(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0155852
(43) 공개일자 2024년10월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61L 27/34 (2006.01) *A61L 27/54* (2006.01)
A61L 31/10 (2006.01) *A61L 31/16* (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7022289
(22) 출원일자(국제) 2022년12월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년07월03일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/084241
(87) 국제공개번호 WO 2023/099748
국제공개일자 2023년06월08일
(30) 우선권주장
PCT/IB2021/000860 2021년12월03일
국제사무국(IB)(IB)

전체 청구항 수 : 총 25 항

(71) 출원인
인세름 (엥스띠뛰 나씨오날 드 라 쌍떼 에 드 라 흐쉐르슈 메디깔)
프랑스, 75013 파리, 뤼 드 똘비악 101
위니베르시떼 빠리 XIII 빠리-노르
프랑스공화국, 에프-93430 빌르따뇌즈, 아브뉘 쟝-바띠스뜨 끌레멍 99
유니베르시떼 파리 시테
프랑스 75006 파리 생 제르맹 블러바드 85
(72) 발명자
칼리주리 쥬세피나
프랑스 75018 파리 세텍스 쥐에이치 비샤 클로드 버나드 - 유1148 46 뤼 헨리 후차드
니꼴레띠 안토니오
프랑스 75018 파리 세텍스 쥐에이치 비샤 클로드 버나드 - 유1148 46 뤼 헨리 후차드
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

(54) 발명의 명칭 **혈관 내 스텐트용 생체모방 코팅**

(57) 요 약

본 발명자들은 이식된 장치와 접촉해 들어갈 수 있는 모든 건강한 내피 세포 및 휴면 혈소판 및 백혈구에 손상되지 않은 CD31 분자가 결합할 수 있도록 하는 펩타이드를 합성하였다. 따라서 이러한 세포는 CD31의 트랜스-동종친화성 결합에 의해 전달되는 "나-혼자-남겨두기" 신호를 수신할 수 있고, 이는 순환계 및 혈관화된 조직에서 항

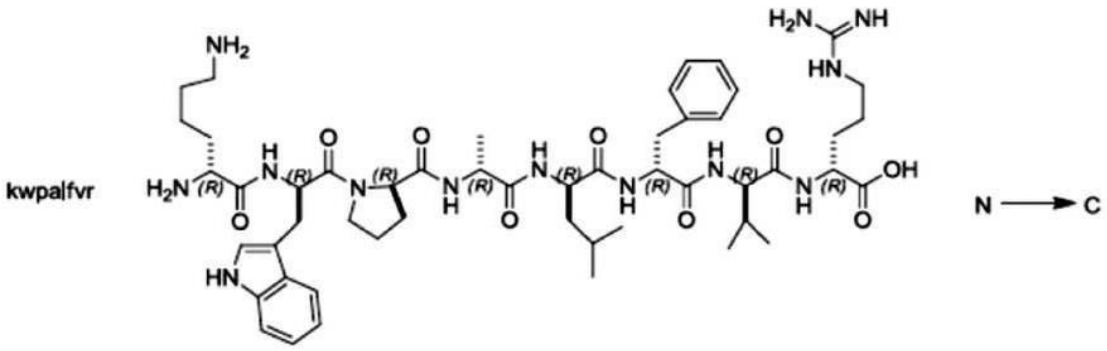
(뒷면에 계속)

대 표 도

도 1A

(D-Lys)-(D-Trp)-(D-Pro)-(D-Ala)-(D-Leu)-(D-Phe)-(D-Val)-(D-Arg).

도 1B



상성을 유지하는 데 필수적이다. 출혈성 또는 혈전색전성 합병증의 혈전성 또는 생명을 위협하는 발생으로 인해 혈관 내 장치의 사용이 손상되어왔다. 본 발명의 모방 펩타이드를 보유하는 장치는 혈소판 및 백혈구에 의해 건강한 내피, 즉 "자기" 구성요소로서 인식되기 때문에 빠르게 통합된다. 또한, 생리학적 내피 세포 표현형으로 빠르게 내피화되는 능력으로 인해 장기적으로 장치 이식 부위에서 혈소판 및 백혈구 활성화 또한 제한된다. 따라서, 본 발명은 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61L 27/34 (2013.01)

A61L 27/54 (2013.01)

A61L 31/10 (2013.01)

A61L 31/16 (2013.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A61L 2300/25 (2013.01)

A61L 2300/41 (2013.01)

(72) 발명자

스킬백 샤를

프랑스 75018 파리 세덱스 쥐에이치 비샤 클로드 버나드 - 유1148 46 뤼 헨리 후차드

비앙키 엘리자베타

이탈리아 00071 포메치아 비아 폰티나 케이엠 30,600 아이알비엠 에스피에이

인제니토 라펠레

이탈리아 00071 포메치아 비아 프라텔리 반디에라 90

명 세 서

청구범위

청구항 1

트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

다음 서열 중 하나를 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

a)

QHXXLFYKDDXXFYNISSXX	서열번호 53

여기서,

1Q는 Q, C, L, K, 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

2H는 H, I, V, Q 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

5L은 L, R, V, F 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

9D는 D, E 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

13F는 F, V, L 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

14Y는 Y, H, R 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

15N은 N 또는 D 중 어느 하나일 수 있고,

16I는 I, V, T 또는 A 중 어느 하나일 수 있고,

17S는 S 또는 T 중 어느 하나일 수 있고,

18S는 S 또는 T 중 어느 하나일 수 있고,

여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있고; 또는

b)

YKSTVIXNNKEKTTXE	서열번호 54

여기서,

2K는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

3S는 S 또는 C 중 어느 하나일 수 있고,

4T는 T, R 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

5V는 V 또는 A 중 어느 하나일 수 있고,

6I는 I, K, V, L, T 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

8N은 N, S 또는 D 중 어느 하나일 수 있고,

9N은 N, S, K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

11E는 E, Q, V, K 또는 M 중 어느 하나일 수 있고,

12K는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

13T는 T, A 또는 P 중 어느 하나일 수 있고,

14T는 T 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

16E는 E, A, Q 또는 D 어느 하나일 수 있고,

여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있고; 또는

c)

PXCTLDKKEXIQGGXVXVNCSVPEEK	서열번호 55

여기서,

3C는 C, V, M 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

4T는 T, I, M 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

5L은 L 또는 V 중 어느 하나일 수 있고,

6D는 D 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

7K는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

8K는 K, T, M, R 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

11I는 I, T, M, V 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

12Q는 Q 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

14G는 G 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

16V는 V 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

18V는 V 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

19N은 N, T, R, S, G 또는 H 중 어느 하나일 수 있고,

22V는 V, M 또는 L 중 어느 하나일 수 있고,

23P는 P, Q, K, E, L 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

24E는 E, G 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

26K는 K, Q, E, R 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있고; 또는

d) a) 내지 c)의 임의의 조합, 특히 a) 및 b)의 조합 및 a) 및 c)의 조합.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

다음 서열 중 하나를 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

아미노산 서열	서열번호
HQMLFYKDDVLFYNISS	4
YKSTVIVNNKEKTTAE	5
PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK	6
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK, hC인 것=호모시스테인	28
YKSTVIVNNKEKTTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTTAEYhC, hC인 것=호모시스테인	23
GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ	24
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVPEEK	25
RDQNFVILEFP	26

.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 서열 중 2개를 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

다음을 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

- 구조 (IA)에 기초한 펩타이드:

아미노산 서열 (IA)	서열번호
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC=호모시스테인	

및 구조 (IB)에 기초한 펩타이드:

아미노산 서열 (IB)	서열번호
YKSTVIVNNKEKTTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTTAEYhC	23
GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ	24
hC=호모시스테인	

, 또는

- 구조 (IA)에 기초한 펩타이드:

아미노산 서열 (IA)	서열번호
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC=호모시스테인	

및 구조 (IC)에 기초한 펩타이드:

아미노산 서열 (IC)	서열번호
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVPEEK	25

.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 5 중 어느 한 항에 있어서,

다음 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

아미노산 서열	서열번호
GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ 및 QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	24 및 28 (서열번호 37 및 38)
PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK 및 QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	6 및 28 (서열번호 39 및 40)

.

청구항 7

청구항 1 내지 청구항 6 중 어느 한 항에 있어서,

고리형 펩타이드인 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 8

청구항 1 내지 청구항 7 중 어느 한 항에 있어서,

임의의 말단에 또는 아미노산 잔기에 연결된 링커 및/또는 스페이서 및/또는 꼬리를 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 어느 한 항에 있어서,

상기 링커 및/또는 스페이서 및/또는 꼬리는

GGSGGSGG	서열번호 27
하나 이상의 PEG4 유닛	
하나 이상의 Ttds 유닛	

또는 이들의 조합으로 표시되는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 10

청구항 1 내지 청구항 9 중 어느 한 항에 있어서,

C-말단 및/또는 N-말단에 변형을 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 10 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형은 다음 중에서 선택되는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

Ac-
$Br-CH_2-CO-$
CH_2-CO-
CH_2-CONH_2-
$Ac-K(N_3)$
$-NH_2$
$-CO-NH_2$

.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 11 중 어느 한 항에 있어서,

다음 변형 중 어느 하나를 포함하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

- 시스테인 잔기는 상응하는 호모시스테인으로 치환될 수 있고,

- L-아미노산 잔기는 상응하는 D-아미노산 잔기로 치환될 수 있다.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 12 중 어느 한 항에 있어서,

다음 구조 중 하나를 갖는 것을 특징으로 하는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드:

아미노산 서열	서열번호
$QHQMLFYCDDVLFYNISSMK-CONH_2$	1
$(BrCH_2CO-GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)_4-K(N_3)-NH_2)$	2
$Ac-K(N_3)-(Ttds)_4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K(BrCH_2CO)-CONH_2$	3

Ac-c*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	29
SHQMLFYKDDVLFYNISSS-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	30
Ac-KKKc*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	31
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	32
hCHQMLFYKDDVLFYNISShCK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	33
YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N_3)-$CONH_2$	34
Ac-K(N_3)-PEG4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-$CONH_2$	35
Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRhCTLDKKEAIQGGIVRVNhCSVPEEK-$CONH_2$	36
[$^{\#}CH_2CONH_2$GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)$_4$-K(N_3)-NH_2]-[QHQMLFYhC$^{\#}$DDVLFYNISSMK-$CONH_2$]	37 및 38
[Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K$^{\#}$ (CH_2CO)-$CONH_2$]-[QHQMLFYhC$^{\#}$DDVLFYNISSMK-$CONH_2$]	39 및 40
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKST-NH_2	41
Ac-YKDDVLFYNISSMKST-GGSGGSGG-K(N_3)-NH_2	42
Ac-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK(GGSGGSGG-K(N_3))STESYFI-$CONH_2$	43
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK-$CONH_2$	44
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-$CONH_2$	45

Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-$CONH_2$	46
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-$CONH_2$	47
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	48
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	49
Ac-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK(GGSGGSGG-K(N_3))STESYFIKK-$CONH_2$	50
RDQNFVILEFP-PEG4-K(N_3)-NH_2	51
여기서 hC:호모시스테인; c: D-시스테인; **고리형 펩타이드의 디술파이드 가교 형성을 위한 위치 #아세틸 티오에테르 결합	

.

청구항 14

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 있어서,

의료용인 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 15

청구항 1 내지 청구항 14 중 어느 한 항에 있어서,

혈관 병리의 예방 또는 치료용 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 16

청구항 1 내지 청구항 15 중 어느 한 항에 있어서,

심장 판막 병리, 죽상동맥경화증, 혈전증, 허혈, 출혈, 재발협착증, 동맥류를 포함하는 군으로부터 선택되는 혈관 병리의 예방 또는 치료용 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 17

청구항 14 내지 청구항 16 중 어느 한 항에 있어서,

스텐트 내 협착증으로 대표되는 병리학적 상태를 예방하기 위한 의료용인 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 18

청구항 14 내지 청구항 17 중 어느 한 항에 있어서,

인간 또는 동물에서의 의료용인 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 펩타이드.

청구항 19

청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 하나 이상 포함하는 코팅.

청구항 20

청구항 1 내지 청구항 19 중 어느 한 항에 있어서,

단층 또는 다층 코팅인 코팅.

청구항 21

혈관 장치에 대한 부착을 위한 청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 생체모방 펩타이드의 용도.

청구항 22

혈관의 내피화를 촉진하거나, 신생내막 성장을 방지하거나 또는 표적 혈관에 혈관 장치를 통합하기 위한 청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 생체모방 펩타이드의 용도.

청구항 23

혈관 장치의 생체적합성을 개선하기 위한 청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 생체모방 펩타이드의 용도.

청구항 24

스텐트 삽입된 세그먼트에 회복된 내피 항염증 및 항혈전 특성을 부여하기 위한 청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 생체모방 펩타이드의 용도.

청구항 25

스텐트 삽입된 세그먼트에 기능적 특성의 회복을 허용하는 개선된 적응성 재형성을 부여하기 위한 청구항 1 내지 청구항 13 중 어느 한 항에 따른 생체모방 펩타이드의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 의료 분야에서의 용도, 특히 이식형 의료 장치의 통합 및 성능을 향상시키는 용도를 발견한다.

배 경 기 술

[0002] 잠재적으로 환자에게 예상치 못한 위험을 초래하는, 의료 장치의 이식에 대한 생체 조직의 반응을 방지하려면 의료 장치의 생체적합성을 개선하기 위한 전략이 필요하다.

[0003] "이물질 반응"은 이식 부위의 조직 손상으로 인해 발생하며 비생체적합성 물질이 혈액과 접촉하여 개시된다.

[0004] 혈소판의 부착 및 활성화에 이어 염증 세포가 동원되면 만성 염증 및 육아종성 조직의 형성을 특징으로 하는 비정상적인 상처 치유 순서가 이어진다.

[0005] 손상이 발생하면, 내피 장벽이 중단되어 혈소판이 활성화되어 손상을 봉쇄하고, 백혈구가 침투하여 잔해물을 제거하고 조직 재생을 위한 부위를 준비한다.

[0006] 그러나 의료 장치는 없앨 수 없다.

[0007] 결과적으로, 즉각적인 내피화가 없으면, 이식 부위에서 백혈구 및 혈소판의 강한 활성화가 존재한다.

[0008] 과도한 혈소판 부착 및 응집은 혈류 장애(허혈)를 유발할 수 있는 반면, 활성화된 혈소판 및 백혈구에 의해 방출된 프로테아제는 혈관벽의 파열(출혈)로 이어질 수 있다.

[0009] 그러한 상태 중 하나는 신체에 이물질로 보이는 심장 판막 및 혈관 장치의 존재로 인해 촉발된다.

[0010] 이는 심각한 심혈관 병태의 예방 및 치료를 위한 판막 및 혈관 장치의 사용을 방해하였으며 현재도 방해하고 있다.

[0011] CD31은 혈소판, 백혈구, 및 내피 세포(EC)에서 구성적으로 그리고 독점적으로 발현되는 막관통 당단백질이다. 건강한 조건에서, 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 상호작용은 내피 세포, 혈소판, 및 백혈구에 의한 "자기" 인식

을 허용하여 부적절한 활성화를 방지한다.

[0012] 혈액 접촉 이식형 장치의 유리한 문제는 표면을 "생체적합성"으로 만들어 그 위에 기능적 내피층을 신속하게 형성하고 생체 재료의 적절한 통합을 보장하는 처리를 통해 달성될 수 있다.

[0013] 건강한 내피에 의한 CD31의 풍부한 발현은 순환계 및 혈관화된 조직의 항상성 유지에 필수적인 역할을 한다.

[0014] Cortese 등(Stroke, 2021년 2월)은 CD31 모방 펩타이드 P8RI(kwpalfvr)의 고정화가 혈액 성분 반응을 감소시키고, 시험관 내에서 내피 세포의 부착을 증가시키며 생체 내 혈관 내 장치의 통합을 향상시킨다는 것을 개시한다.

[0015] Diaz-Rodriguez 등(EHJ, 2021)은 P8RI라고 불리는 가용성 펩타이드가 CD31 작용제처럼 작용함을 개시한다; 따라서, 내피 세포 및 혈액 요소의 시험관 내 부착 및 생체 내 내피 지지대 커버리지 및 이물질 신체 반응에 의해 구동되는 신생내막 성장에 대한 CD31 모방 금속 스텐트 코팅의 효과가 연구되었다.

[0016] CD31은 막 원위 N-말단부터 시작하여 번호가 매겨진 6개의 세포외 Ig 유사 도메인, 짧은 막관통 단편, 및 세포질 꼬리로 구성된 I형 막관통 당단백질이다.

[0017] CD31의 결합은 첫 번째 세포 A에 의해 발현되는 분자의 도메인 1 및 2 그리고 상호작용 세포 B에 의해 발현되는 동일한 도메인 사이의 트랜스-동종친화성 상호작용에 따라 달라진다.

[0018] 보다 구체적으로, 상호작용 도메인 1 및 2(각각 "IgL1" 및 "IgL2"라고 함)에 따르면, 이는 디술파이드 결합을 형성하는 한 쌍의 시스테인에 의해 고정된 역평행 β-가닥을 보유하는 2개 층의 β-시트로 구성된 고전적인 Ig 도메인 형태를 채택한다.

[0019] 2개의 상호작용 세포의 CD31 분자 사이의 트랜스-동종친화성 상호작용시, CD31 이량체 계면은 소수성 및 친수성 상호작용을 포함한다.

[0020] 트랜스-동종친화성 상호작용 CD31 분자의 2개의 IgL1-2 단편은 하나의 β 시트의 측면과 대면 역평행 패턴으로 서로 패킹된다(IgL1은 반대편 단량체의 IgL2와 상호작용한다).

[0021] 결정 구조에는 2개의 상호 작용 표면이 존재하는데, 하나는 사슬 A의 IgL1(IgL1-A, 즉 첫 번째 세포 A의 CD31 분자의 IgL1 도메인)과 사슬 B의 IgL2(IgL2-B, 즉 상호작용 세포 B의 CD31 분자의 IgL2 도메인) 사이에 있고, 다른 하나는 사슬 A의 IgL2(IgL2-A, 즉 첫 번째 세포 A의 CD31 분자의 IgL2 도메인)와 사슬 B의 IgL1(IgL1-B, 즉 상호작용 세포 B의 CD31 분자의 IgL1 도메인) 사이에 있다.

[0022] CD31 도메인 1 및 2의 트랜스-동종친화성 상호작용은 막관통 및 막근접 세포외 서열의 측면 변위 및 강한 시스-동종친화성 상호작용에 의해 분자의 클러스터화를 구동한다.

[0023] 이 시스-동종친화성 상호작용은 세포 활성화 부위에서 발생하며 CD31 단백질이 자가인산화를 할 수 없기 때문에 CD31의 조절 기능을 허용하는 데 필수적이다.

[0024] CD31 인산화는 활성화된 티로신 키나제 수용체에 근접하여 클러스터링된 상태로 유지되는 분자의 능력에 따라 달라진다.

[0025] 세포 활성화시, 세포막 프로테아제의 활성화는 CD31 단백질의 세포외 부분의 대부분의 절단 및 탈락(shedding)을 구동한다.

[0026] CD31 탈락은, 트랜스-동종친화성 부분(도메인 1 및 2 사이로 구성됨)이 손실되어 CD31의 클러스터가 용해되기 때문에, 분자의 트랜스-동종친화성 결합을 무효화한다.

[0027] P8RI 서열에 포함된 아미노산은 CD31의 시스-동종친화성 막근접 부분에서 흘러나온다. P8RI는 이 서열과 공동 클러스터를 이루고 염증 또는 혈전증 부위의 활성화된 내피 세포, 혈소판 및 백혈구에서 절단된 CD31 분자의 조절 신호 특성을 유지한다.

발명의 내용

[0028] **발명의 요약**

[0029] 본 특허 출원의 발명자들은 놀랍게도 트랜스-동종친화성(도메인 1 및 2) CD31-CD31 세포간 상호작용을 모방하는 특성을 부여받은 일부 펩타이드를 발견하였다.

[0030] **발명의 목적**

[0031] 첫 번째 목적에 따르면, 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방하는 특성을 갖는 펩타이드가 개시된다.

[0032] 바람직한 측면에 따르면, 상기 펩타이드는 세 가지 상이한 일반 구조를 가질 수 있다.

[0033] 다른 측면에 따르면, 상기 펩타이드의 유도체가 개시된다.

[0034] 두 번째 목적에 따르면, 개시된 펩타이드 또는 펩타이드 유도체의 의학적 용도가 개시된다.

[0035] 바람직한 측면에 따르면, 의학적 용도는 심장 및 혈관 병리를 치료하기 위한 의료 장치의 이식과 관련된 합병증을 예방하기 위한 것이다.

[0036] 또 다른 바람직한 측면에 따르면, 의학적 용도는 심장 혈관 병리의 치료를 위한 것이다.

[0037] 본 발명의 세 번째 목적에 따르면, 개시된 생체모방 펩타이드를 포함하는 코팅이 개시된다.

[0038] 본 발명의 네 번째 목적에 따르면, 개시된 생체모방 펩타이드를 포함하는 코팅의 제조 방법이 개시된다.

[0039] 다섯 번째 목적에 따르면, 본 발명의 펩타이드 또는 코팅으로 코팅된 부분을 포함하는 장치가 개시된다.

[0040] 여섯 번째 목적에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드의 사용을 포함하는 혈관 병리의 예방, 치료 또는 진단 방법이 개시된다.

[0041] 이러한 용도는 본 발명에 따른 펩타이드로 코팅된 장치의 이식을 포함할 수 있다.

[0042] 또 다른 목적에 따르면, 장치 표면에 대한 부착을 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0043] 일 구현예에 따르면, 혈관 장치에 대한 부착을 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0044] 추가적인 목적에 따르면, 동맥 혈관의 내피화를 촉진하고, 신생내막 성장을 방지하고 및 표적 혈관에 장치를 통합하기 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1A 및 1B는 옥타-펩타이드 P8RI의 구조를 보여준다.

도 2는 인간 내피 세포와 상호작용하는 니티놀 디스크의 생체적합성을 분석하는 데 사용되는 전략을 보여준다.

도 3은 베어(bare) 및 코팅된 디스크에서 성장한 HAEC의 F-액틴 염색의 대표적인 이미지 및 정량화를 보여준다.

도 4는 베어 및 코팅된 디스크에서 성장한 HAEC의 CD31 염색의 대표적인 이미지 및 정량화를 보여준다.

도 5는 코팅된 vs 베어 대조군 니티놀 디스크에서 성장한 HAEC에 대한 F-액틴 및 CD31 발현의 정량적 분석을 보여준다.

도 6은 CD31 및 F-액틴 발현 사이의 비율을 보여준다.

도 7 내지 17은 본 발명의 바람직한 펩타이드의 구조를 보여준다.

도 18은 중간체 A의 구조를 보여준다.

도 19는 중간체 B의 구조를 보여준다.

도 20은 중간체 C의 구조를 보여준다.

도 21은 본 발명에 따른 링커의 구조를 보여준다.

도 22는 상이한 그룹에 속하는 본 발명의 펩타이드의 기능 점수 결과를 보여준다.

도 23은 상이한 그룹에 속하는 본 발명의 펩타이드의 기능 점수 결과를 나타내는 그래프를 보여준다.

도 24는 상이한 그룹에 속하는 본 발명의 펩타이드의 생체모방 성능을 나타내는 그래프를 보여준다.

도 25는 CD31 및 F-액틴 발현 사이의 비율을 보여준다.

도 26은 eG™ NTMA 필름의 적외선 스펙트럼을 보여준다.

도 27은 베어 표면 및 eG™ NTMA 표면 상의 물방울의 모양을 보여준다.

도 28은 eG NTMA 대 SP1072 펩타이드 코팅을 이용한, CFD 스텐트 이식 7일 후의 SEM 단면을 보여준다.

도 29는 eG NTMA 대 SP1072 펩타이드 코팅을 이용한, CFD 스텐트 이식 7일 후의 SEM 단면의 조직병리학적 분석을 보여준다.

도 30은 SP1072 펩타이드 코팅을 이용한, CFD 스텐트 이식 60일 후의 SEM 단면의 조직병리학적 분석을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] *정의*

[0047] 본 발명의 목적을 위해, 용어 "생체모방"은 자연적 효과를 모방하는 것으로 의도된다.

[0048] 본 발명 내에서, 생체모방 펩타이드에는 내피, 즉 혈관의 내부 벽, 특히 동맥의 내부 벽을 코팅하는 내피 세포(EC) 층의 자연적 효과를 모방하는 특성이 부여된다.

[0049] 특히, 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 세포간 상호작용에 의해 제공되는 건강한 조건 하에서의 내피의 자연적 효과가 모방된다.

[0050] 보다 구체적으로, 상기 모방 활성은 내피 세포(EC), 혈소판 세포(순환 혈소판 세포) 및 백혈구를 활성화하지 않는 효과를 갖는다.

[0051] 상기 모방 특성은 또한 본 발명의 펩타이드로 덮인 표면에 제공될 수 있다.

[0052] 본 특허 출원의 목적을 위해, 본 발명의 펩타이드는 트랜스-동종친화성 CD31-CD31 도메인 1 및 2 세포간 상호작용을 모방한다.

[0053] "동종친화성 상호작용"은 동일한 분자 사이의 상호작용으로 의도되어야 하고, 이는 본 발명의 목적을 위해, 2개의 CD31 분자의 상호작용으로 의도되어야 하며, 이들 각각은 각각 하나의 세포 및 상호작용 세포에 의해 발현된다.

[0054] 보다 구체적으로, 각각의 CD31 분자 내에서, 상호작용은 세포외 도메인 1 및 도메인 2를 통해 발생한다.

[0055] 제1 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 그룹 I로서 지칭된다.

[0056] 바람직한 구현예에서, 그룹 I 펩타이드는 His71-Ser87에 상응하는 인간 CD31 IgL1의 영역 또는 오르토로그(ortholog) 포유동물 CD31 분자의 상응하는 영역에 걸쳐 있고; 대안적으로, 펩타이드는 Gln70-Lys89에 상응하는 인간 CD31 IgL1의 영역 또는 오르토로그 포유동물 CD31 분자의 상응하는 영역에 걸쳐 있다. 오르토로그 포유동물 CD31 분자의 아미노산 서열은 다음에서 이용가능한 NCBI 오르토로그 데이터베이스 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175/ortholog/?scope=40674에서 얻을 수 있다. 이후 상응하는 영역은 관심있는 CD31 오르토로그 아미노산 서열과 인간 CD31 아미노산 서열의 정렬에 기초하여 숙련된 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0057] 일 구현예에서, 그룹 I 펩타이드는 디술파이드 결합 및 고리형 구조를 제공하는 돌연변이된 Gln70hCys 및 Met88hCys 호모시스테인을 포함한다.

[0058] 그룹 I 펩타이드는 다음 서열을 포함한다:

[0059]

QHXXLFYKDDXXFYNISSXX	서열번호 53

[0060] 본 발명의 목적을 위해, 상기 서열 내에서:

[0061] 1Q(즉, 서열번호 53에서 Q로서 지칭되는 위치 1의 잔기)는 Q, C, L, K, 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0062] 2H는 H, I, V, Q 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0063] 5L은 L, R, V, F 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

[0064] 9D는 D, E 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

[0065] 13F는 F, V, L 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

[0066] 14Y는 Y, H, R 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

[0067] 15N은 N 또는 D 중 어느 하나일 수 있고,

[0068] 16I는 I, V, T 또는 A 중 어느 하나일 수 있고,

[0069] 17S는 S 또는 T 중 어느 하나일 수 있고,

[0070] 18S는 S 또는 T 중 어느 하나일 수 있고,

[0071] 여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있다.

[0072] 공통 서열 서열번호 53은 2022년 12월 1일 NCBI 오르토로그 데이터베이스에서 얻은 포유동물 CD31 아미노산 서열의 다중 서열 정렬에서 인간 CD31의 아미노산 서열의 위치 70 내지 89에 해당하는 영역을 기반으로 한다. X 이외의 잔기는 포유동물의 오르토로그 CD31 아미노산 서열의 보존된 잔기에 해당한다. 잔기 X는 다중 정렬에서 매우 가변적인 위치에 해당한다.

