반면; 생체 내 수명은 일반적으로 더 길고 시간 윤곽은 조직-특이적임을 주목해야 한다.

[0062]

hMSCs가, 폴리에틸렌 글리콜, 아가로오스, 콜라겐 및 알기네이트와 같은 다양한 하이드로겔 시스템에 성공적으로 캡슐화되었는데, 이들 세포의 조직 복구 또는 재생 능력 및 장기 약물 방출로 인한 것이다 [Nuttelman 등, 24 Matrix Biol. 208-18 (2005); Nuttelman 등, 27 Biomats. 1377-86 (2006); Mauck 등, 14 Osteoarthr. Cartilage 179-89 (2006); Lewus & Nauman, 11 Tissue Eng. 1015-22 (2005); Majumdar 등, 185 J. Cell Physiol. 98-106 (2000); Boison, 27 Trends Pharmacol. Sci. 652-58 (2006)]. 4% 미란(w/v)의 단백질을 갖는 실크 하이드로겔은 물리적 한계로 인해 취급이 어려웠다. 그러므로, hMSC 캡슐화를 위해 4%, 8% 및 12% (w/v) 실크 피브로인으로 된 하이드로겔을 사용하였다. 모든 3 가지 겔 농도에서, 세포는 1 일째 그 원래의 등근 형태 및 균일한 분포를 유지하였다. 6 일째, 12% 겔의 일부 세포 상에 결함이 나타났고, 세포 형태학이 변하였다. 21 일째, 4% 겔의 세포는 1 일째와 비교할 때 변하지 않았지만, 8% 및 12% 겔의 세포들은 많이 변형 및 응집되었다. 조직학적 분석은 4% 겔의 매트릭스 내 hMSCs가 등근 형태를 유지하였고, 실험 동안에 응집되지 않은 한편, 겔의 표면 근처의 것들은 겔 밖으로 성장하여 6 일째부터 등근 형태로부터 스핀들-형태로 형태학이 변하였음을 나타냈다. 모든 hMSCs는, 겔 표면 근처의 스핀들-형태이거나 겔 안에 캡슐화된 등근-형태이거나, 생-사 분석에서 녹색 형광에 의해 알 수 있듯이 살아있었다. 그러므로, hMSCs는 4% 실크 하이드로겔 시스템에서 적어도 21일 동안 그 활성 및 기능을 유지하였다. 그러나, 8% 및 12% 겔에서 hMSCs는 형태학이 크게 변했고, 그 중 다수는 조직학적 영상에서 빈 공동 및 생-사 분석에서 녹색의 형광 얼룩이 거의 없는 것으로 알 수 있듯이, 사망, 응집 및/또는 용해되었다. 세포가 캡슐화되지 않은 대조 실크 겔은 강력한 적색 형광 배경을 나타냈고, 이것이 생-사 분석에서 죽은 세포로부터의 적색 형광을 가렸다.

[0063] 이러한 관찰 및 결론은 DNA 정량(PicoGreen assay)에 의해서도 지지되었다 (도 6). 세포들은 처음 6 일에 걸쳐 모든 3 가지 하이드로겔에서 상당히 증식되었다 (도 6에서 *시료 간의 $p < 0.05$). 4% 겔의 경우, 세포 수는 6 일 후 증가하기를 멈추었으며, 이는 세포 증식을 위한 최대의 겔 용량에 도달했음을 의미한다. 유사한 현상이 PEG 및 알기네이트와 같은 여타 하이드로겔 시스템에서 관찰되었다 [Nuttelman 등, 2006; Ramdi 등, 207 Exp. Cell Res. 449-54 (1993)]. 8% 및 12% 겔의 경우, 세포 수는 6 일 후 감소하였으며, 이는 현미경적, 조직학적 및 생-사 관찰과 일치하였다. 보다 높은 농도의 겔에서 활성의 소실은 질량 이송 한계로 인한 것으로 보이지만, 또한 이들 보다 높은 겔 농도에서 부과된 기계적 제한으로 인한 것일 수도 있다. 실크 겔이 hMSCs에 대하여 독성이었을 가능성은 배제될 수 있는데, 그 이유는 4%, 8% 및 12%에서 실크 겔의 위에서 성장하는 hMSCs가 대조 세포 배양 플레이트 위에서 성장하는 것들과 유사한 성장 속도를 가졌으며, 세포 형태학 (스핀들 형)이 모든 군들 간에 유사하였기 때문이다. 보다 낮은 겔 농도(1% 및 2%)를 안정화하기 위한 조건의 적정화는 여기에 제공된 가르침에 따라 탐구될 수 있는데, 다양한 농도의 실크 겔을 통한 산소 및 영양분의 확산 속도가 상세히 연구될 수 있다.

