



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0091993
(43) 공개일자 2016년08월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 5/062 (2006.01) A61K 38/06 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) A61K 49/14 (2006.01)
C07K 5/083 (2006.01) C07K 5/103 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 5/06034 (2013.01)
A61K 38/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-7017328

(22) 출원일자(국제) 2014년12월01일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2016년06월28일

(86) 국제출원번호 PCT/SG2014/000569

(87) 국제공개번호 WO 2015/080671

국제공개일자 2015년06월04일

(30) 우선권주장

201308891-9 2013년11월30일 싱가포르(SG)

(71) 출원인

에이전시 포 사이언스, 테크놀로지 앤드 리서치
싱가폴 138632, 커넥시스 #20-10, 퓨저노폴리스
웨이 1

(72) 발명자

하우저 살롯

싱가포르 138669 더 나노스 #04-01 바이오폴리스
웨이 31 인스티튜트 오브 바이오엔지니어링 앤드
나노테크놀로지 내

루 이화

싱가포르 138669 더 나노스 #04-01 바이오폴리스
웨이 31 인스티튜트 오브 바이오엔지니어링 앤드
나노테크놀로지 내

(74) 대리인

김진희, 김태홍

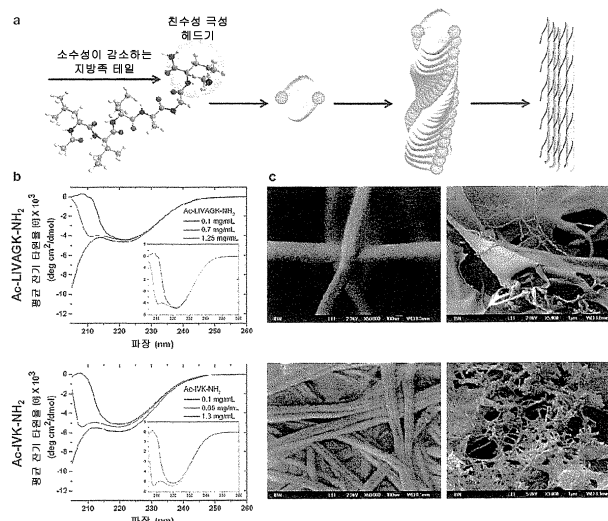
전체 청구항 수 : 총 59 항

(54) 발명의 명칭 바이오패브리케이션 및 프린팅을 위한 빌딩 블록으로서의 자기 조립형 펩티드, 펩티드 모방체 및 펩티드 접합체

(57) 요약

본 발명은, (나노섬유) 하이드로겔을 자기 조립하고 형성할 수 있는 펩티드, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의, 바이오패브리케이션(biofabrication)에 있어서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 하이드로겔을 제조하는 방법, 및 연속 섬유를 제조하는 방법, 및 정의된 정확한 지오메트릭(geometric)을 가지는 다세포 구성물을 얻는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 미니-하이드로겔 어레이 및 3D 오가노이드 구조물 또는 3D 거대분자 생물학적 구성물을 얻기 위한 상기 하이드로겔의 다양한 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/07 (2013.01)

A61K 38/08 (2013.01)

A61K 47/48238 (2013.01)

A61K 49/14 (2013.01)

C07K 5/06052 (2013.01)

C07K 5/0808 (2013.01)

C07K 5/1005 (2013.01)

C07K 5/101 (2013.01)

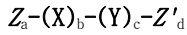
C07K 7/06 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기 일반식을 가지고, 하이드로겔을 자기 조립하고 형성할 수 있는 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의, 바이오패브리케이션(biofabrication)에 있어서의 용도:



상기 식에서,

Z 는 N-말단 보호기이고;

a 는 0 또는 1, 바람직하게는 1이고;

X 는, 각각의 경우에, 독립적으로 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, 전체 소수성은 N-말단에서부터 C-말단으로 감소하고;

b 는 1 내지 7로부터 선택되는 정수이고;

Y 는 극성 아미노산 및 극성 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고;

c 는 0, 1 또는 2이고;

Z' 는 C-말단 극성 헤드기이고;

d 는 1이고,

$b + c$ 는 2 이상이다.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체, 및 상기 극성 아미노산 및 극성 아미노산 유도체가 D-아미노산 또는 L-아미노산인 용도.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 지방족 아미노산이 알라닌(Ala, A), 호모알릴글리신, 호모프로파길글리신, 이소류신(Ile, I), 노르류신, 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터, 바람직하게는, 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 지방족 아미노산의 전부 또는 일부가 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 아미노산 크기가 감소하는 순으로 배열되고, 여기서, 지방족 아미노산의 크기는 $I = L > V > A > G$ 로 정의되는 것인 용도.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 지방족 아미노산이

LIVAG(서열 번호 1),

ILVAG(서열 번호 2),

LIVAA(서열 번호 3),

LAVAG(서열 번호 4),

AIVAG(서열 번호 5),

GIVAG(서열 번호 6),
 VIVAG(서열 번호 7),
 ALVAG(서열 번호 8),
 GLVAG(서열 번호 9),
 VLVAG(서열 번호 10)
 IVAG(서열 번호 11),
 LIVAG(서열 번호 12),
 LIVG(서열 번호 13),
 IVA(서열 번호 47), 및
 IV(서열 번호 48)로부터 선택되는 서열을 가지고,
 여기서, 임의적으로, N-말단에서 상기 서열 앞에 A가 존재하는 것인 용도.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, **b**가 1 내지 7, 바람직하게는, 2 내지 7, 또는 2 내지 6의 정수인 용도.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 극성 아미노산이 아스파르트산(Asp, D), 아스파라긴(Asn, N), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 5-N-에틸-글루타민(테아닌), 시트룰린, 티오-시트룰린, 시스테인(Cys, C), 호모시스테인, 메티오닌(Met, M), 에티오닌, 셀레노메티오닌, 텔루로메티오닌, 트레오닌(Thr, T), 알로트레오닌, 세린(Ser, S), 호모세린, 아르기닌(Arg, R), 호모아르기닌, 오르니틴(Orn), 리신(Lys, K), N(6)-카복시메틸리신으로 이루어진 군으로부터 선택되며,