[0073] 그룹 I의 펩타이드는 SP722, SP745, SP765, SP1374, SP1375를 포함한다.

[0074] 제2 측면에 따르면, 본 발명 모방체의 생체모방 펩타이드는 그룹 II로서 지칭된다.

[0075] 바람직한 구현예에서, 그룹 II 펩타이드는 Tyr107-Glu122에 상응하는 인간 CD31 IgL1의 영역 또는 오르토로그 포유동물 CD31 분자의 상응하는 영역에 걸쳐 있고; 대안적으로, 펩타이드는 106-124 aa에 상응하는 인간 CD31 IgL1의 영역 또는 오르토로그 포유동물 CD31 분자의 상응하는 영역에 걸쳐 있다.

[0076] 일 구현예에서, 돌연변이된 106hCys 및 124hCys 호모시스테인은 디술파이드 결합 및 고리형 구조를 제공한다.

[0077] 그룹 II 펩타이드는 다음 서열을 포함한다:

[0078]

YKSTVIXNNKEKTTXE	서열번호 54

[0079] 본 발명의 목적을 위해, 상기 서열 내에서:

[0080] 2K(즉, 서열번호 54에서 K로서 지칭되는 위치 2의 잔기)는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0081] 3S는 C 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

[0082] 4T는 T, R 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

[0083] 5V는 V 또는 A 중 어느 하나일 수 있고,

[0084] 6I는 I, K, V, L, T 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

[0085] 8N은 N, S 또는 D 중 어느 하나일 수 있고,

[0086] 9N은 N, S, K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0087] 11E는 E, Q, V, K 또는 M 중 어느 하나일 수 있고,

[0088] 12K는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0089] 13T는 T, A 또는 P 중 어느 하나일 수 있고,

[0090] 14T는 T 또는 S 중 어느 하나일 수 있고,

[0091] 16E는 E, A, Q 또는 D 어느 하나일 수 있고,

[0092] 여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있다.

[0093] 공통 서열 서열번호 54는 2022년 12월 1일 NCBI 오르토로그 데이터베이스에서 얻은 포유동물 CD31 아미노산 서열의 다중 서열 정렬에서 인간 CD31의 아미노산 서열의 위치 107 내지 122에 해당하는 영역을 기반으로 한다. X 이외의 잔기는 포유동물의 오르토로그 CD31 아미노산 서열의 보존된 잔기에 해당한다. 잔기 X는 다중 정렬에서 매우 가변적인 위치에 해당한다.

[0094] 그룹 II의 펩타이드는 SP1072, SP1376을 포함한다.

[0095] 제3 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 그룹 III으로서 지칭된다.

[0096] 바람직한 구현예에서, 그룹 III 펩타이드는 Pro133-Lys158에 상응하는 인간 CD31 IgL2의 영역 또는 오르토로그 포유동물 CD31 분자의 상응하는 영역에 걸쳐 있다.

[0097] 일 구현예에서, 그룹 III 펩타이드는 디술파이드 결합 및 고리형 구조를 제공하는 돌연변이된 Val135hCys 및 Cys152hCys를 포함한다.

[0098] 그룹 III 펩타이드는 다음 서열을 포함한다:

[0099]

PXCTLDKKEXIQGGXVXVNCSVPEEK	서열번호 55

[0100] 본 발명의 목적을 위해, 상기 서열 내에서:

[0101] 3C(즉, 서열번호 55에서 C로서 지칭되는 위치 3의 잔기)는 C, V, M 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

[0102] 4T는 T, I, M 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

[0103] 5L은 L 또는 V 중 어느 하나일 수 있고,

[0104] 6D는 D 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

[0105] 7K는 K 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0106] 8K는 K, T, M, R 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

[0107] 11I는 I, T, M, V 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

[0108] 12Q는 Q 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

[0109] 14G는 G 또는 E 중 어느 하나일 수 있고,

[0110] 16V는 V 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

[0111] 18V는 V 또는 I 중 어느 하나일 수 있고,

[0112] 19N은 N, T, R, S, G 또는 H 중 어느 하나일 수 있고,

[0113] 22V는 V, M 또는 L 중 어느 하나일 수 있고,

[0114] 23P는 P, Q, K, E, L 또는 R 중 어느 하나일 수 있고,

[0115] 24E는 E, G 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

[0116] 26K는 K, Q, E, R 또는 N 중 어느 하나일 수 있고,

[0117] 여기서, 서로 독립적으로 다른 아미노산 X는 임의의 다른 아미노산일 수 있다.

[0118] 공통 서열 서열번호 53은 2022년 12월 1일 NCBI 오르토로그 데이터베이스로부터 얻은 포유동물 CD31 아미노산 서열의 다중 서열 정렬에서 인간 CD31의 아미노산 서열의 위치 133 내지 158에 해당하는 영역을 기반으로 한다. X 이외의 잔기는 포유동물 오르토로그 CD31 아미노산 서열에서 보존된 잔기에 해당한다. 잔기 X는 다중 정렬에서 매우 가변적인 위치에 해당한다.

[0119] 그룹 III의 펩타이드는 SP1071, SP1380을 포함한다.

[0120] 제4 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 그룹 IVa로서 지칭된다.

[0121] 바람직한 구현예에서, 그룹 IVa 펩타이드는 a) 공유 결합된 그룹 II의 펩타이드 및 그룹 I의 펩타이드를 포함하는 이종이량체이다.

[0122] 그룹 IVa의 펩타이드는 SP1379를 포함한다.

[0123] 제5 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 그룹 IVb로서 지칭된다.

[0124] 바람직한 구현예에서, 그룹 IVb 펩타이드는 a) 공유 결합된 그룹 III의 펩타이드 및 그룹 I의 펩타이드를 포함

하는 이종이량체이다.

[0125] 그룹 IVb의 펩타이드는 SP1383을 포함한다.

[0126] 제1 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 다음 서열 IA를 기반으로 한다:

[0127]

HQMLFYKDDVLFYNISS	서열번호 4

[0128] 제2 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 다음 서열 IB를 기반으로 한다:

[0129]

YKSTVIVNNKEKTTAE	서열번호 5

[0130] 제3 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 다음 서열 IC를 기반으로 한다:

[0131]

PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK	서열번호 6

[0132] 본 발명의 목적을 위해, 생체모방 펩타이드에는 고리형 펩타이드도 포함되고; 특히, 시스테인 또는 호모시스테인을 포함하는 생체모방 펩타이드는 디술파이드 결합을 통해 고리형 형태로 존재할 수 있다.

[0133] 본 발명의 목적을 위해, 생체모방 펩타이드는 선택적으로 아미노산 서열로 표시되는, 링커 및/또는 스페이서 및/또는 꼬리를 포함할 수 있고; 특히, 상기 서열은 펩타이드 말단 또는 하나의 아미노산 잔기에 연결될 수 있다.

[0134] 특히 바람직한 구현예에서, 상기 아미노산 서열은 다음 서열로 표시될 수 있다:

[0135]

GGSGGSGG	서열번호 27

[0136] 본 발명의 목적을 위해, 생체모방 펩타이드는 또한 상기 기술된 펩타이드 서열 중 2개를 포함하는 헤테로펩타이드를 포함한다.

[0137] 특히, 헤테로펩타이드는 다음을 포함할 수 있다:

[0138] - 구조 IA에 기초한 서열을 갖는 펩타이드 및 구조 IB에 기초한 서열을 갖는 펩타이드, 또는

[0139] - 구조 IA에 기초한 서열을 갖는 펩타이드 및 구조 IC에 기초한 서열을 갖는 펩타이드.

[0140] 헤테로펩타이드는 서로 다른 서열의 아미노산 사이 또는 링커 및/또는 스페이서 사이에 아세틸 티오에테르 결합을 통해 연결된 펩타이드 서열을 포함할 수 있다.

[0141] 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 다음 서열을 기반으로 한다:

[0142]

아미노산 서열 (IA)	서열번호
HQMLFYKDDVLFYNISSC	7
SHQMLFYKDDVLFYNISSS	8
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK	9
CHQMLFYKDDVLFYNISSCK	10
YKDDVLFYNISSMKST	11
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	12
FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK	13
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	14
YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	15
HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV	16
LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF	17
PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK	18
QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	28
hC=호모시스테인	

[0143] 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 다음 서열을 기반으로 한다:

아미노산 서열 (IB)	서열번호
YKSTVIVNNKEKTTAE	19
DDVLFYNISSMK	20
QHQMLFY	21
CYKSTVIVNNKEKTTAEYC	22
hCYKSTVIVNNKEKTTAEYhC	23
GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ	24
hC=호모시스테인	

[0144]

[0145] 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 다음 구조를 기반으로 한다:

아미노산 서열 (IC)	서열번호
PRCTLDKKEAIQGGIVRVNCSVPEEK	25

[0146]

[0147] 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 다음 구조를 기반으로 한다:

아미노산 서열	서열번호
RDQNFVILEFP	26

[0148]

[0149] 특히 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 헤테로펩타이드는 다음 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 한다:

아미노산 서열	서열번호
GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ 및 QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	24 및 28 (서열번호 37 및 38)
PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK 및 QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK	6 및 28 (서열번호 39 및 40)

[0150]

[0151] 바람직한 측면에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 하기 변형 중 임의의 것을 포함할 수 있다:

[0152] - 시스테인 잔기는 상응하는 호모시스테인 잔기로 치환될 수 있고,

[0153] - L-아미노산은 상응하는 D-아미노산으로 치환될 수 있다.

[0154] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 다음으로부터 선택되는 스페이서 및/또는 링커 및/또는 꼬리를 포함할 수 있다:

GGSGGSGG	서열번호 27
하나 이상의 PEG4 유닛	
하나 이상의 Ttds 유닛	
KN_3	

[0155]

[0156] 및 이들의 조합, 예컨대 예를 들어:

$K(N_3)(Ttds)_4$
$(Ttds)_2$-$K(N_3)$
$(Ttds)_4$-$K(N_3)$
$K(N_3)$GGSGGSGG

[0157]

[0158] 본 발명의 목적을 위해, 상기 개시된 구조는 C-말단 및/또는 N-말단에서의 변형을 포함할 수 있다.

[0159] 특히, 상기 변형은 다음을 포함할 수 있다:

Ac-
Br-CH_2-CO-
CH_2-CO-
CH_2-$CONH_2$-
Ac-KN_3
-NH_2
-CO-NH_2

[0160]

[0161] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 하기의 생체모방 펩타이드가 개시된다:

[0162]

아미노산 서열	서열번호	Ref (SP)
QHQMLFYCDDVLFYNISSMK-$CONH_2$	1	Int. A
($BrCH_2CO$-GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)$_4$-K(N_3)-NH_2)	2	Int. B
Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K($BrCH_2CO$)-$CONH_2$	3	Int. C
Ac-c*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	29	722
SHQMLFYKDDVLFYNISSS-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	30	745
Ac-KKKc*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	31	765
QHQMLFYKDDVLFYNISSMK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	32	1375
hCHQMLFYKDDVLFYNISShCK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	33	1374
YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N_3)-$CONH_2$	34	1072
Ac-K(N_3)-PEG4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-$CONH_2$	35	1071
Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRhCTLDKKEAIQGGIVRVNhCSVPEEK-$CONH_2$	36	1380
[#CH_2CONH_2GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)$_4$-K(N_3)-NH_2]-[QHQMLFYhC#DDVLFYNISSMK-$CONH_2$]	37 및 38	1379
[Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K# (CH_2CO)-$CONH_2$]-[QHQMLFYhC#DDVLFYNISSMK-$CONH_2$]	39 및 40	1383

Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKST-NH_2	41	547
Ac-YKDDVLFYNISSMKST-GGSGGSGG-K(N_3)-NH_2	42	548
Ac-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK(GGSGGSGG-K(N_3))STESYFI-$CONH_2$	43	724
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-FADVSTTSHVKPQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYK-$CONH_2$	44	732
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTV-$CONH_2$	45	723
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-$CONH_2$	46	746
Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-HQMLFYKDDVLFYNISSMKSTESYFIPEVRIYDSGTYKSTVIV-$CONH_2$	47	747
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$	48	762
Ac-LFYKDDVLFYNISSMKSTESYF-Ttds-Ttds-K(N_3)-$CONH_2$	49	763
Ac-PQHQMLFYKDDVLFYNISSMK(GGSGGSGG-K(N_3))STESYFIKK-$CONH_2$	50	766
RDQNFVILEFP-PEG4-K(N_3)-NH_2	51	1070
여기서 hC:호모시스테인; c: D-시스테인; **고리형 펩타이드의 디술파이드 가교 형성을 위한 위치 #아세틸 티오에테르 결합		

[0163]

[0164] 본 발명의 목적을 위해, 본 발명의 생체모방 펩타이드는 상기 개시된 구조 중 어느 하나와 적어도 95% 동일성, 바람직하게는 적어도 97%, 더욱 더 바람직하게는 적어도 99% 동일성을 갖는 펩타이드를 포함한다. 본 발명의 개시내용의 문맥과 관련하여 언급된 동일성 백분율은 비교될 서열의 최적의 전체 정렬 후에 결정되며, 따라서 최적의 전체 정렬은 하나 이상의 삽입, 삭제, 절단 및/또는 치환을 포함할 수 있다. 정렬은 전역적이고, 이는 전체 길이에 걸쳐 전체로서 비교될 서열을 포함함을 의미한다. 정렬은 "최적"이고, 이는 삽입, 삭제, 절단 및/또는 치환 횟수가 가능한 한 적게 이루어짐을 의미한다. 최적의 전체 정렬이 수행될 수 있고 본 기술분야의 숙련된 기술자에게 널리 공지된 임의의 서열 분석 방법을 사용하여 동일성 백분율을 계산할 수 있다. 수동 비교 외에도, Needleman 및 Wunsch(1970)의 알고리즘을 사용하여 전체 정렬을 결정하는 것이 가능하다. 뉴클레오티드 서열의 경우, 서열 비교는 Needle 소프트웨어와 같이 본 기술분야의 숙련된 기술자에게 잘 알려진 임의의 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 사용되는 매개변수는 특히 다음과 같을 수 있다: 10.0과 동일한 "Gap open", 0.5와 동일한 "Gap extend", 및 EDNAFULL 매트릭스(NCBI EMBOSS 버전 NUC4.4). 아미노산 서열의 경우, 서열 비교는 Needle 소프트웨어와 같이 본 기술분야의 숙련된 기술자에게 잘 알려진 임의의 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 사용되는 매개변수는 특히 다음과 같을 수 있다: 10.0과 동일한 "Gap open", 0.5와 동일한 "Gap extend", 및 BLOSUM62 매트릭스.

[0165] 두 번째 목적에 따르면, 개시된 펩타이드의 의학적 용도가 개시된다.

[0166] 바람직한 측면에 따르면, 의학적 용도는 혈관 병리의 예방을 위한 것이다.

[0167] 이러한 의학적 용도는 본 발명에 따른 펩타이드로 코팅된 장치의 이식을 포함할 수 있다.

[0168] 특히, 본 발명에 따르면, 상기 병리는 심장 판막 병리, 죽상경화증, 혈전증, 허혈, 출혈, 재발협착증, 동맥류를 포함하는 군으로부터 선택된다.

[0169] 상기한 바에 더하여, 스텐트 내 협착증으로 대표되는 병리학적 상태를 예방하기 위한 의학적 용도가 개시된다.

[0170] 또 다른 바람직한 측면에 따르면, 의학적 용도는 혈관 병리의 치료를 위한 것이다.

[0171] 상기 의학적 용도는 인간뿐만 아니라 수의학 분야에서 동물에 대해서도 개시된다.

[0172] 본 발명의 세 번째 목적에 따르면, 개시된 생체모방 펩타이드를 포함하는 코팅이 개시된다.

[0173] 본 발명의 구현예에 따르면, 코팅은 단층 코팅인 반면, 본 발명의 대안적인 구현예에 따르면 이는 다층 코팅이다.

[0174] 본 발명의 네 번째 목적에 따르면, 개시된 생체모방 펩타이드를 포함하는 코팅의 제조 방법이 개시된다.

[0175] 본 발명의 목적을 위해, 장치 또는 그의 일부의 코팅은 코팅조 내에 코팅될 부분을 침지시킴으로써, 딥-코팅으로 수득될 수 있다.

[0176] 표면을 작용화하는 잘 알려진 방법은 클릭 화학이며, 예를 들어 US 2018/0296732, WO 2020/109836 또는 WO 2021/239905에 개시되어 있다.

[0177] 무동 클릭 화학은 디아릴시클로옥틴 모이어티(DBCO, 아자디벤조시클로옥틴의 경우 ADIBO 또는 디벤조아자시클로옥틴의 경우 DIBAC로도 알려짐)와 스트레인 촉진 알킨 아지드 고리첨가(SPAAC)로 알려진 아지드 표지 반응 파트너의 반응을 기반으로 한다. 이 클릭 화학은 실온에서 매우 빠르고 Cu(I) 촉매가 필요없다. 디아릴시클로옥틴은 아지드에 대한 매우 좁고 특정한 반응성을 가지고 열안정성이 있으므로, 안정적인 트리아졸을 거의 정량적으로 얻을 수 있다. 반응은 수성 완충 매질에서 수행될 수 있다.

[0178] 바람직한 구현예에 따르면, 이 방법은 다음을 포함하는 세 단계 딥-코팅 방법이다:

[0179] - 폴리도파민 코팅을 위한 제1 단계,

[0180] - 적합한 링커를 그래프팅하는 제2 단계, 및

[0181] - 본 발명의 펩타이드로 코팅하는 제3 단계.

[0182] 제1 단계는 도파민으로부터 폴리도파민 코팅된 표면을 수득하기 위해, 장치의 표면 또는 그의 일부의 표면 상에 폴리도파민 층의 코팅을 실현하는 것을 나타낸다.

[0183] 도파민은 여러 종류의 기질에서 매우 부착력이 좋은 필름으로 자가 중합되는 것으로 알려져 있다. 폴리도파민(이하 PDA)은 도파민의 산화에 의해 형성된 자가조립 중합체이다. 실제로, PDA는 도파민, 인돌, 및 피롤 단위를 함유한다. 다양한 반응성 기로 인해, PDA는 기질 작용화, 특히 생리활성 분자 고정화에 대한 여러 가능성을 제공하는 것으로 알려져 있다. PDA 코팅은 도파민의 염, 특히 도파민 염산염 또는 도파민 암모니아를 포함하는 용액에 장치 또는 그의 일부를 담금으로써 수행될 수 있다. 용액은 수용액, 알코올 용액 또는 수성 알코올일 수 있다. 장치가 물에 민감한 경우(예를 들어 부식), 용액의 용매는 바람직하게는 알코올, 특히 무수 에탄올이다. 장치는 도파민 용액에 침지하기 전에 예를 들어 불화수소산과 같은 강산으로 에칭함으로써 사전 처리될 수 있다.

[0184] 마지막에는, 코팅되지 않은 폴리도파민 또는 PDA 집합체를 제거하기 위해 헹굼 단계 및/또는 초음파 처리 단계가 수행될 수 있다. 헹굼 단계는 탈염수 또는 알코올을 이용하여 수행될 수 있다.

[0185] 제2 단계는 후속적으로 관심있는 펩타이드를 그래프팅하기 위해 폴리도파민 코팅에 링커를 고정시키는 것에 해당한다. 생체모방 펩타이드의 고정을 허용하는 임의의 링커가 사용될 수 있다. 이를 위해, 폴리도파민 코팅 상에 링커 필름을 형성하기 위해, 앞서 제1 단계에서 얻은 폴리도파민 코팅을 임의의 적합한 수단에 의해 링커 용액과 접촉시킨다.

[0186] 링커는 임의의 적합한 이작용성 시약이다. 링커는 바람직하게는 생물 직교적이다(bio orthogonal).

[0187] 링커는 바람직하게는 상기 개시된 바와 같이 클릭 화학에 적합하다. 따라서, 링커는 유리 삼중 결합, 바람직하게는 시클로옥틴 모이어티, 더 바람직하게는 DBCO와 같은 디아릴시클로옥틴 모이어티를 포함한다. 삼중 결합은 펩타이드의 아지드 기와 반응할 수 있다. 링커는 유리하게는 폴리도파민 코팅에 대해 반응성인 아민 및/또는 티올 작용기로 추가로 작용화된다.

[0188] 물뿐만 아니라 일반적으로 사용되는 적당한 극성의 유기 용매에 대한 용해도를 향상시키기 위해, 링커는 스페이서를 포함하는 것이 바람직하다. 이 스페이서는 바람직하게는 중합체 또는 올리고머이다. 사용될 수 있는 중합

체 또는 올리고머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리락테이트, 폴리락트산, 당, 지질, 폴리글루탐산(PGA), 폴리글리콜산, 폴리(락틱-코-글리콜산)(PLGA), 폴리비닐 아세테이트(PVA), 및 이들의 조합을 포함한다. PEG가 특히 바람직하다. 구체적으로, PEG4 친수성 스페이서는 응집 또는 침전 문제를 감소시키거나 제거하는 것으로 알려져 있다.

[0189] 시클로옥틴 PEG의 예는 DBCO-술포-PEG4-NH_2와 같은 DBCO-PEG4-아민과 같은, DBCO-PEG 유도체이다.

[0190] PDA 코팅의 표면에 고정되지 않은 링커를 제거하기 위해 바람직하게는 헹굼 단계를 수행한다. 헹굼 단계는 탈염수 및/또는 알코올을 사용하여 수행될 수 있다.

[0191] 제3 단계는 적합한 링커를 사용하여 변형된 폴리도파민 코팅 장치에 생체모방 펩타이드를 그래프팅하는 것을 포함한다. 이러한 목적을 위해, 펩타이드는 바람직하게는 유리 삼중 결합과 같은 링커의 작용기와 반응할 수 있는 아지드기와 같은 작용기를 포함한다.

[0192] 제2 단계 후에 얻은 장치, 또는 그의 일부는 장치에 그래프팅시키기 위해 특정 작용기를 포함하는 생체모방 펩타이드와 임의의 적합한 수단에 의해 접촉된다. 그래프팅은 생체모방 펩타이드를 포함하는 수용액에 장치 또는 그의 일부를 담금으로써 수행될 수 있다. 반응은 실온에서 수행될 수 있다.

[0193] 본 발명의 다섯 번째 목적에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드 또는 코팅으로 코팅된 부분을 포함하는 장치가 개시된다.

[0194] 코팅은 장치의 전체 표면 또는 장치의 일부의 표면을 포함할 수 있다.

[0195] 본 발명의 목적을 위해, 본 발명의 생체모방 펩타이드로 완전히 또는 부분적으로 덮일 수 있는 장치는 다음을 포함한다: 관상동맥 스텐트, 흐름 전환 스텐트, 대동맥관, 심장 판막, 풍선 확장형 스텐트, 자가 확장형 스캐폴드, 그래프트 스텐트의 중합체 튜브, 흐름 전환 메쉬, 대동맥관, 심장 판막, 스텐트 회수기, 트랜스카테터 승모판 장치, 카테터, 리플렛(leaflet) 또는 그의 임의의 일부, 및 제한된 시간 또는 장기간 동안 혈액과 접촉할 수 있는 일반적인 임의의 의료 장치.

[0196] 완전히 또는 부분적으로 코팅된 장치는 예를 들어 다음과 같은 임의의 적합한 물질일 수 있다:

[0197] - 금속 또는 합금: 스테인리스강, 코발트-크롬 합금, 백금-크롬 합금, 니켈-티타늄 합금(니티놀이라고도 함), 코발트-크롬-니켈 합금, 마그네슘 또는 마그네슘 합금 예컨대 JDBM, Mg-Nd-Zn-Zr 합금, Mg-Nd-Zn-Ca 합금, Mg-Zn-Y-Nd 합금, Mg-Al, Mg-AL-Zr, WE43, AZ31;

[0198] - 합성 중합체성 물질: PEBAX, PVP, PE, PP, Dacron®, Teflon®;

[0199] - 심장 판막 생체 인공 삽입물용 심낭 시트와 같은 임상 등급의 생물학적 조직.

[0200] 여섯 번째 목적에 따르면, 본 발명의 생체모방 펩타이드의 사용을 포함하는 심장 및 혈관 병리의 예방 또는 치료 방법이 개시된다.

[0201] 특정 측면에 따르면, 심장 및 혈관 병리의 예방 또는 치료를 위한 상기 방법은 본 발명의 코팅으로 완전히 또는 부분적으로 코팅된 장치의 사용을 포함한다. 특히, 장치는 풍선 장착형 스텐트, 심장 판막 생체 인공 삽입물, 흐름 전환기일 수 있고 상기 장치는 예를 들어 관상 동맥 및 말초 동맥 혈관 재생, 중재 신경학 및 심장 판막 이식과 같은 중재 심혈관 시술에 사용될 수 있다.

[0202] 특히, 표적 병리는 심장 판막 병리, 협착성 혈관 질환(동맥경화증, 특히 죽상동맥경화증을 포함함), 죽상혈전증, 허혈성 심장 및 말초 질환, 출혈 위험에 노출되는 혈관 재형성(remodeling), 재발협착증, 동맥류로 대표된다.

[0203] 상기한 바에 더하여, 스텐트 내 협착증으로 대표되는 병태를 예방하는 방법이 개시된다.

[0204] 혈액과 접촉하는 이물질의 존재와 관련된 병리학적 조직 재형성을 추진하는 초기 메커니즘 중 하나는 해당 이물질의 표면에 혈소판이 부착되어 백혈구의 동원 및 활성화를 촉발한 후 잠재적으로 혈액응고의 형성 및/또는 활성화된 혈소판 및 백혈구에 의해 방출된 수용성 인자에 반응하여 빠르게 증식하는 혈관 세포에 의한 이물질의 캡슐화로 이어지는 일련의 반응의 시작을 촉발하여, 결국 혈관 루멘의 감소, 예로서 (재발)협착증의 발생을 초래하는 것임이 잘 알려져 있다(예를 들어 Forrester et al., J Am Coll Cardiol., 17:758-769 (1991) 참조).

[0205] 이러한 이유로 심장 및 혈관 병리의 맥락에서 스텐트 및 판막 생체 인공 삽입물과 같은 의료 장치를 이식한 개

체에게 일반적으로 항혈소판 요법(아스피린 및/또는 항-P2Y12 요법, 예컨대 클로피도그렐, 티클로피딘, 티카그렐러, 또는 프라수그렐)이 스텐트 이식 후 최소 1개월에서 수개월 동안 투여된다. 두 가지 항혈소판 치료제 중 하나 이상을 종종 사용하는 것은 완전히 재내피화될 때까지 혈류에 노출된 스텐트와 접촉시 혈소판 활성화 위험을 제거하여 스텐트 혈전증의 위험을 제거하고 재발협착률을 제한하기 위한 것이다. 대부분의 경우, 아스피린 및 항-P2Y12 요법을 포함하는 이중 항혈소판 요법(DAPT)을 6개월 내지 12개월간 투여한다. 이러한 치료는 결국 환자를 출혈의 위험에 노출시키며, 이러한 관찰은 항혈소판 치료 기간 단축의 안전성을 평가하도록 촉발시켰다. DAPT를 30일로 단축하는 약물 용출 스텐트를 이용한 임상 시험이 현재 진행 중이다. DAPT가 필요한 기간이 끝나면, 항혈소판 치료는 일반적으로 아스피린을 단독으로 이용한 지속적인 요법(항-P2Y12 요법 없이)으로 구성된다.

[0206] 약물 용출 스텐트를 사용할 때, 인간에게 권장되는 아스피린(아세틸-살리실산 또는 그의 염) 용량은 50 내지 100 mg/일, 예컨대 75 mg/일이다. 항-P2Y12 제제와 관련하여, 인간에게 권장되는 용량은 사용되는 특정 항-P2Y12 제제에 따라 다르다. 클로피도그렐의 권장 용량은 50 내지 100 mg/일, 특히 75 mg/일(일반적으로 1일 1회 75 mg)이다. 티클로피딘의 권장 용량은 200 내지 300 mg/일, 특히 250 mg/일(일반적으로 1일 1회 250 mg)이다. 티카그렐러의 권장 용량은 160 내지 200 mg/일, 특히 180 mg/일(일반적으로 1일 2회 90 mg)이다. 그리고 프라수그렐의 권장 용량은 5 내지 20 mg/일, 특히 10 mg/일(일반적으로 1일 1회 10 mg)이다.

