



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0023365  
(43) 공개일자 2009년03월04일

(51) Int. Cl.

*C08J 5/18* (2006.01) *C08L 89/00* (2006.01)  
*C09D 189/00* (2006.01) *B32B 5/00* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7029623

(22) 출원일자 2008년12월03일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년12월03일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2007/003304

국제출원일자 2007년04월13일

(87) 국제공개번호 WO 2007/128378

국제공개일자 2007년11월15일

(30) 우선권주장

06113438.3 2006년05월03일

유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인

테크니셰 유니베르시테트 뮌헨

독일, 디-80333 뮌헨, 아르시스슈트라쎄 21

(72) 발명자

샤이벨, 토마스

독일, 디-95448 바이레우쓰, 피쉬텔게비르그스스  
트라쎄 50

스로타, 유테

독일, 디-95447 바이레우쓰, 호엘더린 안라게 3

(74) 대리인

손민

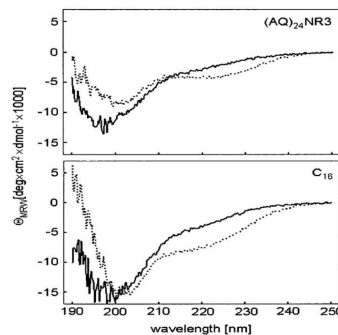
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 다층 실크 단백질 필름

(57) 요약

본 발명은 다층 실크 단백질 필름을 형성하는 방법 및 그로부터 얻어진 다층 필름에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 다층 필름을 포함하는 다양한 물질, 제품 및 조성물, 및 여러 응용제품에 있어서 상기 다층 필름의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



도 1 합성 실크 단백질 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>18</sub>을 6 M 구아니디늄 티오시안산염에 용해시키고 5mM 인산칼륨 pH 8.0에 대하여 투석하거나(직선) 또는 HRP에 용해한(점선) 후의 합성 실크 단백질의 CD-스펙트럼.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 다층 실크 단백질 필름을 형성하는 방법:

- a) 포름산에 용해되거나 현탁된 하나 또는 그 이상의 실크 단백질 용액을 제공하는 단계;
- b) 상기 용액의 하나를 필름으로 형성하는 단계;
- c) 용매를 기화시키고, 제1 실크 단백질 필름층을 형성하는 단계; 및
- d) 다층 실크 단백질 필름을 형성하기 위하여 상기 제1 실크 단백질 필름층 위에 추가적인 실크 단백질 필름층을 형성하도록 단계 a) - c)를 1회 또는 그 이상 반복하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 다층 필름의 각 단일층은 하나 또는 그 이상의 실크 단백질 타입을 포함하는 실크 단백질 용액으로부터 형성되는 것인 방법.

### 청구항 3

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 다층 필름은 동일(동질의 다층 필름) 또는 다른(이질의 다층 필름) 실크 단백질을 포함하는 층으로부터 형성되는 것인 방법.

### 청구항 4

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 다층 필름은 실크 단백질로부터 제조된 하나 또는 그 이상의 층 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 물질을 포함하는 하나 또는 그 이상의 층을 포함하는 것인 방법.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 비단백질성 물질은 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 폴리(스틸렌 술폰네이트(PSS)), 폴리(알릴아민 히드록로라이드)(PAH), 폴리(아크릴산)(PAA) 및/또는 폴리(디알릴디메틸암모늄클로라이드)(PDADMAC)로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 6

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 다른 단백질성 물질은 콜라겐, 엘라스틴 또는 케라틴으로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 7

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 실크 단백질은 곤충 실크 단백질 또는 거미 실크 단백질, 바람직하게 천연 또는 재조합 실크 단백질, 바람직하게는 곤충강(Insecta), 거미류(Arachnida) 또는 이의 유사체로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 8

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 다층 필름의 층은 층에 결합되거나 두 개의 인접한 층 사이에 위치하는 하나 또는 그 이상의 제제를 포함하는 것인 방법.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 제제는 금속, 화학물질 및/또는 약제학적 제제로부터 선택되는 것인 방법.

### 청구항 10

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 실크 단백질은 단계 1b)의 전 또는 후에 공유결합하여 기능화되는 것인 방법.

#### 청구항 11

전술한 청구항 어느 한 항에 있어서, 실크 단백질 용액은 실크 단백질을 0.1 내지 2.0% w/v, 바람직하게 0.5 내지 10% w/v, 보다 바람직하게 1 내지 3% w/v 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 12

전술한 청구항 중 어느 한 항에 있어서, 필름은 적합한 기저 상에 용액을 몰딩(moulding), 스핀코팅(spincoating) 또는 캐스팅(casting)에 의해 형성되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항의 어느 한 항의 방법에 의해 획득될 수 있는 다층 필름.

#### 청구항 14

실크 단백질 필름의 최소한 두 개 층 이상을 포함하는 다층 실크 단백질 필름.

#### 청구항 15

제14항에 있어서, 다층 필름의 각 단일 층은 실크 단백질의 하나 또는 그 이상의 타입을 포함하는 실크 단백질 용액으로부터 형성된 것인 다층 필름.

#### 청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 다층 필름은 동일(동질의 다층 필름) 또는 다른(이질의 다층 필름) 실크 단백질을 포함하는 층으로부터 형성된 것인 다층 필름.

#### 청구항 17

제14항 내지 제16항의 어느 한 항에 있어서, 다층 필름은 실크 단백질로부터 제조된 하나 또는 그 이상의 층 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 물질을 포함하는 하나 또는 그 이상의 층을 포함하는 것인 다층 필름.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 비단백질성 물질은 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 폴리(스틸렌 술포네이트(PSS)), 폴리(알릴아민 히드록로라이드)(PAH), 폴리(아크릴산)(PAA) 및/또는 폴리(디알릴디메틸암모늄클로라이드)(PDADMAC)로부터 선택되는 것인 다층 필름.

#### 청구항 19

제17항에 있어서, 다른 단백질성 물질은 콜라겐, 엘라스틴 또는 케라틴으로부터 선택되는 것인 다층 필름.

#### 청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 실크 단백질은 곤충 실크 단백질 또는 거미 실크 단백질, 바람직하게 천연 또는 재조합 실크 단백질, 바람직하게는 곤충강(Insecta), 거미류(Arachnida) 또는 이의 유사체로부터 선택되는 것인 다층 필름.

#### 청구항 21

제14항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 다층 필름의 층은 층에 결합되거나 두 개의 인접한 층 사이에 위치하는 하나 또는 그 이상의 제제를 포함하는 것인 다층 필름.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 하나 또는 그 이상의 제제는 금속, 화학물질 및/또는 약제학적 제제로부터 선택되는 것인 다층 필름.

#### 청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 실크 단백질은 공유결합하여 기능화된 것인 다층 필름.

## 명세서

### 기술 분야

- <1> 본 발명은 다층 실크 단백질 필름을 형성하는 방법 및 그로부터 얻어진 다층 필름에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 다층 필름을 포함하는 다양한 물질, 제품 및 조성물, 및 여러 응용제품에 있어서 상기 다층 필름의 용도에 관한 것이다.

### 배경 기술

- <2> 다층 필름은 다양한 목적으로 사용된다<sup>1-12</sup>. 응용제품은 일반적으로 두 가지부류에 속하는 것으로 말할 수 있다: 표면의 상호작용을 그 환경과 맞추는 것과 한정된 구조적 특성을 갖는 "장치"로 제조하는 것이다. 개발 영역의 범위는 코팅, 콜로이드 안정화, 발광 또는 태양광발전 장치, 전극 변형, 광학 저장 및 자성 필름, 고전하 밀도 전지, 생체적합물질, 생체적합성의 변형, 효소 부동화, 수처리 및 제지공정을 위한 응집, 기능성 막, 분리, 운반, 제어된 방출 장치, 센서 및 나노반응기 등을 포함한다. 다층 필름 및 캡슐을 제조하는 바람직한 방법의 주요한 요소는 나노 수준에서 수직 구조를 형성하도록 제어하는 것이다. 폴리펩티드 다층 필름은 폴리펩티드로 제조된 다층 필름을 말한다. 어떠한 경우에는 다른 형태의 폴리머, 예를 들어 화학적으로 변형된 폴리펩티드<sup>13</sup>, 비생물학적 유기 고분자전해질<sup>14</sup>, 또는 폴리사카라이드<sup>15</sup>가 제조 공정에 투입된다. 폴리펩티드 필름은 침착시켜 세포에 생체-비활성인 표면에 특이 생체기능성을 부여하거나, 생체 활성 표면을 세포에 부착되지 않는 것으로 변화시킬 수 있다.
- <3> 폴리펩티드 다층 필름은 다음의 바람직한 특성들의 일부를 포함하는 응용제품 개발을 가능하게 한다: 부착 방지성, 생체적합성, 생체퇴화성, 특이 생체-분자 민감성, 식용성, 환경 온화성, 온도 반응성 및 점착성 또는 비점착성. 실크 단백질은 생화학적 자체 특성, 고분자 합성으로 다양한 접근에 있어서 화학적 구조에 대해 가질 수 있는 제어성, 이차 구조의 형성을 제어하는 능력 또는 계층 데이터의 이용가능성에 의한 응용제품에 매우 적합하다.
- <4> 미국특허출원 US 2005/0069950 A1은 정전기적 층간 자기조립(electrostatic layer-by-layer self assembly: ELBL)에 의해 적합한 표면에서의 폴리펩티드 초박막 다층 필름의 제조를 개시하고 있다. 또한, 생약 및 다른 분야에서의 응용제품을 위한 박막의 나노제조를 위해 폴리펩티드를 디자인하는 방법을 개시한다. 또한 제한된 길이의 서열 패턴 및 ELBL에서의 사용을 위한 아미노산 서열 정보에서의 중성 pH의 순전하량을 확인하고, 원하는 수의 상기 패턴을 기록하기 위한 새로운 방법을 제공한다. US 2005/0069950은 ELBL 조립에서의 작고, 고충전된 펩티드의 용도를 특허청구범위에 기재하고 있다.
- <5> 거미 실크(spider silk)는 독특한 물리적 특성을 보여주는 단백질 폴리머이다. 상이한 형태의 거미 실크들 중에서, 드래그라인(dragline)은 연구가 가장 집중되는 분야이다. 드래그라인 실크는 거미줄의 골격 및 반경을 형성하기 위해 원형으로 직조하고, 후방에서 지속적으로 끌어당기는 생명선으로 거미들에 의해 이용된다. 이러한 목적을 위해서 높은 인장강도 및 탄력성이 요구된다. 그러한 특성들의 조합은 공지의 대부분의 다른 재료보다 더 높은 인장(toughness)을 나타낸다. 드래그라인 실크는 일반적으로 두 개의 주요한 단백질로 구성되어 있으며, 상기 단백질들의 일차 구조는 공통의 반복 구조(common repetitive architecture)를 공유한다.
- <6> 편상선(flagelliform gland)에 의하여 형성되는 점착성의 실크로 일부 구성되며 편상 실크(flagelliform silk)라 명명되고 있는 오르브 웹(orb web)의 포획 나선은 신축성이 있고 끊어지기 전에 3배의 길이로 늘어날 수 있지만, 드래그라인 실크의 인장강도의 절반 수준이다.
- <7> 이.콜리(*E. coli*)에서의 거미 실크 단백질의 재조합 생산을 위한 시스템이 초기에 개발되었다. 예를 들어, WO 2006/008163 A2, WO 2006/002827 A1 및 미국 가출원 60/712,095 (미공개)에 언급되어 있다. 상기 특허들에서 기술된 발현 시스템에서 단일의 빌딩 블록(=모듈)은 자유롭게 가변될 수 있어, 특별한 경우의 필요조건에 부합할 수 있다. 이러한 유형의 모듈은 참고문헌 21에 또한 기술되어 있다.
- <8> 그러나, 지금까지 이용가능한 이들 실크 단백질로부터 다층 필름을 형성하는 일반적 방법은 없었다. 당해 분야에서 알려진 방법은 실크 단백질로부터 만들어진 다양한 다층 필름을 생산하는 일반적 방법으로 사용할 수는 없다. 상기에 기술한 바와 같이, 일부 공개문헌은 다층 필름을 안정화하기 위하여 전하된 표면에 의존하지만, 이