여기서, 상기 극성 아미노산은 바람직하게는, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 세린, 트레오닌, 메티오닌, 리신, 오르니틴(Orn), 2,4-디아미노부티르산(Dab), 및 2,3-디아미노프로피온산(Dap)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, **c**가 2이고, 상기 극성 아미노산은 동일한 아미노산이거나, 또는

c가 1이고, 상기 극성 극성 아미노산은 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 세린, 트레오닌, 시스테인, 메티오닌, 리신, 오르니틴, 2,4-디아미노부티르산(Dab) 및 히스티딘,

바람직하게는, 리신, 오르니틴, 2,4-디아미노부티르산(Dab) 및 2,3-디아미노프로피온산(Dap) 중 어느 하나를 포함하는 것인 용도.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, **(Y)_b**가 Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys, Met, Lys, Orn, Dab, His, Asn-Asn, Asp-Asp, Glu-Glu, Gln-Gln, Asn-Gln, Gln-Asn, Asp-Gln, Gln-Asp, Asn-Glu, Glu-Asn, Asp-Glu, Glu-Asp, Gln-Glu, Glu-Gln, Asp-Asn, Asn-Asp Thr-Thr, Ser-Ser, Thr-Ser, Ser-Thr, Asp-Ser, Ser-Asp, Ser-Asn, Asn-Ser, Gln-Ser, Ser-Gln, Glu-Ser, Ser-Glu, Asp-Thr, Thr-Asp, Thr-Asn, Asn-Thr, Gln-Thr, Thr-Gln, Glu-Thr, Thr-Glu, Cys-Asp, Cys-Lys, Cys-Ser, Cys-Thr, Cys-Orn, Cys-Dab, Cys-Dap, Lys-Lys, Lys-Ser, Lys-Thr, Lys-Orn, Lys-Dab, Lys-Dap, Ser-Lys, Ser-Orn, Ser-Dab, Ser-Dap, Orn-Lys, Orn-Orn, Orn-Ser, Orn-Thr, Orn-Dab, Orn-Dap, Dab-Lys, Dab-Ser, Dab-Thr, Dab-Orn, Dab-Dab, Dab-Dap, Dap-Lys, Dap-Ser, Dap-Thr, Dap-Orn, Dap-Dab, Dap-Dap로부터 선택되는 서열을 가지는 것인 용도.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, $(X)_a-(Y)_b$ 가

LIVAGD(서열 번호 14),
 ILVAGD(서열 번호 15),
 LIVAAD(서열 번호 16),
 LAVAGD(서열 번호 17),
 AIVAGD(서열 번호 18),
 LIVAGE(서열 번호 19),
 LIVAGK(서열 번호 20),
 ILVAGK(서열 번호 21),
 LIVAGT(서열 번호 22),
 AIVAGT(서열 번호 23),
 AIVAGK(서열 번호 24),
 LIVAD(서열 번호 25),
 LIVGD(서열 번호 26),
 IVAD(서열 번호 27),
 IVAK(서열 번호 28),
 IIID(서열 번호 29),
 IIIK(서열 번호 30),
 IVD(서열 번호 49),
 IID(서열 번호 50),
 LVE(서열 번호 51),
 IVE(서열 번호 52),
 LVD(서열 번호 53),
 VIE(서열 번호 54),
 VID(서열 번호 55),
 VLD(서열 번호 56),
 VLE(서열 번호 57),
 LLE(서열 번호 58),
 LLD(서열 번호 59),
 IIE(서열 번호 60),
 ID(서열 번호 61),
 IE(서열 번호 62),
 LIVAGOrn(서열 번호 31),
 ILVAGOrn(서열 번호 32),

AIVAGOrn(서열 번호 33),
 LIVAGDab(서열 번호 34),
 ILVAGDab(서열 번호 35),
 AIVAGDab(서열 번호 36),
 LIVAGDap(서열 번호 37),
 ILVAGDap(서열 번호 38),
 AIVAGDap(서열 번호 39),
 IVOrn(서열 번호 63),
 IVDab(서열 번호 64),
 IVDap(서열 번호 65),
 IVK(서열 번호 66),
 VIK(서열 번호 67),
 VIOrn(서열 번호 68),
 VIDab(서열 번호 69),
 VIDap(서열 번호 70),
 LIVAGDD(서열 번호 40),
 LIVAGEE(서열 번호 41),
 LIVAGKC(서열 번호 42),
 LIVAGS(서열 번호 43),
 ILVAGS(서열 번호 44),
 AIVAGS(서열 번호 45), 및
 ILVAGT(서열 번호 46)로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 가지는 것인 용도.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, **a**가 1이고, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 일반식 -C(O)-R을 가지고, 여기서, R은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고,

여기서, R은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 및 이소부틸로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 보호기 **Z**가 아세틸 기인 용도.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 N-말단 보호기 **Z**가 천연 및 합성 아미노산 유도체를 포함한 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 N-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰아이드, 니트라이드, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있는 것인 용도.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C-말단 극성 헤드가 **Z'**가

- 극성 작용기,

예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만)

-COOH, -COOR, -COR, -CONHR 또는 -CONRR'(여기서, R 및 R'은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨),

-NH₂, -OH, -SH, -CHO, 말레이미드, 이미도에스테르, 카보디이미드 에스테르, 이소시아네이트;

- 소분자,

예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만) 당, 알코올, 하이드록시산, 아미노산, 비타민, 바이오틴, L-도파, 티록신;

- (이에 제한되는 것은 아니지만) 에틸렌디아민, PEG, 카보디이미드 에스테르, 이미도에스테르와 같은 극성 작용기로 종결되는 링커;

- 바이오틴, 당, 하이드록시산과 같은 소분자 또는 비타민에 커플링된 링커

로부터 선택되고,

여기서, 극성 헤드기 **Z'**는 바람직하게는 아마이드 기인 용도.