[0064] 초음파 처리에 근거한 신규의 방법이 여기에 제공되며, 이는 실크 피브로인 하이드로겔의 신속한 형성을 가능하게 한다. 겔화는 음파 처리 전력 출력 및 지속 시간에 따라 수 분 내지 수 시간에 유도될 수 있다. 겔화는 소수성 수화의 변화로 인하여 β -시트 구조 형성을 동반하였다. 낮은 K^+ 농도 및 낮은 pH가 겔화 속도를 촉진한 반면, Ca^{2+} 의 존재 및 K^+ 의 높은 농도는 겔화를 방해하였다. 실크 피브로인 하이드로겔은 압축 탄성율을 기준으로 369 - 1712 kPa 범위의, 종전에 보고된 것들보다 우수한 기계적 성질을 가졌다. 겔 기계적 강도는 실크 피브로인 용액 농도의 증가와 함께 증가하였다. 4% (w/v) 실크 피브로인 하이드로겔이 hMSCs의 캡슐화에 적합하였다; 세포는 수 주에 걸친 정적 배양 조건에서 생존가능성 및 증식을 유지하였다.

[0065] 본 발명은 구현예의 예로써 의도되는 이하의 실시예에 의해 더욱 특징화될 것이다.

실시예

[0066] 실시예 1. 실크 피브로인 용액

[0067] 실크 피브로인 저장 수용액을 종래 기술에 기재된 대로 제조하였다 [Sofia 등, 54 J. Biomed. Mater. Res. 139-48 (2001)]. 요약하면, 봄빅스. 모리(*B. mori*)의 고치를 0.02 M 탄산 나트륨 수용액에서 40 분 동안 끓인 다음, 순수한 물로 완전히 행구었다. 건조 후, 추출된 실크 피브로인을 60°C의 9.3M LiBr 용액에 4 시간 동안 용해시켜 20% (w/v) 용액을 수득하였다. 상기 용액을 슬라이드-어-라이저 (Slide-a-Lyzer) 투석 카세트(MWCO 3,500, Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 2일 동안 증류수에 대하여 투석하여 염을 제거하였다. 상기 용액은 투석 후 광학적으로 투명하였으며, 이를 원심분리하여 상기 공정 도중 형성된, 고치 상에 존재하는 환경 오염물로부터 통상적으로 유래하는, 소량의 실크 응집물을 제거하였다. 실크 피브로인 수용액의 최종 농도는 대략 8%(w/v)였다. 상기 농도는 건조 후 알고 있는 부피의 용액 중 잔류 고체를 칭량함으로써 결정되었다. 상기 8% 용액을 물로 희석하여, 보다 낮은 농도를 갖는 실크 용액을 제조하였다. 보다 높은 농도를 갖는 실크 용액을 수득하기 위해, 슬라이드-어-라이저 투석 카세트(MWCO 3,500, Pierce)의 8% 용액을 10% (w/v) PEG (10,000 g/mol) 용액에 대하여 실온에서 적어도 24 시간 동안 투석하였다 (Jin & Kaplan, 2003; Kim 등, 2004). 원하는 농도에 도달할 때까지 그 부피를 물로 조절하였다. 모든 용액은 사용 전 4°C에서 보관하였다.

[0068] 실시예 2. 다양한 염 농도 및 pH를 갖는 실크 용액

[0069] 실크 겔화에 대한 염 농도의 영향을 측정하기 위해, 1M의 KCl 및 $CaCl_2$ 저장 용액을 실크 용액에 가하여 20 mM 내지 200 mM의 최종 염 농도에 도달하도록 하였다. 겔화에 대한 pH의 영향을 측정하기 위해, 실크 용액을 1M HCl 또는 NaOH 용액으로 적정하였고, pH를 pH 측정계로 모니터링하였다.