[0207] 그러나, 항혈소판 요법은 모든 개체에서의 심각한 부작용 및 어려움(주로 출혈)의 위험과 관련될 수 있고, 혈우병 A(인자 VIII 결핍증), 혈우병 B(인자 IX 결핍증), 폰 빌레브란트병, 및 I, II, V, VII, X, XI, XII 및 XIII을 포함한 희귀 인자 결핍증과 같은 출혈 장애를 앓고 있는 개체에게는 더 많은 위험이 있을 수 있다. 특히, 항-P2Y12 제제는 매우 강력한 분자로 특별한 이유 없이 몸 전체에 멍을 유발하는 경향이 있다. 더욱이, 중재 시 관리할 수 없는 출혈의 임의의 위험을 피하기 위해 어떠한 치과의사, 위장병 전문의, 또는 외과의사도 항-P2Y12 요법을 받는 동안 환자를 만지는 것을 원하지 않을 것이다. 일부 경우, 일반적으로 중재를 필요로 하는 심혈관 이외의 일부 질병에 대한 중재를 방해하므로 이는 심각한 문제가 될 수 있다. 이 분자는 또한 설사, 가려움증, 메스꺼움, 피부 발진, 및 위 통증을 포함한 주목할만한 부작용을 가지고 있다.

[0208] 본 발명에 따른 의료 장치에 대한 CD31 유래 펩타이드로 구성된 코팅의 생리학적, 비활성화된, 내피 조직 모방 특성을 기반으로, 장치와 접촉해 들어가는 혈소판의 초기 부착/활성화는 예방되거나 크게 감소되어, 일반적으로 상기 장치의 이식 후에 수행되는 항혈소판 치료가 불필요해지거나 최소한 보다 낮은 용량으로 감소되고 및/또는 평소보다 더 짧은 기간 동안 투여된다.

[0209] 따라서, 심장 및 혈관 병리(심장 판막 병리, 죽상동맥경화증, 죽상혈전증, 허혈, 출혈, 재발협착증, 동맥류를 포함함)의 예방 또는 치료를 위한 임의의 방법 또는 본 발명에 따른 의료 장치를 이식한 후 스텐트 내 협착증으로 대표되는 병태의 예방을 위한 임의의 방법에 있어서, 수용자 개체는 바람직하게는:

[0210] a) 항-P2Y12 요법을 받지 않거나(개체는 임의의 항혈소판 요법을 받지 않을 수도 있음).

[0211] b) 전통적인 이중 항혈소판 요법(DAPT) 내에서 약물 용출 스텐트에 권장되는 것보다 상당히 더 낮은 용량(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배...)의 항-P2Y12 요법을 시행하거나(및 선택적으로 또한 상당히 더 낮은, 예컨대 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배... 낮은 용량의 아스피린);

[0212] c) 전통적인 이중 항혈소판 요법(DAPT) 내에서 약물 용출 스텐트에 권장되는 것보다 훨씬 더 짧은(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배... 더 짧은) 기간 동안 항-P2Y12 요법을 시행하거나(및 선택적으로 아스피린); 또는

[0213] d) b) 및 c)의 임의의 조합.

[0214] 상기 a) 내지 d) 항목은 모두 의료 장치(특히 스텐트)의 이식 후 치료에만 관련되고, 임상 권장사항에 따라 의사가 선택하는 의료 장치의 이식 중에 투여될 수 있는 약물에는 관련되지 않는다.

[0215] 상기 b), c) 및 d) 항목에서, "약물 용출 스텐트" 또는 "DES"는 시롤리무스와 같은 평활근 세포(SMC)의 증식을 억제하는 약물을 천천히 방출하는 스텐트를 지칭한다. 상업적으로 이용가능한 약물 용출 스텐트의 예는 HT Supreme®, Xience V®, Promus®, Cypher®, Taxus®, 및 Endeavour®를 포함한다.

[0216] 상기 b) 항목에서, 본 발명에 따른 의료 장치가 이식된 개체는 이식 후 전통적인 이중 항혈소판 요법(DAPT) 내에서 약물 용출 스텐트에 권장되는 것보다 상당히 더 낮은 용량(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배...)의 항-P2Y12 요법을 시행한다; 특히, 이식 후 개체는 다음을 복용할 수 있다:

[0217] o 50 mg/일 미만, 바람직하게는 40 mg/일 미만, 35 mg/일 미만, 30 mg/일 미만, 25 mg/일 미만 또는 심지어 20

mg/일 미만의 클로피도그렐,

[0218] o 200 mg/일 미만, 바람직하게는 175 mg/일 미만, 150 mg/일 미만, 125 mg/일 미만, 또는 심지어 100 mg/일 미만의 티클로피딘,

[0219] o 160 mg/일 미만, 바람직하게는 150 mg/일 미만, 140 mg/일 미만, 130 mg/일 미만, 120 mg/일 미만, 110 mg/일 미만, 100 mg/일 미만, 90 mg/일 미만 또는 심지어 80 mg/일 미만의 티카그렐러(일반적으로 일일 용량의 절반을 1일 2회 복용), 또는

[0220] o 5 mg/일 미만, 바람직하게는 4 mg/일 미만, 3 mg/일 미만, 2.5 mg/일 미만, 또는 심지어 2 mg/일 미만의 프라수그렐.

[0221] 개체는 이식 후 상당히 더 낮은 용량(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배 …)의 아스피린을 추가로 복용할 수 있다. 예를 들어, 개체는 50 mg/일 미만, 바람직하게는 40 mg/일 미만, 35 mg/일 미만, 30 mg/일 미만, 25 mg/일 미만 또는 심지어 20 mg/일 미만의 아스피린을 복용할 수 있다.

[0222] 상기 c) 항목에서, 본 발명에 따른 의료 장치가 이식된 개체는 이식 후 약물 용출 스텐트에 권장되는 것보다 훨씬 더 짧은(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배... 더 짧은) 기간 동안 항-P2Y12 요법을 시행한다. 개체는 이식 후 약물 용출 스텐트에 권장되는 것보다 훨씬 더 짧은(예로서, 최소 2배, 최소 3배, 최소 4배,… 더 짧은) 기간 동안 아스피린을 추가로 복용할 수 있다.

[0223] 예를 들어, 개체는 3개월 미만, 바람직하게는 2개월 미만, 1개월 미만, 또는 심지어 4주 미만, 3주 미만, 2주 미만 또는 1주 미만 동안 DAPT를 복용할 수 있다. 항혈소판 치료 기간이 더 짧다는 것은 개체가 특정 치료 기간 후에 항-P2Y12 요법을 완전히 중단한다는 것을 의미할 수도 있다.

[0224] 상기 d) 항목은 상기 b) 및 c) 항목의 임의의 조합이다.

[0225] 항혈소판 요법을 사용하지 않거나 적게 사용하는 이 개정된 프로토콜은 항혈소판 요법과 관련된 부작용(출혈 사건)을 예방하거나 강력하게 억제하므로 모든 개체에게 유용하다. 그러나 이는 혈우병 A(인자 VIII 결핍증), 혈우병 B(인자 IX 결핍증), 폰 빌레브란트병, 및 I, II, V, VII, X, XI, XII 및 XIII를 포함하는 희귀 인자 결핍증과 같은 출혈 장애가 있는 개체에게 특히 유용하다.

[0226] 상기 개시된 예방 또는 치료 방법은 인간 뿐만 아니라 수의학 분야의 동물에게도 개시된다.

[0227] 또 다른 목적에 따르면, 장치의 표면에 대한 부착을 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0228] 일 구현예에 따르면, 혈관 장치에 대한 부착을 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0229] 추가적인 목적에 따르면, 혈관의 내피화를 촉진하고, 신생내막 성장을 예방하고 표적 혈관에 장치를 통합하기 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0230] 특히, 표적 혈관은 관상동맥혈관, 말초동맥혈관 또는 뇌혈관으로 대표된다.

[0231] 또 다른 목적에 따르면, 장치의 생체적합성을 개선하기 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0232] 또 다른 목적에 따르면, 스텐트 삽입된 세그먼트에 회복된 내피 항염증 및 항혈전 특성을 부여하기 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0233] 또 다른 목적에 따르면, 스텐트 삽입된 세그먼트에 기능적 특성의 회복을 허용하는 개선된 적응성 재형성을 부여하기 위한 본 발명의 생체모방 펩타이드의 용도가 개시된다.

[0234] 본 발명은 다음의 비제한적인 실시예에서 추가로 개시될 것이다.

[0235] **실시예:**

[0236] 약어

[0237] 특정 약어가 실시예 및 본 명세서의 다른 곳에서 사용된다:

[0238] "AA"는 아미노산을 지칭하고;

[0239] "Alloc"은 알릴옥시카르보닐을 지칭하고;

[0240] "Boc"은 tert-부틸옥시카르보닐을 지칭하고;

[0241] "tBu"은 3차 부틸을 지칭하고;

[0242] "DCM"은 디클로로메탄을 지칭하고;

[0243] "DIC"는 N,N'-디이소프로필카르보디이미드를 지칭하고;

[0244] "DIPEA"는 N,N-디이소프로필에틸아민을 지칭하고,

[0245] "DMF"는 디메틸포름아미드를 지칭하고;

[0246] "Fmoc"은 플루오레닐메틸옥시카르보닐을 지칭하고;

[0247] "HOAt"는 1-히드록시-7-아자벤조트리아졸을 지칭하고;

[0248] "HPLC"는 고성능 액체 크로마토그래피를 지칭하고;

[0249] "LCMS"는 액체 크로마토그래피/질량 분석법을 지칭하고;

[0250] "UPLC"는 고성능 크로마토그래피를 지칭하고;

[0251] "RP-HPLC"는 역상 고성능 액체 크로마토그래피를 지칭하고;

[0252] "MS"는 질량 분석법을 지칭하고;

[0253] "OtBu"은 O-tert-부틸을 지칭하고;

[0254] "Oxyma"는 에틸 시아노히드록시이미노아세테이트를 지칭하고;

[0255] "Pbf"는 2,2,4,6,7-펜타메틸디히드로벤조푸란-5-술포닐을 지칭하고;

[0256] "TIPS"는 트리이소프로필실란을 지칭하고;

[0257] "TFA"는 트리플루오로아세트산을 지칭하고;

[0258] "Trt"는 트리틸을 지칭한다.

[0259] **재료 및 방법**

[0260] 펩타이드는 Fmoc/t-Bu 화학을 사용하여 표준 고체상 펩타이드 합성(SPPS)에 의해 합성하였다. 용매로서 DMF를 사용하였다. 실시예에 기재된 합성 절차에는 다음 출발 물질 및 방법을 사용하였다.

[0261] Fmoc 보호된 천연 아미노산은 Novabiochem, Iris Biotech, Bachem 또는 Chem-Impex International에서 구입하였다. 다음과 같은 표준 아미노산이 합성에 사용되었다: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.

[0262] 또한, 상기한 바와 동일한 공급업체로부터 다음 아미노산을 구입하였다: Fmoc-K-(N_3)OH; Fmoc-K(alloc)OH; Fmoc-c-OH, Fmoc-hC-OH, Fmoc-Ttds-COOH, Fmoc-NH-PEG4-COOH.

[0263] **분석적 특성화.**

[0264] 조질 및 정제된 펩타이드는 UV 및 질량 분석법 검출 기능을 갖춘 초고성능 액체 크로마토그래피(UPLC-UV-MS)로 분석하였다. 분석적 UPLC는 다음 방법 중 하나에 따라 수행하였다:

[0265] 방법 A:

[0266] 214 nm에서 검출

[0267] 컬럼: Acquity Waters BEH130 C4, 1.7 ㎛(2.1×100 ㎜), 45℃

[0268] 용매: H_2O+0.1%TFA: ACN+0.1%TFA(유량 0.4 ㎖/분)

[0269] 구배: 85:15(0분) ~ 85:15(1분) ~ 65:35(5분) ~ 10:90(5.2분) ~ 10:90(5.5분) ~ 85:15(5.7분) ~ 85:15(6분)

[0270] 질량 분석기: 양이온 검출 모드에서 전기분무 이온화 기능을 갖춘 Waters SQ 검출기

[0271] 방법 B:

[0272] 214 nm에서 검출

[0273] 컬럼: Acquity Waters BEH130 C4, 1.7 ㎛(2.1×100 ㎜), 45℃

[0274] 용매: H_2O+0.1%TFA: ACN+0.1%TFA(유량 0.4 ㎖/분)

[0275] 구배: 80:20(0분) ~ 80:20(1분) ~ 60:40(5분) ~ 10:90(5.2분) ~ 10:90(5.5분) ~ 80:20(5.7분) ~ 80:20(6분)

[0276] 방법 C:

[0277] 214 nm에서 검출

[0278] 컬럼: Acquity Waters BEH130 C4, 1.7 ㎛(2.1×100 ㎜), 45℃

[0279] 용매: H_2O+0.1%TFA: ACN+0.1%TFA(유량 0.4 ㎖/분)

[0280] 구배: 75:25(0분) ~ 75:25(1분) ~ 55:45(4분) ~ 10:90(4.2분) ~ 10:90(4.5분) ~ 80:20(4.7분) ~ 75:25(5분)

[0281] 질량 분석기: 양이온 검출 모드에서 전기분무 이온화 기능을 갖춘 Waters SQ 검출기

[0282] 질량 분석은 양이온 검출 모드에서 전기분무 이온화 기능을 갖춘 Waters SQ 검출기에서 수행하였고 질량 대 전하 비율의 스캔 범위는 400-1800이었다.

[0283] 표 1: 실시예 화합물의 분석 방법, 체류 시간, 계산 및 발견된 질량

SP	서열번호	정확한 질량 (단일동위원소)	관찰된 [M+2H]2+	관찰된 [M+3H]3+	관찰된 [M+4H]4+	관찰된 [M+5H]5+	체류 시간 (분)	방법
722	29	3034.32	1519.2	1013.5	ND	ND	3.27	C
745	30	2962.37	1483.8	989.4	ND	ND	2.85	C
765	31	3506.78	1756.2	1171.0	878.6	ND	2.90	C
1375	32	3868.04	ND	1291.8	969.2	775.5	4.20	B
1374	33	3843.58	ND	1282.8	962.4	770.2	4.05	B
1072	34	2225.21	1114.0	743.0	ND	ND	2.97	A
1376	23	3580.90	ND	1195.4	897.1	ND	3.57	A
1071	35	3249.83	ND	1085.0	814.0	651.6	3.65	A
1380	36	4298.36	ND	1435.4	1076.8	861.8	3.23	B
1379	37-38	6169.14	ND	ND	1545.5	ND	4.35	B
1383	39-40	7216.85	ND	ND	ND	1445.9	4.59	B
	ND: 검출되지 않음							

[0284]

[0285] **고체 지지체 상의 펩타이드 합성을 위한 일반 절차**

[0286] 모든 펩타이드의 합성은 Liberty Blue 마이크로파 합성기(CEM corp.)에서 표준 Fmoc 단계적 고체상 합성(SPPS)에 의해 수행하였다. 조립은 Protide Rink-아미드(4-(2',4'-디메톡시페닐-Fmoc-아미노메틸)-페녹시아세트아미도-노르류실아미노메틸 수지, CEM, 200 μmol, 100-200 메쉬; 로딩 0.2 mmol/g)를 0.2 mmol 규모로, DIC/Oxyma 활성화와 함께 사용하여 수행되었다. 용매로서 DMF를 사용하였다.

[0287] 모든 아미노산을 DMF에 0.4M 농도로 용해시켰다. 수지가 없는 아미노기에 비해 5배 과량의 활성화된 아미노산을 사용하여 마이크로파 조사 하에 아실화 반응을 90℃에서 3분 동안 수행하였다. DMF 중 0.5M DIC 용액 및 DMF 중 1M Oxyma 용액의 등몰량으로 아미노산을 활성화하였다.

[0288] 다음 조건이 사용되었다:

[0289] 표준 탈보호: DMF 중 20% 피페리딘, 2 × 120초 동안, 90℃

[0290] 세척: 4 × DMF.

[0291] 표준 단일 커플링: 5 eq. AA 0.4M / 5eq. DIC 1M/ 5eq. Oxyma 1M, 120초, 90℃

[0292] 표준 이중 커플링: 표준 단일 커플링을 두 번 반복하였다.

[0293] 세척: 4 × DMF.

[0294] 조립의 마지막에, 수지를 DMF, MeOH, DCM, Et_2O로 세척하였다.

[0295] 수지로부터의 펩타이드 절단은 다음 절단 칵테일을 사용하여 수행하였다:

[0296] 믹스 1) 87.5% TFA, 5% 페놀, 5% 물, 2.5% TIPS를 실온(30㎖)에서 1.5 내지 2.5시간 동안.

[0297] 믹스 2) 87.5% TFA, 5% 페놀, 5% 물, 2.5% 티오아니솔을 실온(20㎖)에서 1.5 내지 2.5시간 동안.

[0298] 합성에 사용된 수지는 C-말단이 1차 아미드로서 수지로부터 절단되도록 하는 것이었다.

[0299] 절단 혼합물을 여과에 의해 수집하고, 조질의 펩타이드를 메틸 tert-부틸 에테르에 침전시키고, 원심분리하고, 상청액을 제거하고, 신선한 디에틸 에테르를 펩타이드에 첨가하고, 2회 재원심분리하였다; 이후 조질의 펩타이드를 동결건조시켰다.

[0300] 펩타이드는 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하였다. 조질의 펩타이드는 분취용 Waters 2489 HPLC 시스템에서 기존의 분취용 RP-HPLC 정제를 통해 정제하였다, (파장 214 nm에서 UV 검출); 용리액으로서 다음의 용매: 아세토니트릴 + 0.1% TFA(이동상 A) 및 물 + 0.1% TFA(이동상 B). 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다. 달리 기재되지 않는 한, 화합물은 TFA 염으로서 시험하였다.

[0301] **서열번호 29의 합성 절차:**

[0302] **Ac-c*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-GGSGGSGG-K(N_3)-$CONH_2$**

[0303] 펩타이드의 구조는 도 7에 나타나 있다.

[0304] 서열번호 29(PepSP722)는 CD31 IgL1-A의 His71-Ser87 영역에 걸쳐 있고 아세틸화된 N-말단 D-시스테인 및 Ser87의 C-말단 위치의 시스테인이 있으며, 2개의 티올기가 디술파이드 결합에 참여하고 있다.

[0305] 일반 절차(믹스 1)에 따라 합성 및 절단을 수행한 후, 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y= 64%). 조질의 물질을 8/2 아세토니트릴/물의 혼합물에 1 mg/㎖ 농도로 용해시켰다: 수성 NH_3를 pH 9에 도달하도록 첨가하고 혼합물을 실온에서 72시간 동안 교반하였다. TFA를 혼합물에 첨가하고 동결 건조시켰다. 조질의 펩타이드를 분취용 Reprosil Gold C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 컬럼을 이용하여 역상 HPLC로 정제하였다. 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분에 걸쳐 20%B에서 20%B로, 25분에 걸쳐 40%B로, 유속 60 ㎖/분, 파장 214 nm. 서열번호 1은 무정형 백색 동결 건조된 고체(Y =5%), TFA 염으로서 단리되었다. 정제된 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2의 혼합물에 1 mg/㎖ 농도로 용해시키고: HCl 50 mM(10eq)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 동결건조 후, 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2에 용해시키고 다시 동결건조시켰다. 펩타이드를 LC/MS(방법 C)로 분석하였다. 체류 시간이 3.27분인 피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1013.5를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3036.37과 일치한다.

[0306] **서열번호 30의 합성 절차:**

[0307] **SHQMLFYKDDVLFYNISSS-GGSGGSGG-K(N_3)- $CONH_2$**

[0308] 펩타이드의 구조는 도 8에 나타나 있다.

[0309] 서열번호 30(PepSP745)은 서열번호 29와 공통인, CD31 IgL1-A의 동일한 영역 His71-Ser87에 걸쳐 있지만, 서열번호 1의 2개의 시스테인 잔기가 세린으로 대체된 선형 서열이다.

[0310] 일반 절차(믹스 1)에 따라 합성 및 절단을 수행한 후, 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y= 66%). 분취용 Reprosil Gold C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 컬럼을 사용하여 조질의 펩타이드를 역상 HPLC로 정제하였다. 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분에 걸쳐 20%B에서 20%B로, 20분에 걸쳐 40%B로, 유속 60 ㎖/분, 파장 214 nm. 서열번호 2는 무정형 동결건조된 고체(Y =4%), TFA 염으로서 단리되었다. 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2의 혼합물에 1 mg/㎖ 농도로 용해시키고: HCl 50 mM(10eq)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 동결건조 후, 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2에 용해시키고 다시 동결건조시켰다. 펩타이드를 LC/MS(방법 C)로 분석하였다. 체류 시간이 2.85분인

피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 989.4를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 2964.22와 일치한다.

[0311] **서열번호 31의 합성 절차:**

[0312] **Ac-KKKc*HQMLFYKDDVLFYNISSC*-Ttds-Ttds-K(N_3)- $CONH_2$**

[0313] 펩타이드의 구조는 도 9에 나타나 있다.

[0314] 서열번호 31(PepSP765)은 서열번호 29의 CD31 IgL1-A의 동일한 영역 His71-Ser87에 걸쳐 있고 유사한 디술파이드 연결성이 있으나 3개 리신 잔기의 N-말단에 가용성 꼬리가 있다.

[0315] 합성은 일반 절차에 따라 수행하였다. 조립의 마지막에 수지를 DMF 중 Ac_2O(10 eq)로 30분 동안 처리하였다. 믹스 1을 사용하여 일반 절차에 따라 절단을 수행하고, 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하였다(Y= 61%). 조질의 물질을 8/2 아세토니트릴/물의 혼합물에 1 mg/mℓ의 농도로 용해시켰다: 수성 NH_3를 pH 9에 도달하도록 첨가하고 혼합물을 실온에서 72시간 동안 교반하였다. TFA를 혼합물에 첨가하고 동결 건조시켰다. 조질의 펩타이드를 분취용 Reprosil Gold C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 컬럼을 사용하여 역상 HPLC로 정제하였다. 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분에 걸쳐 25%B에서 25%B로, 25분에 걸쳐 40%B로, 유속 60 mℓ/분. 서열번호 3은 무정형 동결건조된 고체(Y =2%), TFA 염으로서 단리되었다. 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2의 혼합물에 1 mg/mℓ 농도로 용해시키고: HCl 50 mM(10eq)을 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 교반하였다. 동결건조 후, 펩타이드를 아세토니트릴/물 8/2에 용해시키고 다시 동결건조시켰다. 펩타이드를 LC/MS(방법 C)로 분석하였다. 체류 시간이 2.90분인 피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1171.0을 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3509.17과 일치한다.

[0316] **서열번호 32의 합성 절차:**

[0317] **QHQMLFYKDDVLFYNISSMK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)- $CONH_2$**

[0318] 펩타이드의 구조는 도 10에 나타나 있다.

[0319] 서열번호 32(PepSP1375)는 CD31 IgL1-A의 동일한 영역 Gln70-Lys89 및 Ttds 유닛의 긴 링커에 걸쳐 있다.

[0320] 고체상에서 펩타이드를 조립하는 동안, Val 및 Leu에 대해 이중 아실화 반응을 수행하였다. 위치 9의 Asp 잔기까지 90℃에서 120 동안 DMF 중 20%(V/V) 피페리딘을 이용하여 수지를 이중 처리하여 Fmoc 탈보호를 수행하였다: 그 후, 잔기 탈보호를 실온에서 수행하여 아스파르트이미드 형성을 최소화하였다. 믹스 2를 사용하여 일반 절차에 따라 절단을 수행하였다. 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y=70%).

[0321] 조질의 물질의 정제는 XBridge C18(250×50㎜, 120Å, 10㎛) 컬럼 및 다음과 같은 용매 B의 구배를 이용하여 수행하였다: 5분 동안 15% B; 20분 내에 B의 15%에서 35%로; 유속: 80 mℓ/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y =10%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 B)로 분석하였다. 체류 시간이 4.20분인 피크 하에서 발견된 $[M+4H]^{4+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 969.2를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3870.58과 일치한다.

[0322] **서열번호 33의 합성 절차:**

[0323] **hCHQMLFYKDDVLFYNISShCK-Ttds-Ttds-Ttds-Ttds-K(N_3)- $CONH_2$**

[0324] 펩타이드의 구조는 도 11에 나타나 있다.

[0325] 서열번호 33(PepSP1374)은 서열번호 32의 CD31 IgL1-A의 동일한 영역 Gln70-Lys89에 걸쳐 있고 호모시스테인에 대한 돌연변이가 있다: 고리형 구조를 갖는 디술파이드 결합을 생성하는 Gln70hCys 및 Met88hCys.

[0326] 펩타이드 조립 중에, Val 및 Leu에 대해 이중 아실화 반응을 수행하였다. 위치 9의 Asp 잔기까지 90℃에서 120초 동안 DMF 중 20%(V/V) 피페리딘으로 수지를 이중 처리하여 Fmoc 탈보호를 수행하였다: 그 후, 잔기 탈보호를 실온에서 수행하여 아스파르트이미드 형성을 최소화하였다. 믹스 2를 사용하여 일반 절차에 따라 절단을 수행하였다. 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻

었다(Y=70%). 조질의 펩타이드를 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하였다. 조질의 물질을 DMSO/H_2O의 9/1 혼합물에 1 mg/mℓ 농도로 용해시켰다: 수성 NH_3를 pH 9에 도달하도록 첨가하고 혼합물을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 이 시간 후, 디술파이드 가교의 형성을 UPLC로 확인하고 혼합물을 동결건조시켰다. 다음 구배를 사용하여 Waters XBridge C18(250×50㎜, 120Å, 10㎛) 컬럼으로 조질의 물질의 정제를 수행하였다: 5분 동안 15% B; 20분 내에 B의 15%에서 35%로; 유속 80 mℓ/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y =10%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 B)로 분석하였다. 체류 시간이 4.05분인 피크 하에서 발견된 $[M+4H]^{4+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 962.4를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3843.58과 일치한다.

[0327] **서열번호 34의 합성 절차:**

[0328] **YKSTVIVNNKEKTTAE-PEG4-K(N_3)- $CONH_2$**

[0329] 펩타이드의 구조는 도 12에 나타나 있다.

[0330] 서열번호 34(PepSP1072)는 CD31 IgL1-A의 Tyr107-Glu122 영역에 걸쳐 있다.

[0331] 조립하는 동안, 모든 천연 아미노산 및 Fmoc-NH-PEG4-COOH에 대해 이중 아실화 반응을 수행하였다. 일반 절차(믹스 1)에 따라 합성 및 절단을 수행한 후, 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고; 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y= 70%). $C_{96}H_{166}N_{27}O_{33}$에 대한 LCMS 분석 계산: 2225.21 Da; 발견됨: 1114.0 $(M+2)^{2+}$. 조질의 펩타이드는 분취용 Waters XBridge C18(250×50㎜, 120Å, 10㎛) 컬럼 및 용리액 B의 다음 구배를 이용하여 역상 HPLC로 정제하였다: 5분에 걸쳐 5%B에서 5%B로, 20분에 걸쳐 5%B에서 25%B로, 유속 80 mℓ/분. 서열번호 34는 TFA 염으로서 무정형 동결건조된 고체로서 단리되었다(Y =25%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 A)로 분석하였다. 체류 시간이 2.97분인 피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 743.0을 나타냈고 이는 분자량의 예상치 2226.54와 일치한다.

[0332] **서열번호 23의 합성 절차:**

[0333] **hCYKSTVIVNNKEKTTAEYhC-$(Ttds)_4$-K(N_3)-NH_2**

[0334] 펩타이드의 구조는 도 13에 나타나 있다.

[0335] 서열번호 23(PepSP1376)은 영역 106-124에 걸쳐 있고 여기서 위치 106 및 124는 호모시스테인으로 돌연변이되어 고리형 구조를 갖는 디술파이드 결합을 생성한다.