청구항 15

제14항에 있어서, 극성 작용기(들)가

생리활성 분자 또는 모이어티,

예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;

표지(들), 염료(들),

예컨대, 영상화용 조영제;

병원체,

예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;

마이크로입자 및 나노입자

또는 이들의 조합

으로부터 선택되는 1종 이상의 화합물의 화학적 접합 또는 커플링을 위해 사용될 수 있고,

여기서, 상기 화학적 접합은 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자기 조립 전 또는 후에 수행될 수 있는 것인 용도.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 C-말단 극성 헤드기 **Z'**가 천연 및 합성 아미노산 유도체를 포함한 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 C-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰이트, 니트라이드, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있는 것인 용도.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, **b + c**가 2 이상, 바람직하게는 2 내지 9, 더욱 바람직하게는 3 내지 7, 또는 2 내지 7인 용도.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 자기 조립 동안의 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)의 입체구조적 변화(conformational change),

바람직하게는, 랜덤 코일 입체구조로부터 나선형 중간 구조로, 그리고, 최종 베타 턴(beta turn) 또는 크로스 베타(cross beta) 입체구조로의 입체구조적 변화를 포함하고,

여기서, 바람직하게는, 입체구조적 변화는 펩티드 농도, 이온 환경, pH 및 온도에 따라 달라지는 것인 용도.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에서 정의되는 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 하이드로겔을 형성하는 것인 용도.

청구항 20

제22항에 있어서, 제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에서 정의된 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)가 하이드로겔을 형성하는 데 사용되는 것인 용도.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에서 정의된 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자극 반응성 겔화를 포함하고, 여기서, 상기 자극/자극들 또는 겔화 조건(들)은 pH, 염 농도 및/또는 온도로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 22

제21항에 있어서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 극성 헤드기로서 염기성 아미노산(들), 예컨대, 리신 또는 리신 모방체 분자, 바람직하게는, 아미드화된 염기성 아미노산(들)을 포함하고,

여기서, 상기 펩티드는 생리학적 조건(예컨대, 0.9% 식염수 및 PBS) 및/또는 생리학적 pH보다 높은 pH, 바람직하게는 pH 7 내지 10에서 염의 존재 하에 자극 반응성 겔화, 바람직하게는, 증진된 겔화를 보이는 것인 용도.

청구항 23

제21항에 있어서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 극성 헤드기로서 산성 아미노산(들)을 포함하고,

여기서, 상기 펩티드는 생리학적 pH 7보다 낮은 pH, 바람직하게는 pH 2 내지 6에서 자극 반응성 겔화, 바람직하게는, 증진된 겔화를 보이고,

여기서, 상기 산성 아미노산(들)의 아미드화 또는 에스테르화가 상기 pH 민감성을 없애는 것인 용도.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 겔화 조건(들)(특히 pH, 염 농도 및/또는 온도)이, 얻어지는 하이드로겔의 특성, 예컨대, 그의 기계적 스티프니스(stiffness), 강성, 다공도에 영향을 주는 것인 용도.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에서 정의된 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 물에 용해시키고, 여기서, 얻어진 용액은 니들 및 프린트 헤드를 통해 디스펜싱될 수 있는 것인 용도.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 조립 후, 추가의 화합물(들)을, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에, 바람직하게는, 극성 작용기(들)에 접합 또는 커플링하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 추가의 화합물(들)은

생리활성 분자 또는 모이어티,

예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항

체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;

표지(들), 염료(들),

예컨대, 영상화용 조영제;

병원체,

예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;

마이크로입자 및 나노입자

또는 이들의 조합으로부터 선택될 수 있는 것인 용도.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 상기 하이드로겔의 총 중량에 대하여 0.1% 내지 30% (w/w), 바람직하게는 0.1% 내지 20% (w/w), 더욱 바람직하게는 0.1% 내지 10% (w/w), 더욱 바람직하게는 0.1% 내지 5% (w/w), 더욱 더 바람직하게는 0.1% 내지 3% (w/w) 범위의 농도로 존재하는 것인 용도.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자 샘플로부터 분리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,

바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함하는 것인 용도.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 분리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있는 것인 용도.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서,

(1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,

(2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하며,

여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 동일하거나 또는 상이하고,

줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 분리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있는 것인 용도.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 가교제를 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 첨가하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 가교제는 바람직하게 단쇄 링커, 선형 및 분지형 중합체, 생리활성 분자 또는 모이어티와 접합된 중합체를 포함하는 것인 용도.

청구항 32

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에서 정의된 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액 중에 또는 극

성 용매 중에 용해시키는 단계를 포함하는, 하이드로겔의 제조 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에서 정의된 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자극 반응성 겔화를 포함하고,

여기서, 상기 자극/자극들 또는 겔화 조건(들)은 pH, 염 농도 및/또는 온도로부터 선택되는 것인 제조 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 극성 헤드기로서 염기성 아미노산(들), 예컨대, 리신 또는 리신 모방체 분자, 바람직하게는, 아마이드화된 염기성 아미노산(들)을 포함하고,

여기서, 겔화는 생리학적 조건(예컨대, PBS, 0.9% 식염수 및 PBS) 및/또는 생리학적 pH보다 높은 pH, 바람직하게는, pH 7 내지 10에서 염의 존재 하에 수행되는 것인 제조 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체가 극성 헤드기로서 산성 아미노산(들)을 포함하고,

여기서, 겔화는 생리학적 pH 7보다 낮은 pH, 바람직하게는 pH 2 내지 6에서 수행되는 것인 제조 방법.

청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 용해된 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 추가로 가온 또는 가열하고, 여기서, 온도는 20℃ 내지 90℃, 바람직하게는 약 30℃ 내지 70℃, 더욱 바람직하게는 약 37℃ 내지 70℃ 범위인 제조 방법.

청구항 37

제32항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 0.01 µg/ml 내지 100 mg/ml의 농도로, 바람직하게는 1 mg/ml 내지 50 mg/ml의 농도로, 더욱 바람직하게는 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml의 농도로 용해시키는 것인 제조 방법.