는 일반적인 접근을 제공하지 않는다.

- <9> 따라서 본 발명의 목적은 다층 실크 단백질 필름을 생산하는 방법 및 그들로부터 획득할 수 있는 필름을 제공하는 것이다. 또한 본 발명의 목적은 그 다층 필름에 대한 다양한 응용제품을 제공하는 것이다.
- <10> 이들 목적은 독립청구항의 청구대상에 의해 성취될 수 있다. 바람직한 양태는 종속항에 개시되어 있다.
- <11> 본 발명자들은 다양한 근원의 실크 단백질로부터 제조된 다층 필름을 형성하는 방법을 최초로 수립하였다. 본 발명자들은 실크 단백질의 다층이 안정하고 유용한 다층 필름을 형성하기 위해 가공될 수 있음을 밝혀냈다. 이러한 발견은 예상할 수 없는 것이었는데, 이는 안정한 다층 필름이 예를 들어 정반대로 전하된 층과 같은 특정 조건을 형성하지 않고 실크 단백질로부터 형성될 수 있음을 당해 분야의 상태로부터 전혀 예상될 수 없었기 때문이다.

### 발명의 상세한 설명

- <12> 첫번째 측면에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 다층 실크 단백질을 형성하는 방법을 제공한다.
- <13> a) 적절한 용매에 용해되거나 현탁된 하나 또는 그 이상의 실크 단백질의 용액을 제공하는 단계;
- <14> b) 상기 용액의 하나를 필름으로 형성하는 단계;
- <15> c) 용매를 기화시키고 제1 실크 단백질 필름층을 형성하는 단계; 및
- <16> d) 다층 실크 단백질 필름을 형성하기 위하여 상기 제1 실크 단백질 필름층 위에 추가적인 실크 단백질 필름층을 형성하도록 단계 a) - c)를 1회 또는 그 이상 반복하는 단계.
- <17> 실크 단백질, 특히 거미 실크 단백질로 만든 필름을 일정 시간 동안 주형하는 것이 알려져 있다. 거미 실크 단백질을 주형하는 필름과 관하여는 참고문헌 22를 참조한다. 그러나 다층 필름을 형성하는 것은 여기에 기술하지 않았다.
- <18> 놀랍게도 다층 필름이 본 발명의 방법에 의해 제조될 수 있다는 사실 이외에 도, 재단된(tailored) 다층 필름이 생산될 수 있다는 이점이 있다. 예로써, 그 필름의 두께는 사용된 단백질 용액의 농도에 의해 조절될 수 있다. 또한, 다양한 실크 단백질이 목적하는 특성을 갖도록 하기 위하여 동일하거나 다른 층에 결합될 수 있다. 추가적으로, 본 접근법은 (하기에 상세히 기술된 것과 같은) 다양한 목적을 달성하기 위하여 실크 단백질이 다른 것, 예를 들어 인조 폴리머와 결합하는 것을 허용한다.
- <19> 추가적으로, 실크 단백질 필름의 단일층이 (상기 언급된 참고문헌과 대조적으로) 단일 필름층의 표면의 어떠한 변형에 대한 필요없이 안정한 다층 필름을 형성했다는 것을 놀랍게도 알 수 있었다. 이는 다른 층의 거부로 유도하지 않고 안정한 다층을 형성하도록 하는 실크 단백질의 양친매성 특성으로 설명될 수 있다.
- <20> 하나의 양태로서, 다층 필름의 각 단일층은 하나 또는 그 이상의 실크 단백질 타입을 포함하는 실크 단백질 용액으로부터 형성된다. 본 발명을 실시하는데 사용된 실크 타입은 후에 설명될 것이다. 예를 들어, 다층 필름은 동일(동질의 다층 필름) 또는 다른(이질의 다층 필름) 실크 단백질을 포함하는 층으로부터 형성된다.
- <21> 상술한 바와 같이, 바람직한 양태로서 다층 필름은 실크 단백질로부터 제조된 하나 또는 그 이상의 층 및 다른 단백질성 또는 비단백질성 물질을 포함하는 하나 또는 그 이상의 층을 포함한다.
- <22> 하나의 양태로서, 다층 필름의 하나의 단일층의 두께는 0.5 내지 1.5 $\mu$ m이다. 그러나 더 얇거나 더 두꺼운 필름(3.0 $\mu$ m까지)을 디자인하는 것도 가능하다. 또한, 본 발명의 다층 필름은 바람직하게 2 - 1,000 층, 보다 바람직하게 2 - 100 층, 보다 더 바람직하게 2 - 20 층을 포함한다.
- <23> 비단백질성 물질은 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 폴리(스티렌 술폰네이트) (PSS), 폴리(알릴아민 히드로클로라이드) (PAH), 폴리(아크릴산) (PAA) 및/또는 폴리(디알릴디메틸암모니움클로라이드) (PDADMAC)로부터 바람직하게 선택된다. 비단백질성 물질은 단독으로 또는 다른 비단백질성 물질 및/또는 실크 단백질 및/또는 다른 단백질성 물질과 조합하여 사용될 수 있다.
- <24> 상기 다른 단백질성 물질은 콜라겐, 엘라스틴 또는 케라틴으로부터 바람직하게 선택될 수 있다. 그 단백질성 물질의 예는, 예를 들어 이는 미티루스 속(*Mytilus* sp.), 바람직하게 미티루스 에두리스(*M. edulis*), 미티루스 갈로프로빈시아리스(*M. galloprovincialis*), 미티루스 캘리포르니안스(*M. californians*) 또는 게우케리아 데미사(*Geukeria demissa*)로부터 획득되는 무셀 비수스 단백질(mussel byssus protein)이다.