[0336] 일반 절차(믹스 1)에 따라 합성 및 절단을 수행하였다; 절단된 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y= 65%). 조질의 물질을 DMSO/H_2O의 9/1 혼합물에 1 mg/mℓ 농도로 용해시키고: 수성 NH_3를 pH 9에 도달하도록 첨가하고 혼합물을 실온에서 48시간 동안 교반하였다. 디술파이드 가교의 형성을 UPLC로 확인하고 혼합물을 동결건조시켰다. XBridge C18(250×50㎜, 120Å, 10㎛) 컬럼 및 용리액 B의 다음 구배를 이용하여 역상 HPLC로 조질의 펩타이드를 정제하였다: 5분에 걸쳐 5%B에서 5%B로, 20분에 걸쳐 25%B로, 유속 80 mℓ/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y =28%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 A)로 분석하였다. 체류 시간이 3.57분인 피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1195.4를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3583.22와 일치한다.

[0337] **서열번호 35의 합성 절차:**

[0338] **K(N_3)-PEG4-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-$CONH_2$**

[0339] 펩타이드의 구조는 도 14에 나타나 있다.

[0340] 서열번호 35(PepSP1071)는 CD31 IgL2-A의 Pro133-Lys158 영역에 걸쳐 있다.

[0341] 일반 절차(믹스 1)에 따라 합성 및 절단을 수행하였다; 절단된 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석법으로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 수득하였다(Y=54%). 분취용 이중 Waters DeltaPack C18 카트리지(100×40㎜, 300Å, 15㎛)를 이용하여 역상 HPLC로 조질의 펩타이드를 정제하였다. 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분에 걸쳐 5% B에서 5% B로, 20분에 걸쳐 25% B로, 유속 80 mℓ/분. 생성물 함유 분획을 수집

하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y =35%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 A)로 분석하였다. 체류 시간이 3.57분인 피크 하에서 발견된 $[M+3H]^{3+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1085.0을 나타냈고 이는 분자량의 예상치 3251.76과 일치한다.

[0342] **서열번호 36의 합성 절차:**

[0343] **Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PR<u>hC</u>TLDKKEAIQGGIVRVN<u>hC</u>SVPEEK-CONH$_2$**

[0344] 펩타이드의 구조는 도 15에 나타나 있다.

[0345] 서열번호 36(PepSP1380)은 서열번호 35와 같이 CD31 IgL2-A의 Pro133-Lys158 영역에 걸쳐 있으나 위치 135 및 152에 돌연변이 호모시스테인이 있고 이는 고리형 구조를 갖는 디술파이드 결합을 생성한다.

[0346] 일반 절차에 따라 합성을 수행하였다. 펩타이드 조립 중에, Ser-Val-Pro, Ile-Val-Arg-Val 및 Pro-Arg-homoCys-Thr-Leu 단편의 잔기에 대해 이중 아실화 반응을 수행하였다. 위치 6의 Asp까지 90℃에서 120초 동안 DMF 중 20%(V/V) 피페리딘으로 수지를 이중 처리하여 Fmoc 탈보호를 수행하였다: 그 후, 잔기 탈보호를 실온에서 수행하여 아스파르트이미드 형성을 최소화하였다. 4개의 Ttds 및 말단 Lys-아지드 잔기는 DMF에서 커플링 시약으로서 HOAT(5 eq) 및 DIPC(5 eq)를 사용하여 수동으로 도입되었다: 마지막 Ttds 잔기의 삼중 커플링을 수행하여 완전한 전환을 제공하였다. 조립의 마지막에 수지를 DMF 중 Ac_2O(10 eq)로 30분 동안 처리하였다. 믹스 1을 사용하여 일반 절차에 따라 절단을 수행하고, 혼합물을 분석용 UPLC로 분석하고 ESI+ 질량 분석기로 검증하고 동결건조하여 조질의 표제 화합물을 얻었다(Y =73%). 조질의 물질을 DMSO/H_2O의 9/1 혼합물에 1 mg/㎖ 농도로 용해시키고: 수성 NH_3를 pH 9에 도달하도록 첨가하고 혼합물을 실온에서 72시간 동안 교반하였다. 이 시간 후, 디술파이드 가교의 형성을 UPLC에 의해 확인하고, TFA를 첨가하여 반응 혼합물을 퀀칭한 후 동결건조시켰다. 조질의 펩타이드는 Reprosil C8(250×40㎜, 200Å, 5㎛) 컬럼을 사용하여 RP-HPLC로 정제하고 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분 동안 20% B; 25분 내에 B의 20%에서 40%로; 유속 60 ㎖/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y =5%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 B)로 분석하였다. 체류 시간이 3.23분인 피크 하에서 발견된 $[M+4H]^{4+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1076.8을 나타냈고 이는 분자량의 예상치 4301.09와 일치한다.

[0347] **서열번호 37의 합성:**

[0348] **[$^{\#}$CH$_2$CONH$_2$GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)$_4$-K(N_3)-NH$_2$]-[QHQMLFYhC$^{\#}$DDVLFYNISSMK-CONH$_2$]**

[0349] 펩타이드의 구조는 도 16에 나타나 있다.

[0350] 서열번호 37-38(SP1379)은 중간체 A(INT A)의 hCys8(QHQMLFYhC#DDVLFYNISSMK-CONH2) 및 중간체 B(INT B)의 브로모아세틸기[BrCH$_2$CO-G#TYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)4-K(N_3)-NH$_2$] 사이의 티오에테르 결합을 통해 수득된 이종 이량체이다.

[0351] DMSO 중 INT B(1 eq)의 5 mM 용액을 DIPEA(5 eq)의 존재 하에 DMSO 중 INT A(1 eq)의 2 mM 용액에 적가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였고, 그 시간 동안 반응 진행을 LCMS로 모니터링하였다. pH 4에 도달하도록 TFA를 반응 혼합물에 첨가하고 조질의 물질을 Reprosil C8(250×40㎜, 200Å, 5㎛) 컬럼을 이용하여 RP-HPLC로 정제하였다. 다음 구배를 사용하였다: 5분 동안 25% B; 25분 내에 B의 25%에서 45%로; 유속: 유속 40 ㎖/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y = 21%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 B)로 분석하였다. 체류 시간이 4.35분인 피크 하에서 발견된 $[M+4H]^{4+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1545.5를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 6173.13과 일치한다.

[0352] **서열번호 38의 합성:**

[0353] **[Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K$^{\#}$(CH$_2$CO)-CONH$_2$]-[QHQMLFYhC$^{\#}$DDVLFYNISSMK-CONH$_2$]**

[0354] 펩타이드의 구조는 도 17에 나타나 있다.

[0355] 서열번호 38은 중간체 A(INT A)의 hCys8(QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK-$CONH_2$) 및 중간체 C(INT C)의 브로모아세틸기[Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K($BrCH_2CO$)-$CONH_2$] 사이의 티오에테르 결합을 통해 수득된 이종이량체이다.

[0356] DMSO 중 INT C(1 eq)의 5 mM 용액을 DIPEA(5 eq)의 존재 하에 DMSO 중 INT A(1 eq)의 2 mM 용액에 적가하였다. 반응물을 실온에서 1시간 동안 교반하였고, 그 시간 동안 반응 진행을 LCMS로 모니터링하였다. pH 4에 도달하도록 TFA를 반응 혼합물에 첨가하고 조질의 물질을 컬럼으로서 Reprosil C8(250×40㎜, 200Å, 5㎛)을 이용하여 RP-HPLC로 정제하였다. 용리액 B의 다음 구배를 사용하였다: 5분 동안 25% B; 25분 내에 B의 25%에서 45%로; 유속: 유속 40 ㎖/분. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y = 5%). 정제된 펩타이드를 LC/MS(방법 B)로 분석하였다. 체류 시간이 4.59분인 피크 하에서 발견된 $[M+5H]^{5+}$ 질량 신호는 펩타이드 질량 1445.9를 나타냈고 이는 분자량의 예상치 7221.47과 일치한다.

[0357] **서열번호 1의 합성:**

[0358] **INT A: QHQMLFYhCDDVLFYNISSMK-$CONH_2$**

[0359] 중간체 A의 구조는 도 18에 나타나 있다.

[0360] 이종이량체 서열번호 37(SP1379) 및 서열번호 38(SP1383)에 대한 선형 전구체 공통 중간체는 합성 및 절단을 위한 일반 절차에 따라 제조하였다: 모든 Fmoc 탈보호는 실온에서 수행하였다. 컬럼으로서 Reprosil C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 및 용리액 B의 다음 구배를 사용하여 조질의 펩타이드를 정제하였다: 5분 동안 20% B; 25분 내에 B의 20%에서 40%로; 유속: 유속 60 ㎖/분, 파장 214 nm. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y = 2%).

[0361] **서열번호 2의 합성:**

[0362] **INT B: ($BrCH_2CO$-GTYKSTVIVNNKEKTTAEYQ-(Ttds)$_4$-K(N_3)-NH_2)**

[0363] 중간체 B의 구조는 도 19에 나타나 있다.

[0364] 이종이량체 서열번호 37-38(SP1379)에 대한 선형 전구체는 합성을 위한 일반 절차에 따라 제조하였다. 조립의 마지막에 수지 상에 남은 잔기의 유리 아미노기(gly)를 DMF에서 DIC/HOAt 방법(수지 로딩에 대해 4당량 과량)에 따라 브로모아세트산(5eq)으로 처리하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 진탕시키고 반응을 카이저 테스트(Kaiser Test)로 모니터링하였다. 수지를 여과하고 DMF/DCM/DMF(각각 6/6/6회)로 세척하고 일반 합성 절차에 보고된 대로 절단 혼합물(믹스 1)로 처리하였다. Reprosil C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 컬럼 및 다음 구배를 사용하여 RP-HPLC로 조질의 펩타이드를 정제하였다: 5분 동안 20% B; 25분 내에 B의 20%에서 40%로; 유속: 유속 60 ㎖/분, 파장 214 nm. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y = 30%).

[0365] **서열번호 3의 합성:**

[0366] **INT C: Ac-K(N_3)-(Ttds)$_4$-PRVTLDKKEAIQGGIVRVNSSVPEEK-Ttds-K($BrCH_2CO$)-$CONH_2$**

[0367] 중간체 C의 구조는 도 20에 나타나 있다.

[0368] 이종이량체 서열번호 39-40(SP1383)에 대한 선형 전구체 C는 일반 합성 절차에 따라 제조하였다. 수지에 로딩된 첫 번째 아미노산은 측쇄 아미노기의 alloc으로 보호된 Lys이다. 이중 아실화는 SVP, IVRV 및 PRVTL 잔기에서 수행되었다: PRVTL 잔기 후 모든 Fmoc 탈보호는 실온에서 수행되었다.

[0369] 조립의 마지막에 수지를 DCM에 현탁시켰다: 페닐실란(24 eq) 및 Pd(PPh_3)$_4$(0.25 eq)를 첨가하고 수지를 30분 동안 진탕시켰다. 주기를 두 번 반복하였다. 두 번째 주기의 마지막에 DMF 중 0.5% DIPEA 및 0.5% 나트륨 디티오카바메이트의 용액을 수지에 걸러서 팔라듐 잔기를 제거하였다. Lys 탈보호된 아미노기와 브로모아세트산(5 eq)의 커플링은 DMF에서 DIC/HOAt 방법(수지 로딩에 대해 4당량 과량)으로 수행하였다. 혼합물을 실온에서 1시간 동안 진탕시키고 반응을 카이저 테스트로 모니터링하였다. 수지를 여과하고 DMF/DCM/DMF(각각 6/6/6회)로 세척하고 일반 합성 절차에 보고된 대로 절단 혼합물(믹스 1)로 처리하였다. 조질의 펩타이드를 정제하였다:

Reprosil C4(250×40㎜, 120Å, 5㎛) 컬럼 및 다음 구배: 5분 동안 20% B; 25분 내에 B의 20%에서 40%로; 유속: 유속 60 ㎖/분, 파장 214 nm. 생성물 함유 분획을 수집하고 동결건조하여 TFA 염으로서 정제된 생성물을 수득하였다(Y = 30%).

[0370] **서열번호 41의 합성:**

[0371] **Ac-K(N_3)-GGSGGSGG-YKDDVLFYNISSMKST-NH_2 (SP547)**

[0372] 서열번호 41(PepSP547)은 N-말단에 아지드-링커 위치가 있는 CD31 IgL1-A의 Tyr76-Thr91 영역에 걸쳐 있는 선형 펩타이드이다.

[0373] **서열번호 42의 합성:**

[0374] **Ac-YKDDVLFYNISSMKST-GGSGGSGG-K(N_3)-NH_2 (SP548)**

[0375] 서열번호 42(PepSP548)는 또한 CD31 IgL1-A의 동일한 영역 Tyr76-Th91에 걸쳐 있으나 C-말단에 아지드-링커 위치가 있는 선형 펩타이드이다.

[0376] *프로토콜*

[0377] 니티놀 디스크를 손대지 않고 두거나(베어 메탈) 도메인 1, 도메인 2 또는 도메인 1 및 2 CD31 아날로그 펩타이드로 코팅하였다. 시험된 펩타이드는 순차적인 딥 코팅 층화 절차를 이용하여 폴리도파민, DBCO-PEG4-아민 및 아지드 CD31 유도체 펩타이드에 이어 니티놀 디스크에 그래프팅되었다. 이 단계 후에 모든 디스크를 인간 대동맥 내피 세포와 함께 48시간 동안 인큐베이션하였다. 이후 디스크를 헹구고 염색하기 전에 세포를 포르말린 용액에 고정하였다. 염색은 AlexaFluor®488 염료(액틴의 녹색 형광)에 커플링된 팔로이딘을 이용하여 수행하였고, DAPI는 DNA 염색에 사용되고 APC에 커플링된 도메인 1 CD31 항체는 외부 도메인 1 염색에 사용된다. 염색 후 표면의 이미지 분석을 통해 세포 부착 및 액틴/CD31 발현을 평가하였다.

[0378] 결과를 도 2 내지 도 6에 나타낸다.

[0379] 특히, 도 2에 따르면 베어 또는 코팅된 니티놀 디스크를 배양 웰 바닥에 배치하였다. 1차 인간 대동맥 내피 세포(HAEC)를 48시간 동안 디스크에서 성장하도록 두었다. 그 후 디스크를 인산염 완충 식염수로 헹구고, 포르말린에 고정하고, 형광 현미경 검사를 위해 처리하였다. 디스크 부착 세포를 Hoechst 33342(1 ㎍/㎖, 핵 염색을 위해), AlexaFluor®488 염료(0,5μM, F-액틴 섬유를 염색하기 위해)에 커플링된 팔로이딘 및 CD31 도메인 1을 지향하는 단클론 항체를 포함하는 용액에 침지하고, 37℃에서 1시간 동안 알로피코시아닌에 커플링하고(세포 표면에서 손상되지 않은 CD31의 존재 및 위치를 검출하기 위해), 세척하고 도립 형광 현미경으로 영상화를 위해 유리 바닥 영상화 챔버에 아래로 향하게 장착하였다. 대표적인 이미지는 베어 물질에서 성장한 HAEC가 강한 F-액틴 염색을 나타내므로 스트레스 섬유의 형성이 향상되었음을 반영하는 반면, 손상되지 않은 CD31의 발현은 다소 희미하였다. 반대로, CD31 모방 펩타이드로 코팅된 디스크는 스트레스 섬유 신호가 거의 없고 세포 경계에서 강렬하고 균일한 CD31 발현을 나타내므로, 보다 생리적인 내피 표현형을 반영한다.

[0380] 도 3은 개별 디스크 이미지에 대한 신호의 정량적 분석을 "통합 밀도"(ImageJ 분석 개방형 소프트웨어에 의해 보고된 바와 같이, 신호 밀도에 양성 염색 영역을 곱한 값)로 표현한 것을 보여준다. 표면 유형은 Y축에 표시되고, 데이터는 평균±SD(N=6/표면 유형)로 표시된다. 각 점은 특정 표면 변형에 해당한다. F-액틴 발현은 외인성 물질의 존재 하에 세포의 세포 스트레스와 관련이 있다. 모든 표면 변형은, 베어 메탈에 비해 세포 스트레스에 영향을 미치지 않은 SP1070 펩타이드를 제외하고, 베어 메탈에 비해 세포 스트레스의 감소로 이어졌다.

[0381] 도 4에서 표면 유형이 Y축에 표시되어 있다. 각 점은 특정 표면 변형에 해당한다. 데이터는 "통합 밀도" 평균±SD(N=6/표면 유형)로 표시된다. CD31 발현은 주어진 기질에서 성장하는 동안 생리학적 표현형을 채택하는 내피 세포의 능력과 관련이 있다. 니티놀 디스크의 표면 변형에 따라 HAEC에 의한 CD31 발현 측면에서 중요한 가변성이 관찰되었다. 표시된 CD31 유사체 펩타이드 중 4개(펩타이드 SP 1072-1374-1375 및 1380)는 다른 변형된 디스크 및 베어 대조군과 비교하여 CD31 발현 측면에서 명백히 긍정적인 효과를 발휘하였다.

[0382] 도 5의 "거울" 막대는 디스크 표면 및 베어 디스크에 코팅된 각각의 표시된(Y축) 유형의 펩타이드에 대한 F-액틴(왼쪽) 및 CD31(오른쪽) 염색의 평균 통합 밀도를 보고한다. 데이터는 각 코팅의 세포 스트레스(액틴 발현)의 증가에 따라 (위에서 아래로) 분류된다. 도면에 표시된 대로, 베어 메탈 디스크에서 성장한 HAEC에서 세포 스트레스(높은 액틴 발현으로 검출된 바와 같음) 및 손상된 내피 표현형(낮은 CD31 발현으로 기록됨)의 정도가 분명하다. 반대로, SP 1374 펩타이드로 코팅된 디스크와 같은 CD31 모방 표면은 낮은 세포 스트레스(낮은 액틴

발현) 및 일관된 기능성 내피 표현형(높은 CD31 발현)을 초래하였다.

[0383] 도 6에 나타낸 데이터는 CD31 및 F-액틴 발현 사이의 비율로 표시된다. 베어 메탈 및 PDA로만 코팅된 디스크와 비교할 때, 펩타이드 SP 1072, 1074, 1075 및 1080으로 코팅된 표면에서 성장한 세포는 보다 높은 CD31/액틴 비율을 분명히 보여주었고, 이는 보다 높은 생리학적 내피 세포 표현형을 반영한다.

[0384] **실시예 1:**

[0385] **기능 점수 및 생체모방 성능**

[0386] *기능 점수*

[0387] 서로 다른 그룹에 속하는 서로 다른 펩타이드의 효과를 도 6과 동일한 프로토콜에 따라 배치로 시험하였다. 각 그룹의 서로 다른 펩타이드를 배치로 시험하고 개별 펩타이드의 효과를 별도의 실험에서 반복적으로 평가하였다. 모든 실험의 데이터는 도립 형광 현미경의 청색, 녹색 및 적색 채널에서 캡처된 내피 세포로 덮인 디스크 측면의 이미지를 컴퓨터를 통해 분석하여 얻은 것이다. 상이한 그룹에 속하는 펩타이드의 기능 점수는 세포 수(청색, Dapi+ 핵의 수로 검출된 바와 같음)에 CD31 발현의 통합 밀도(마우스 항-인간 CD31 단클론 항체, 클론 9G11, 접합된 알로피코시아닌의 결합에 의해 제공되는 적색 신호)를 곱하고, 그 산물을 F-액틴 중합의 통합 밀도(녹색 형광색소에 커플링된 팔로이딘)로 나누어 계산하였다.

[0388] 모든 실험의 미가공 데이터를 사용하여 점수를 계산하는 데 사용된 공식은 다음과 같다:

[0389] $$\frac{\text{핵의 수} \times \text{CD31 염색의 통합 밀도}}{\text{F-액틴 염색의 통합 밀도}}$$

[0390] 점수는 각 실험에서 공식 (x-min)/(max-min)을 사용하여 0-1로 조정되었다.

[0391] 데이터는 도 22의 표 및 도 23의 그래프에 보고되어 있다.

[0392] *생체모방 성능*

[0393] 서로 다른 그룹(괄호 안에 표시된 펩타이드 ID)에 속하는 펩타이드의 기능적 효과(생체모방 성능)는 도 6의 실시예에 대해 설명된 것과 동일한 프로토콜을 사용하여 스크리닝되었다. 각 그룹의 서로 다른 펩타이드를 배치로 시험하였고 개별 펩타이드의 효과는 별도의 실험에서 반복적으로 평가하였다. 모든 실험의 데이터는 도립 형광 현미경의 청색, 녹색 및 적색 채널에서 캡처된 내피 세포로 덮인 디스크 측면의 이미지를 컴퓨터를 통해 분석하여 얻은 것이다. 상이한 그룹에 속하는 펩타이드의 기능 점수는 세포 수(청색, Dapi+ 핵의 수로 검출된 바와 같음)에 CD31 발현의 통합 밀도(마우스 항-인간 CD31 단클론 항체, 클론 9G11, 접합된 알로피코시아닌의 결합에 의해 제공되는 적색 신호)를 곱하고, 그 산물을 F-액틴 중합의 통합 밀도(녹색 형광색소에 커플링된 팔로이딘)로 나누어 계산하였다.

[0394] 모든 실험의 미가공 데이터를 사용하여 점수를 계산하는 데 사용된 공식은 다음과 같다:

[0395] $$\frac{\text{핵의 수} \times \text{CD31 염색의 통합 밀도}}{\text{F-액틴 염색의 통합 밀도}}$$

[0396] 점수는 각 실험에서 공식 (x-min)/(max-min)을 사용하여 0-1로 조정되었고 모든 실험의 조정된 점수는 도 24에 나타나 있다.

[0397] **실시예 2:**

[0398] **본 발명에 따른 펩타이드의 추가 CD31/액틴 점수 및 종래 기술 펩타이드 P8RI와의 비교**

[0399] *재료 및 방법*

[0400] 상기 정의한 바와 같은 본 발명에 따른 펩타이드(SP547, SP548 SP745, SP1374, SP1072, SP1070, SP1071, SP1379 및 SP1383) 및 서열 KWPALFVR(서열번호 52)의 종래 기술 펩타이드 P8RI를 사용하여, 실시예 1과 동일한 프로토콜을 뒤이어 수행하였다.

[0401] 결과

[0402] CD31 면역염색 신호의 통합 밀도를 세포골격의 중합된 F-액틴에 결합하는 팔로이딘의 신호로 나눈 결과인 "CD31/액틴" 점수는 배양 웰 바닥에 놓인 실험 디스크의 표면에서 성장한 동맥 내피 세포의 생리학적/비스트레

스 특성을 식별하는 데 사용되었다. 점수가 높을수록 보다 생리학적 상태를 나타내고, 점수가 낮을수록 혈전 생성/염증 유발 활성과 관련된 내피 세포의 스트레스 상태를 반영한다(개별 배양 웰의 상청액의 가용성 PAI-1 및 IL-6 수준으로서 확인됨). 따라서, CD31/액틴 점수가 높을수록 더 좋다.

[0403] 상이한 펩타이드를 사용하여 수행된 반복 실험 결과는 도 25에 제시되어 있다. 본 발명에 따른 새로운 펩타이드 SP745, SP1374, SP1072, SP1070, SP1071, SP1379 및 SP1383을 이용하여 수득된 CD31/액틴 점수는 베어 금속 디스크 또는 PDA만으로 코팅된 디스크에 의해 수득된 점수보다 훨씬 더 높다. 단 한 번의 측정만으로는 통계적 유의성을 달성할 수 없지만, 새로운 펩타이드 SP547 및 SP548로 코팅된 섹션은 본 발명에 따른 다른 펩타이드로 코팅된 섹션의 CD31/액틴 점수와 동등한 CD31/액틴 점수를 갖는 것으로 보인다. 또한, 본 발명에 따른 모든 펩타이드의 평균 CD31/액틴 점수는 종래 기술 펩타이드 P8RI의 평균 CD31/액틴 점수보다 높다.

[0404] 결론

[0405] 상기 결과는 본 발명에 따른 새로운 펩타이드로 코팅된 디스크가 PDA만으로 코팅된 섹션보다 더 높고 따라서 더 나은 CD31/액틴 점수를 나타내고, 또한 종래 기술 펩타이드 P8RI로 코팅된 섹션보다 더 나은 CD31/액틴 점수를 나타냄을 확인시켜준다.

[0406] **실시예 3:**

[0407] **친수성 중합체 NTMA만으로 코팅된 스텐트와 비교한 본 발명에 따른 펩타이드 SP1072로 코팅된 흐름 전환기 스텐트(CFD)의 생체 내 효과**

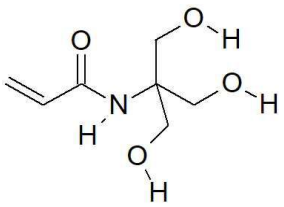
[0408] *재료 및 방법*

[0409] 스텐트

[0410] 흐름 전환기 스텐트(CFD)는 Sinomed의 니티놀로 만든 편조 메쉬이다. 이는 다음 코팅 중 하나로 코팅된다:

[0411] 1. 본 발명에 따른 SP1072 펩타이드, 또는

[0412] 2. 친수성 중합체 eG NTMA (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]아크릴아미드의 전기그래프팅으로부터 수득됨).

[0413] 

[0414] SP1072 코팅된 흐름 전환기 스텐트의 경우, 다음 재료 및 프로토콜을 사용하여 코팅을 수행하였다:

[0415] 재료:

[0416] 탈염수

[0417] Tris 10 mM (MW: 121.135, 즉 1.21 mg/mℓ) pH 8.5 완충액

[0418] 0.6g 트리즈마 염기 (CAS 77-86-1)

[0419] 탈염수 500 mℓ

[0420] HCl로 pH를 8.5로 조정

[0421] 0.45 ㎛ 필터로 여과

[0422] 실온에서 보관

[0423] 2 mg/mℓ의 폴리도파민(PDA)

[0424] 도파민 염산염 99% (CAS 62-31-7, MW: 189.64, 4℃에서 보관)

[0425] 10 mM Tris 완충액 pH 8.5에 적절한 양의 도파민 염산염을 용해시켜 최종 농도 2 mg/mℓ의 용액을 수득한다(암실에 보관).

[0426] DBCO (MW: 678.79, DBCO-술포-PEG(4)-NH2 (참조: RL-2421, IRIS biotech)

[0427] 화합물을 받으면, 15-20 ㎎의 스톡 중량을 준비한다. 분말을 용해시켜 10mM Tris 완충액 pH 8.5에 20 ㎎/㎖의 스톡 용액을 만든다. 최종 농도 300 μM(203 ㎍/㎖)로 코팅 공정에 필요한 부피를 준비한다.

[0428] 50 ㎍/㎖의 SP1072 펩타이드.

[0429] 프로토콜:

[0430] 1) 각 스텐트를 5㎖ 폴리프로필렌 둥근 바닥 튜브(Bd Falcon Ref 352063)로 옮겼다. 스텐트가 튜브 바닥에 떨어지도록 하였다.

[0431] 2) 튜브당 2 ㎎/㎖ PDA 용액 4.5㎖를 넣었다. 실온에서 밤새(18 +/- 2시간) 회전 휠(대략 20rpm)에서 각 튜브를 균질화하고 빛으로부터 보호하였다. 스텐트가 튜브 내에서 이동하도록 하고 캡에 끼어있지 않은지 확인하였다. 스텐트 색상은 은색에서 갈색/흑색으로 변해야 한다. 인큐베이션 기간이 지난 후 용액은 작은 PDA 집합체로 검게 변한다.

[0432] 3) 각 스텐트를 새 튜브로 옮기고 탈염수로 3회 헹구고 매번 헹굴 때마다 회전 휠에서 5분 동안 균질화하였다.

[0433] 4) 마지막 헹굼을 남기고 튜브를 최소 30초 동안 초음파 처리하여 임의의 남은 PDA 덩어리를 폐기하였다.

[0434] 5) 각 스텐트를 튜브당 1.8㎖의 DBCO(300 μM)를 함유하는 2㎖-에펜도르프 튜브로 옮겼다. 실온에서 밤새 회전 휠(대략 20rpm)에서 각 튜브를 균질화하고 빛으로부터 보호하였다.