청구항 38

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에서 정의된 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액, 예컨대, 물 중에 용해시키는 단계, 및

얻어진 용액을 니들, 프린트 헤드, 미세 배관 및/또는 미세유체 디바이스를 통해 완충된 용액, 예컨대, PBS로 디스펜싱하는 단계

를 포함하는, 연속 섬유의 제조 방법.

청구항 39

제32항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 추가의 화합물(들)은

생리활성 분자 또는 모이어티,

예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;

표지(들), 염료(들),

예컨대, 영상화용 조영제;

병원체,

예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;

양자점, 나노입자 및 마이크로입자,

또는 이들의 조합

으로부터 선택될 수 있는 것인 제조 방법.

청구항 40

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자 샘플로부터 분리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,

바람직하게는, (제39항에서 정의된 바와 같이) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 41

제32항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 분리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있는 것인 제조 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 하기 단계:

(1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 단계, 및

(2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 단계

를 포함하고,

여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 동일하거나 또는 상이하고,

줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 분리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있는 것인 제조 방법.

청구항 43

제32항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 겔화/자기 조립 전, 중, 또는 후에, 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 가교제를 첨가하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 가교제는 바람직하게 단쇄 링커, 선형 및 분지형 중합체, 생리활성 분자 또는 모이어티와 접합된 중합체(예컨대, 제40항에서 정의된 것)를 포함하고,

여기서, 바람직하게는, 상기 가교제는 자기 조립 동안 펩티드 및/또는 펩티드 모방체(들)와 정전기적으로 상호작용하는 것인 제조 방법.

청구항 44

제32항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)의 사용을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 45

기재(substrate)를 매개로 한 유전자 전달을 위한, 제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도로서,

여기서, 올리고뉴클레오타이드는 하이드로겔 내에 캡슐화되고, 세포는 상기 하이드로겔 내에 공동 캡슐화되거나 그 위에 시딩되는 것인 용도.

청구항 46

2D 미니-하이드로겔 어레이를 얻기 위한, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 용도, 또는 제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도로서, 바람직하게는, 프린터, 핀틀 및 미세접촉 프린팅을 사용하는 것을 포함하는 용도.

청구항 47

제42항에 있어서, 2D 미니-하이드로겔을, 전류를 전도하는 전기 회로 또는 압전 표면 상에 프린팅하는 것을 포함하는 용도.

청구항 48

예컨대, 퇴행성 추간판 질환 치료용의

주사제로서 또는 주사 요법을 위한,

바람직하게는, 주사 가능한 스캐폴드, 주사 가능한 임플란트 및/또는 이식 가능한 스캐폴드로서의, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 용도, 또는 제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도.

청구항 49

바이오프린팅, 예컨대, 3D 마이크로액적 프린팅, 및 바이오성형을 포함하는, 제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 따른 용도, 또는 제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도.

청구항 50

제49항에 있어서, 3D 오가노이드 구조물 또는 3D 거대분자 생물학적 구성물을 얻기 위한 것인 용도.

청구항 51

제49항 또는 제50항에 있어서, 하이드로겔을 3D로 패턴화하기 위한 몰드(예컨대, 실리콘으로 이루어진 몰드)의 사용을 포함하는 용도.

청구항 52

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

상이한 세포/세포 유형을 포함하고,

바람직하게는, 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 제37항에서 정의된 것) 및/또는 가교제(예컨대, 제39항에 정의된 것)를 포함하는, 다세포 구성물을 얻기 위한 것인 용도.

청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 캡슐화된 세포, 및 프린팅된/형성된 스캐폴드의 표면 상에 침적 또는 프린팅된 세포를 포함하는, 3D 세포 구성물 또는 스캐폴드를 얻기 위한 것인 용도.

청구항 54

- 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 상이한 세포 또는 세포 유형을 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,

여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자 샘플로부터 단리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,

바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 제39항에서 정의된 것)을 첨가하는 것을 포함하고,

임의적으로, 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 가교제(예컨대, 제41항에서 정의된 것)를 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 첨가하는 것을 포함하는,

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 하이드로겔을 제조하는 단계,

- 다세포 구성물을 얻는 단계

를 포함하는, 다세포 구성물을 얻는 방법.

청구항 55

- 하기 단계:

(1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 단계, 및

(2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 단계

를 포함하고,

여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 상이하고,

줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 분리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있고,

바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 제39항에서 정의된 것)을 첨가하는 것을 포함하고,

임의적으로, 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 가교제(예컨대, 제41항에서 정의된 것)를 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 첨가하는 것을 포함하는, 제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 하이드로겔을 제조하는 단계,

- 다세포 구성물을 얻는 단계

를 포함하는, 다세포 구성물을 얻는 방법.

청구항 56

제54항 또는 제55항에 있어서, 얻어진 다세포 구성물이 몰드(예컨대, 실리콘으로 이루어진 몰드)에서 형성되는 것인 방법.

청구항 57

바람직하게 마이크로-도메인을 포함하는, 제54항 내지 제56항 중 어느 한 항의 방법에 따라 얻은 다세포 구성물.

청구항 58

- 생체분자 라이브러리의 스크리닝, 세포 거동, 병원체의 감염력 및 질환 진행의 연구, 감염된 환자 샘플의 스크리닝, 약물 효능 및 독성의 평가를 위한 오가노이드 모델로서,

- 재생 의학용 조직 공학적 임플란트로서, 및/또는

- 시험관내 질환 모델로서의,

제32항 내지 제44항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 얻은 3D 생물학적 구성물, 또는 제54항 내지 제56항 중 어느 한 항의 방법에 따라 얻은 다세포 구성물의 용도.