- <25> 마스콜로(MASCOLO) 및 와이트(WAITE) (1986)는 미티루스(Mytilus)에 있는 비수스 실(bysuss thread)에서 화학적 구배를 처음으로 동정했다. 그 실(thread)을 펩신으로 처리한 후에, ColP 및 ColD로 호칭되고, 50kDa 및 60kDa의 분자량을 가지는 두 개의 펩신 저항성 콜라겐 단편이 각각 확인되었다. ColP는 주로 근위부(proximal area)에서 발견될 수 있고, 원위부(distal area)에서는 거의 발견될 수 없다. 반대로, ColD의 양은 약 100%까지 원위부에서 증가한다(LUCAS et al., 2002; QIN & WAITE, 1995). 비수스 실 외에 홍합 발(mussel foot)에는 그 실 구조의 제조에 참여하는 또 다른 콜라겐 유사 단백질이 있다. 이 추가적인 단백질은 ColNG(NG = 비구배(no gradient))로 호칭되고, ColD 및 ColP와 대조적으로 전체 실의 전체에 걸쳐 균등하게 분포되어 있다. 이의 생리학적 기능은 두 개의 다른 실 콜라겐들 사이에서 어댑터(adapter)인 것으로 추정된다(QIN & WAITE, 1998).
- <26> 케라틴은 내구성이 있고 불용성인 섬유성 구조 단백질 군이고, 파충류, 조류 및 포유동물에서 발견되는 단단하지만 광물화되지 않은 구조를 형성한다. 케라틴은 또한 선충(roundworm)을 포함한 많은 동물의 위장관에서 발견된다. 케라틴의 다양한 타입이 있다. 곤충 및 거미에 의해 생산된 실크 피브로인(silk fibroin)은 흔히 케라틴으로 분류된다.
- <27> 콜라겐은 동물에서 결합조직의 주 단백질이고, 포유동물에서 전체의 약 40%를 구성하는 가장 풍부한 단백질이다. 콜라겐은 내구성이 있고 큰 인장력을 가진 비신장성이고, 연골, 인대 및 건의 주요 성분이고, 골 및 치아의 주요 단백질 성분이다. 콜라겐은 신체 전체에 걸친 많은 장소에서 발생하고, 무엇보다도 (전체적으로 27개 콜라겐 타입이 있음) I형 내지 XIII형 콜라겐을 포함하는 타입으로써 알려진 다른 형태로 발생한다.
- <28> 엘라스틴은 결합조직에 있는 탄성있는 단백질이고, 신체의 여러 조직이 연장되거나 수축된 후에 그들의 형상으로 돌아가도록 한다. 엘라스틴은 피부를 쿡쿡 찌르거나 꼬집었을 때 피부의 원래 위치로 돌아가는데 도움을 준다. 엘라스틴은 주로 아미노산 글리신, 발린, 알라닌 및 프롤린으로 구성된다. 엘라스틴은 대량의 불용성의 내구력 있는 교차결합된 어레이(array)를 만드는 많은 용해성의 트로포엘라스틴 단백질 분자를 결합시킴으로써 제조된다.
- <29> 그러나 본 발명은 이들 단백질성 물질로 제한되지 않고, 많은 다른 물질들이 사용될 수 있다.
- <30> 용매로써, 바람직하게 극성 용매가 사용된다. 극성용매는 바람직하게 물, 포름산, 헥사플루오로이소프로판올 및/또는 아세트산으로부터 선택된다. 우수한 이용가능성 및 비독성 때문에 물이 가장 바람직하다. 이 용매에서, 실크 단백질은 용해되거나 현탁된다. 더욱이, 그 용매는 용해된 단백질을 남기도록 쉽게 용해되어 개개의 필름 층을 형성할 수 있는 물질들로부터 선택되어야 한다.
- <31> 본 발명의 의미에서 "용액"은 실크 단백질을 포함하는 어느 액체 혼합물을 의미하며, 필름 캐스팅으로 다루기 쉽다. 이들 용액들은 단백질 단량체 외에 예를 들어 다이머, 트리머, 테트라머를 포함하는 고차 응집체(higher order aggregates)를 또한 포함할 수 있다. 용액은 용액의 보존, 안정성, 또는 가동성을 증가시키기 위해 첨가제를 포함할 수 있다.
- <32> 본 발명에서 현탁액은 액체에서 고체 입자들의 분산으로 정의된다. 입자들의 지름이 100nm 이내일 경우 그 현탁액은 콜로이드성이다.
- <33> 바람직한 양태로서, 실크 단백질은 곤충 실크 단백질 또는 거미 실크 단백질, 바람직하게는 천연 또는 재조합 실크 단백질, 바람직하게는 곤충강(Insecta), 거미류(Arachnida) 또는 이의 유사체로부터 선택된다.
- <34> 특히 드래그라인(dragline) 및/또는 드래그라인으로부터 유래한 섬모 모양의 서열 또는 오르브-웹(orb-web) 거미(왕거미과(Araneidae) 및 아라네오이드(Araneoids))의 편상 단백질(fragelliform protein)이 바람직하다
- <35> 거미 실크는 일반적으로 독특한 물리적 특성을 나타내는 단백질 폴리머이지만, 다른 거미들에 의해 생산된 다양한 실크 조성물에 관한 제한된 정보만이 있다(Scheibel, 2004 참조). 거미 실크들의 다양한 형태 중에서, 황금 원형거미(golden orb weaver) 네필라 클라비페스(*Nephila clavipes*)와 무당거미(garden cross spider) 아라네우스 디아데마투스(*Araneus diadematus*)는 가장 집중적으로 연구되었다. 드래그라인 실크는 일반적으로 두 개의 주요한 단백질로 구성되어 있고, 추가적 단백질들이 실크 어셈블리(assembly) 및 최후 실크 구조에서 어떤 중요한 역할을 하는지 명확하지 않다. 아라네우스 디아데마투스(*Araneus diadematus*)의 드래그라인의 두 개의 주요한 단백질은 ADF-3 및 ADF-4(*Araneus Diadematus Fibroin*)이다.
- <36> 본 발명에서 사용된 용어 "거미 실크 단백질"은 모든 천연 서열뿐만 아니라 그로부터 유래된 모든 인공의 또는 합성 서열을 포함한다.



- <37> 따라서 거미 실크 단백질은 본 발명에서 "본래의(authentic)"라 칭하는 서열로부터 유래될 수 있다. 이 용어는 근원적인 핵산 서열이 그 서열 자체에서 실질적인 수정 없이 천연 환경으로부터 분리된 것을 의미한다. 유일한 변형이 발생하도록 인정되는데, 이는 코딩된 아미노산 서열을 변경하는 것 없이 숙주에서 발현에 상기 서열을 적용하기 위하여 본래의 핵산 서열이 변형되는 장소이다.
- <38> 본래의 서열은 바람직하게 천연적으로 거미 실크 단백질의 아미노 말단 비반복 부위(편상 단백질) 및/또는 카르복시 말단 비반복 부위(편상 및 드래그라인 단백질)로부터 유래된다. 이들 단백질의 바람직한 예는 하기에 표시될 것이다.
- <39> 또 다른 양태에 따르면, 본래의 서열은 천연적으로 거미 실크 단백질의 아미노 말단 비반복 부위(섬모 모양의 단백질) 및/또는 카르복시 말단 비반복 부위(섬모 모양의 및 드래그라인 단백질)로부터 유래된다.
- <40> 하나의 바람직한 양태에 따르면, 드래그라인 단백질은 야생형 ADF-3, ADF-4, MaSp I, MaSp II이고, 편상 단백질은 FLAG이다. 용어 ADF-3/-4(아라네우스 디아데마투스 피브로인-3/-4)는 아라네우스 디아데마투스에 의해 생산된 MaSp 단백질의 문맥에서 사용된다. ADF-3 및 -4의 두 단백질은 MaSp II 단백질(major ampullate spidroin II) 분류에 속한다. 이는 WO 2006/002827에 명백히 참조되며, 이의 목록이 참조문헌으로 본원에 있다.
- <41> 단인자표현의 서열 모듈이 본 발명의 개시점을 또한 형성하고 있는 것으로 개발되었다. 이들 모듈은 거미 아라네우스 디아데마투스(*Araenus diadematus*)의 ADF3 및 ADF4 유전자뿐만 아니라 거미 네필라 클라비페스(*Nephila clavipes*)의 FLAG 유전자로부터 유래된다. 사용된 ADF3 및 ADF4 서열의 변이들은 공개되어 이용할 수 있다(기탁번호 U47855 및 U47856 하에 이용할 수 있음). 첫 번째 두 개의 유전자(ADF3 및 ADF4)는 거미의 드래그라인 실을 형성하고 있는 단백질을 코딩하고 있으며, 세번째 유전자는 편상 실크 단백질을 코딩하고 있다. 이들 단백질의 아미노산 서열에 기초하여 몇 개의 모듈이 디자인되었다.
- <42> 모듈 A : GPYGPASAA AAAAGGYGPG SGQQ (서열번호 1)
- <43> 모듈 C : GSSAAAAAAA ASGPGGYGPE NQGSPGPGGY GPGGP (서열번호 3)
- <44> 모듈 Q : GPGQQGPGQQ GPGQQGPGQQ (서열번호 2)
- <45> 모듈 K : GPGGAGGPYG PGGAGGPYGP GGAGGPY (서열번호 4)
- <46> 모듈 sp: GGTIIEDLD ITIDGADGPI TISEELTI (서열번호 5)
- <47> 모듈 X : GGAGGAGGAG GSGGAGGS (서열번호 6)
- <48> 모듈 Y : GPGGAGPGGY GPGGSGPGGY GPGGSGPGGY (서열번호 7)
- <49> 모듈 A<sup>C</sup> : GPYGPASAA AAAAGGYGPG CGQQ (서열번호 8)
- <50> 모듈 A<sup>K</sup> : GPYGPASAA AAAAGGYGPG KGQQ (서열번호 9)
- <51> 모듈 C<sup>C</sup> : GSSAAAAAAA ASGPGGYGPE NQGPCGPGGY GPGGP (서열번호 10)
- <52> 모듈 C<sup>K1</sup> : GSSAAAAAAA ASGPGGYGPE NQGPKGPGGY GPGGP (서열번호 11)
- <53> 모듈 C<sup>K2</sup> : GSSAAAAAAA ASGPGGYGPK NQGSPGPGGY GPGGP (서열번호 12)
- <54> 모듈 C<sup>KC</sup> : GSSAAAAAAA ASGPGGYGPK NQGPCGPGGY GPGGP (서열번호 13)
- <55> 모듈 sp<sup>C</sup> : GGTIIEDLD ITIDGADGPI TICEELTI (서열번호 14)
- <56> 모듈 sp<sup>K</sup> : GGTIIEDLD ITIDGADGPI TIKEELTI (서열번호 15)
- <57> 모듈 X<sup>C</sup> : GGAGGAGGAG GCGGAGGS (서열번호 16)
- <58> 모듈 X<sup>K</sup> : GGAGGAGGAG GKGGAGGS (서열번호 17)
- <59> 모듈 Y<sup>C</sup> : GPGGAGPGGY GPGGSGPGGY GPGGCGPGGY (서열번호 18)