[0070] 실시예 3. 실크 겔화 조건에 대한 스크리닝

[0071] 다양한 음파 처리 조건 하에 실크 겔화를 측정하기 위해, 1.5 ml 들이 에펜도르프 관(Eppendorf tube)에 들어 있는 0.5 ml의 실크 (수)용액을 브랜슨 (Branson) 450 초음파 처리기(Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT)로 음파 처리하였는데, 이는 모델 450 전력 공급기, 변환기 (부품 번호 101-135-022), 1/2" 외부 연결된 분쇄기 혼 (Externally Threaded Disruptor Horn) (부품 번호 101-147-037) 및 1/8" 직경의 테이퍼 마이크로팁 (Tapered Microtip)(부품 번호 101-148-062)으로 이루어졌다. 전력 출력은 10%에서 50% 진폭까지 (3 와트 - 21 와트) 변화였고, 음파 처리 시간은 5 초에서 30 초까지 변화하였다. 염과 pH의 겔화에 대한 영향을 측정하기

위해, 전술한 바와 같이 제조된 0.5 ml의 실크 용액을 20% 진폭(7 와트)으로 15 초 동안 음파 처리하였다. 음파 처리 후 용액을 37°C에서 항온 처리하고, 상기 관을 뒤집어 용액의 탁도 변화를 검사함으로써 졸-겔 전이를 육안으로 모니터링하였다 (Matsumoto 등).

[0072] 예비 결과에 근거하여, 12%(w/v)에 이르는 실크 피브로인 농도를 이용하여 더 낮은 점도를 유지하였고, 12% 용액이 8% 및 4% 시료보다 신속하게 겔화되었다. 결과를 이하의 표 2에 기재한다.

표 2

[0073] 음파 처리 후 대 용량 (5 ml - 7 ml) 실크 피브로인 수용액에 대한 겔화 시간

	7W, 30s	10W, 30s	15W, 30s	21W, 30s
4% (w/v)	1 주 내에 겔 없음	1 주 내에 겔 없음	5일	12 시간 (2차 음파 처리 후 1 시간 - 2 시간)
8% (w/v)	6 일	22-24 시간	45-60분	15-30 분
12% (w/v)	4 일	1.5-2 시간	15-30분	관 안에 겔

주: 겔화 시간은 적어도 2회의 독립적인 실험에 근거하여 평가되고 평균되었다.

[0074] 실시예 4. 원형 이색성 (CD)

[0075] 0.5 ml 분량의 2% 실크 (수)용액을 20% 진폭(7 와트)으로 30 초 동안 음파 처리하고, 즉시 0.01 mm 경로 길이의 샌드위치형 석영 셀에 가하였다 (Nova Biotech, El Cajon, CA). CD 측정은 재스코(Jasco)-720 CD 분광광도계 (Jasco Co., Japan)를 이용하여 수행하였다. 모든 시료를 100 nm/분의 속도로 4-s 누적 시간으로 37°C에서 스캔하였고, 4회의 반복된 실험으로부터 결과를 평균하였다. 실크 β-시트 구조 형성의 동역학적 측정을 위해, 217 nm에서 타원율의 변화를 매 10 초마다 샘플링하여 2.5 시간 동안 모니터링하였다.

[0076] 실시예 5. 기계적 시험

[0077] 기계적 시험을 수용하도록 대용량의 실크 겔을 음파 처리에 의해 제조하였다. 유리 플라스크 중 4%, 8% 및 12% (w/v) 실크 용액을 121°C에서 20 분 동안 오토클레이브 처리하였다. 오토클레이브 처리된 용액에 살균된 둘베코의 개질된 이글 배지 분말 (Dulbecco's Modified Eagle Medium powder)(DMEM 분말, Invitrogen, Carlsbad, CA) 및 중탄산 나트륨(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)을 0.135 g/ml 및 0.037 g/ml의 농도까지 각각 보충하였다. 용액의 결과적인 pH는 pH 7.4였고, 이는 pH 측정계로 확인되었다. 15 ml 들이 펠컨 (Falcon) 플라스틱 관에 7 ml의 분량을 가한 다음, 20%, 30%, 40% 진폭으로 (각각 7 와트, 10 와트, 15 와트) 30 초 동안 음파 처리하였다. 6 ml의 음파 처리된 용액을 작은 배양 접시(BD Falcon™, No. 35-3001, BD Biosciences, Palo Alto, CA)에 가하였고, 이를 37°C 항온기에서 육안으로 모니터링하여, 불투명한 특성 및 겔 표면 상의 응결에 근거하여 겔화가 완료될 때까지 세포 배양 변수를 어렵잡을 수 있도록 하였다. 이어서, 겔화 직후 기계적 시험을 위해 9.525 mm 직경의 플러그(높이 2 mm - 3 mm)를 친공하였다. 시험에 앞서 상기 겔 플러그를 완전한 DMEM 용액 (Gibco/Invitrogen)에서 1 시간이 넘게 예비-컨디셔닝하였다.