청구항 59

제49항 내지 제53항 및 제58항 중 어느 한 항에 있어서,

- 바람직하게는, 환자 표본 확인을 위한, 더욱 바람직하게는, 천연 표현형을 상실한 1차 세포를 감염시키지 않는 병원체(예컨대, 뎅기열, 말라리아, 노로바이러스)를 함유하는 환자 표본을 확인하기 위한, 세포 기반 검정법을 제작하기 위한 것;

- 바람직하게는, 감염 메커니즘(들)을 규명하기 위해 및/또는 병원체 감염 및/또는 복제를 억제하는 분자를 디자인할 수 있도록 하기 위해, 관심있는 병원체(들)를 확인 및 증식시킬 목적으로 감염된 세포를 회수하기 위한

것인 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은, (나노섬유) 하이드로겔을 자기 조립하고 형성할 수 있는 펩티드, 펩토이드 및/또는 펩티드 모방체의, 바이오패브리케이션(biofabrication)에 있어서의 용도에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 하이드로겔을 제조하는 방법, 및 연속 섬유를 제조하는 방법, 및 정의된 정확한 지오메트릭(geometric)을 가지는 다세포 구성물을 얻는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 미니-하이드로겔 어레이 및 3D 오가노이드 구조물 또는 3D 거대분자 생물학적 구성물을 얻기 위한 상기 하이드로겔의 다양한 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 자기 조립은 정돈된 3차원 및 생체적합성 나노바이오물질을 디자인하기 위한 것으로서 정밀하고, 편리한 "상향식" 접근법이다. 재생 가능한 거대분자 나노구조물은 빌딩 블록 사이의 고도로 특이적인 상호작용에 기인하여 수득될 수 있다. 이러한 분자간 회합이 초분자 구조를 조직화하며, 이는 주로 비공유 정전기적 상호작용, 수소 결합, 반데르발스 힘 등이다. 초분자 화학 또는 생물학은 2차 또는 3차원적인 복합 구조물 및 화학적 또는 생물학적 종들의 회합에 의해 형성된 엔티티의 거대한 모체를 모은다. 이러한 회합은 분자 상보성 또는 분자 인식 및 자기 조립의 원리에 의해 지배된다. 분자간 회합에 대한 규칙에 관한 지식은 다양한 생체의학 또는 기술적 적용을 위해 막, 필름, 층, 미셀, 세관, 겔의 형태로 다분자 조립체를 디자인하는 데 이용될 수 있다(문헌 [J.-M. Lehn, Science, 295, 2400-2403, 2002]).
- [0003] 펩티드는 초분자 구조를 제조하기 위한 다용도의 빌딩 블록이다. 아미노산 서열에 의해 지시되는 바에 따라 특이적인 2차 구조물을 취할 수 있는 그의 능력이 계층적 3차원(3D: three-dimensional) 거대분자 구조, 나노 규모의 특징 및 조정 가능한 물리적 특성을 가진 바이오물질을 자기 조립하는 디자인을 위한 독특한 플랫폼을 제공한다(문헌 [S. Zhang, Nature Biotechnology, 21, 1171-1178, 2003]). 펩티드는 예를 들어, 나노튜브(US 7,179,784)로, 또는 다량의 약 98-99%의 고정화된 물 또는 수용액과 함께 3차원 스캐폴드로 이루어진 초분자 하이드로겔로 조립될 수 있다. 펩티드 기반 바이오물질은 생명공학, 의학 및 심지어 기술적 응용에서도 잠재적인 적용을 위한 강력한 도구이다. 개별적인 특성에 따라, 상기 펩티드 기반 하이드로겔은 약물 및 백신 전달 비히클로서 또는 제약 연구 및 진단을 위한 펩티드 칩으로서 조직 공학, 재생 의학을 위한 새로운 물질들의 개발에 기여하는 것으로 여겨진다(문헌 [E. Place et al., Nature Materials, 8, 457-470, 2009]). 예컨대, 분자 전자 디바이스들의 개발을 위한 겔과 같은 펩티드 기반의 자기 조립된 바이오물질의 사용에도 큰 관심이 있다(문헌 [A. R. Hirst et al. Angew. Chem. Int. Ed., 47, 8002-8018, 2008]).
- [0004] 외부 조작, 예컨대, 온도, pH, 기계적인 영향 또는 팽윤, 수축 또는 분해의 동적 거동에 의한 다른 자극에 대해 반응하는 다양한 "스마트 펩티드 하이드로겔(smart peptide hydrogels)"이 생성되었다. 그럼에도 불구하고, 상기 바이오물질은 여전히 천연 조직, 예를 들어, 세포외 기질(ECM: extracellular matrix) 또는 연골 조직 등의 생물학적 가변성을 모방할 수 있을 정도로 충분히 "진보된" 상태는 아니다. 펩티드 하이드로겔의 의미 있는 사용을 위한 도전과제는 "공간 충전제" 또는 기계적 스캐폴드로서 대체성 천연 조직을 모방하는 것일 뿐만 아니라, 함유되는 세포를 정확한 위치 및 "생체내" 조건하에서 유지하는 생화학적 신호 및 생리적인 요건을 이해하고 대처하는 것이다(문헌 [R. Fairman and K. Akerfeldt, Current Opinion in Structural Biology, 15, 453-463, 2005]).
- [0005] 적합한 하이드로겔의 합리적인 디자인을 위해 펩티드 서열과 구조 사이의 관계를 이해하고 조절하려는 많은 노력들이 시도되어 왔다. 일반적으로, 하이드로겔은 망을 얹히게 하고 형성하는 섬유와 같은 거시적 구조물을 함유한다. 대부분의 펩티드 기반 하이드로겔은 빌딩 블록으로서 섬유로 조립되는 β 폴리펩티드 시트를 활용한다(문헌 [S. Zhang et al., PNAS, 90, 3334-3338, 1993]; [A. Aggeli et al., Nature, 386, 259-262, 1997] 등). 또한, β 시트 구조 기반의 물질 이외에도, α 나선형 펩티드로부터 자기 조립된 하이드로겔을 수득할 수 있다(문헌 [W. A. Petka et al., Science, 281, 389-392, 1998]; [C. Wang et al., Nature, 397, 417-420, 1999]; [C. Gribbon et al., Biochemistry, 47, 10365-10371, 2008]; [E. Banwell et al., Nature Materials, 8, 596-600, 2009] 등).
- [0006] 그럼에도 불구하고, 현재 공지되어 있는 펩티드 하이드로겔은 대부분의 경우에 낮은 강성도, 때때로 바람직하지 못한 생리적인 특성 및/또는 복잡성, 및 그의 실질적으로 프로세싱 조건과 연관이 있으며, 이는 높은 생산 비용