- <60> 모듈  $Y^k$  : GPGGAGPGGY GPGGSGPGGY GPGGKGPGGY (서열번호 19)
- <61> 이들 아미노산 모듈로부터 합성 거미 실크 단백질 작제물이 만들어졌다. 이들 모듈 및 이들로부터 유래된 거미 실크 단백질은 다층 필름을 형성하는 본 방법에서의 개시 물질을 특히 형성하고 있다.
- <62> 본 발명은 또한 특이적 펩티드 TAGs의 용도와 관련된다. 이들 태그들(예를 들어 태그는 하기 서열번호 20 내지 27에 개시되어 있다)은 시스테인 또는 라이신을 포함한다. 그 태그(TAG)의 서열이 선택된 결과 실크 단백질의 나머지와 어셈블링 행동의 영향과의 상호 작용은 가장 큰 가능성 있는 범위로 제외될 수 있다.
- <63> 하기 Tag가 거미 실크 작제물에서 바람직한 용도로 개발되었다.
- <64>  $NH^{CYS1}$  : GCGGGGGSG GGG (서열번호 20)
- <65>  $NH^{CYS2}$  : GCGGGGGG (서열번호 21)
- <66>  $NH^{LYS1}$  : GKGGGGSG GGG (서열번호 22)
- <67>  $NH^{LYS2}$  : GKGGGGG (서열번호 23)
- <68>  $CH^{CYS1}$  : GGGSGGGGS GGCG (서열번호 24)
- <69>  $CH^{CYS2}$  : GGGSGGCG (서열번호 25)
- <70>  $CH^{LYS1}$  : GGGSGGGGS GGKG (서열번호 26)
- <71>  $CH^{LYS2}$  : GGGSGGKG (서열번호 27)
- <72> 이들 모듈로부터 생성된 합성 실크 단백질의 바람직한 예는 실시예에서 알 수 있으며, 바람직하게는  $(AQ)_{24}NR3$  및  $C_{16}$  이다.
- <73> 실크 단백질이 획득될 수 있는 실크 생산 곤충의 예는 무엇보다도 봄빅스 모리(*Bombyx mori*), 안테라에아 미리타(*Antheraea mylitta*)(갈색 실크를 생산하는 동양 나방)이다. 안테라에아 미리타는 누에고치에서 얻는 실크(tussah silk)을 생산하고 있다. 누에고치에서 얻는 실크(tussah silk)는 갈색 색깔의 야생 실크 고치(cocoon)로부터 만들어지는 갈색의 실크실 또는 직물이다. 이들 벌레들은 다양한 식물 및 오크, 체리와 야생 뽕나무와 같은 나무의 잎을 먹는다. 그러한 곤충의 또 다른 예는 캐디스 플라이(예, 히드롭시케 슬로소나에(*Hydropsyche slossonae*)), 나방(예로, 갈레리아 멜로넬라(*Galleria mellonella*))(꿀벌부채명나방(wax moth)), 에프헤스트리아 쿠에니엘라(*Ephestria kuehniella*))(플로우르 나방(flour moth)), 플로디아 인터푼크텔라(*Plodia interpunctella*))(화랑곡나방(indian meal moth)) 또는 히아로포라 세크로피아(*Hyalophora cecropia*)(누에나방(silk moth))).
- <74> 다층 필름의 층은 바람직하게 층에 결합되거나 두 개의 인접한 층 사이에 위치하는 하나 또는 그 이상의 체제를 포함한다. 이들 체제들은 바람직하게 염, 안료, 금속, 화학물질 및/또는 약제학적 체제로부터 선택된다. 이 점에 있어서, 그러한 결합의 원리가 도 9, 11 및 12에 언급되어 있다. 결합되는 물질은 제한없이 고체, 반고체 또는 액체일 수 있다.
- <75> 예를 들어, 약제학적 체제는 진통제; 수면제 및 진정제; 우울증 및 정신분열증과 같은 정신 질환의 치료용 약물; 항간질제 및 항경련제; 파킨슨병 및 헌팅턴병, 노화 및 알츠하이머의 치료용 약물; CNS 외상 및 뇌졸중의 치료를 목적으로 하는 약물; 약물 중독 및 약물 남용의 치료용 약물; 기생충 감염 및 미생물 원인이 된 질환을 위한 화학요법제; 면역억제제 및 항암제; 호르몬 및 호르몬 길항제; 비금속 독성제에 대한 길항제; 암 치료용 세포증식억제제; 의료용 진단 물질; 면역활성 및 면역반응제; 항생제; 진경약; 항히스타민; 항멀미약; 이완제; 자극제; 대뇌확장제(cerebral dilators); 항정신약; 혈관확장제 및 혈관수축제; 항고혈압제; 편두통 치료용 약물; 수면제, 고혈당제 및 저혈당제; 항천식제; 항바이러스제; 및 이들의 혼합물로부터 선택될 수 있다.
- <76> 또한, 본 발명에 따른 다층 필름은 국소 또는 전신 약물 전달 시스템으로써 활동하도록 디자인될 수 있다. 국소 시스템은 다층 필름을 포함할 수 있으며, 그 다층 필름에는 점성이 있는 액체가 결합되고, 그 시스템은 미리 정해진 시간동안 피부에 적용된다. 그 시간 동안 액체는 상기 다층 필름의 하나 또는 그 이상의 층을 통하여



침투하고, 따라서 피부 표면에 상기 액체의 제한된 양을 제공한다. 이 경우에 그 다층 필름은 TTS(transdermal therapeutic system)로 간주될 수 있다. 호르몬 또는 니코틴과 같은 약제학적 물질은 상기 방법에 의해 주입될 수 있다.

<77> 선택적으로, 고체 물질은 상기 다층의 하나 또는 그 이상의 층 내부 및/또는 사이에 결합될 수 있다. 구강 투여 후, 입자들은 층을 통과하여 이동하거나 체액의 유입에 의해(삼투계) 밀어내지거나 또는 하나 또는 그 이상의 외부층을 천천히 분해하고 개개의 물질의 (지연된) 방출에 의해 밀어내질 것이다.

<78> 다른 응용제품, 예를 들어 의류에서, 다층 필름은 특이적으로 필요한 사용 분야에 적용될 수 있는데, 예를 들어 하나 또는 그 이상의 바람이 통하지 않거나 내수성의 층을 가질 수 있다. 따라서, 예로써, 방부제 효과를 제공하기 위하여 층 내로 은이 결합될 수 있다.

<79> 다른 하나의 바람직한 양태에 따르면, 실크 단백질은 상기 정의된 바와 같이 단계 1b)의 전 또는 후에 공유결합하여 기능화된다. 이와 관련하여 수반되는 실시예에 또한 언급되어 있으며, 도 7 및 8을 참고한다.

<80> 추가적인 특성을 달성하기 위하여 그 층은 또한 달리 가공될 수 있다. 예를 들면, 수불용성은 (대부분 수용성인) 단백질 필름의 가장 많은 응용제품을 위해 필수적이기 때문에 수불용성이 되도록 그 필름은 가공될 수 있다. 이러한 목적을 위한 적합한 방법은 인산칼륨 또는 메탄을 처리이다.

<81> 다층 필름의 개개의 층을 캐스팅하기 위한 실크 단백질 용액은 실크 단백질을 0.1 - 20% w/v, 바람직하게 0.5 - 10% w/v, 보다 바람직하게 1 - 3% w/v 포함하고 있다. 그 용액의 농도는 그 필름의 실제적인 두께를 결정할 것이기 때문에 매우 중요하다는 점을 주의하는 것이 중요하다. 또한 이 방법에 의하여 선결정된 두께를 가지는 층의 재단된(tailored) 다층 필름은 특정한 예견된 응용제품에 적용되는데 사용될 수 있다.

<82> 본 발명의 다층 필름의 층은 어떤 이용가능한 방법, 바람직하게 적합한 기질 상에 용액을 몰딩(moulding), 스핀 코팅(spincoating) 또는 캐스팅(casting)에 의해 형성될 수 있다. 기저의 타입은 일반적으로 제한되지 않으나, 폴리스티렌, 글라스 또는 실란 기저 (또는 사용된 용매에 저항성이 있는 어떤 다른 표면)이 적합한 기저로써 거명될 수 있다.

<83> 두 번째 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 방법에 의해 획득될 수 있는 다층 필름과 관련된다. 본 발명의 다층 실크 단백질 필름은 실크 단백질 필름의 최소한 2 이상의 층을 포함한다.

<84> 세 번째 측면에 따르면, 본 발명은 상기 다층 필름을 포함하는 화장품 조성물; 약제학적 또는 의학적 조성물, 바람직하게 약물전달시스템, 인공세포, 콘택트렌즈 코팅, 서방성 약물전달시스템, 인조 피부 이식편; 식품 조성물; 자동차 부품; 항공기 구성 부품; 컴퓨터 또는 데이터 저장장치; 건축 재료; 직물 또는 멤브레인을 제공한다.

<85> 또한, 본 발명은 의약품에서 다층 필름의 용도를 제공한다.

## 실시예

<98> 본 발명은 제한되지 않은 하기 실시예 및 수반된 도면에 의해 설명될 것이다.

### <99> 거미 실크 단백질의 필름 캐스팅:

<100> 필름을 캐스트하기 위하여 발명자들은 전에 왕거미(garden spider) 아라네우스 디아데마투스(*Araneus diadematus*)의 드래그라인 실크 단백질 ADF-3 및 ADF-4로부터 유래된 두 개의 합성 실크 단백질, (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub>을 사용하였다. 이들 단백질은 ADF-3 및 ADF-4 뿐만 아니라 그의 유도체는 현저하게 다른 용해도 및 어셈블리 작용(behaviour)을 나타내는 예전의 관찰에 기초하여 선택되었다. (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub> 용액의 원편광 2색성(circular dichroism; CD)을 관찰함으로써 이차구조에서 수용성 버퍼 및 HFIP의 상이한 효과가 나타났다. 수용액에서 두 단백질 모두 200nm 이하의 파장에서 주로 무작위 코일 단백질의 징후인 단일의 최소치 CD-스펙트럼을 나타내었다(도 1).

<101> 대조적으로, HFIP에서 두 단백질의 스펙트럼 모두 201 - 202 nm에서 하나의 최소치 및 220nm에서 증가된 α-나선 내용물의 징후인 추가적인 최소치((AQ)<sub>24</sub>NR3) 또는 쇼올더(C<sub>16</sub>)를 나타내었다. 불소화 알콜의 단백질 및 펩타이드에 관한 그러한 영향이 실크 피브로인 및 거미 네피라 클라비페스(*Nephila clavipes*)의 드래그라인 실크 단백질 MaSp1에서 유래된 합성 실크 단백질에 대하여 또한 관찰되었다.