[0078] 모든 시료를 보관을 위해 DMEM에 담그고, 24 시간 이내에 시험하였다. 막히지 않은 압축 압반 및 100 N 부하 변환기가 장착된 3366 인스트론 (Instron) 기계 (Norwood, MA) 상에서 시료를 평가하였다. 압축 신장 방법은 1 mm/분의 신장 속도를 가지고 시험하였다. 압축 응력 및 변형을 측정하고, 반-자동 기술에 근거하여 탄성율을 계산하였다. 응력-변형 그래프를 상기 그래프의 초기 선형 부분을 너머 설정된 절단 응력 수준 아래 8 개 구획으로 나누었다. 최소-정사각형 맞춤을 이용하여, 이들 8 개 구획 중 가장 높은 기울기를 그 시료에 대한 압축 탄성율로 정의하였다. 차감-항복 접근법을 이용하여 압축 강도를 결정하였다. 탄성율 라인에 평행하게 선을 긋고, 다만 시료 게이지 길이의 0.5% 만큼 차감하였다. 상기 차감 라인이 응력-변형 곡선과 교차하는 해당 응력 값을 골격의 압축 강도로 정의하였다. 상기 시험은 ASTM 방법 F451-95에 근거한 변법에 따라 수행되었다.

[0079] 2 개의 막히지 않은 압축 시험 방식을 수행하여 음파 처리 조건이 기계적 성능에 미치는 영향을 평가하였다. 먼저, 파열까지의 변형 시험을 이용하여 종래 물질의 경직 성질을 알아내고 파열 반응을 관찰하였다 [Almany & Seliktar 26(15) Biomats. 2467-77 (2005); Kong 등, 24(22) Biomats. 4023-29 (2003)]. 둘째로, 응력 이완 시험을 이용하여 형 등[Hung 등, 32 Ann. Biomed. Eng. 35-49 (2004)]의 시험 변수를 근거로, 평형 탄성율 성질을 평가하였다. 또한, 이들 척도는 세포 캡슐화에 사용된 여타 분해가능한 하이드로겔의 보고된 성질에 대하여 폭넓은 비교를 제공한다. 보고된 각 군에 대하여 N = 4 시료를 평가하였고, 막히지 않은 압축 압반 및 100

N 부하 변환기가 장치된 3366 인스트론 (Instron) 기계 (Norwood, MA) 상에서 시험하였으며, 시료 데이터는 블루힐 (Bluehill) 소프트웨어 버전 2.0을 이용하여 송출하였다.

[0080] 파열까지의 변형 시험을 위해, 각 시료를 1 mm/분의 신장-조절된 속도로 압축하였는데, 명목상의 용기 중량 부하에 도달한 후 시작하고, 시료 높이를 기록하였다. 압축 응력 및 변형은 시료 기하학에 대하여 표준화함으로써 결정되었고, "전통적" 탄성율은 각 응력/변형 곡선의 5% 변형 부분에서 이루어진 접축 라인의 기울기로 계산되었다. 항복 강도는 상기 접축 라인에 평행인 라인을 2% 변형만큼 차감하여 결정되었는데; 여기에서 응력/변형 반응과 교차하는 차감 라인이 항복 강도(이는 파열 시작과 일치함)로 정의되었다. 응력 이완 시험을 위해, 시료를 인산염-완충된 염수(PBS)에 담그고 명목상 용기 중량 부하 하에 200 초 동안 두었다. 그 후, 10% 변형에 도달할 때까지 시료를 1 mm/s로 압축하였는데, 이는 20 분이 걸렸다. 평형 탄성율은 상기 이완 응력을 10% 변형으로 표준화함으로써 계산되었다.