을 초래한다. 따라서, 용이하게 형성되고, 비독성이며, 표준 적용에 충분히 높은 강성도를 가지는 펩티드 하이드로겔이 요구되고 있다는 것이 널리 인정되고 있다. 하이드로겔은 또한 생리활성 모이어티(예컨대, 핵산, 소분자 치료제, 화장제 및 항미생물제)의 전달을 위해, 및/또는 세포의 생체내 및 시험관내 성장을 지원하고, 천연 조직의 재생을 촉진시키는 생체모방 스캐폴드로서 사용하기 위해, 및/또는 2D 및/또는 3D 바이오패브리케이션에서의 사용을 위해 적합하여야 한다.

[0007] "바이오패브리케이션"은 바이오물질 빌딩 블록으로부터 2D 및 3D 구조물을 생성하기 위해 예컨대, 적층 가공(즉, 프린팅) 및 성형과 같은 기법을 이용한다. 본 제조 공정 동안 생리활성 모이어티 및 세포는 정확한 방식으로 도입될 수 있다. "바이오프린팅"의 구체적인 예에서, 층상(layer-by-layer) 접근법을 이용하여 바이오물질 빌딩 블록(잉크)을 미리 결정된, 지시된 3D 기하학적 형태로 정확하게 증착시키는 데 컴퓨터 지원 장치가 사용된다. 상기 구조물의 크기는 미세 규모에서부터 더 큰 구조물 범위까지에 이른다. 첨가제, 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 비타민, 미네랄, 올리고뉴클레오타이드, 소분자 약물, 및 다른 생리활성 모이어티, 및 각종 세포 유형 또한 동시에 또는 순차적으로 정확하게 증착될 수 있다. 생체 불활성 성분은 생물학적 조직을 모방하기 위한 개방형 내부 공간을 생성하기 위한 지지체 또는 충전제로서 사용될 수 있다. 이어서, 상기 생물학적 구성물은 세포 및/또는 바이오물질 사이의 상호작용을 조사하기 위해서 뿐만 아니라, 3D 질환 모델을 개발하기 위해서 삽입되거나, 사용될 수 있다. "성형"의 구체적인 예에서, 바이오물질 빌딩 블록은 관련된 생리활성 모이어티 및 세포와 함께 특정 형상 및 크기의 주형으로 증착된다(문헌 [Malda J., et al. Engineering Hydrogels for Biofabrication. Adv. Mater. (2013)]; [Murphy S.V., et al. Evaluation of Hydrogels for Bio-printing Applications. J. of Biomed. Mater. Res. (2012)]).

발명의 내용

[0008] 그러므로, 현재 이용 가능한 하이드로겔보다는 더 높은 정도로 상기 조건들 중 적어도 일부를 충족시키고, 상기 언급된 한계에 의해 한정되지 않으며, 바이오패브리케이션에서 사용되는 데 특히 적합한 하이드로겔을 형성할 수 있는 생체적합성 화합물을 제공하는 것이 바람직할 수 있다.

[0009] 본 발명의 목적은, 바이오패브리케이션에 있어서의, 하기 일반식 I을 가지고, (나노섬유) 하이드로겔을 자기 조립하고 형성할 수 있는 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 용도에 의해 해결된다:

[0010] $Z_a-(X)_b-(Y)_c-Z'_d$ I

[0011] 상기 식에서,

[0012] Z 는 N-말단 보호기이고;

[0013] a 는 0 또는 1, 바람직하게는 1이고;

[0014] X 는, 각각의 경우에, 독립적으로 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, 전체 소수성은 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 감소하고;

[0015] b 는 1 내지 7로부터 선택되는 정수이고;

[0016] Y 는 극성 아미노산 및 극성 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고;

[0017] c 는 0, 1 또는 2이고;

[0018] Z' 는 C-말단 극성 헤드기이고;

[0019] d 는 1이고,

[0020] $b + c$ 는 2 이상이다.

[0021] 본 발명자들은 상기 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체가 나노섬유 하이드로겔을 형성하기 위해서는 상기 펩티드 및/또는 펩티드의 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 소수성이 전반적으로 감소되어야 할 필요가 있다는 것을 발견하게 되었다.

[0022] "펩티드" 및 "펩티드 모방체"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되고, 펩티드를 모방하도록 디자인된 분자를 의미한다. 펩티드 또는 펩티드 모방체는 현존 펩티드의 변형으로부터, 또는 펩티드를 모방하는 유사 시스템을 디자인함으로써 생성될 수 있다. 상기 변형은 천연적으로는 발생하지 않는 펩티드의 변이(예컨대, 골격 변경 및/또는 비천연 아미노산의 도입)를 포함한다.