- <102> 필름은 폴리스티렌 표면 위에 (또는 CD-측정을 위해 석영 유리 위에) 2% w/v 단백질을 포함하는 200 $\mu$ l HFIP 용액으로부터 캐스트되었다. 용매를 증발시킨 후에 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub> 모두는 표면에서 쉽게 벗겨질 수 있는 투명한 필름을 형성하였다. 용매의 완전한 증발과 거미 드래그라인 실크에 대한 1.3g/cm<sup>3</sup>의 보고된 값과 동일하게 단백질 필름의 밀도를 가정하면, 그 필름의 두께는 0.5 내지 1.5 $\mu$ m 범위내로 계산되었다. 캐스트한 바와 같이, 어느 하나의 단백질로 만들어진 (새로 제조된) 필름을 물과 접촉하여 용해하였다. 수불용성은 단백질 필름의 최상의 적용을 위한 필수조건이기 때문에, 필름이 수불용성되도록 제조 방법을 연구하였다. 인산 칼륨은 사용된 실크 단백질이 화학적으로 안정한 구조를 형성하고 응집을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 메탄올은 수불용성 실크 형태를 획득하는데 사용되어 왔다. 따라서 캐스트된 필름을 1M 인산칼륨 또는 메탄올로 인큐베이션하는 제조 방법은 수용성 필름을 수불용성 필름으로 전환하는 결과를 초래했다.
- <103> 필름의 구조적 특성을 조사하기 위하여 CD-분광기로 하기의 단백질의 이차 구조를 조사하였다. 캐스트된 필름은 용해성 단백질보다 더 높게  $\alpha$ -나선 내용물의 징후인 208nm 및 220nm에서 두 개의 뚜렷한 최소치를 가진 스펙트럼을 나타내었다. 1M 인산칼륨으로 처리한 후에 필름은 218nm에서 단일의 최소치를 가진 스펙트럼을 나타내었고, 이는 풍부한  $\beta$ -병풍 단백질 구조에 전형적이다(도 2). 메탄올로 필름을 처리한 후에 유사한 결과가 얻어졌다(데이터는 미도시). 따라서 수용성에서 수불용성으로의 변화는  $\alpha$ -나선에서  $\beta$ -병풍으로 단백질의 이차 구조의 전환에 의해 병행되어진다.
- <104> 이들의 화학적 안정성을 테스트하기 위하여, 필름은 8M 요소, 6M 구아니디늄 염산염 및 6M 구아니디늄 티오시안산염에 24시간 동안 침지하였다. 인산칼륨 또는 메탄올로 처리된 두 단백질의 캐스트된 필름 뿐만 아니라 (AQ)<sub>24</sub>NR3 필름은 이들 변성제 모두에 용해된다. 대조적으로, 인산칼륨 또는 메탄올로 처리된 C<sup>16</sup> 필름은 단지 구아니디늄 티오시안산염에 용해될 수 있었다. 이러한 C<sup>16</sup> 필름의 현저한 화학적 안정성은 천연의 드래그라인 실크 및 제조합적으로 생산되고 어셈블리된 ADF-4와 동일하다. 예전의 연구는 실크 단백질의 아미노산 서열로 직접 어셈블리된 구조의 어셈블리 특성 및 안정성과 관련할 수 있다. 따라서 거미 실크 필름의 특성은 관련 실크 유전자의 조작을 통하여 실크 단백질의 1차 구조를 변경하는 것에 의하여 직접적으로 변형될 수 있다(도 2).
- <105> 단백질 필름의 많은 적용은 그 필름의 표면 상의 특별한 기능성의 존재를 필요로 한다. 사용된 거미 실크 필름은 소유기물 분자(small organic molecular) 뿐만 아니라 단백질과 같은 생물학적 거대분자로 변형될 수 있음을 증명하기 위하여, 원리의 증거로써 크로모포르 플루오레세인(chromophor fluorescein)과 효소  $\beta$ -갈락토시다제가 인산칼륨이 처리된 C<sub>16</sub> 필름에 화학적으로 연결되었다. 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드(EDC)를 사용하여 C<sub>16</sub>의 카르복실기에 노출된 표면을 활성화하는 것에 의하여 상기 연결은 이루어졌다. 또한 그 필름은 아미드의 형성을 유도하기 위하여 에틸렌디아민으로 인큐베이트하였다. 다음으로 잔존하는 에틸렌디아민의 자유 아미노기는 플루오레세인이소티오시안레이트와 결합하여 안정한 티오우레아 유도체의 형성을 통하여 플루오레세인과 유효한 공유결합을 이루었다(도 3). 유사하게,  $\beta$ -갈락토시다제로 EDC-활성화된 C<sub>16</sub> 필름의 인큐베이션은 C<sub>16</sub>의 카르복실기와 효소의 표면에 접근할 수 있는  $\beta$ -갈락토시다제의 제1 아민 (예로, 리신 잔기로부터) 사이에 아미드 결합의 형성을 이끌었다. 상기 변형된 필름의 반복된 세척 후에,  $\beta$ -갈락토시다제 활성은 기질로써 5-브로모-4-클로로-3-인돌일- $\beta$ -D-갈락토피라노사이드(X-Gal)를 사용하여 검출될 수 있었다(도 3).
- <106> 본 발명자들은 단백질 필름이 거미 실크 단백질로부터 획득될 수 있음을 증명할 수 있었다. 초기에 수용성이었던 그 필름은 많은 응용제품에 주요 필수조건인 수불용성을 유도하도록 인산칼륨 또는 메탄올로 처리될 수 있다. 그 필름의 성질은 단백질의 1차 구조에 기초된다는 것이 두 개의 다른 합성 거미 실크 단백질로부터 만들어진 필름의 화학적 안정성의 비교로부터 제시되었다. 본 발명자들이 거미 실크 유전자에 대하여 예전에 수립하였던 클로닝 전략을 사용함으로써 특정한 성질을 나타내는 필름을 형성하는 실크 단백질을 생산하는 것이 가능할 것이다. 다른 기능성의 분자들이 그 필름의 표면에 공유적으로 결합될 수 있기 때문에 많은 다양한 기술적 또는 의학적 응용제품에 접근할 수 있다.
- <107> 단백질 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub>은 HFIP 또는 포름산 용액에서 개시하는 몇몇 필름 내로 캐스트될 수 있다. 그러나, 본 발명자들의 모듈(서열 1-27)뿐만 아니라 사용될 수 있는 천연의 곤충 및 거미 실크 단백질로 만들어지는 어떤 다른 실크 단백질이 사용될 수 있다. 단백질 용액은 폴리스티렌, 유리 또는 실란 (또는 사용된 용매에 저항성이 있는 어느 다른 표면) 위로 캐스트되고, 그 용매는 후에 완전히 증발된다. 핵사플루오로이소프로판올 용액으로부터 캐스트된 필름은 수용성이다. 수불용성을 달성하기 위하여 이들 필름은 메탄올, 에탄올 또는 인산칼륨으로 처리되어야 한다. 포름산으로부터 캐스트된 필름은 처리 없이 물에 불용성이다.