[0081] 실시예 6. 실크 겔의 시험관내 효소 분해

[0082] 4%, 8%, 12%(w/v)의 실크 겔 플러그(직경 = 4 mm; 높이 = 2 mm - 3 mm)를 전술한 바와 같이 제조한 다음, 24-웰 플레이트에서 프로테아제 XIV (Sigma-Aldrich) 용액 1 mL에 담갔다. 상기 프로테아제 용액은 PBS에 효소 분말을 용해시켜 5 U/mL의 농도에 도달하게 함으로써 새롭게 제조되었고, 24 시간마다 새로이 제조된 용액으로 교체되었다. 대조 플러그를 역시 24 시간마다 새로 공급되는 1 mL의 PBS에 담갔다. 모든 시료를 37°C에서 항온 처리하였다. 1, 2, 3, 4 및 7 일째, 4 개의 플러그를 물로 세척하고, 티슈로 닦아 겔 표면의 과량의 물을 제거하고, 칭량하였다.

[0083] 실시예 7. 실크 겔에서 hMSCs의 접종 및 배양

[0084] 종래 기술에 기재된 것과 같은 [Meinel 등, 71 J. Biomed. Mater. Res. A 25-34 (2004)] 동의하는 공여자로부터 신선한 전체 골수 흡입물로부터 hMSCs를 분리하였고, 90% DMEM, 10% 소 태아 혈청 (FBS), 0.1 mM의 비필수 아미노산, 100 U/mL의 페니실린, 1000 U/mL의 스트렙토마이신, 0.2%의 핑기존 (fungizone) 항진균약, 및 1 ng/mL의 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF)를 함유하는 성장 배지에서 배양물을 증식시켰다. 사용 전에, 배양 플라스크로부터 통과 3-4 세포를 트립신 처리하고 DMEM에 재현탁시켜 5×10^7 세포/mL의 세포 밀도를 수득하였다. 4%, 8% 및 12%의 실크 용액 15 mL를 수증기 멸균하고 (오토클레이브 처리), 전술한 바와 같이 DMEM 분말과 중탄산 나트륨을 보충하였다. 5 mL 분량을 15-mL 펠킨 플라스틱 관에 가하고 두 관(대조 및 세포 접종된) 모두를 각각의 실크 농도에 대하여 준비하였다. 4% (w/v) 실크 용액(5 mL)을 관 모양의 유동 후드에서 50% 진폭으로 30 초 동안 음파 처리하고, 30 분의 항온 처리 후, 상기 용액을 동일한 조건 하에 다시 음파 처리하였다. 두 번째 음파 처리 후, 상기 용액을 5 분 내지 10 분 내에 실온까지 식히고, 이어서 50 mL의 세포 현탁액을 가하고, 상기 음파 처리된 실크 용액과 혼합하여 5×10^5 세포/mL의 최종 농도에 도달하게 하였다. 대조 시료를 같은 방식으로 음파 처리하였는데, 단지 음파 처리 후 세포 현탁액 대신 50 mL의 DMEM을 가하였다. 상기 혼합물의 1.5 mL 분량을 신속하게 12-웰 세포 배양 플레이트 내에 피펫으로 가하고, 3 개의 웰 전부를 각 시료 군에 대하여 준비하였다. 8% 및 12% (w/v) 용액을 일단 각각 40% 및 30% 진폭에서 30 초 동안 음파 처리하였다. 50 mL 분량의 hMSC 현탁액을 가하고, 혼합물을 전술한 것과 같이 플레이트에 가하였다. 이어서, 모든 플레이트를 37°C 및 5% CO₂에서 항온처리하였다.

[0085] 일단 실크가 0.5 시간 내지 2 시간 내에 플레이트에서 겔화되면, 작은 플러그(직경 = 4 mm; 높이 = 2-3 mm)를 겔에서 천공해내어 새로운 24-웰 플레이트의 웰에 넣었다. 다음, 플러그를 90% DMEM, 10% FBS, 0.1 mM의 비필수 아미노산, 100 U/mL의 페니실린, 1000 U/mL의 스트렙토마이신, 0.2%의 핑기존 (fungizone) 항진균약을 함유하는 성장 배지 1 mL 중 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 현미경 사진을 위해, 0.5 mL의 부피를 갖는 hMSC 캡슐화된 실크 겔을 24-웰 플레이트에서 제조하고 동일한 성장 배지 1 mL 중, 위와 동일한 조건 하에 배양하여, 원하는 시점에 사진을 얻었다.