- [0023] 특히, 펩토이드는 펩티드 모방체의 하위부류(subclass)이다. 펩토이드에서 측쇄는 일반 펩티드와 달리 펩티드 골격의 질소에 연결되어 있다. 펩티드 모방체는 오직 일반적으로 발생된 아미노산만이 예컨대, 노르류신과 유사한 류신과 같이, 화학적으로는 상이한 유사한 아미노산으로 교환된 것인 통상의 펩티드 골격을 가질 수 있다. 본 개시내용에서, 상기 용어는 상호교환적으로 사용된다.
- [0024] 본원에 개시된 펩티드, 펩티드 모방체 및 펩토이드는 바이오프린팅, (바이오)성형을 비롯한, 바이오패브리케이션에서 잉크(들) 또는 (바이오물질) 빌딩 블록(들)으로서 적합하다.
- [0025] 본원에서 사용되는 바, "바이오패브리케이션"이란 기법, 예컨대, 적층 가공(즉, 바이오프린팅) 및 성형을 사용하여 바이오물질 빌딩 블록(즉, 본 발명에 따른 펩티드 및/또는 펩티드 모방체)으로부터 2D 및 3D 구조물 또는 생물학적 구성물을 생성하는 것을 의미한다. 제조 공정 동안, 생리활성 모이어티 및 세포는 정확한 방식으로 도입될 수 있다. "바이오프린팅"의 구체적인 예에서, 층상 접근법을 이용하여 바이오물질 빌딩 블록(잉크)을 미리 결정된, 지시된 3D 기하학적 형태로 정확하게 증착시키는 데 컴퓨터 지원 장치가 사용된다. 상기 구조물의 크기는 미세 규모에서부터 더 큰 구조물 범위까지에 이른다. 첨가제, 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 비타민, 미네랄, 올리고뉴클레오타이드, 소분자 약물, 및 다른 생리활성 모이어티, 및 각종 세포 유형 또한 동시에 또는 순차적으로 정확하게 증착될 수 있다. 생체 불활성 성분은 생물학적 조직을 모방하기 위한 개방형 내부 공간을 생성하기 위한 지지체 또는 충전체로서 사용될 수 있다. 이어서, 상기 생물학적 구성물은 세포 및/또는 바이오물질 사이의 상호작용을 조사하기 위해서 뿐만 아니라, 3D 질환 모델을 개발하기 위해서 삽입되거나, 사용될 수 있다. "성형"의 구체적인 예에서, 바이오물질 빌딩 블록은 관련된 생리활성 모이어티 및 세포와 함께 특정 형상 및 크기의 주형으로 증착된다(문헌 [Malda J., et al. Engineering Hydrogels for Biofabrication. Adv. Mater. (2013)]; [Murphy S.V., et al. Evaluation of Hydrogels for Bio-printing Applications. J. of Biomed. Mater. Res. (2012)] 참조).
- [0026] "바이오프린팅"은 생물학적 기능을 개선시키거나, 또는 대체하기 위해 세포, 공학 및 물질 방법, 및 적합한 생화학적 및 물리화학적 인자의 조합을 사용하는 조직 공학 분야의 일부이다.
- [0027] 조직 공학은 전체 조직 (즉, 골, 연골, 혈관, 방광, 피부, 근육 등)의 일부, 또는 그를 수복 또는 대체하는 데 사용된다. 포함된 조직은 대개 적절하게 작용하기 위해서는 특정의 기계적 및 구조적 특성을 필요로 한다.
- [0028] 본원에서 사용되는 바, "바이오프린팅"이라는 용어는 또한 천연적으로 발생된 조직의 텍스처 및 구조의 컴퓨터 구동식 모방에 기초하여 스캐폴딩 또는 잉크 물질(본 발명의 펩티드/펩티드 모방체 또는 그의 하이드로겔)을 단독으로, 또는 세포와 혼합하여 증착시킴으로써 조직 유사체를 제조하는 공정을 포함한다.
- [0029] 본원에서 사용되는 바, 바이오프린팅용의 "잉크" 또는 "바이오잉크"란 연속적으로 증착되어 거대분자 스캐폴드를 구축하는 바이오물질 빌딩 블록을 의미한다.
- [0030] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체, 및 상기 극성 아미노산 및 극성 아미노산 유도체는 D-아미노산 또는 L-아미노산이다.
- [0031] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산은 알라닌(Ala, A), 호모알릴글리신, 호모프로파길글리신, 이소류신(Ile, I), 노르류신, 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는, 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0032] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산의 전부 또는 일부는 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 아미노산 크기가 감소하는 순으로 배열되고, 여기서, 지방족 아미노산의 크기는 $I = L > V > A > G$ 로 정의된다.
- [0033] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산의 제일 첫번째 N-말단 아미노산(G, V 또는 A일 수 있다)은 덜 중요하다. 본 발명자들은 상기와 같은 특성의 첫번째 아미노산이 상기의 것 이외의 다른 요건인, N-말단에서부터 C-말단 방향으로 소수성 감소라는 필수요건을 지배하는 것은 아니라는 것을 발견하게 되었다.
- [0034] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산은
- [0035] LIVAG(서열 번호 1),
- [0036] ILVAG(서열 번호 2),
- [0037] LIVAA(서열 번호 3),