[0435] 6) 각 스텐트를 새 튜브로 옮기고 탈염수로 3회 헹구었다. 매번 헹굴 때마다 회전 웰에서 5분 동안 균질화하였다.

[0436] 7) 각 스텐트를 튜브당 1.8㎖의 CD31 펩타이드(50 ㎍/㎖)를 함유하는 2㎖-에펜도르프 튜브로 옮겼다. 회전 휠(대략 20rpm)에서 각 튜브를 실온에서 2시간 동안 균질화하고 빛으로부터 보호하였다.

[0437] 8) 각 스텐트를 새 튜브로 옮기고 탈염수로 3회 헹구었다. 매번 헹굴 때마다 회전 웰에서 5분 동안 균질화하였다.

[0438] 9) 각 스텐트를 5초 동안 무수 에탄올에 담근 후 건조시켰다.

[0439] 비교용 친수성 중합체 eG NTMA 코팅된 흐름 전환기 스텐트는 다음 프로토콜을 통해 수득하였다:

[0440] (1) 세정 전처리: 스텐트 프레임을 아세톤, 에탄올, 및 주사용 물에서 각각 10분간 초음파 처리하였다.

[0441] (2) 전기그래프팅 용액 제조: N-[트리스(히드록시메틸)메틸]아크릴아미드, 농도 0.30 M; $NaNO_3$, 농도 0.05M; 4-니트로페닐 테트라플루오로보레이트 디아조늄염, 0.005M; 남은 양은 DMSO 용매이다.

[0442] (3) 전기그래프팅 공정: 전처리된 스텐트를 작동 전극으로서 사용하고, 백금박을 상대 전극으로서 사용하고, 이를 전기그래프팅 용액에 넣고, -0.1 내지 -3.0V의 선형 스윕 전압 및 백은 10 주기 동안 0.05 V/s의 전압 스캔 속도로 두 전극 사이에 적용하였다.

[0443] (4) 코팅 평활화 및 건조: 전기그래프팅된 스캐폴드를 아세톤(2L)에서 질소 버블링(속도 0.5-10 L/분)으로 10분간 평활화하고 40℃의 진공 건조 오븐에 2시간 동안 두었다.

[0444] 편조 메쉬와 동일한 구성의 쿠폰에 동일한 프로토콜을 적용하였다. 전기그래프팅된 쿠폰에 나무 막대를 사용하여 긁는 단계에서 프로필로메트리(KLA-Tencor)로 측정했을 때, 125 nm의 필름이 수득되었다.

[0445] *동물 시술*

[0446] 체중 약 3㎏의 건강한 뉴질랜드 흰토끼 총 8마리(예비 동물 2마리 포함)(암컷 및 수컷)이 이 연구에 포함되었다. 수술 후 7일, 30일 및 60일에 총 세 번의 관찰 시점을 설정하였다. 실험은 두 단계로 나누어졌다: 1) 동맥류 동물 모델링; 2) 각 동물의 동맥류 운반 동맥 및 복부 대동맥에 조밀한 메쉬 스텐트를 이식하였다. 동맥류 운반 동맥의 스텐트 이식은 동맥류 치료에 있어서 스텐트의 안전성과 효율성을 조사하기 위해 사용하였고, 한 쌍의 요추 동맥을 덮는 복부 대동맥의 스텐트 이식은 시험된 스텐트의 안전성을 조사하기 위해 사용하였다. 자세한 내용은 아래 표 1을 참조한다.

[0447] 표 2. 실험 설계

관찰 기간 (일)	동물 수 (오직)	브라켓 수 (개)	스텐트 이식 부분	평가 지표
7	2	4	동맥류 운반 동맥, 복부 대동맥	1. 적응 기간 동안, 수술 전, 및 샘플링 전 정기적인 혈액 및 혈액 생화학 검사. 2. 조밀한 메쉬 지지체의 조작성 및 효율성을 평가한다. 3. 중재 절차 후 예상 종료점까지 동물을 보관하고, 종료점 추적 관찰 후 안락사시켰으며, 총체적 해부 및 조직 샘플링을 수행하였다. 4. 조직병리학적 평가: 동맥류 운반 동맥의 정성적 및 정량적 분석. 5. SEM 분석; SEM 분석을 위해 복부 대동맥에서 선택된 7D 시점; SEM 분석을 위해 복부 대동맥에서 선택된 30D 시점, 운반 동맥 SEM 검출이 결정됨; SEM 분석을 위해 각각 하나의 운반 동맥 및 하나의 복부 대동맥에서 선택된 60D 시점.
30	2+2	4+4		
60	2+2	4+4		

[0448]

[0449] 단계 1) 및 2의 경우 다음과 같이 마취를 수행하였다:

[0450] 모든 수술은 무균 기술을 이용하여 수행하였고, 이식 과정 동안 실험 동물은 전신 마취 하에 있었다.

[0451] 수술 당일, 실험 동물을 진정시키고 6 ㎎/㎏의 Sutex® 50을 근육 내 주사하여 마취를 유도하였다. 필요한 경우, 호흡 마스크를 사용하여 흡입함으로써 실험 동물을 이소플루란으로 마취시킬 수 있다.

[0452] 성공적인 마취 유도 후, 실험 동물은 구강 평시 기관을 통해 삽관된 후 인공호흡기에 연결되어 호흡기 접근을 설정하고 마취제 및 산소의 혼합물을 지속적으로 흡입하여 마취를 유지하였다. 구토로 인한 질식을 방지하기 위해 수술 전에 구토를 멈추기 위한 일부 아트로핀을 실험 동물에게 투여해야 할 수 있다.

[0453] 마취되고 삽관된 실험 동물을 옆으로 누운 자세 또는 바로 누운 자세로 수술대에 놓고, 동물을 구속 밴드를 사용하여 묶은 다음, 위치를 사진으로 촬영하고 기록하였다(나중에 관찰할 때 사용된 것과 동일한 위치 및 각도를 용이하게 하기 위함). 오른쪽 뒷다리의 수술 부위를 준비하고, 소독하고, 시트를 깔았다. 동물의 위치가 변경되면 새 시트와 수술 부위 준비가 필요하다.

[0454] 또한 정맥 주사바늘을 말초 정맥 혈관 중 하나에 삽입하고 필요에 따라 약물 또는 재수화액을 카테터를 통해 투여하였다.

[0455] 단계 1) (동맥류 동물 모델링)은 다음과 같이 수행하였다:

[0456] (a) 토끼를 수술대 위에 반듯이 두고 목을 면도하였다. 요오드포 및 알코올로 정기적으로 소독한 후 수건을 깔았다.

[0457] (b) 오른쪽 총경동맥을 찾아냄: 중앙 목을 절개(흉골상와 위 및 아래 1.5㎝)하여 피부를 자르고, 오른쪽 흉쇄유돌근의 측면을 따라 분리하고, 오른쪽 총경동맥을 찾아 꺼내고, 토끼의 심장박동 및 호흡이 느려지거나 멈추는 것을 방지하기 위해 미주 신경 보호에 주의를 기울였다. 20분마다 식염수를 토끼의 자궁경부 혈관 및 미주 신경에 주입하여 촉촉하게 유지하였다. 2개의 1번 실크 와이어를 오른쪽 총경동맥 주위에 감았다.

[0458] (c) 오른쪽 총경동맥의 시작 세그먼트를 완전히 노출시켰다: 조직 전단으로 오른쪽 가슴 근육의 일부를 열고, 오른쪽 총경동맥을 따라 근위부로 분리하고, 오른쪽 총경동맥과 오른쪽 쇄골하 동맥의 일부를 조심스럽게 분리하였다.

[0459] (d) 오른쪽 총경동맥 시작 부분에서 폐쇄된 루멘의 생성: 오른쪽 총경동맥 시작 부분에서 약 2.5㎝ 떨어진 곳에 1번 와이어를 결찰하고, 다른 1번 와이어를 매듭으로 감지만 결찰하지 않고, 동맥류 클립을 오른쪽 쇄골하 동맥 근처의 오른쪽 총경동맥 시작 부분에 죔쇠로 고정하여, 동맥류 클립의 안쪽이 오른쪽 총경동맥과 오른쪽 쇄골하 동맥의 교차점 아래에 있도록 하였다.

[0460] (e) 엘라스타제 주입: 안과용 가위로 오른쪽 총경동맥 시작 부분에서 1.5㎝ 떨어진 동맥의 측벽을 절단하고, 엘라스타제 함유 캐뉼라 바늘(끝 부분에 주사기가 있는 22G 캐뉼라 바늘)을 삽입하여 바늘의 머리는 동맥류 클립에 최대한 가깝게 하고, 캐뉼라 바늘 삽입을 실크 실로 결찰하여 유체가 새지 않도록 하고, 약 75U의 돼지 췌장 엘라스타제를 튜브의 루멘에 주입하였다.

[0461] (f) 혈관 결찰: 엘라스타제 절제 20분 후 투관침을 제거하고, 천자 포트를 결찰하고, 조심스럽게 동맥류 클립을

느슨하게 풀고, 필요한 경우 식염수 방울로 적신다.

[0462] (g) 상처 봉합: 건조된 축적된 혈액에 담근 거즈를 사용하여 근육과 피부를 층별로 봉합하고, 절개부위를 요오드포로 소독하였다.

[0463] (h) 수술 직후, 헤파린 나트륨 200 U/kg 및 세프트리악손 나트륨 용액 0.3 g/kg을 정맥 주사하고, 동물을 세정할 때까지 활력 징후를 면밀히 관찰하고 별도의 우리에서 급이하였다. 수술 후 3~5일 동안 항생제를 계속 사용하였다.

[0464] 단계 2) (각 동물의 동맥류 운반 동맥 및 복부 대동맥에 조밀한 메쉬 스텐트 이식)은 다음과 같이 수행하였다:

[0465] (a) 마취: 상술한 바와 같음.

[0466] (b) 오른쪽 대퇴 동맥을 절개하고 5F 보호 혈관 천자 시스(sheath)를 삽입하였다.

[0467] (c) 5F 유도 카테터를 대동맥 궁에 배치하고 DSA 혈관 조영술을 수행하였다.

[0468] (d) 마이크로카테터의 배치: 정맥 내 헤파린을 전신 헤파린화 처리하고 마이크로카테터를 배치하고, 마이크로가이드 와이어를 통해 쇄골하 동맥에서 혈관의 원위 말단까지 이를 밀어넣은 후 빼냈다.

[0469] (e) 운반 동맥 위치에 스텐트 이식: 유도관을 통해 조밀한 메쉬 스텐트 시스템을 마이크로카테터에 삽입하고, 푸시 로드를 적절한 위치로 앞으로 밀고, 유도관을 빼내고, 스텐트가 운반 동맥으로 밀려들어갈 때까지 푸시 로드를 계속 밀고, 종양의 경부가 스텐트의 중앙 근처에 오도록 스텐트 위치를 조정하였다. 푸시 로드를 고정하고, 마이크로카테터를 후퇴시키고 스텐트를 회수 지점 위치로 부분적으로 방출하기 시작하였다. 스텐트의 위치가 만족스러우면 계속해서 마이크로카테터를 후퇴시켜 스텐트를 완전히 방출하고; 위치가 만족스럽지 않으면 마이크로카테터를 뒤로 밀어 스텐트를 마이크로카테터에 회수하고 위치를 조정하여 다시 방출하여 동맥류 경부를 완전히 덮는다. 스텐트 장착이 완료된 후 전달 시스템 및 마이크로카테터를 빼냈다.

[0470] (f) 복부 대동맥에 스텐트 이식: 운반 동맥의 위치에서 시험 물품 스텐트의 방출이 완료된 후, 가이드 카테터를 후퇴시켜 복부 대동맥의 위치에 두고, 두 번째 스텐트를 동일한 방식으로 배치하였다; 스텐트는 적어도 한 쌍의 요추 동맥 시작 부분을 통해 복부 대동맥에 배치되어야 한다. 방출이 완료된 후, 전달 시스템, 마이크로카테터, 및 가이드 카테터를 빼내고 대퇴 동맥 절개부위를 봉합하였다.

[0471] (g) 동물이 깨어나 정상적으로 급이할 때까지 기다렸다.

[0472] 실험군은 동물 모델의 동맥류 위치(총경동맥) 및 복부 대동맥에 조밀한 메쉬 스텐트 시스템을 이식하였고, 대조군은 동맥류 운반 동맥에 조밀한 메쉬 스텐트 시스템을 이식하였으며, 관통 혈관 및 분지 혈관에 대한 스텐트의 효과를 평가하기 위해 복부 대동맥에 장치를 이식하였다.

[0473] 이식하는 동안 헤파린 나트륨 150 U/kg을 IV 주사한 후 동물에게 항혈소판 요법(아스피린 및 클로피도그렐)을 수술 전 3일 동안 5 ㎎/kg씩 1일 1회 급이하고, 수술 후 종료점까지 5 ㎎/kg씩 급이하였다.

[0474] 조직병리학적 분석

[0475] 담체 동맥의 스텐트 삽입된 세그먼트의 수집된 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 이상 침지 고정하여 보존하고, 알코올 구배로 탈수시키고 자일렌 투명 처리하여 조직병리학적 분석을 실시하였다.

[0476] 동맥류 운반 동맥의 수지-내장된 스텐트 삽입된 세그먼트를 동맥류의 경부를 통해 가로로 절개하되, 한 조각은 동맥류에서 자르고 두 조각은 비동맥류에서 자르고, HE로 염색하였다; 스텐트 삽입되지 않은 세그먼트는 파라핀-내장되었고, 하나는 근위부에서, 다른 하나는 원단부에서 잘랐다; 조직병리학적 평가를 위해 HE 염색을 수행하였다.

[0477] 주사전자현미경(SEM) 분석

[0478] 7D(7일), 30D(30일) 및 60D(60일)에 각각 한 마리의 동물을 무작위로 선정하고, 상기 시점에 이식된 동맥류 운반 동맥 및 복부 대동맥을 SEM을 위해 수집하여 동맥류 경부 부위의 흐름 지향 스텐트 및 복부 대동맥 부위의 분지 혈관의 개방 부위의 내피화를 관찰하였다.

[0479] 참고: 7D 시점에는 복부 대동맥만 SEM으로 검사하였고, 30D 시점에는 운반 동맥 SEM을 확인하였으며, 60D 시점에서는 운반 동맥 및 복부 대동맥을 SEM으로 검사하였다.

[0480] 결과

[0481] 전기그래프팅된 쿠폰 상에 eG™ NTMA 필름 그래프팅의 확인

[0482] eG™ NTMA 필름의 적외선 스펙트럼은 도 26에 나타나 있다.

[0483] 또한, 샘플의 친수성 특성의 비교는 물방울 모양으로 시각화될 수 있다(도 27): 베어 표면에서는 물방울이 표면에 서 있는 반면, eG™ NTMA 표면에서는 방울이 완전히 편평하고, 물 접촉각은 거의 측정할 수 없으며, 이는 표면이 초친수성임을 나타낸다.

[0484] 이러한 결과는 비교용 CFD 스텐트에 eG™ NTMA 필름이 효율적으로 전기그래프팅되었음을 확인시켜 준다.

[0485] SEM 결과

[0486] 본 발명에 따른 eG™ NTMA 또는 SP1072 펩타이드로 코팅된 스텐트의 7일째의 예시적인 SEM 단면이 도 28에 제시되어 있다.

[0487] eG™ NTMA 코팅된 스텐트(왼쪽 부분 참조)의 경우, 스텐트가 혈관 내에서 완전히 확장되었으며, 스텐트 혈관 안착 및 혈관 루멘 개방성이 양호하였다. 소량의 혈전이 일부 영역에 흩어져 있었다. 소량의 스텐트의 경우, 스텐트 표면에 내피 커버리지가 있었고, 내피 커버리지가 없는 영역에서는 스텐트 표면에 부착된 적혈구, 염증 세포 및 혈소판 집합 정도가 다양하였다. 측부 혈관 구경에서 막힘이 발견되지 않았고, 이는 측부 혈관의 혈류의 개방성을 나타낸다.

[0488] SP1072 코팅된 스텐트의 경우(오른쪽 부분 참조), 스텐트가 혈관 내에서 완전히 확장되었고, 스텐트 혈관 안착 및 혈관 루멘 개방성이 양호하였다. eG™ NTMA 코팅된 스텐트와 달리 뚜렷한 혈전은 발견되지 않았다. 일부 영역에서 스텐트 표면에 내피 커버리지가 있었고(특히 도 26B의 B 및 D 영역에서 특히 우수한 커버리지 참조), 내피 커버리지가 없는 영역에는 스텐트 표면에 부착된 소량의 적혈구, 염증 세포 및 혈소판이 있었다. 측부 혈관 구경에서 막힘이 발견되지 않았고, 이는 측부 혈관의 혈류의 개방성을 나타낸다.

[0489] 조직병리학적 분석

[0490] 7일차의 예시적인 병리학적 결과는 도 29에 제시되어 있다.

[0491] eG™ NTMA 코팅된 스텐트의 경우(도 29A 참조), 동맥류 경부 앞의 스텐트(오른쪽 참조)가 신생-벽(neo-wall)으로 덮여 있다. 그러나 후자는 백혈구(근육 부분 내의 검은색 핵, 스텐트 지지대 부근, 오른쪽 아래 도면 참조)에 의해 침윤된 것으로 보이며, 내부에 신선한 피브린 층 및 외부에 패킹된 적혈구 및 혈소판(피브린 층 중 진회색 영역, 왼쪽 아래 도면의 검은색 원 참조)이 층을 이루고 있다. 더욱이, 동맥류 낭의 혈전은 조직화되어 있지 않은 것으로 보이며(중합된 세포외 기질 시트가 존재한다는 증거가 없음) 신선한 혈액(적혈구, 혈소판, 백혈구)이 여전히 혈전으로 유입되고 있다. 신선한 혈액이 여전히 낭에 들어가고 낭에 갇힐 수 있다는 사실은 후기 동맥류 파열의 위험을 증가시킬 수 있기 때문에 이는 중요한데 그 이유는 신선한 혈액이 지속적으로 도착하면 혈전증/섬유소용해의 새로운 물결이 발생하고 두 시스템의 효소(트롬빈, 플라스민 등)가 결국 동맥류 벽의 분해를 촉진하기 때문이다. 종합적으로, 이러한 데이터는 동맥류 경부를 덮고 있는 신생-조직이 가능하게는 금속(이물질)에 대해 과민반응성(혈전성 및 염증성)이고 누출이 있음을 나타낸다.

[0492] 대조적으로, SP1072 코팅된 스텐트의 경우(도 29A 참조), 동맥류 낭의 혈전은 깨끗하고 정렬된 세포외 기질 시트가 그것을 가로지르는 것이 보이고 진회색의 길고 굴곡진 선으로 감지될 수 있기 때문에 "조직화"되어 있다. 주목할 만한 점은 동맥류 낭 내 신생-벽 및 혈전 사이의 공간에는 무정형 회색질(신선한 피브린이나 적혈구)이 함유되어 있지 않다는 점이고, 이는 신선한 혈액이 더 이상 그곳에 들어가고 갇혀 있는 것이 허용되지 않으므로 혈액 효소에 의해 구동되는 동맥류 벽 분해의 위험이 낮다는 것을 나타낸다. 낭 주위 동맥 벽의 두껍고 규칙적인 모양은 이러한 가정을 뒷받침하며, 혈전 내에 무정형 물질/어두운 핵이 없다는 점은 신선한 혈소판 및 응고 인자에 침투할 수 없다는 가정을 뒷받침한다.

[0493] 오른쪽 상단 도면의 검은색 원: 스텐트 아래에 세포외 기질(진회색)이 조밀하고 풍부하며 혈전증 또는 염증이 없는(검은색 핵이 없음) 신생-동맥 벽이 형성되고 있다.

[0494] 외부에 조직화된 혈전 및 내부에 조직화된 신생-벽이 존재하는 것은, 실시예에서 나타낸 바와 같이, 혈액이 여전히 특징적인 스텐트 부분을 통해 큰 동맥류 낭에 여전히 들어갈 수 있더라도 혈전으로 들어가거나 신생-벽 너머로 응고될 수 없다는 사실을 뒷받침하고, 이는 혈액이 신선한 혈전 및/또는 무방비로 노출된 스텐트와 접촉할 수 있는 상황에 비해 더 짧은 기간에 혈전 및 폐색을 완전히 치유할 수 있도록 한다. 실제로, 일단 공동이 실제가 되면, 무방비로 노출된 스텐트(신생-벽이 없는 부분) 위의 CD31 모방 코팅은 장치 위 및 그 사이의 인접한

내피 세포의 이동과 성장을 촉진하여 조직화된 혈전을 완전히 덮을 수 있으므로 동맥류 경부를 폐쇄한다.

[0495] SP1072 코팅된 스텐트의 동맥류에 대한 60일째의 예시적인 병리학적 결과가 도 30에 제시되어 있다. 매우 큰 동맥류 낭에도 불구하고 혈전은 매우 잘 조직화된 것으로 나타난다(혈전 전체에 걸쳐 길고 규칙적인 세포외 기질의 시트, 백혈구/혈소판/혈전의 적혈구 침윤이 없는 것에 의해 검출가능한 신선한 혈액으로의 불투과성). 조직화된 혈전의 앞쪽이 스텐트에 도달하자마자, 경부는 신생-동맥벽으로 완전히 덮일 것이다. 후자는 이미 스텐트 지지대와 접촉하고 있는 동맥벽의 염증/혈전증의 부재(이물질에 대한 반응의 부재)에 의해 제안된 바와 같이 잘 조직화될 것이다.

[0496] *결론*

[0497] 위의 결과는 SP1072 코팅이 다음과 같음을 보여준다:

[0498] ● 흐름 전환기 스텐트의 내부 표면의 조기 내피화를 촉진하고,

[0499] ● 동맥류 낭 입구에서 조직화되고, 혈액 불투과성인 신생 동맥벽의 성장을 촉진하여 낭 내부에 잘 조직화된 비염증성 혈전이 형성되도록 하고, 그리고

[0500] ● 동맥류 진입 이외의 부위에서, 장치의 내피화가 빠르고 완전하며 뚜렷한 염증이나 신생내막이 없다.

[0501] 본 발명에 따른 다른 펩타이드를 이용하여 얻은 동등한 시험관 내 결과를 고려하면, 유사한 생체 내 결과도 숙련된 기술자에 의해 예상될 것이다.

[0502] **실시예 4:**

[0503] **항혈소판 화합물 투여의 부재 하에 친수성 중합체 NTMA 만으로 코팅된 스텐트와 비교한 본 발명에 따른 펩타이드 SP1072로 코팅된 흐름 전환기 스텐트(CFD)의 생체 내 효과**

[0504] 실시예 3에서 얻은 양호한 결과는 SP1072(또는 본 발명에 따른 또 다른 펩타이드)로 코팅된 스텐트가 충분히 빠른 재내피화 및 염증의 충분한 부재를 허용하여 이식 후 항혈소판 화합물, 특히 항-P2Y12 제제의 투여 필요성을 방지할 수 있음을 시사한다.

[0505] 따라서 이 가설을 시험하는 예비 실험을 수행하였다.

[0506] *재료 및 방법*

[0507] 다음을 제외하고 실시예 3과 동일한 재료 및 프로토콜을 사용하였다:

[0508] ● 각 조건에 대해 세 마리의 동물만 사용하였다, 그리고

[0509] ● 이식 후 동물에게 아스피린이나 클로피도그렐을 투여하지 않았다.

[0510] 결과

[0511] 예비 결과는 다음을 보여준다:

[0512] ● SP1072 코팅된 흐름 전환기 스텐트를 이식한 동물은 7일 후에도 혈전 없이 여전히 살아 있다(n=3).

[0513] ● 대조적으로, eG™ NTMA 코팅된 스텐트를 이식한 동물은 7일째에 모두 혈전증으로 사망하였다(n=3).

[0514] *결론*

[0515] 비록 예비적이지만, 이 실험은 본 발명에 따른 펩타이드로 코팅된 의료 장치를 이식한 후 환자의 치료에 항-P2Y12의 사용이 필요하지 않을 수 있으며 보다 일반적으로는 항혈소판 요법(아스피린 포함)이 필요하지 않을 수 있음을 시사한다.

[0516] 항혈소판 화합물, 특히 항-P2Y12 요법은 출혈 위험이 있는 개체에게는 안전하게 사용할 수 없기 때문에 이 결과는 매우 중요하다. 나아가, 출혈 위험이 없는 개체에게도 항혈소판 화합물은 심각한 부작용(아스피린을 사용하면 위궤양, 항-P2Y12를 사용하면 호중구감소증...)을 나타낼 수 있으며, 이는 항혈소판 화합물이 필요하지 않거나 훨씬 더 낮은 농도로 사용될 수 있는 경우, 본 발명에 따른 펩타이드로 코팅된 의료 장치를 사용함으로써 예방될 수 있다.

[0517] **실시예 5:**

[0518] **친수성 중합체 NTMA만으로 코팅된 스텐트와 비교하여 본 발명에 따른 펩타이드 SP1072로 코팅된 자가 확장형 스**

텐트의 생체 내 효과

[0519] *재료 및 방법*

[0520] 스텐트

[0521] 자가 확장형 스텐트(ISS)는 Sinomed의 니티놀로 만든 편조 메쉬이다. 이것을 다음 코팅 중 하나로 코팅하였다:

[0522] 1. 본 발명에 따른 SP1072 펩타이드, 또는

[0523] 2. 친수성 중합체 eG™ NTMA (N-[트리스(히드록시메틸)메틸]아크릴아미드의 전기그래프팅으로부터 획득됨).

[0524] SP1072 펩타이드 코팅은 상기 실시예 3에 기술된 바와 같이 수행하였다.

[0525] 친수성 중합체 eG™ NTMA 코팅된 스텐트는 상기 실시예 3에 기술된 바와 같이 수득하였다.

[0526] 동물 시술

[0527] 본 연구에서는 건강한 뉴질랜드 흰토끼 5마리를 실험동물로 선정하고, 예비동물 2마리를 추가로 선정하였다. 수술 후 7일, 14일 및 28일에 세 번의 관찰 시점이 있으며, 7일 시점에 2마리, 14일 시점에 1마리, 28일 시점에 2마리이다. 각 실험동물에는 총 4개의 스텐트(시험항목 A와 시험항목 B에 각각 2개씩)를 이식하였고, 각 동물의 스텐트 이식 부위로서 복부 대동맥 및 양측 장골 동맥을 선택하여, 복부 대동맥에 2개의 스텐트를 이식하고 양측 장골 동맥 각각에 1개의 스텐트를 이식하였다. 수술 후 관찰 기간은 영상화로 이어지며, 그룹 A 및 B의 각 동물로부터 하나의 샘플을 SEM을 위해 무작위로 선택하고, 나머지 샘플은 조직병리학적으로 분석하였다. 실험의 일반적인 설계는 다음과 같다:

[0528] 표 3. 일반 실험 설계

시점	동물 수	스텐트 이식 개수		이식 위치	실험 내용
		시험항목 그룹 A	시험항목 그룹 B		
7 일	1	2	2	양측 외부 장골 동맥과 함께 복부 대동맥	1. 적응 기간, 수술 전, 복용 전 정기적인 혈액 및 혈청 화학 검사. 2. 수술 후 관찰 급이 단계 동안 실험동물의 일상 관찰. 3. 해부 및 육안 관찰 및 사진촬영. 4. 전자현미경 스캐닝 분석. 5. 조직병리학적 분석을 위한 표적 혈관.
14 일	1	2	2		
28 일	1	2	2		

[0529]

[0530] 참고: 시험항목 그룹 A 및 그룹 B는 자가 확장 스텐트의 2개의 서로 다른 코팅이다.

[0531] 수술 절차:

[0532] (1) 다음과 같이 마취를 수행하였다:

[0533] 모든 수술은 무균 기술을 이용하여 수행하였고, 이식 과정 동안 실험 동물은 전신 마취 하에 있었다.

[0534] 수술 당일, 실험 동물을 진정시키고 6 ㎎/㎏의 Sutex® 50을 근육 내 주사하여 마취를 유도하였다. 필요한 경우, 호흡 마스크를 사용하여 흡입함으로써 실험 동물을 이소플루란으로 마취시킬 수 있다.