- <108> 필름의 두께는 사용된 단백질의 농도에 의해 조절될 수 있다(데이터는 명시하지 않음). 중요하게, 필름은 단일의 단백질(1-단백질 필름) 또는 두 개의 단백질(2-단백질 필름) 용액으로부터 캐스트될 수 있다.
- <109> **2-단백질 필름**
- <110> 본 발명자들은 두 개의 단백질 성분을 함유하는 용액으로부터 캐스트된 필름(2-단백질 필름)이 1-단백질 필름과 비교하여 다른 구조 또는 안정성을 나타내는지를 분석하였다. (AQ)<sub>12</sub>와 C<sub>16</sub> 또는 (AQ)<sub>24</sub>NR3과 C<sub>16</sub>NR4는 HFIP에 용해되었다(각각 1% w/v, 전체 2% w/v). 서열 정보에 대하여 본 명세서에 참조된 WO 2006/008163에 언급되어 있다.
- <111> 2-단백질 필름이 (AQ)<sub>12</sub>/C<sub>16</sub> (물 비율 1: 1) 또는 (AQ)<sub>24</sub>NR3/C<sub>16</sub>NR4 (물 비율 1: 1.8) 혼합물로부터 캐스트되었다. 현재하게, 2-단백질 필름은 단일의 실크 단백질로부터 캐스트된 필름의 특성의 조합을 나타내었다. (AQ)<sub>12</sub>/C<sub>16</sub>로 만들어진 캐스트된 2-단백질 필름은 모든 테스트된 시약에서 용해되었다. 메탄올로 처리된 후에 이들 필름은 물 및 요소에 불용성이 되었으나, GdmCl 및 GdmSCN 용액에서는 용해되었고, 단순(plain) C<sub>16</sub> 또는 단순 (AQ)<sub>12</sub> 필름의 필름 사이의 화학적 안정성을 반영하였다. 캐스트된 2-단백질 필름은 물에 완전히 용해되지 않았다. 물을 처리한 후에 무정형의 단백질 응축물은 남아있었다. NR 부위 사이의 분자간 이황 가교의 형성은 무정형 응축의 원인이 되는 것으로 배제될 수 있는데, 이는 그 필름의 작용(behaviour)는 β-머캅토에탄올(5% (v/v))과 같은 환원제의 존재에서 변하지 않았기 때문이다. (AQ)<sub>24</sub>NR3/C<sub>16</sub>NR4 필름의 메탄올 처리는 물 및 요소에서 화학적 안정성을 유도하였다.
- <112> 2-단백질 필름의 경우 두 단백질에 의해 영향을 받은 화학적 안정성을 유도했다. 통상적인 합성 폴리머와 비교하여 블렌딩(blending)이 보통 혼합된 특성을 야기한다는 그러한 발견은 단백질에 대하여 놀라운 것이다. 일반적으로, 단백질의 구조 및 상호작용은 복잡하고 여러 인자들에 의존한다. 두 개의 단백질이 혼합되었을 때, 상호작용하지 않고, 보통 두 번째 단백질의 부재에서 발견되는 그들의 화학적 안정성을 유지한다. 두 단백질들이 상호작용하는 경우에, 두 단백질은 더 높은 화학적 안정성을 나타낸다. 본 발명의 경우에, 두 단백질들은 상호작용하는 것처럼 보였으나, 얻어진 화학적 안정성은 단일의 화합물의 화학적 안정성 사이에 있었다.
- <113> **다층 필름**
- <114> 다층된 필름은 이미 존재하고 있는 필름 위에 다른 층들을 캐스팅하는 것에 의하여 얻어질 수 있다(도 4, 5 및 6). 다층 필름의 모든 층은 거미 실크로 만들어질 수 있으나, 필름 층들은 추가적으로 곤충 실크, 엘라스틴, 콜라겐, 케라틴, 폴리스티렌, 폴리염화비닐, 폴리(스티렌 술폰네이트)(PSS), 폴리(알릴아민 히드로클로라이드)(PAH), 폴리(아크릴산)(PAA), 폴리(디알릴디메틸암모늄클로라이드)(PDADMAC) 등과 같은 다른 물질로 만들어질 수 있다. 실크 필름의 두께는 단백질 농도에 의해 조절될 수 있다. 각 층은 다른 화학적 및 물리적 특성을 가진 다른 실크 단백질(천연의 곤충 또는 거미 실크, 또는 본 발명의 모듈 서열 1-27에 기초한 재조합 실크)을 함유할 수 있다. 또한, 각 필름은 상이하게 변형된 실크 단백질을 포함할 수 있다(그 변형은 필름 캐스팅 전에 발생할 수 있다). 마지막으로, 각 층은 각각의 실크 단백질에 제제를 화학적으로 결합하는 것에 의해 목적하는 기능성을 가지도록 캐스트 후 처리될 수 있다.
- <115> 캐스팅 전에 물질들을 첨가하는 것에 의해 재조합 거미 실크 단백질로부터 캐스트된 필름 내로 물질들을 결합할 수 있다(도 9 및 10). 선택적으로 그 물질은 실크 필름의 상부 위에 있을 수 있으며, 그 위에 또 다른 실크 필름이 캐스트될 수 있다(도 11 및 12).
- <116> **요약으로써, 다음의 목적들이 본 발명에 의해 달성될 수 있다:**
- <117> 단일의 실크 필름은 캐스팅 전과 후 어느 쪽이든 공유적으로 기능화될 수 있다. 또한 실크와 제제(예를 들어, 염, 안료, 금속, 화학물질, 약물 등) 사이의 혼합(blend)은 캐스팅 전에 준비될 수 있다. 캐스팅 층층은 각 층에서 다른 기능성을 가진 다층 필름을 발생시킨다. 그러한 다층 다기능성 실크 단백질 필름은 전체적으로 새로운 것이다. 추가적으로, 다른 거미 실크 단백질의 혼합함으로써, 각각 다르게 기능화되고, 캐스팅에 대하여 단일의 필름은 새로운 것이다. 그에 의하여, 다층 단백질 필름의 각 단일 필름은 단일 기능의 한정된 공간적 분포를 가진 복잡한 3차원적 스캐폴드를 형성하면서 다른 기능을 제공한다. 만일의 경우 단일 기능은 전달할 수 있으며, 그 결과는 상당한 3차원 구조이다. 마지막으로, 실크 필름은 존재하고 있는 다른 폴리머 필름과 함께 층을 이루고, 혼합된 다른 성분을 가진 다층 필름을 형성할 수 있다.

## 산업상 이용 가능성

- <118> 다층, 다기능적 스캐폴드 및 구조는 식품 과학, 쓰레기 처리, 및 화장품, 의학, 약학, 자동차, 항공기 등의 시장에 대한 수많은 혁신적 제품에 대한 기초이다. 그 응용제품은 예를 들어, 장치 코팅 (예로, 진보된 내피 세포 부착), 약물 전달 시스템, 인공세포, 콘택트 렌즈 코팅, 서방성 약물 전달 시스템, 바이오센서, 및 다양한 전기적(예로, 발광 다이오드), 마그네틱의, 전기변색의 및 광학적 성질(예로, 초소형 컴퓨터 및 컴퓨터 스크린의 밝기를 증가시키는 것, 세포 신호의 간섭량을 감소하는 것, 자동차가 적외선(열선)을 반사하고 그에 의하여 공기조화기의 무게를 감소함으로써 더 효율적으로 작동하도록 하는 것)을 가지는 기능적으로 진보된 물질을 포함한다.
- <119> 다층 실크 필름은 정상적으로 흡수되는 빛을 가질 수 있고, 그 흡수된 빛을 유용한 빛으로 전환할 수 있고, 밝기를 증가할 수 있다. 자동차 산업에서 다층 실크 필름은 태양 적외선을 반사하는 것으로 사용될 수 있는데, 이는 비전도성 필름은 증가된 일광 전달이 바람직한 건축물 응용제품에서 유용할 수 있는 성질로서 투명하기 때문이다. 투명한 실크 폴리머의 수백개 층을 포함하는 다층 필름은 광학적 간섭 효과 때문에 반사한다. 반사되고 전달되는 파장은 그들이 가지는 각도의 결과만큼 변한다.
- <120> 다층 필름은 얇은 나노기공성 및 미세기공성 막을 형성하는데 사용될 수 있으며, 금속성 나노입자의 합성을 위한 나노반응자(nanoreactor)로써 활용될 수 있다.
- <121> 수소결합된 다층 실크 필름은 수소결합된 필름의 분리 속도(deconstruction rate) 조절이 요구되는 마이크로패터닝(micropatterning) 및 약물 전달과 같은 응용제품에 사용될 수 있다. 다층의 얇은 필름의 분해 작용(behavior)을 모듈화하는 것에 대한 하나의 접근은 그 필름의 구조적 디자인을 통해서이다.
- <122> 또 다른 응용제품은 이성질체 분리일 것이다. 키랄성은 생물학에서 분자 인식에 중요하다. 단일의 이성질체 약물에 대한 제약업의 요구가 키랄 분자의 준비과정 분리(preparative-scale separation)를 위한 기술의 개발을 자극해왔다. 막에 기초한 분리는 작동의 단순함과 저비용으로 훨씬 매력적이었다.
- <123> 다층 실크 필름의 또 다른 응용제품은 인조 피부 이식편이다. 대부분의 화상 사고는 피부에 광범위한 손상을 수반한다. 즉각적인 보호가 체액의 손실을 제한하고, 조직 회복 및 재생산을 돕는 데에 필요하다. 이상적인 피부 대체물의 구조적 및 기능적 특성은 자가이식 피부와 근접하게 일치되어야 한다. 대체물 준비 절차의 유연성(plasticity) 및 그의 조성물은 회복, 거부의 최소화 및 면역 반응의 활성화에 대한 부가된 가치를 제공한다. 다층 거미 실크 필름은 인조 피부 이식편을 제조하는데 유용할 수 있는데, 그 방법은 크, 모양에 제한 없이 필름을 생산하는 단순한 수단을 제공하고, 그 조성물 및 폴리펩타이드는 본래적으로 생체적합성이 있기 때문이다.
- <124> 나노여과(nanofiltration, NF)는 연수화(water softening), 해수담수화 및 다이솔트(dyesalt) 분리와 같은 응용제품에 사용되는 압력이 강제된 막 분리 공정이다. 이러한 응용제품은 역삼투(RO)막에 전형적인 높은 NaCl 폐기물(rejection)을 필요로 하지 않는다. 그래서 NF는 RO보다 현저하게 더 낮은 압력에서 발생하고, 따라서 더 적은 에너지를 필요로 한다. 이러한 이유로, NF의 용도는 급속히 증가하고 있으나, 안정적이고 부작용이 없는 선택적 고유량 막의 계속된 개발로 그 분리 기술의 유용성이 증가되어야 한다. RO 및 NF 모두에서, 막은 표피층(skin layer)의 최소 두께가 조밀한 상태에도 불구하고 적당한 유량을 허용해야 하기 때문에 매우 흡수성이 있는 기저(support) 위에 선택적인 표피층을 구성하고 있다. 그러한 막 구조를 형성하는 전형적 과정은 미리 형성된 기공성 기저 위에 계면 폴리머화, 그라프팅 또는 필름 증착에 의한 복합막의 형성 및 상 전환을 포함한다. 복합막은 잠재적으로 값비싼 표피 물질을 소량만 필요로 하기 때문에 특히 매력적이다. 다층 실크 필름은 NF, 가스-분리 및 투과증발을 위한 막의 표피층을 형성하기 위한 조절된 방법을 제공한다.
- <125> **문헌**
- <126> (1) Decher, G. *Science* **1997**, 277, 1232.
- <127> (2) Chen, W.; McCarthy, T. J. *Macromolecules* **1997**, 30, 78.
- <128> (3) Bertrand, P.; Jonas, A.; Laschewsky, A.; Legras, R. *Macromol. Rapid Comm.* **2000**, 21, 319.
- <129> (4) Hammond, P. T. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2000**, 4, 430.
- <130> (5) Anzai, J.-I. *Bunseki Kagaku* **2001**, 50, 585.
- <131> (6) Tripathy, S. K., Kumar, J., Nalwa, H. S., Eds.; *Handbook of Polyelectrolytes and their Application*. Vol.



1. Polyelectrolyte-based Multilayers, Self-assemblies and Nanostructures; American Scientific Publishers: Stevenson Ranch, CA, 2002.