[0086] 실시예 8. 실크 겔에 캡슐화된 hMSCs의 분석

[0087] 상 대조 현미경 - 배양 2, 6, 14 및 21 일째, 소니 엑스웨이브 (Sony Exwave) HAD 3 CCD 컬러 비디오 카메라가 장치된 상 대조 광 현미경(Carl Zeiss, Jena, Germany)으로 세포 형태학을 모니터링하였다.

[0088] 세포 증식 - DNA 분석으로 세포 증식을 평가하였다. 요약하면, 각 시점에서, 각 군으로부터 4 개의 겔 플러그를 PBS, pH 7.4로 세척하고, 칭량하고 (습윤 중량), 얼음 중 마이크로가위로 잘랐다. 제조자의 지시에 따라 피코그린 (PicoGreen) 분석(Molecular Probes, Eugene, OR)을 이용하여 DNA 함량을 측정하였다. 시료를 480 nm

의 여기 파장 및 528 nm의 방출 파장에서 형광측정법에 의해 측정하였다. 같은 분석에서 취득된 표준 곡선을 기준으로 DNA 함량을 계산하였고, 또한 각 겔 플러그의 습윤 중량에 의해 표준화하였다.

[0089] 세포 생존가능성: 겔 플러그 중 hMSCs의 생존가능성을 생/사 분석(Molecular Probes, Eugene, OR)에 의해 조사하였다. 요약하면, 배양 종료 시, hMSCs가 접종된 각 군의 겔 플러그를 PBS로 세척하고, 이등분하고, PBS 중 2 mM 칼세인 AM (살아있는 세포를 염색) 및 4 mM 에티디움 호모다이머(EthD-1, 죽은 세포를 염색)에서 37°C로 30 분 동안 항온 처리하였다. 절단된 겔의 단면을, 레이저샤프 (Lasersharp) 2000 소프트웨어(여기/방출 ~495 nm/~515 nm)를 이용하여 공초점 현미경(Bio-Rad MRC 1024, Hercules, CA)으로 영상화하였다. 깊이 투영 현미경 사진이 일련의 수평 부분으로부터 취득되었고, 잘-정의된 세포 콜로니의 총 높이를 기준으로, 서로로부터 다양한 거리(1 μ m - 10 μ m)에서 영상화되었다. 다양한 깊이에서의 정지 영상을 캡처하였고, 그 후 일련의 현미경 사진을 "z-스택(z-stacked)" 편집 영상을 위해 조합하였다.

[0090] 조직학. 조직학적 분석 이전에 세포가 접종된 실크 겔을 PBS에서 세척하고, 10% 중성-완충된 포르말린에서 2 일 동안 고정시켰다. 일련의 등급화된 에탄올을 통해 시료를 탈수하고, 파라핀에 파묻고 5 mm 두께로 절단하였다. 조직학적 평가를 위해, 그 절단부분에서 파라핀을 제거하고, 일련의 등급화된 에탄올을 통해 다시 수화하고, 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색하였다.

[0091] 실시예 9. 통계학

[0092] 스튜던트 t-시험을 이용하여 통계학적 분석을 수행하였다. 차이는 pp0.05일 때 유의한 것으로, pp0.01일 경우 매우 유의한 것으로 간주되었다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 다양한 음파 처리 조건 하에 실크 피브로인 (SF) 겔화를 보여준다. 0.5 ml의 수용액을 사용하였고, 음파 처리는 20% 진폭에서 수행되었으며, 시간은 5 초 내지 30 초에서 변하였다. 값은 각 군의 경우 최소 N = 3 시료의 평균 \pm 표준 편차이다. * 상기 군들 사이에 유의한 차이 (스튜던트의 t-시험, p < 0.01).

[0013] 도 2A-2C는 겔화 공정 도중 동적인 실크 β -시트 구조 형성을 보여준다. 도 2A는 음파 처리 후 120 분 동안 8 분마다 수행된 파장 스캔을 이용한, 음파 처리된 2% (w/v) 실크 피브로인 수용액에 대한 원형 2색성 (CD) 측정을 보여준다. 도 2B는 시간에 대하여 기록된 217 nm(β -시트 구조 피크)에서 타원을 증가의 그래프를 보여준다. 도 2C는 실크 겔화의 메카니즘을 도식적으로 보여준다. 겔화 공정은 2 개의 동역학적 단계를 포함한다: (a) 일부 사슬-간 물리적 가교가 단시간 프레임에서 일어나는 랜덤 코일에서 β -시트로의 구조적 변화; 및 (b) 다량의 사슬-간 β -시트 가교가 형성되고 분자가 비교적 긴 시간 윤곽에 걸쳐 겔 그물구조로 조직된, 연장된 β -시트 구조.