[0535] 성공적인 마취 유도 후, 실험 동물은 구강 평시 기관을 통해 삽관된 후 인공호흡기에 연결되어 호흡기 접근을 설정하고 마취제 및 산소의 혼합물을 지속적으로 흡입하여 마취를 유지하였다. 구토로 인한 질식을 방지하기 위해 수술 전에 구토를 멈추기 위한 일부 아트로핀을 실험 동물에게 투여해야 할 수 있다.

[0536] 마취되고 삽관된 실험 동물을 옆으로 누운 자세 또는 바로 누운 자세로 수술대에 놓고, 동물을 구속 밴드를 사용하여 묶은 다음, 위치를 사진으로 촬영하고 기록하였다(나중에 관찰할 때 사용된 것과 동일한 위치 및 각도를 용이하게 하기 위함). 오른쪽 뒷다리의 수술 부위를 준비하고, 소독하고, 시트를 깔았다. 동물의 위치가 변경되면 시트와 수술 부위 준비가 반복될 필요가 있다.

[0537] 또한 정맥 주사바늘을 말초 정맥 혈관 중 하나에 삽입하고 필요에 따라 약물 또는 재수화액을 카테터를 통해 투

여하였다.

[0538] (2) 5F 혈관 시스를 왼쪽 또는 오른쪽 총경동맥에 삽입하여 혈관 접근을 확립하였다.

[0539] (3) 5F 카테터를 가이드와이어의 안내 하에 혈관 접근을 통해 심장의 하행 대동맥에 삽입하고, 장골 동맥 혈관 조영술을 수행하였다. 스텐트 이식 부위 선택을 안내하기 위해 혈관 조영술 후에 정량적 동맥 혈관 측정을 수행하였다.

[0540] (4) 마이크로카테터의 배치: 정맥 내 헤파린을 전신 헤파린화 처리한 후, 마이크로카테터를 배치하였다. 마이크로카테터를 마이크로가이드 와이어를 통해 실험동물 스텐트를 이식할 장골 동맥 부위까지 밀어 넣은 후, 마이크로가이드 와이어를 빼냈다.

[0541] (5) 장골 동맥 스텐트 이식: 유도관을 통해 마이크로카테터에 시스템을 삽입하고, 푸시 로드를 적절한 위치로 앞으로 밀고, 유도관을 빼내고, 스텐트가 장골 동맥 안으로 밀려들어갈 때까지 푸시 로드를 계속해서 밀고, 스텐트가 혈관 내에서 의도한 위치에 있도록 스텐트 위치를 조정하였다. 푸시 로드를 고정하고 마이크로카테터를 후퇴시켜 스텐트를 회수 지점 위치로 부분적으로 방출하기 시작하였다. 스텐트의 위치가 만족스러우면 계속해서 마이크로카테터를 후퇴시켜 스텐트를 완전히 방출하고; 위치가 만족스럽지 않으면 마이크로카테터를 뒤로 밀어 스텐트를 마이크로카테터에 회수하고 위치를 조정하여 다시 방출한다. 스텐트 장착이 완료된 후 전달 시스템을 빼내고, 마이크로가이드 와이어를 다시 마이크로카테터에 밀어 넣고, 마이크로가이드 와이어를 마이크로카테터와 함께 장골 동맥의 반대편으로 밀어 넣고, 반대편 스텐트의 이식을 같은 방식으로 완료하였다.

[0542] (6) 복부 대동맥에 스텐트 이식: 장골 동맥 위치 테스트 핀 스텐트의 방출이 완료된 후, 마이크로카테터를 후퇴시켜 복부 대동맥 위치에 배치하고, 두 세트의 스텐트를 복부 대동맥에 같은 방식으로 배치하였다. 절차가 끝난 후, 모든 기구 및 장비를 실험 동물에서 제거하였다.

[0543] (7) 동물이 깨어날 때까지 기다리고 실험이 끝날 때까지 정상적으로 유지하였다.

[0544] 이식하는 동안 헤파린 나트륨 150 U/kg을 IV 주사하는 것 외에, 아스피린을 수술 전 3일 동안 1일 1회 5 mg/kg 급이하고 수술 후 종료점까지 5 mg/kg을 급이함으로써 동물에게 제공하고, 클로피도그렐은 수술 전 3일 동안 1일 1회 18.75 mg 급이하고 수술 후 종료점까지 18.75 mg을 급이함으로써 동물에게 제공하였다.

[0545] 조직병리학적 분석

[0546] 담체 동맥의 스텐트 삽입된 세그먼트의 수집된 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 이상 침지 고정하여 보존하고, 알코올 구배로 탈수시키고 자일렌 투명 처리하여 조직병리학적 분석을 실시하였다.

[0547] 장골 동맥의 수지-내장된 스텐트 삽입된 세그먼트를 가로로 절단하고 HE로 염색하였다; 스텐트 삽입되지 않은 세그먼트는 파라핀-내장되었고, 하나는 근위부에서, 다른 하나는 원단부에서 잘랐다; 조직병리학적 평가를 위해 HE 염색을 수행하였다.

[0548] 주사전자현미경(SEM) 분석

[0549] 7D(7일), 14D(14일) 및 28D(28일)에 각각 한 마리의 동물을 무작위로 선정하고, 상기 시점에 이식된 스텐트 삽입된 장골 동맥 및 복부 대동맥을 SEM을 위해 수집하여 ISS 스텐트의 내피화를 관찰하였다.

[0550] *결과*

[0551] 실시예 3에서 CFD 스텐트로 이미 얻은 결과에 기초하면, SP1072 펩타이드 코팅된 ISS 스텐트의 경우, eG™ NTMA 전기그래프팅된 ISS 스텐트보다 더 나은, 신생내막 형성이 제한된 양호한 내피화가 예상된다.

[0552] **실시예 6:**

[0553] **베어 금속 스텐트 및 HT Supreme 스텐트와 비교한 본 발명에 따른 펩타이드 SP1072로 코팅된 풍선 확장형 CoCr 스텐트의 생체 내 효과**

[0554] *재료 및 방법*

[0555] 스텐트

[0556] 세 가지 유형의 풍선 확장형 스텐트를 사용하였다:

[0557] ● SP1072 펩타이드로 코팅된 CoCr 스텐트,

[0558] ● 베어 금속 스텐트, 및

[0559] ● eG BuMA 프라이머 층 및 1.2 ㎍/㎟ 농도의 시롤리무스를 갖는 10 ㎛ 두께의 PLGA(폴리(락틱-코-글리콜산)) 층을 함유하는, Sinomed에서 상용화한 FT Supreme 스텐트.

[0560] 동물 시술

[0561] 본 연구에서는 건강한 뉴질랜드 흰토끼 9마리를 실험동물로 선정하고 예비동물 2마리를 선정하였다. 수술 후 7일, 14일 및 28일의 세 번의 관찰 시점으로, 각 시점에 세 마리씩, 동물을 나누었다. 각 동물에는 4개의 스텐트를 이식하였고, 각 동물의 복부 대동맥 및 양측 장골 동맥이 스텐트 이식 부위로서 선택되었다. 복부 대동맥에 2개의 스텐트를 이식하고, 양측 장골 동맥에 각각 1개의 스텐트를 이식하였다. 수술 후 관찰 기간이 끝난 후, 상이한 코팅을 갖는 각 동물의 2개 샘플을 SEM을 위해 무작위로 선택하고, 나머지 샘플은 조직병리학적으로 분석하였다. 실험의 일반적인 설계는 아래 표 4에 나타나 있다.

[0562]

시점	동물 수	스텐트 이식 개수	이식 위치	실험 내용
7 일	3	12	양측 외부 장골 동맥과 함께 복부 대동맥	1. 적응 기간 동안, 수술 전, 및 샘플링 전 정기적인 혈액 및 혈청 화학 검사; 2. 수술 후 관찰 및 급이 단계 동안 실험동물의 일상 관찰; 3. 해부 및 육안 관찰 및 사진촬영; 4. 전자현미경 스캐닝 분석; 5. 표적 혈관의 조직병리학적 분석.
14 일	3	12		
28 일	3	12		
(28 일)까지 대기	2	8		

[0563] 수술 절차

[0564] (1) 마취:

[0565] 모든 수술은 무균 기술을 이용하여 수행하였고, 이식 과정 동안 실험 동물은 전신 마취 하에 있었다.

[0566] 수술 당일, 실험 동물을 진정시키고 6 ㎎/㎏의 Sutex® 50을 근육 내 주사하여 마취를 유도하였다. 필요한 경우, 호흡 마스크를 사용하여 흡입함으로써 실험 동물을 이소플루란으로 마취시킬 수 있다.

[0567] 성공적인 마취 유도 후, 실험 동물은 구강 평시 기관을 통해 삽관된 후 인공호흡기에 연결되어 호흡기 접근을 설정하고 마취제 및 산소의 혼합물을 지속적으로 흡입하여 마취를 유지하였다. 구토로 인한 질식을 방지하기 위해 수술 전에 구토를 멈추기 위한 일부 아트로핀을 실험 동물에게 투여해야 할 수 있다.

[0568] 마취되고 삽관된 실험 동물을 옆으로 누운 자세 또는 바로 누운 자세로 수술대에 놓고, 구속 밴드를 사용하여 동물을 묶었다. 수술 부위를 준비하고, 소독하고, 시트를 깔았다. 동물의 위치가 변경되면 수술 부위에 다시 시트를 깔고 준비해야 한다.

[0569] 또한 정맥 주사바늘을 말초 정맥 혈관 중 하나에 삽입하고 필요에 따라 약물 또는 재수화액을 카테터를 통해 투여하였다.

[0570] (2) 6F 혈관 시스를 왼쪽 또는 오른쪽 총경동맥에 삽입하여 혈관 접근을 확립하였다.

[0571] (3) 5F 카테터를 가이드와이어의 안내 하에 혈관 접근을 통해 심장의 하행 대동맥에 삽입하고, 복부 대동맥 및 장골 동맥 혈관 조영술을 수행하였다. 스텐트 이식 부위 선택을 안내하기 위해 혈관 조영술 후에 정량적 동맥 혈관 측정을 수행하였다.

[0572] (4) 장골 동맥 스텐트 이식: 조영제 카테터를 빼내고, 스텐트 전달 시스템을 준비하고, 음압에 도달할 때까지 전달 시스템의 풍선의 공기를 빼낸 다음 풍선이 조영제 및 헤파린 처리된 식염수 혼합물을 흡입하도록 하였다. 스텐트 전달 시스템은 0.014 가이드와이어에 의해 안내되어 선택된 스텐트 이식 부위로 스텐트를 전달하였다. 스텐트가 장골 동맥 혈관 이식 부위에 전달된 후, 풍선 팽창 압력 펌프는 스텐트를 가압하여 이를 개방하고 형광투시 영상을 저장하여 스텐트 이식 정보를 기록한다. 풍선은 이식 부위에 스텐트 직경 및 표적 혈관 직경 사이의 1.10-1.20:1의 비율로 적절한 압력으로 확장되고, 밸러스트 스텐트를 풀고 30초 동안 유지하여 이식된 스

텐트의 양호한 벽 안착을 보장한다.

[0573] (5) 한쪽에 스텐트를 이식한 후, 전달 풍선을 신체에서 빼내고 이식된 스텐트를 평가하기 위해 또 다른 혈관 조영술을 수행하였다. 같은 방식으로 반대편 장골 동맥에 스텐트 삽입을 완료하였다.

[0574] (6) 복부 대동맥 내 스텐트 이식: 장골 동맥 위치에서 스텐트 방출이 완료된 후, 동일한 방식으로 두 세트의 스텐트를 복부 대동맥에 배치하였다. 수술 후, 실험동물의 모든 기구 및 장비를 제거하였다.

[0575] (7) 동물이 깨어날 때까지 기다리고 실험이 끝날 때까지 정상적으로 유지하였다.

[0576] 이식하는 동안 헤파린 나트륨 150 U/kg을 IV 주사하는 것 외에, 항혈소판 요법(아스피린 및 클로피도그렐)을 수술 전 3일 동안 1일 1회 5 ㎎/kg씩 급이하고 수술 후 종료점까지 5 ㎎/kg씩 급이함으로써 동물에게 제공하였다.

[0577] 조직병리학적 분석

[0578] 담체 동맥의 스텐트 삽입된 세그먼트의 수집된 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 이상 침지 고정하여 보존하고, 알코올 구배로 탈수시키고 자일렌 투명 처리하여 조직병리학적 분석을 실시하였다.

[0579] 장골 동맥의 수지-내장된 스텐트 삽입된 세그먼트를 가로로 절단하고 HE로 염색하였다; 스텐트 삽입되지 않은 세그먼트는 파라핀-내장되었고, 하나는 근위부에서, 다른 하나는 원단부에서 잘랐다; 조직병리학적 평가를 위해 HE 염색을 수행하였다.

[0580] 주사전자현미경(SEM) 분석

[0581] 7D(7일), 14D(14일) 및 28D(28일)에 각각 한 마리의 동물을 무작위로 선정하고, 상기 시점에 이식된 스텐트 삽입된 장골 동맥 및 복부 대동맥을 SEM을 위해 수집하여 ISS 스텐트의 내피화를 관찰하였다.

[0582] *결과*

[0583] 실시예 3에서 CFD 스텐트로 이미 얻은 결과에 기초하면, SP1072 펩타이드 코팅된 풍선 확장형 스텐트의 경우 풍선 확장형 베어 금속 스텐트 또는 HT Supreme 스텐트보다 더 나은, 신생내막 형성이 제한된 양호한 내피화가 예상된다.

[0584] 상기 설명으로부터 본 발명의 장점은 본 기술분야의 숙련된 기술자에게 명백해질 것이다.

[0585] P8RI 서열은 활성화 세포에 의해 발현되는 절단된 CD31 분자의 클러스터화를 유지할 수 있는 반면, 본 발명의 펩타이드의 존재는 이식된 장치와 접촉해 들어갈 수 있는 모든 건강한 내피 세포 및 휴면 혈소판 및 백혈구에 손상되지 않은 CD31 분자의 결합을 허용한다.

[0586] 따라서 이러한 세포는 CD31의 트랜스-동종친화성 결합에 의해 전달되는 "나-혼자-남겨두기" 신호를 수신할 수 있고, 이는 순환계 및 혈관화된 조직에서 항상성을 유지하는 데 필수적이다.

[0587] 출혈성 또는 혈전색전성 합병증의 혈전성 또는 생명을 위협하는 발생으로 인해 혈관 내 장치의 사용이 손상되어 왔다.

[0588] 본 발명의 모방 펩타이드를 함유하는 장치는 혈소판 및 백혈구에 의해 건강한 내피, 즉 "자기" 구성요소로서 인식되기 때문에 빠르게 통합된다.

[0589] 또한, 생리학적 내피 세포 표현형으로 빠르게 내피화되는 능력으로 인해 장기적으로 장치 이식 부위에서 혈소판 및 백혈구 활성화 또한 제한된다.

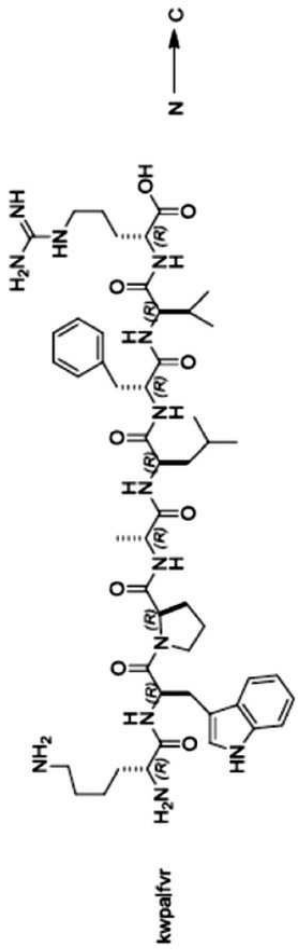
도면

도면1

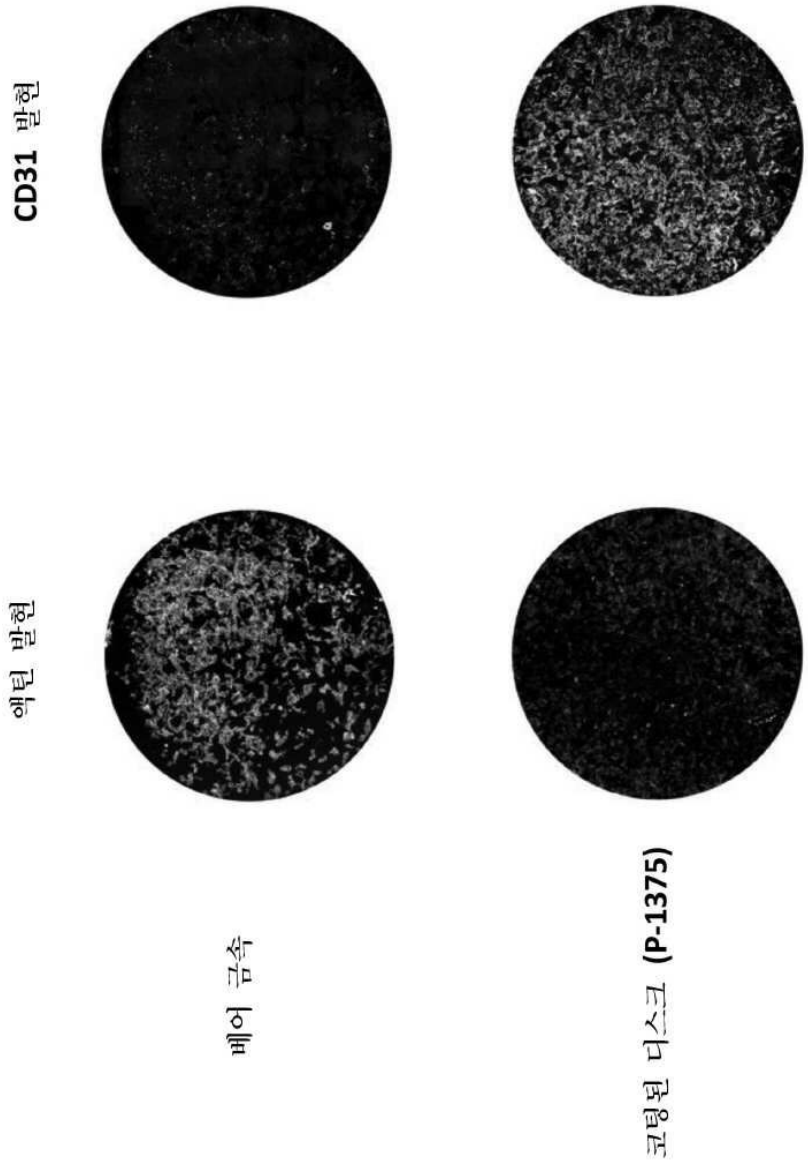
도 1A

(D-Lys)-(D-Trp)-(D-Pro)-(D-Ala)-(D-Leu)-(D-Phe)-(D-Val)-(D-Arg).

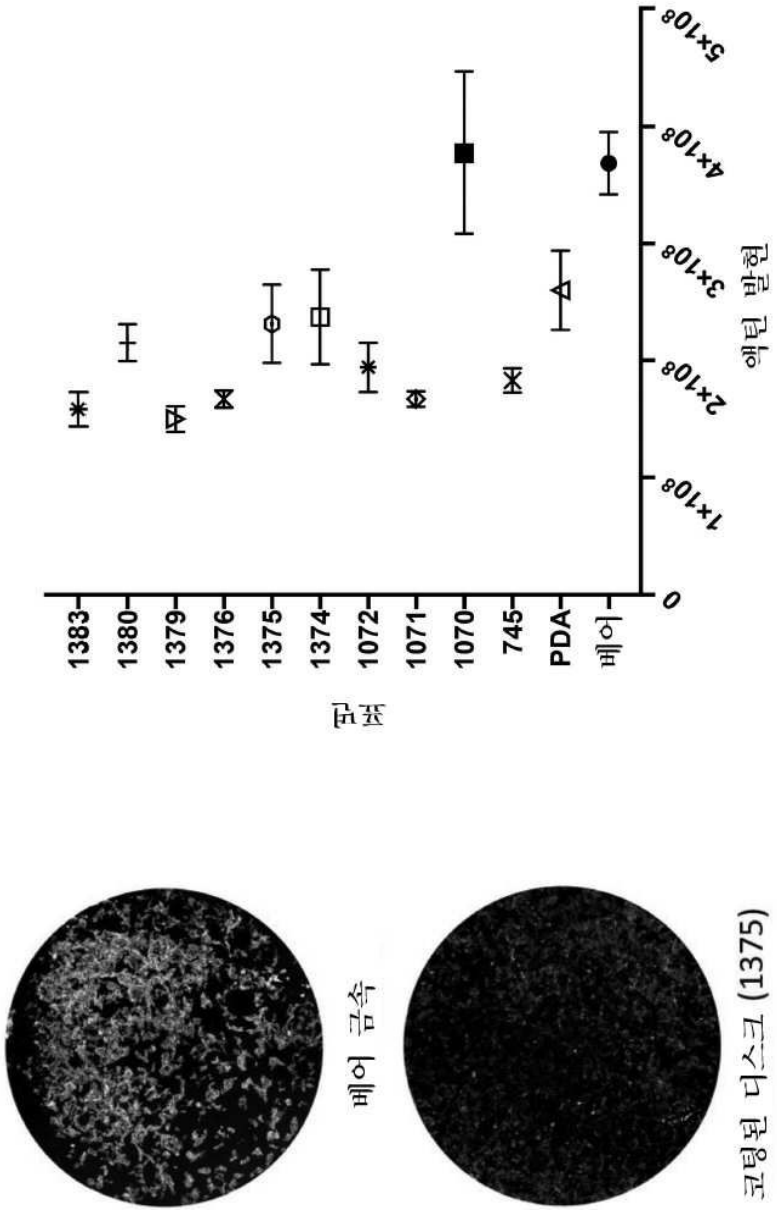
도 1B



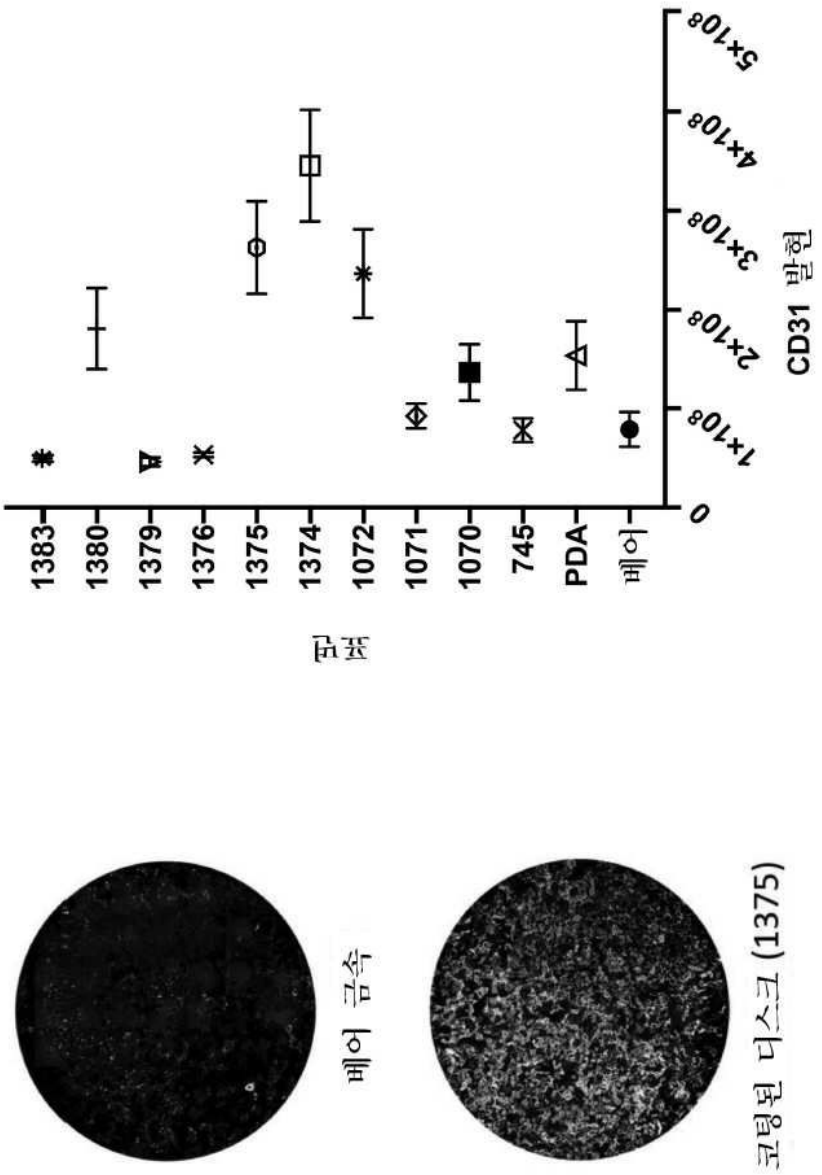
도면2



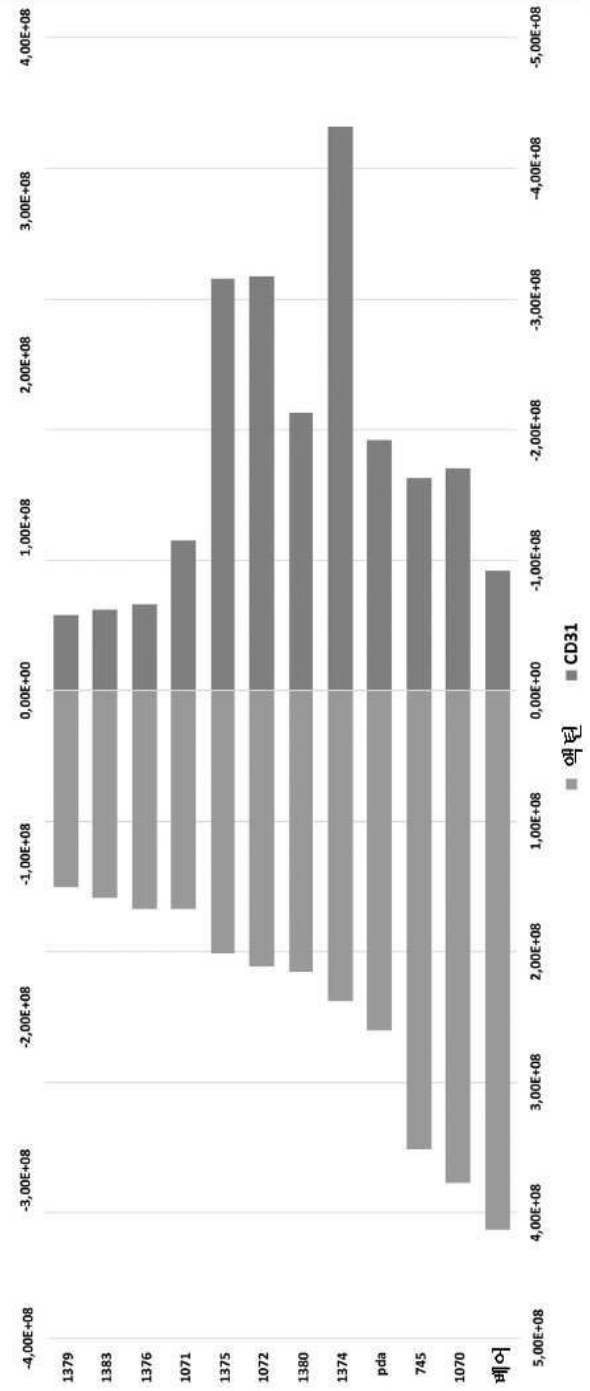
도면3


액틴 발현
0
1x10⁸
2x10⁸
3x10⁸
4x10⁸
5x10⁸
베어
PDA
745
1070
1071
1072
1374
1375
1376
1379
1380
1383
표면
베어 금속
코팅된 디스크 (1375)