- <132> (7) Decher, G., Schlenoff, J.B., Eds.; *Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials*; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, 2003.
- <133> (8) Schonhoff, M. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2003**, 8, 86.
- <134> (9) Schonhoff, M. *J. Phys.-Condens. Mater.* **2003**, 15, R1781.
- <135> (10) Hammond, P.T. *Ad. Mater.* **2004**, 16, 1271.
- <136> (11) Muller, M.; et al. *Adhesion* **2004**, 80, 521.
- <137> (12) Peyratout, C.S.; Da'hne, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2004**, 43, 3762.
- <138> (13) Boulmedais, F.; et al. *Biomaterials* **2004**, 25, 2003.
- <139> (14) Hubsch, E.; et al. *Langmuir* **2005**, 21, 3664.
- <140> (15) Picart, C.; et al. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 12531.
- <141> (16) Elbert, D. L.; Herbert, C.B.; Hubbell, J.A. *Langmuir* **1999**, 15, 5355.
- <142> (17) Richert, L.; et al. *Biomacromolecules* **2002**, 3, 1170.
- <143> (18) Halthur, T.J.; Claesson, P.M.; Elofsson, U.M. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 17009.
- <144> (19) Richert, L.; Arntz, Y.; Schaaf, P.; Voegel, J.-C.; Picart, C. *Surf. Sci.* **2004**, 570, 13.
- <145> (20) Haynie, D.; et al. *Biomacromolecules* **2005**, 6, 2895.
- <146> (21) Hummerich, D.; Helsen, C.W.; Oschmann, J.; Rudolph, R.; Scheibel, T. *Biochemistry* **2004**, 43, 13604.
- <147> (22) Hummerich, D.; Slotta, U.; Scheibel, T. *Applied Physics A* **2006**, 82, 219.

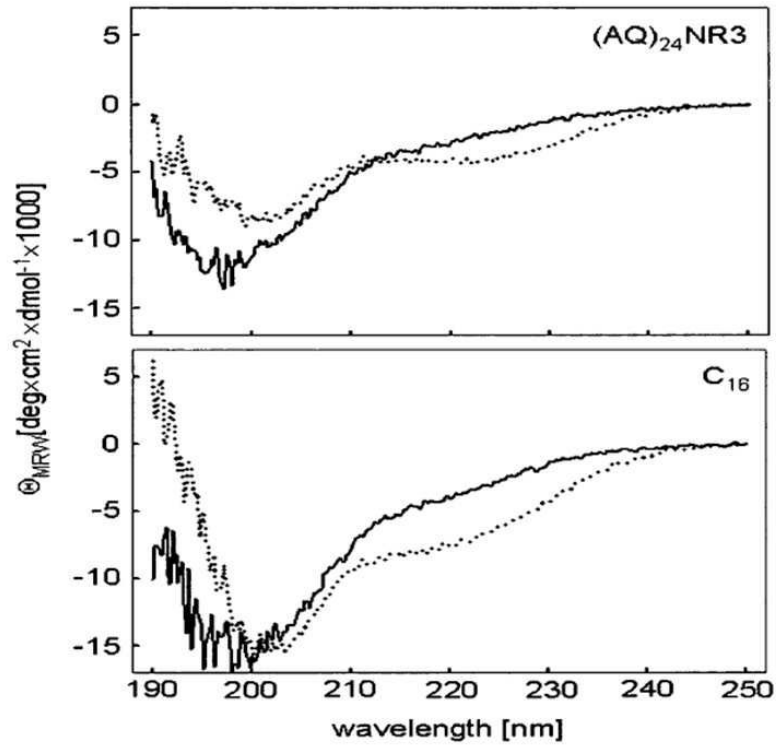
### 도면의 간단한 설명

- <86> 도 1은 합성 실크 단백질 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub>을 6 M 구아니디움 티오시안산염에 용해시키고 5mM 인산칼륨 pH 8.0에 대하여 투석하거나(직선) 또는 HFIP에 용해한(점선) 후의 합성 실크 단백질의 CD-스펙트라이다.
- <87> 도 2는 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub>으로부터 제조된 단백질 필름의 CD-스펙트라이다. 필름은 평평한 석영 유리(plain quartz glass) 상에 직접적으로 HFIP에 있는 단백질 용액으로부터 캐스트 되었고 CD-분광기로 분석되었다(점선). 다음으로 1M 인산칼륨으로 처리되었고 재분석되었다. 필름 두께를 한정하는데 있어서의 부정확성 때문에  $\Theta_{MRW}$  은 측정될 수 없다.
- <88> 도 3은 HFIP 용액으로부터 캐스트되고 인산칼륨으로 처리된 C<sub>16</sub> 필름의 변형이다. (A) C<sub>16</sub>의 카르복실기가 EDC를 사용하여 활성화(+ )되었을 때 플루오레세인의 효율적인 결합(노란색)만이 발생하였다. 대조적으로 단지 플루오레세인은 EDC 활성화 없이(-) 필름에 결합하지 않았다. (B) 결합된  $\beta$ -갈락토시다제의 활성은 기질로써 X-Gal을 사용하여 모니터링되었다. 파란색 침전의 발생은 EDC (+)로 활성화되었던 필름 상에서만 효소활성을 나타내었고, 반면에 비활성화된 필름은 단지 잔류 효소 활성을 보여주었다(-).
- <89> 도 4는 다층 실크 필름의 캐스팅을 나타낸다.
- <90> 도 5는 다양한 기능성을 가진 다층 실크 필름의 캐스팅을 나타낸다.
- <91> 도 6은 다양한 기능성을 가진 다층 실크 필름의 캐스팅을 나타낸다.
- <92> 도 7은 예를 들어 EDC(N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보디이미드)로 유도된 아미노-반응 제제의 결합을 보여주는 것으로써 실크 단백질에 대한 제제의 화학적 결합을 나타낸다.
- <93> 도 8은 실크 표면의 특정한 기능화를 나타낸다. 다층 필름에서 양극성(polarity)은 다른 단백질로부터 캐스팅된 다층 실크 필름을 사용함으로써 획득할 수 있다.

- <94> 도 9는 다층 실크 필름에서 제제의 결합을 나타낸다.
- <95> 도 10은 다층 실크 필름에서 제제의 결합을 나타낸다. 상이하게 착색된 화학물질은 원리의 증명으로써 캐스팅 전에 실크 단백질 용액에 첨가되어졌다.
- <96> 도 11은 샌드위치 다층 실크 필름에서 고체 제제의 결합을 나타낸다.
- <97> 도 12는 샌드위치 다층 실크 필름에서 유체 제제의 결합을 나타낸다.

## 도면

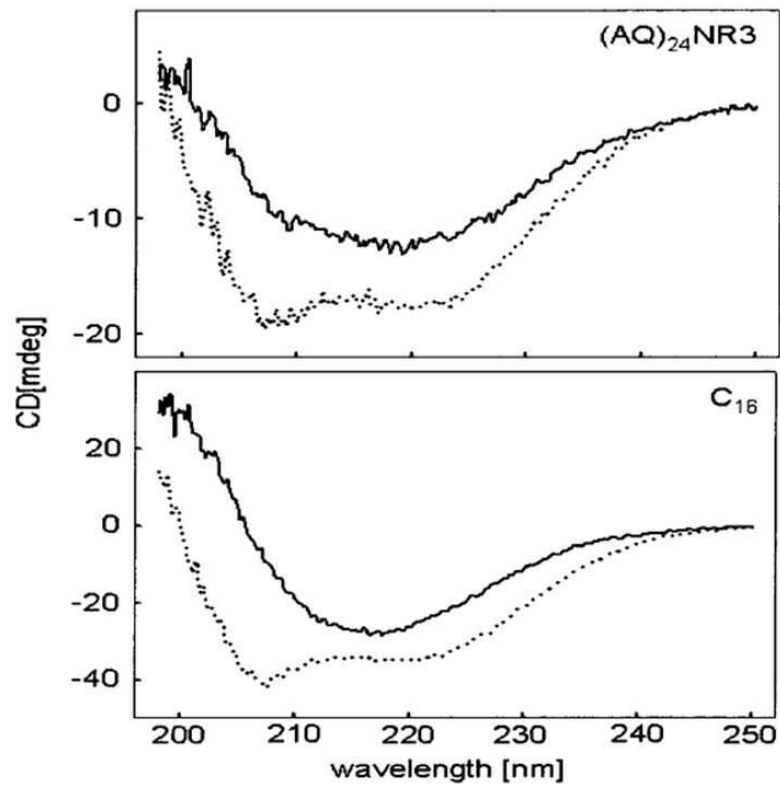
### 도면1



**도 1** 합성 실크 단백질  $(AQ)_{24}NR3$  및  $C_{16}$ 을 6 M 구아니디움 티오시안산염에 용해시키고 5mM 인산칼륨 pH 8.0에 대하여 투석하거나(직선) 또는 HFIP에 용해한(점선) 후의 합성 실크 단백질의 CD-스펙트라.

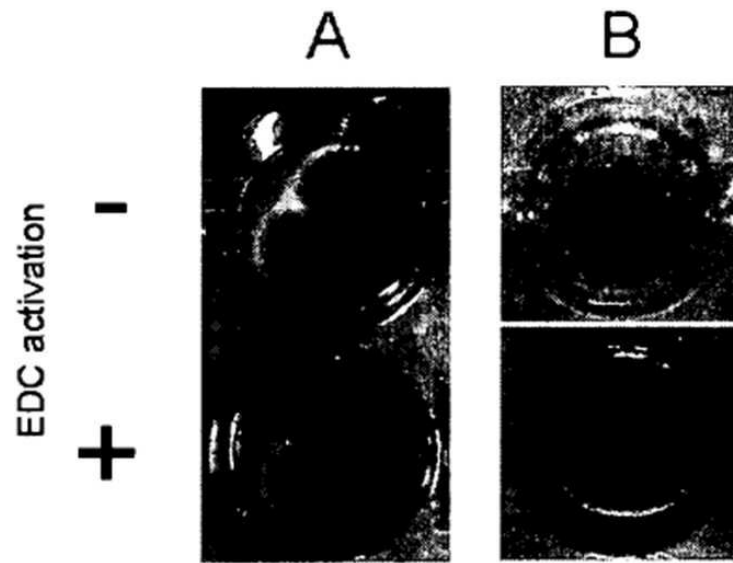


도면2



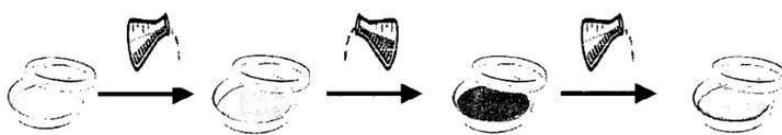
도 2 (AQ)<sub>24</sub>NR3 및 C<sub>16</sub>으로부터 제조된 단백질 필름의 CD-스펙트럼. 필름은 평평한 석영 유리(plain quartz glass) 상에 직접적으로 HFIP에 있는 단백질 용액으로부터 캐스트되었고 CD-분광기로 분석되었다(점선). 다음으로 1M 인산 칼륨으로 처리되었고 재분석되었다. 필름 두께를 한정하는데 있어서의 부정확성 때문에  $\Theta_{MRW}$ 은 측정될 수 없다.