[0014] 도 3A-3C는 실크 피브로인 겔화에 대한 염 및 pH의 영향을 보여준다. 음파 처리 전, 다양한 농도의 용액에 K⁺ (도 3A) 및 Ca²⁺(도 3B)를 최종 농도 20 mM 내지 200 mM까지 보충하였다. 도 3C는 음파 처리 이전의 실크 피브로인 수용액의 pH 조절 효과를 보여준다. 음파 처리는 모든 시료에 대하여 15 초 동안 20% 진폭으로 수행되었다. 값들은 각 군의 경우 최소 N = 3의 평균 \pm 표준 편차이다. *, \diamond 군들 사이의 유의한 차이 (스튜던트 t-시험, p < 0.05).

[0015] 도 4A-4C는 실크 피브로인 하이드로겔의 기계적 성질을 분석하는 도표를 나타낸다. 위의 두 도표는 음파 처리되지 않은 하이드로겔로부터의 보고된 결과를 나타내고, 아래 두 도표는 본 발명에 따르는 음파-처리된 하이드로겔 진행을 보여준다. 왼쪽의 두 도표는 압축 강도의 효과를 보여주며, 오른쪽의 두 도표는 압축 탄성율의 효과를 보여준다. 실크 피브로인 수용액(위의 두 도표)으로부터 제조된 하이드로겔은 다양한 온도에서 진행되었고, 음파 처리된(아래 두 도표) 하이드로겔은 다양한 음파 처리로 진행되었다. 값들은 최소 N = 3 시료의 평균 \pm 표준 편차이다.

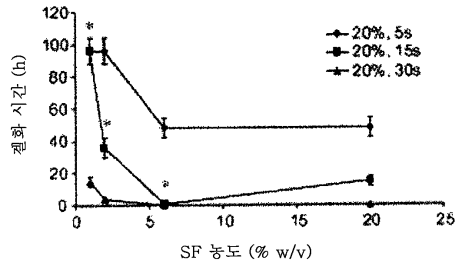
[0016] 도 5는 실크 피브로인 하이드로겔의 효소 분해를 보여준다. 4%, 8% 및 12%(w/v)의 하이드로겔을 음파 처리에 의해 제조하여, PBS, pH 7.4 (대조) 또는 PBS 중 프로테아제 XIV(5 U/ml)에 7 일 동안 담갔다. 각 시점에서 겔 플러그의 습윤 질량을 원래의 습윤 질량과 비교함으로써 잔류 질량을 결정하였다. 값들은 최소 N = 4 시료의 평균 \pm 표준 편차이다.

[0017] 도 6은 실크 피브로인 하이드로겔에 캡슐화된 hMSCs의 DNA 정량을 그래프로 보여준다. 각 겔 군에서 DNA 함량을 피코그린 (PicoGreen) 분석으로 분석하였고, 결과를 각 겔 플러그의 습윤 중량에 의해 표준화하였다. 값들

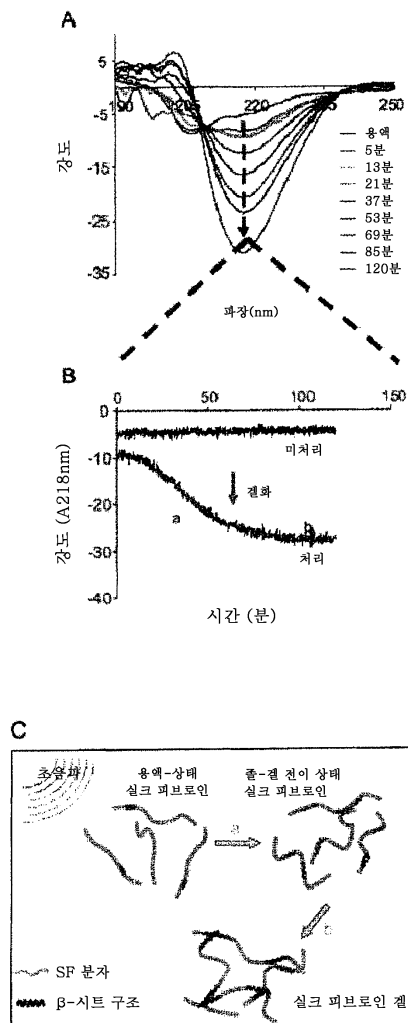
은 최소 N = 4 시료의 평균±표준 편차이다. *군들 사이의 유의한 차이 (스튜던트 t-시험, p < 0.05).