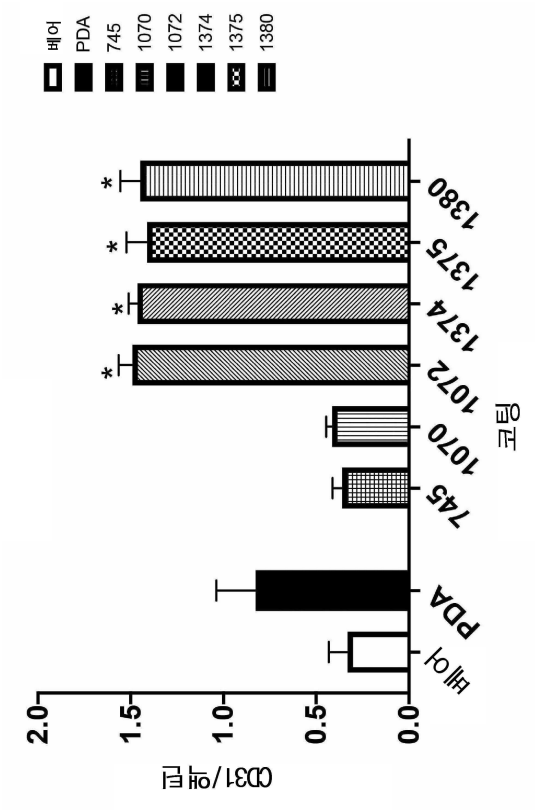
도면4


CD31 발현
0
1*10⁸
2*10⁸
3*10⁸
4*10⁸
5*10⁸
베어
PDA
745
1070
1071
1072
1374
1375
1376
1379
1380
1383
균주
베어 금속
코팅된 디스크 (1375)

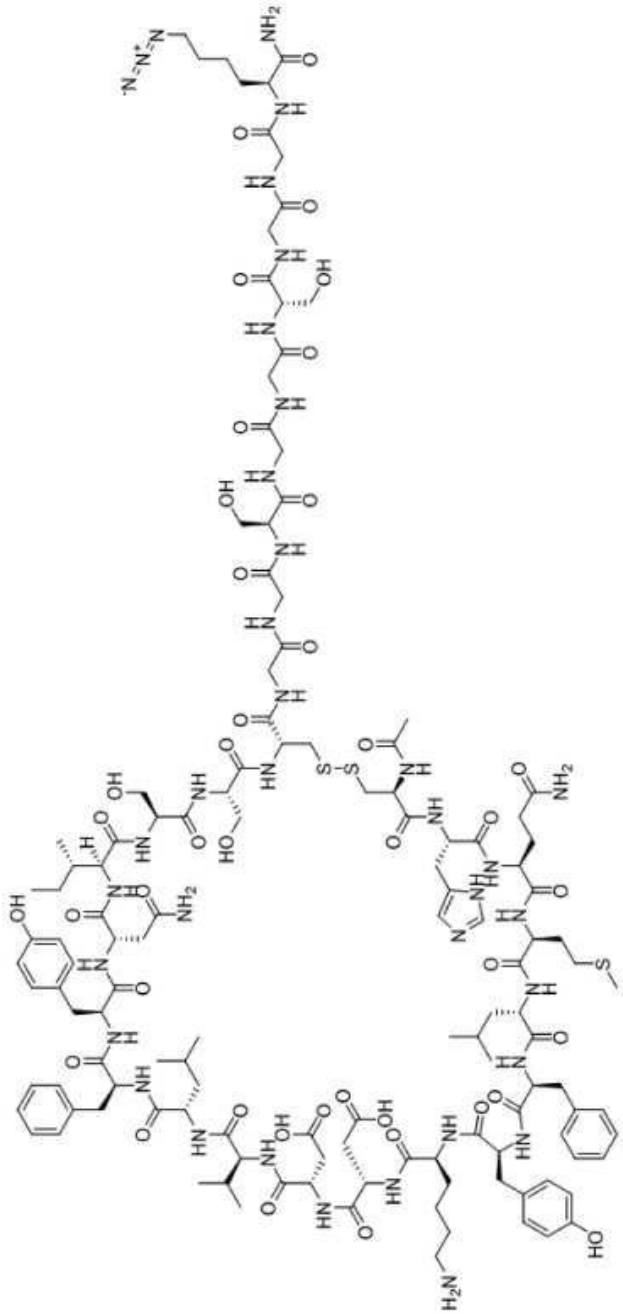
도면5


4,00E+08
3,00E+08
2,00E+08
1,00E+08
0,00E+00
-1,00E+08
-2,00E+08
-3,00E+08
-4,00E+08
5,00E+08
4,00E+08
3,00E+08
2,00E+08
1,00E+08
0,00E+00
-1,00E+08
-2,00E+08
-3,00E+08
-4,00E+08
-5,00E+08
1379
1383
1376
1071
1375
1072
1380
1374
pda
745
1070
베이
액틴
CD31

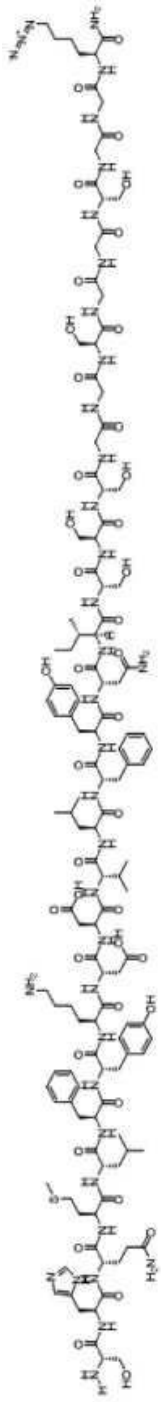
도면6


베어
PDA
745
1070
1072
1374
1375
1380
CD31/액틴
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
베어
PDA
745
1070
1072
1374
1375
1380
코팅
*
*
*
*