도면3



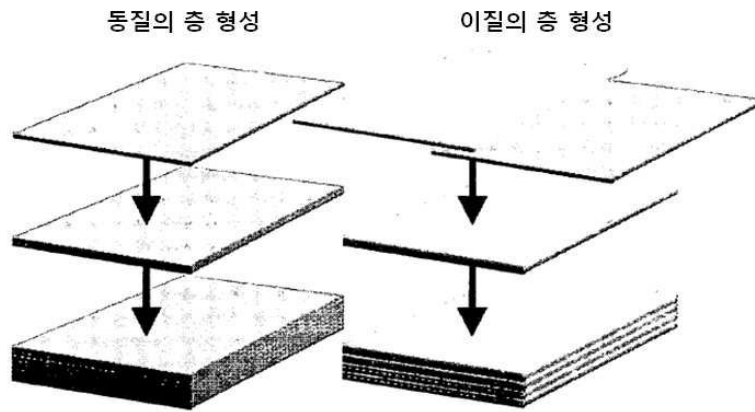
도 3 HFIP 용액으로부터 캐스트되고 인산칼륨으로 처리된  $C_{16}$  필름의 변형. (A)  $C_{16}$ 의 카르복실기가 EDC를 사용하여 활성화(+ )되었을 때 플루오레세인의 효율적인 결합(노란색)만이 발생하였다. 대조적으로 단지 플루오레세인은 EDC 활성화 없이(-) 필름에 결합하지 않았다. (B) 결합된  $\beta$ -갈락토시다제의 활성은 기질로써 X-Gal을 사용하여 모니터되었다. 파란색 침전의 발생은 EDC (+)로 활성화되었던 필름 상에서만 효소활성을 나타내었고, 반면에 비활성화된 필름은 단지 잔류 효소 활성을 보여주었다(-).

도면4



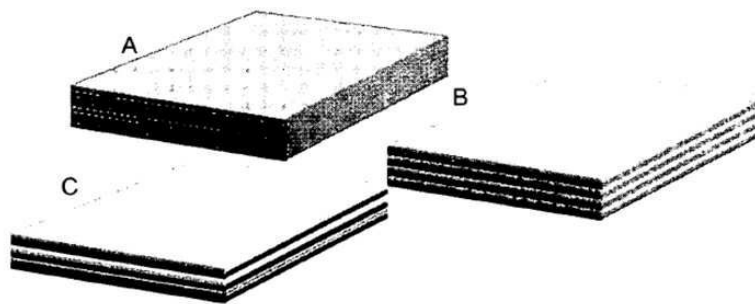
도 4 다층 실크 필름의 캐스팅.

도면5



도 5 다양한 기능성을 가진 다층 실크 필름의 캐스팅.

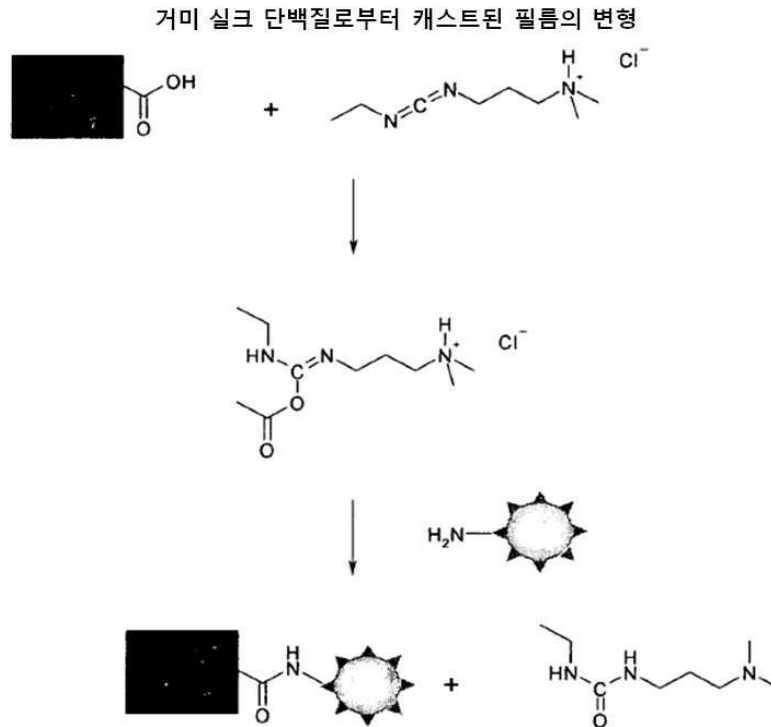
도면6



- A) 동질의 층 형성
- B) 두 개의 상이한 실크 필름을 가진 이질의 층 형성
- C) 다수의 상이한 실크 필름을 가진 이질의 층 형성

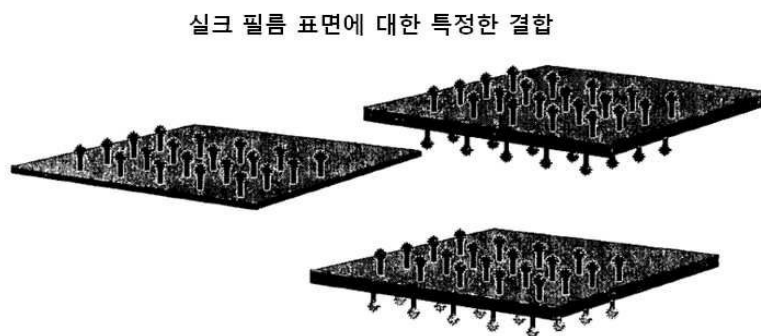
도 6 다양한 기능성을 가진 다층 실크 필름의 캐스팅.

도면7



도 7 예를 들어 N-에틸-N'-(3-디메틸아미노프로필)-카르보  
디이미드(EDC)로 유도된 아미노-반응 제제의 결합을 보여주  
는 것으로서 실크 단백질에 대한 제제의 화학적 결합

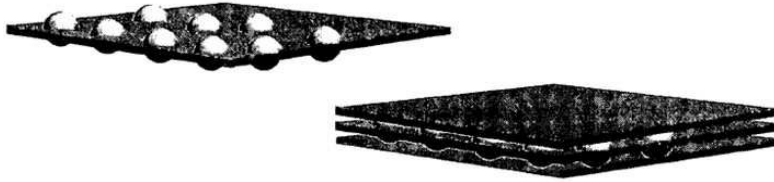
도면8



도 8 실크 표면의 특정한 기능화. 다층 필름에서  
양극성(polarity)은 다른 단백질로부터 캐스팅된  
다층 실크 필름을 사용함으로써 획득할 수 있다.

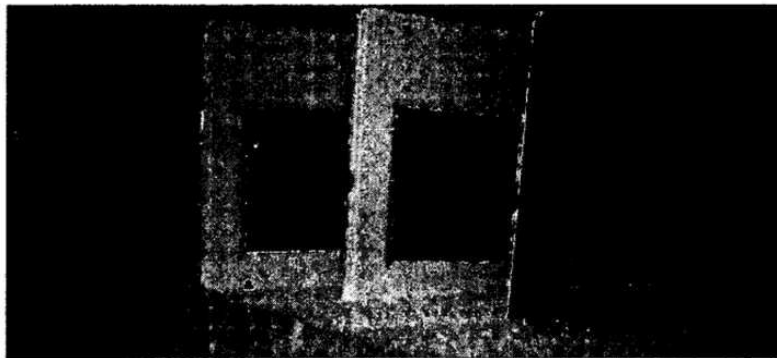
도면9

필름 내로의 물질의 결합



도 9 다층 실크 필름에서 제제의 결합.

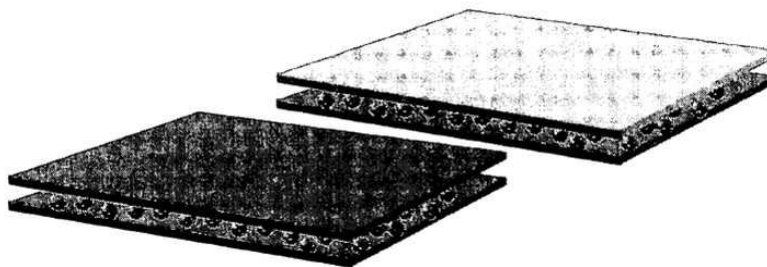
도면10



도 10 다층 실크 필름에서 제제의 결합. 상이하게 착색된 화학물질은 원리의 증명으로써 캐스팅 전에 실크 단백질 용액에 첨가되어졌다.

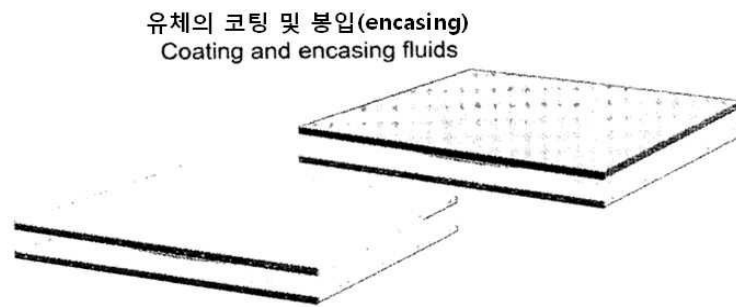
도면11

고체의 코팅 및 봉입(encasing)



도 11 샌드위치 다층 실크 필름에서 고체 제제의 결합.

도면12



도 12 샌드위치 다층 실크 필름에서 유체 제제의 결합.