도면

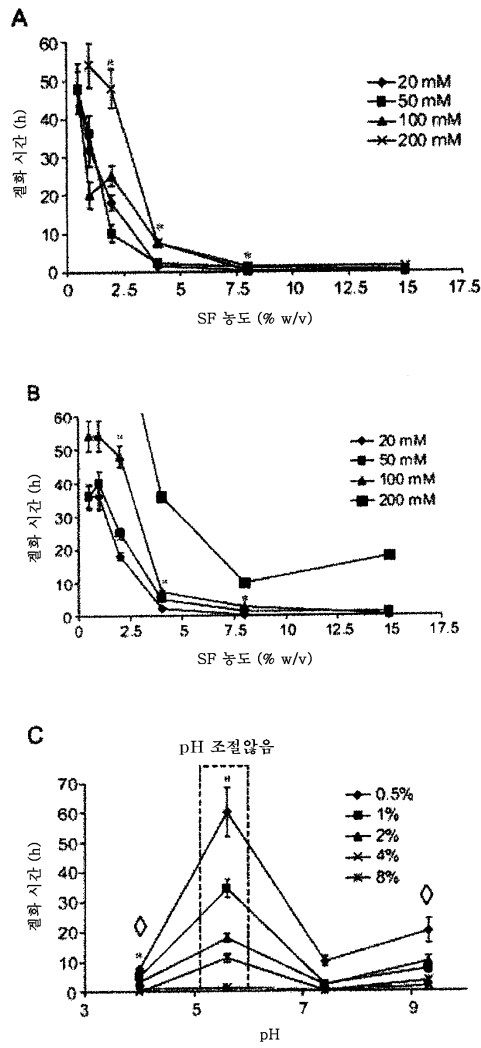
도면1



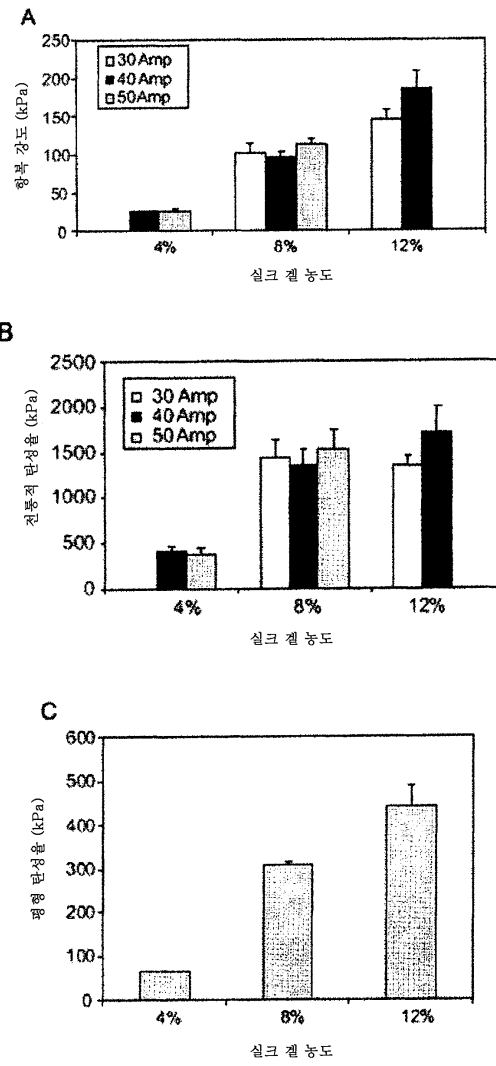
도면2



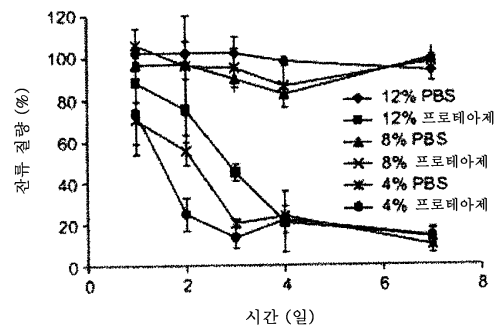
도면3



도면4



도면5



도면6