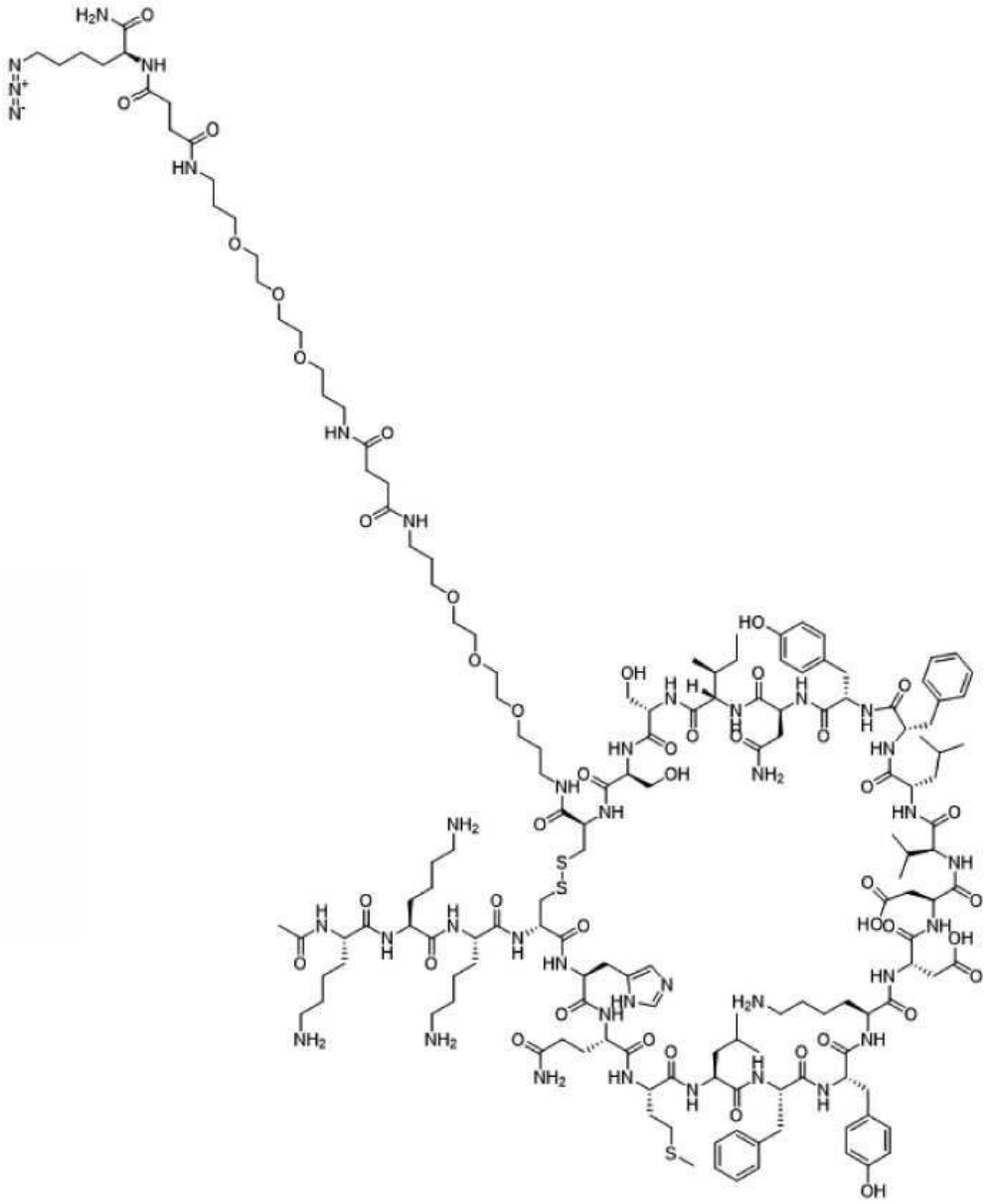
도면7



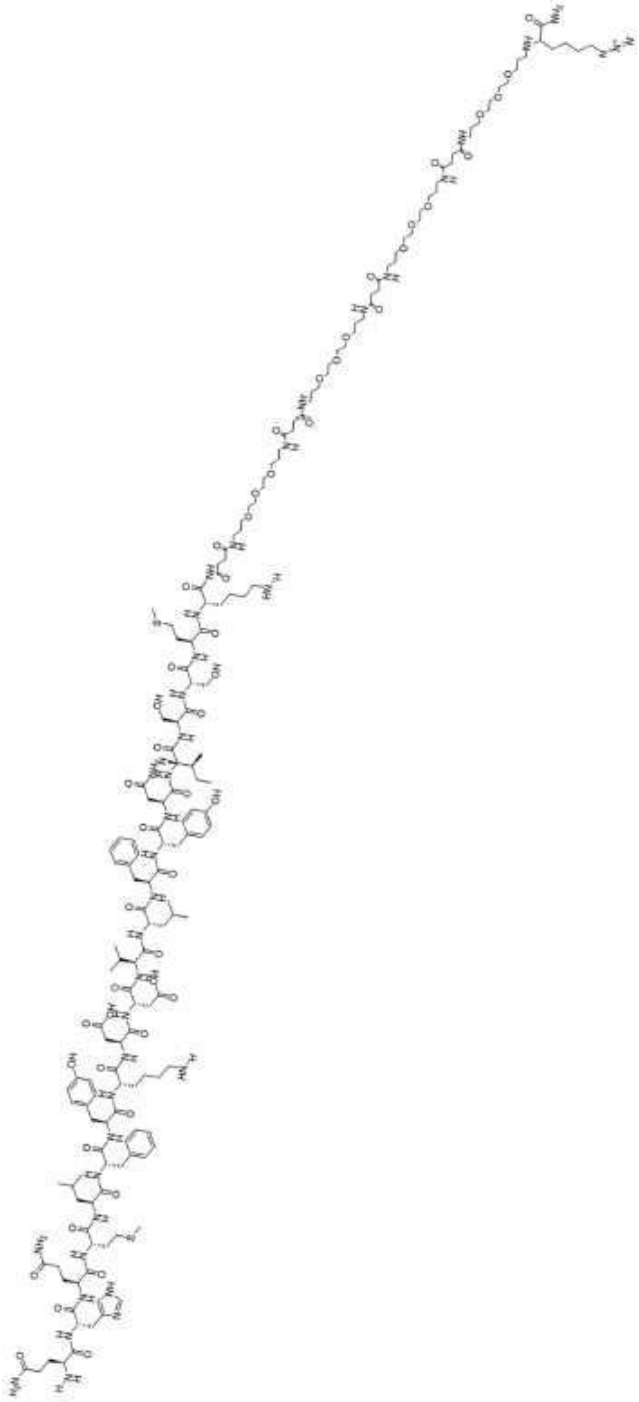
도면8



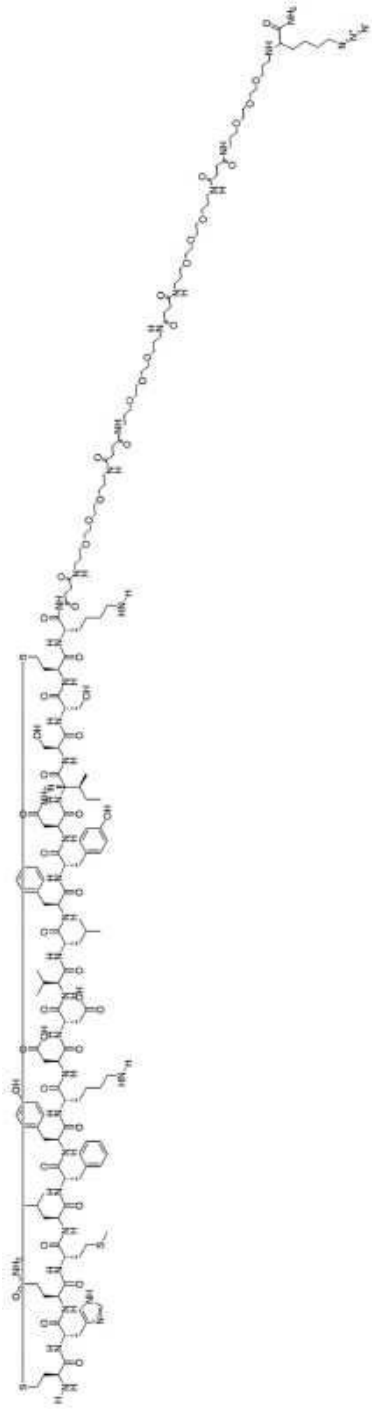
도면9



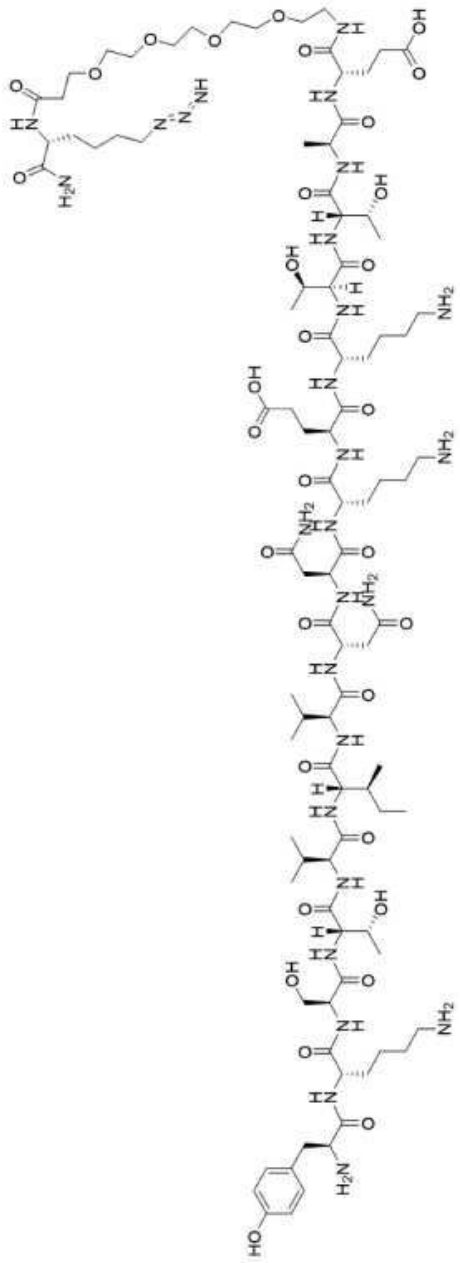
도면10



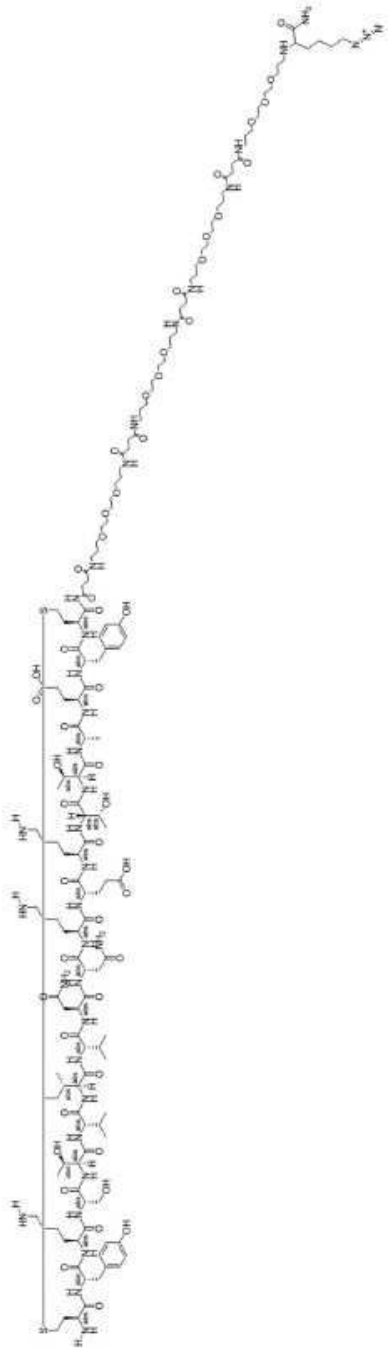
도면11



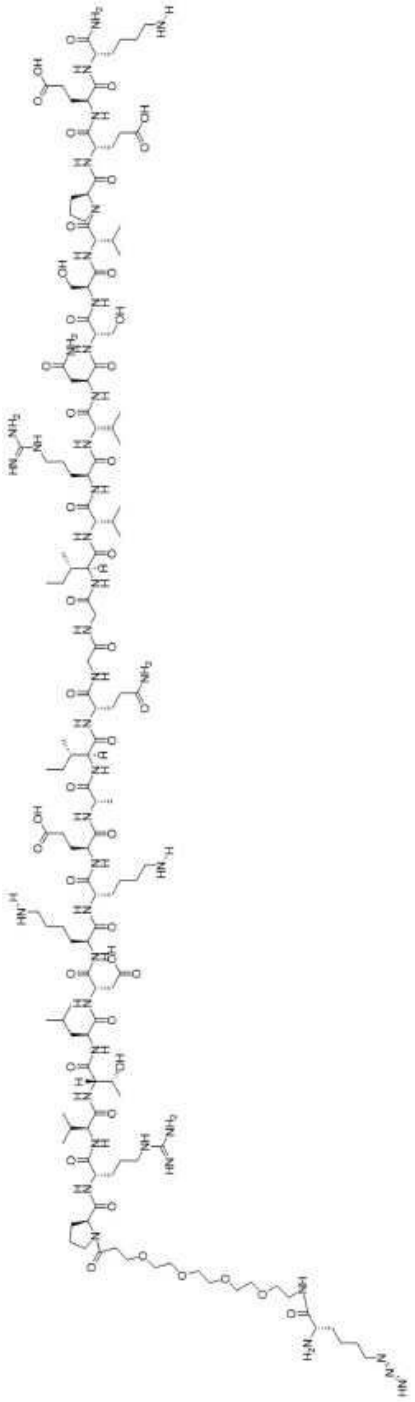
도면12



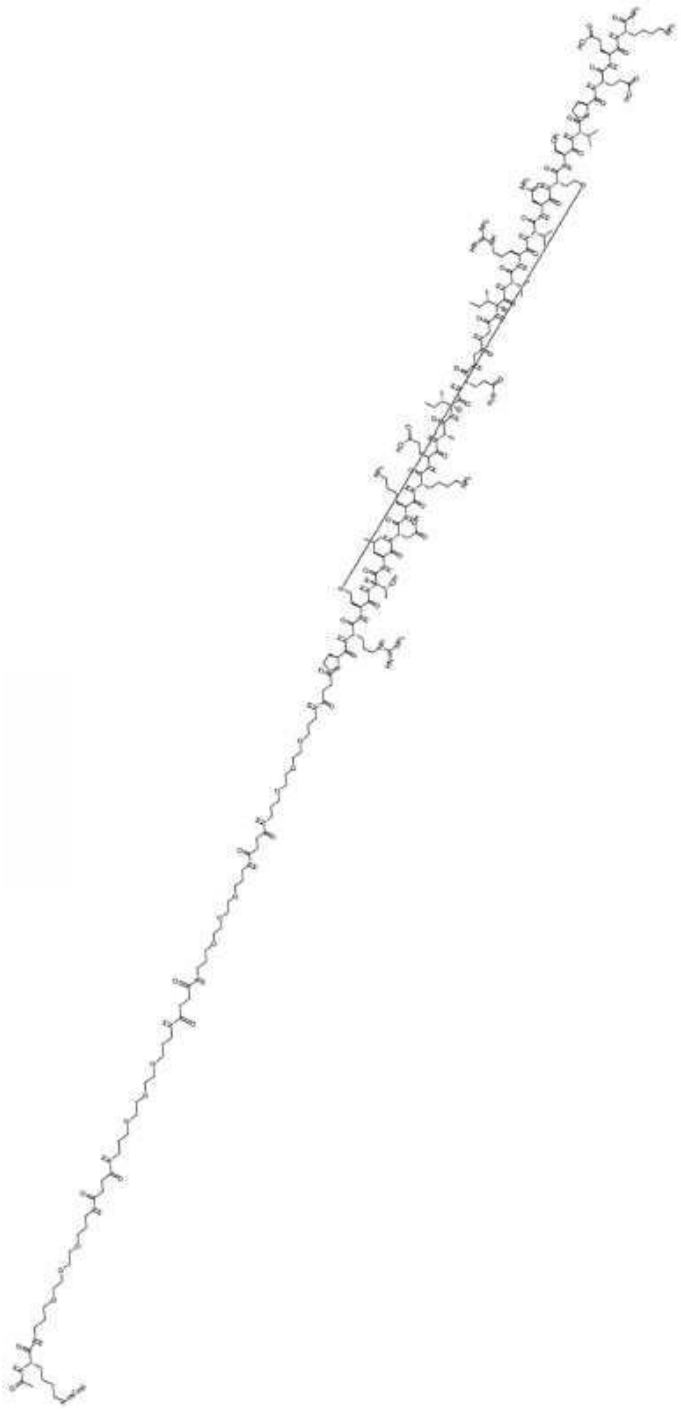
도면13



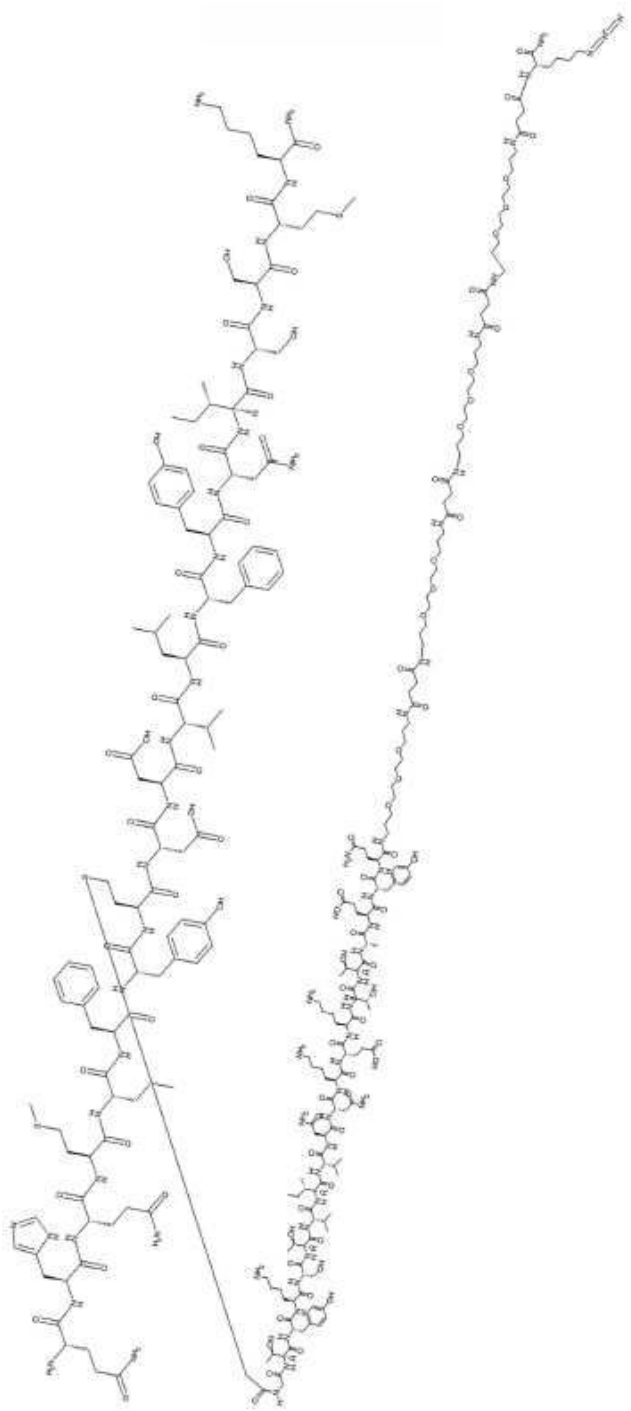
도면14



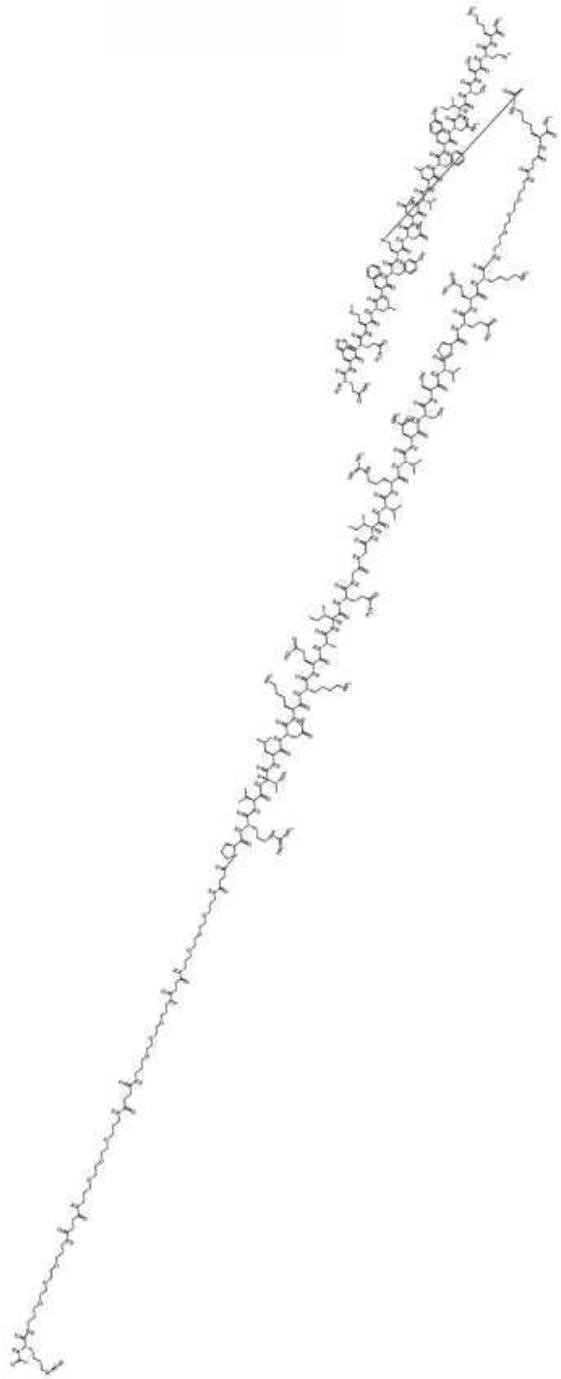
도면15



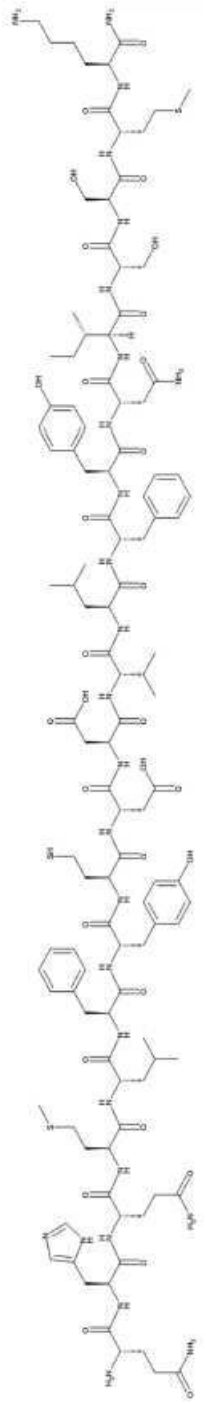
도면16



도면17



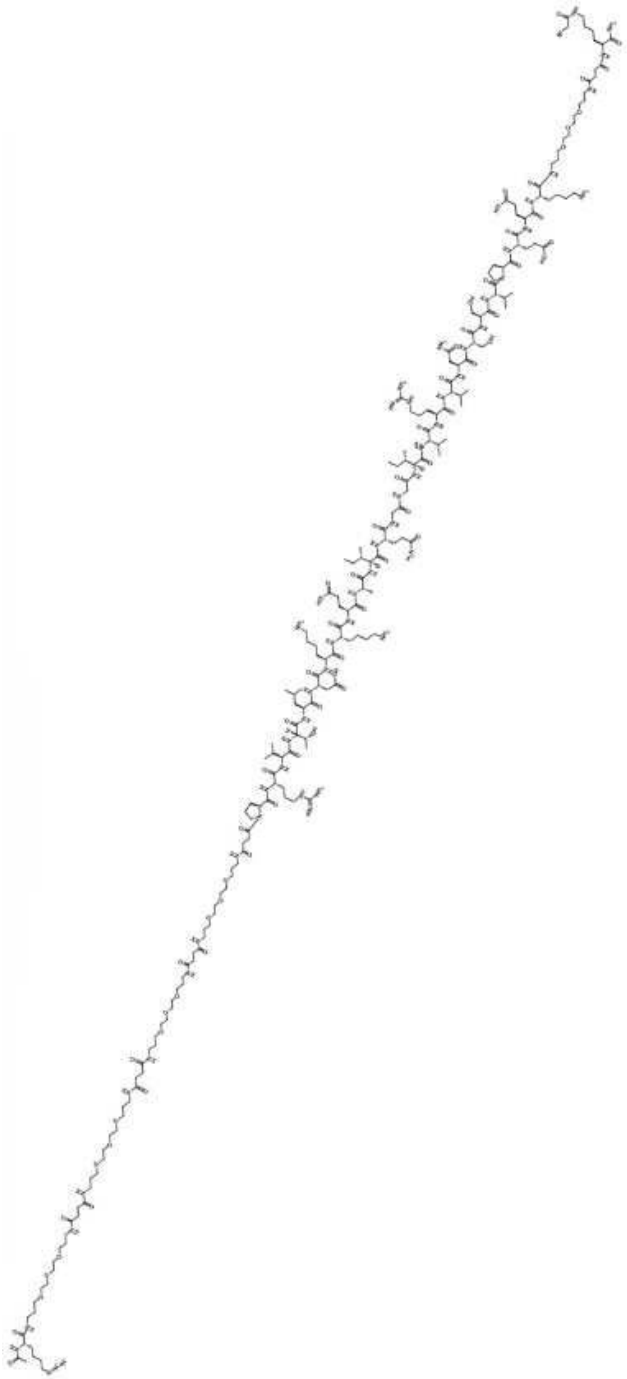
도면18



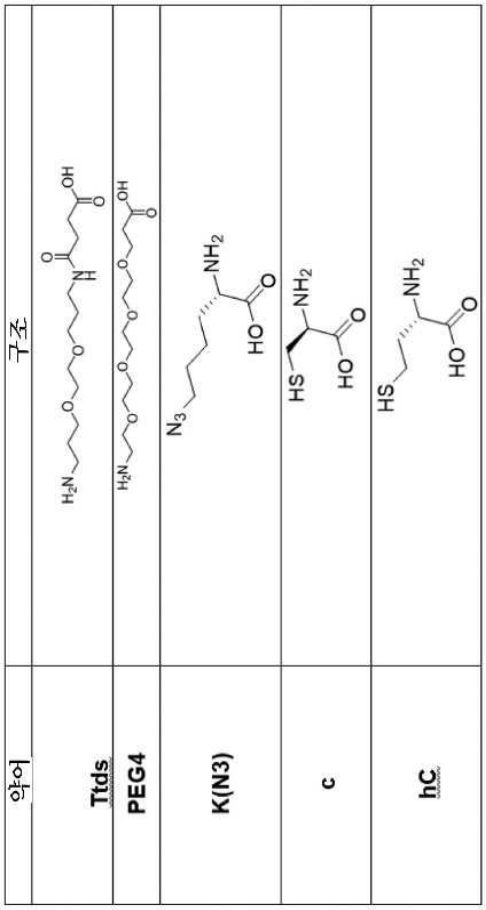
도면19



도면20



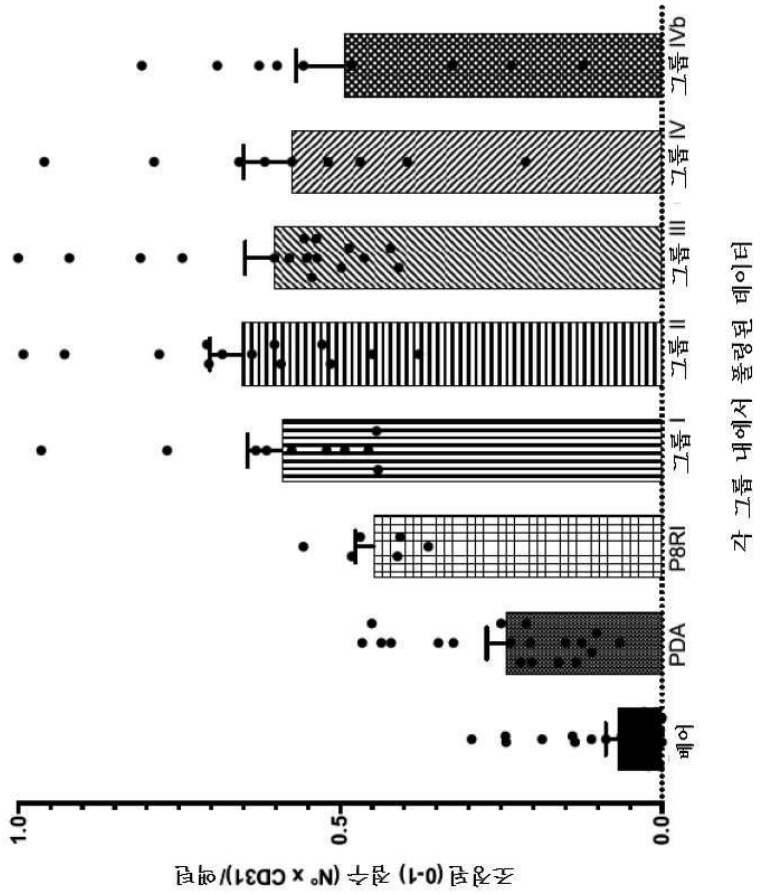
도면21



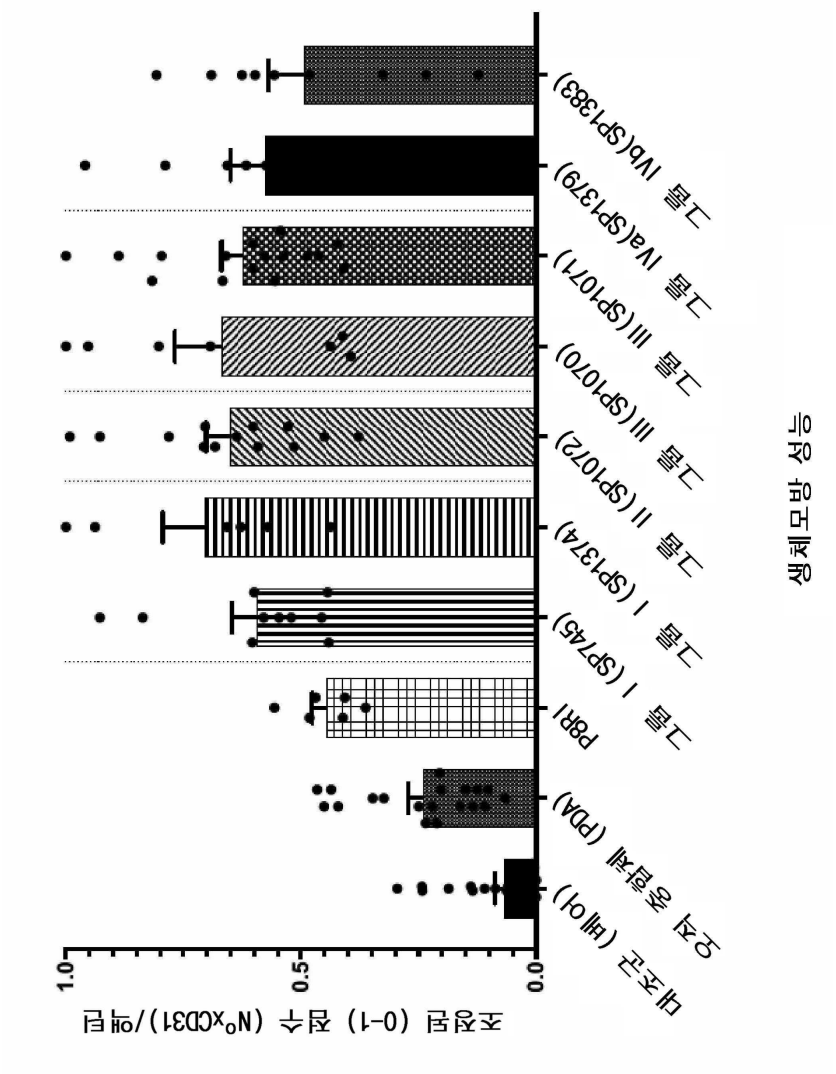
도면22

Group I				Group II	Group III		Group IVa	Group IVb	Control (Bare)	Polymer only (PDA)	P8R1
PepSP547 (PP1)	PepSP548 (PP2)	PepSP745	PepSP1374	SP1072	PepSP1070	PepSP1071	PepSP1379	PepSP1383	0	0,066	0,469
0,686	0,612	0,928	1	0,992	1	1	0,95953328	0,808	0	0,102	0,482
		0,837	0,938	0,928	0,953	0,888	0,789	0,691	0,003	0,109	0,55699036
		0,604	0,657	0,781	0,803	0,817	0,657	0,626	0,004	0,12478828	0,411
		0,6	0,628	0,707	0,693	0,797	0,617	0,598	0,00704047	0,13350259	0,407
		0,58	0,57	0,704	0,43721216	0,667083315	0,575	0,55699036	0,00855627	0,15	0,363
		0,547	0,438	0,683	0,4117493	0,66021646	0,519	0,482	0,00870129	0,161	
		0,521		0,637	0,39440542	0,602	0,469	0,326	0,013	0,202	
		0,456		0,602		0,602	0,396	0,234	0,013	0,205	
		0,443		0,592		0,579	0,212		0,014	0,211	
		0,441		0,528		0,556		0,123	0,017	0,21997152	
				0,515		0,544			0,01982545	0,23536752	
				0,45		0,537			0,021	0,25	
				0,378		0,486			0,02716642	0,32423811	
						0,463			0,03070658	0,34757748	
						0,422			0,06	0,421	
						0,409			0,063	0,43602171	
									0,087	0,451	
									0,10952705	0,46573906	
									0,13517547		
									0,139		
									0,186		
									0,242		
									0,243		
									0,29552831		

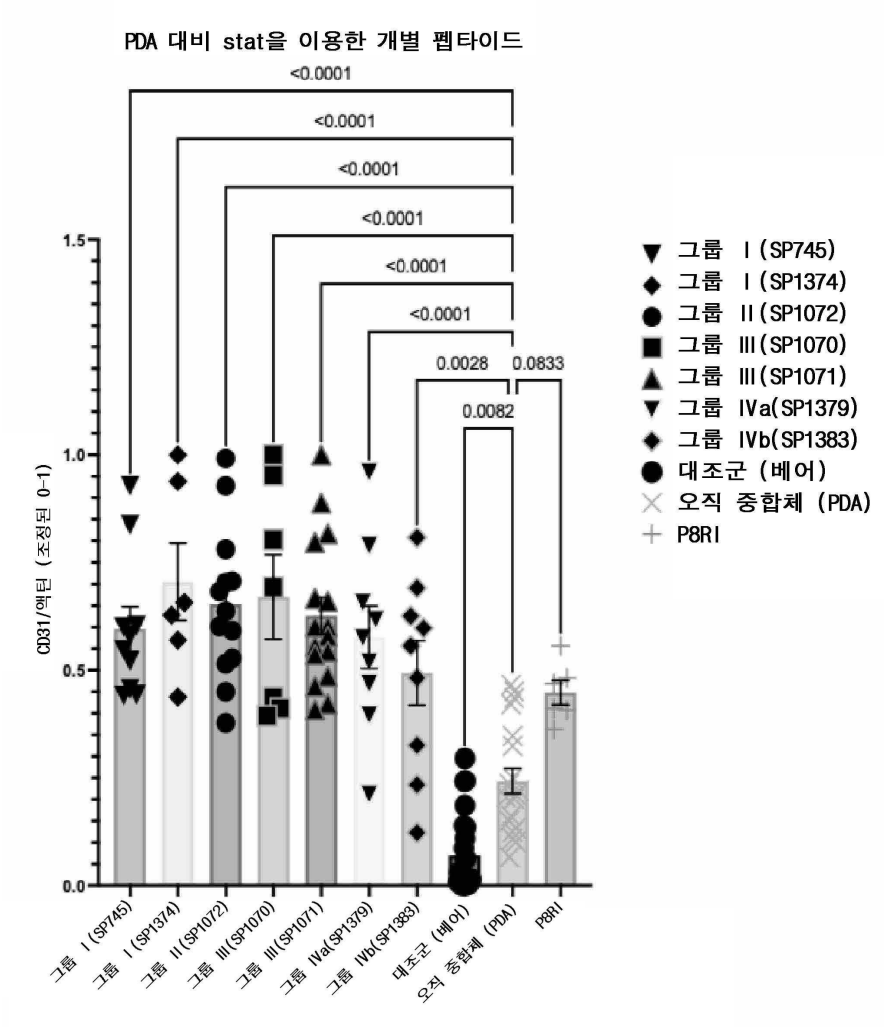
도면23


조정된 (0-1) 점수 (N° x CD31)/영역
1.0
0.5
0.0
베어
PDA
P8RI
그룹 I
그룹 II
그룹 III
그룹 IV
그룹 IVb
각 그룹 내에서 풀링된 데이터

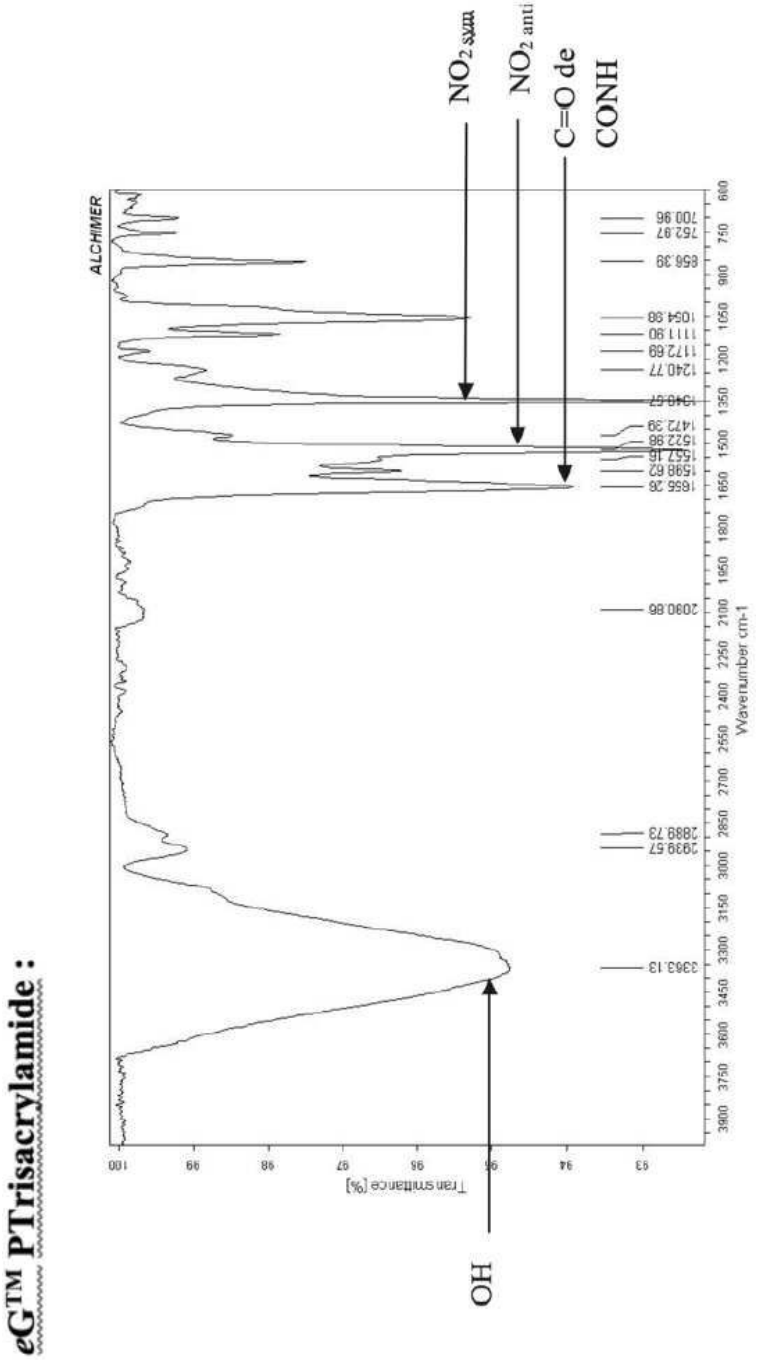
도면24


생체모방 성능
대조군 (bilo)
오직 중합체 (PDA)
PBRI
그룹 I (SP745)
그룹 I (SP1374)
그룹 II (SP1072)
그룹 III (SP1070)
그룹 III (SP1071)
그룹 IVa(SP1379)
그룹 IVb(SP1383)
조정된 (0-1) 점수 (N°xCD31)/액틴
0.0
0.5
1.0

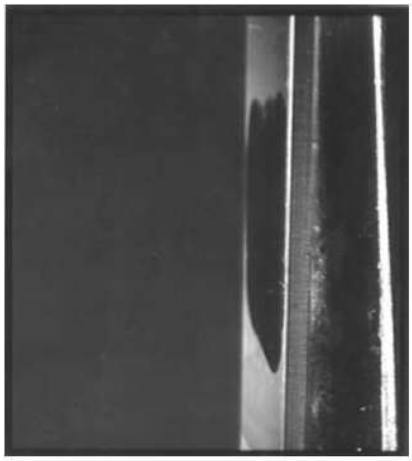
도면25


PDA 대비 stat을 이용한 개별 펩타이드
<0.0001
<0.0001
<0.0001
<0.0001
<0.0001
<0.0001
0.0028
0.0833
0.0082
CD31/액틴 (조정된 0-1)
1.5
1.0
0.5
0.0
그룹 I (SP745)
그룹 I (SP1374)
그룹 II (SP1072)
그룹 III (SP1070)
그룹 III (SP1071)
그룹 IVa (SP1379)
그룹 IVb (SP1383)
대조군 (베어)
오직 중합체 (PDA)
P8RI

도면26


eG™ PTrisacrylamide :
ALCHIMER
NO2 sym
NO2 anti
C=O de CONH
OH
Transmittance [%]
Wavenumber cm-1
3363.13
2999.57
2889.73
2080.86
1656.26
1598.62
1522.98
1472.39
1348.67
1240.77
1172.69
1111.90
1054.98
856.39
752.97
700.96

도면27

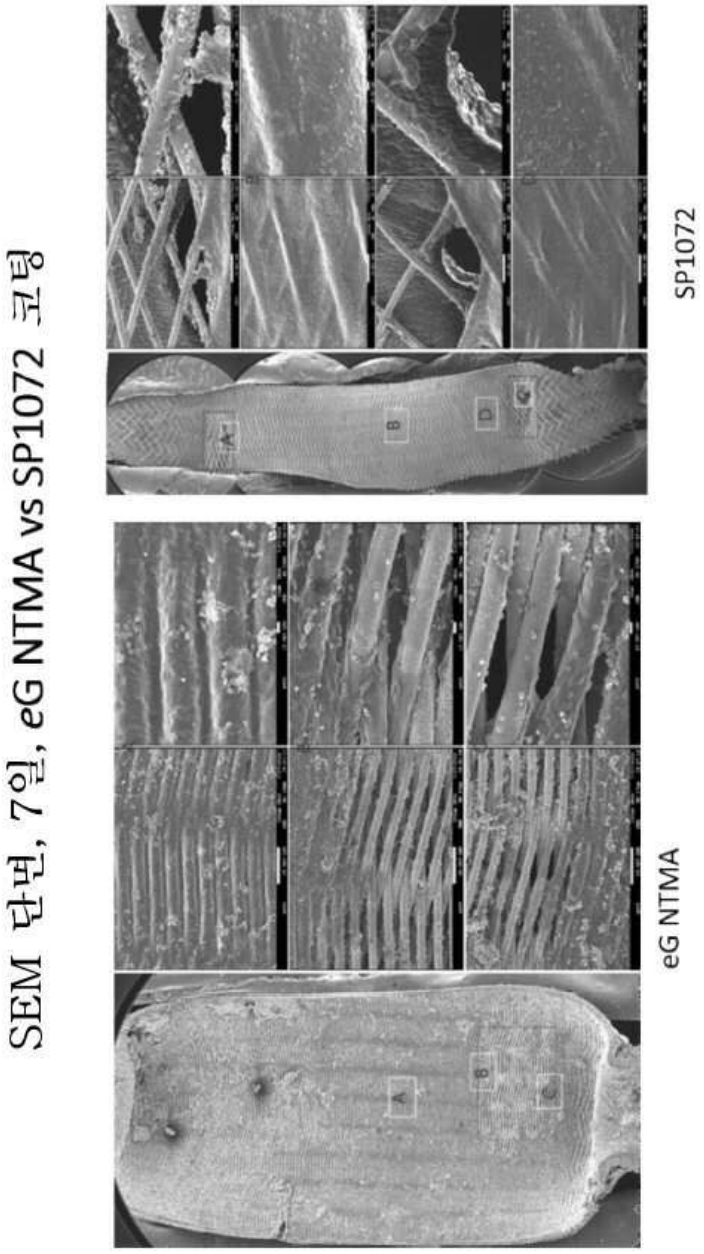


eG™ NTMA

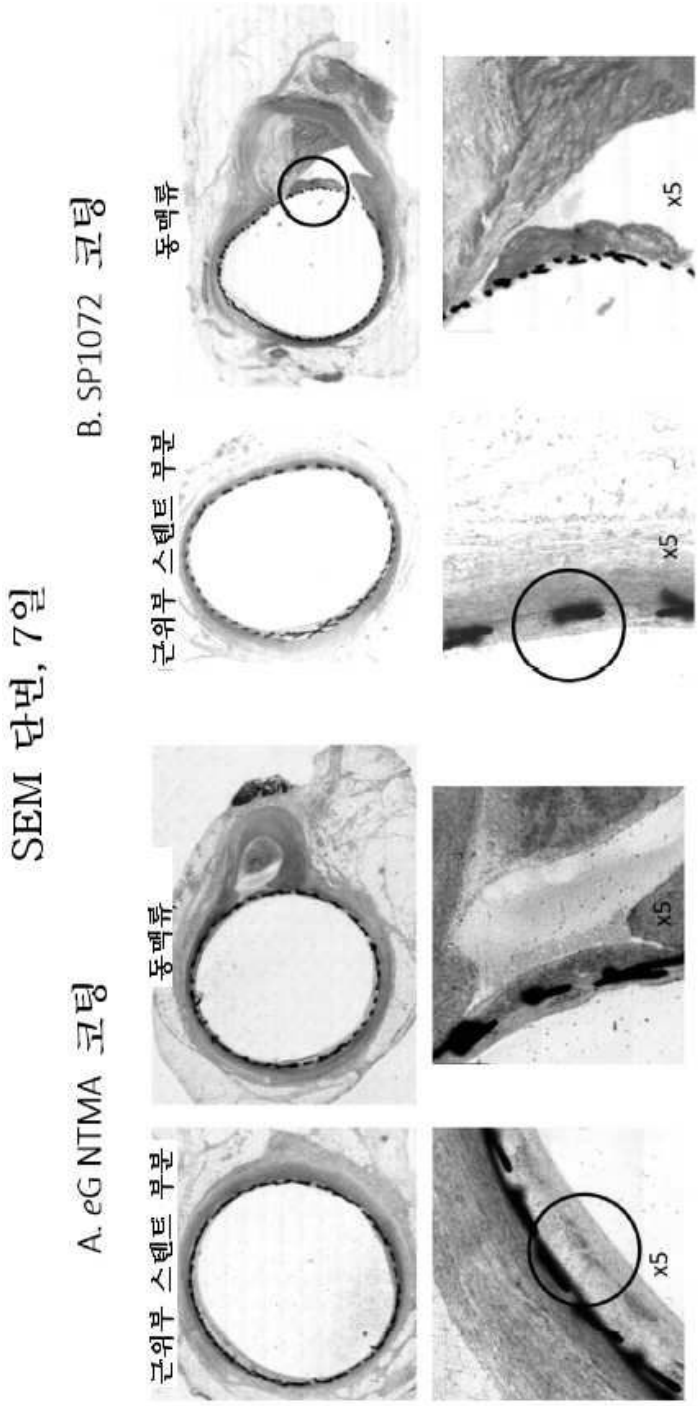


베어 표면

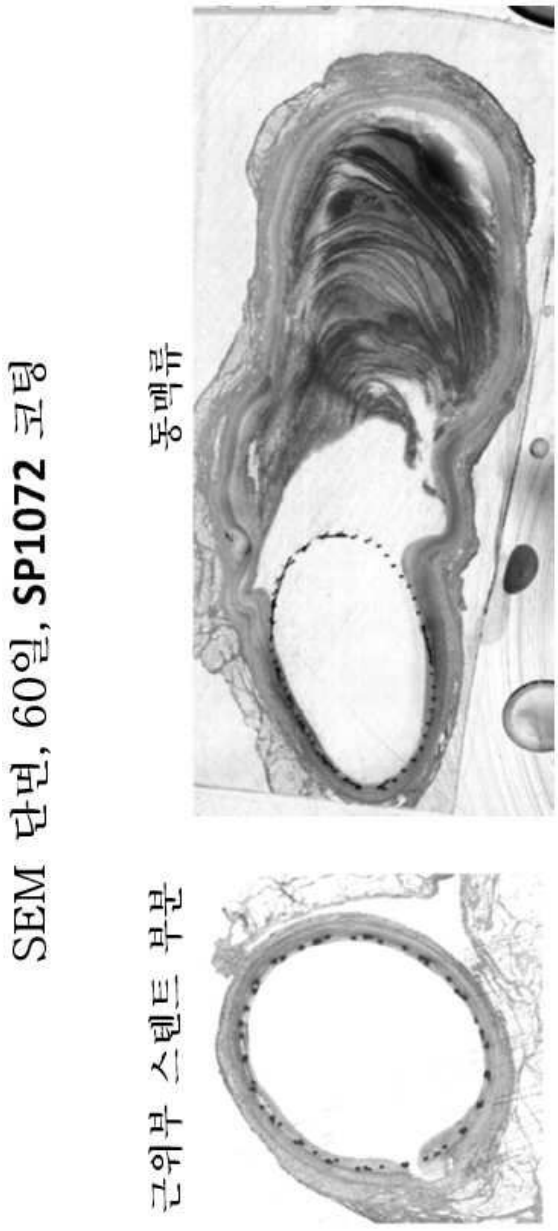
도면28



도면29



도면30



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.