- [0038] LAVAG(서열 번호 4),
- [0039] AIVAG(서열 번호 5),
- [0040] GIVAG(서열 번호 6),
- [0041] VIVAG(서열 번호 7),
- [0042] ALVAG(서열 번호 8),
- [0043] GLVAG(서열 번호 9)
- [0044] VLVAG(서열 번호 10)
- [0045] IVAG(서열 번호 11),
- [0046] LIVAG(서열 번호 12),
- [0047] LIVG(서열 번호 13),
- [0048] IVA(서열 번호 47), 및
- [0049] IV(서열 번호 48)로부터 선택되는 서열을 가지고,
- [0050] 여기서, 임의적으로, N-말단에서 상기 서열 앞에 A가 존재한다.
- [0051] 한 실시양태에서, 지방족 아미노산의 전부 또는 일부는 아미노산 크기가 동일한 순서로 배열되며, 바람직하게는, 여기서, 아미노산 크기가 동일한 순서로 배열된 상기 지방족 아미노산은 길이가 2 내지 4개의 아미노산 길이인 서열을 가진다.
- [0052] 예를 들어, 크기가 동일한 순서로 배열된 상기 지방족 아미노산은 LLLL, LLL, LL, IIII, III, II, VVV, VVV, VV, AAAA, AAA, AA, GGGG, GGG, 및 GG로부터 선택되는 서열을 가진다.
- [0053] 한 실시양태에서, **b**는 정수 1 내지 7, 바람직하게는, 2 내지 7, 또는 2 내지 6이다.
- [0054] 한 실시양태에서, 상기 극성 아미노산은 아스파르트산(Asp, D), 아스파라긴(Asn, N), 글루탐산(Glu, E), 글루타민(Gln, Q), 5-N-에틸-글루타민(테아닌), 시트룰린, 티오시트룰린, 시스테인(Cys, C), 호모시스테인, 메티오닌(Met, M), 에티오닌, 셀레노메티오닌, 텔루로메티오닌, 트레오닌(Thr, T), 알로트레오닌, 세린(Ser, S), 호모세린, 아르기닌(Arg, R), 호모아르기닌, 오르니틴(Orn), 리신(Lys, K), N(6)-카복시메틸리신, 히스티딘(His, H), 2,4-디아미노부티르산(Dab), 2,3-디아미노프로피온산(Dap), 및 N(6)-카복시메틸리신으로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [0055] 여기서, 상기 극성 아미노산은 바람직하게는 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 세린, 트레오닌, 메티오닌, 리신, 오르니틴(Orn), 2,4-디아미노부티르산(Dab), 및 2,3-디아미노프로피온산(Dap)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0056] 한 실시양태에서, **c**는 2이고, 상기 극성 아미노산은 동일한 아미노산이거나, 또는 **c**는 1이고, 상기 극성 극성 아미노산은 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 글루타민, 세린, 트레오닌, 시스테인, 메티오닌, 리신, 오르니틴, 2,4-디아미노부티르산(Dab) 및 히스티딘,
- [0057] 바람직하게는, 리신, 오르니틴, 2,4-디아미노부티르산(Dab) 및 2,3-디아미노프로피온산(Dap) 중 어느 하나를 포함한다.
- [0058] 한 실시양태에서, **(Y)_b**는 Asp, Asn, Glu, Gln, Ser, Thr, Cys, Met, Lys, Orn, Dab, His, Asn-Asn, Asp-Asp, Glu-Glu, Gln-Gln, Asn-Gln, Gln-Asn, Asp-Gln, Gln-Asp, Asn-Glu, Glu-Asn, Asp-Glu, Glu-Asp, Gln-Glu, Glu-Gln, Asp-Asn, Asn-Asp Thr-Thr, Ser-Ser, Thr-Ser, Ser-Thr, Asp-Ser, Ser-Asp, Ser-Asn, Asn-Ser, Gln-Ser, Ser-Gln, Glu-Ser, Ser-Glu, Asp-Thr, Thr-Asp, Thr-Asn, Asn-Thr, Gln-Thr, Thr-Gln, Glu-Thr, Thr-Glu, Cys-Asp, Cys-Lys, Cys-Ser, Cys-Thr, Cys-Orn, Cys-Dab, Cys-Dap, Lys-Lys, Lys-Ser, Lys-Thr, Lys-Orn, Lys-Dab, Lys-Dap, Ser-Lys, Ser-Orn, Ser-Dab, Ser-Dap, Orn-Lys, Orn-Orn, Orn-Ser, Orn-Thr, Orn-Dab, Orn-Dap, Dab-Lys, Dab-Ser, Dab-Thr, Dab-Orn, Dab-Dab, Dab-Dap, Dap-Lys, Dap-Ser, Dap-Thr, Dap-Orn, Dap-Dab, Dap-Dap로부터 선택되는 서열을 가진다.

- [0059] 한 실시양태에서, $(X)_a-(Y)_b$ 는
- [0060] LIVAGD(서열 번호 14),
- [0061] ILVAGD(서열 번호 15),
- [0062] LIVAAD(서열 번호 16),
- [0063] LAVAGD(서열 번호 17),
- [0064] AIVAGD(서열 번호 18),
- [0065] LIVAGE(서열 번호 19),
- [0066] LIVAGK(서열 번호 20),
- [0067] ILVAGK(서열 번호 21),
- [0068] LIVAGT(서열 번호 22),
- [0069] AIVAGT(서열 번호 23),
- [0070] AIVAGK(서열 번호 24),
- [0071] LIVAD(서열 번호 25),
- [0072] LIVGD(서열 번호 26),
- [0073] IVAD(서열 번호 27),
- [0074] IVAK(서열 번호 28),
- [0075] IIID(서열 번호 29),
- [0076] IIIK(서열 번호 30),
- [0077] IVD(서열 번호 49),
- [0078] IID(서열 번호 50),
- [0079] LVE(서열 번호 51),
- [0080] IVE(서열 번호 52),
- [0081] LVD(서열 번호 53),
- [0082] VIE(서열 번호 54),
- [0083] VID(서열 번호 55),
- [0084] VLD(서열 번호 56),
- [0085] VLE(서열 번호 57),
- [0086] LLE(서열 번호 58),
- [0087] LLD(서열 번호 59),
- [0088] IIE(서열 번호 60),
- [0089] ID(서열 번호 61),
- [0090] IE(서열 번호 62),
- [0091] LIVAGOrn(서열 번호 31),
- [0092] ILVAGOrn(서열 번호 32),
- [0093] AIVAGOrn(서열 번호 33),

- [0094] LIVAGDab(서열 번호 34),
- [0095] ILVAGDab(서열 번호 35),
- [0096] AIVAGDab(서열 번호 36),
- [0097] LIVAGDap(서열 번호 37),
- [0098] ILVAGDap(서열 번호 38),
- [0099] AIVAGDap(서열 번호 39),
- [0100] IVOrn(서열 번호 63),
- [0101] IVDab(서열 번호 64),
- [0102] IVDap(서열 번호 65),
- [0103] IVK(서열 번호 66),
- [0104] VIK(서열 번호 67),
- [0105] VIOrn(서열 번호 68),
- [0106] VIDab(서열 번호 69),
- [0107] VIDap(서열 번호 70),
- [0108] LIVAGDD(서열 번호 40),
- [0109] LIVAGEE(서열 번호 41),
- [0110] LIVAGKC(서열 번호 42),
- [0111] LIVAGS(서열 번호 43),
- [0112] ILVAGS(서열 번호 44),
- [0113] AIVAGS(서열 번호 45), 및
- [0114] ILVAGT(서열 번호 46)로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 가진다.
- [0115] 한 실시양태에서, **a**는 1이고, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 일반식 -C(O)-R을 가지고, 여기서, R은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [0116] 여기서, R은 바람직하게는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 및 이소부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0117] 한 실시양태에서, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 아세틸 기이다.
- [0118] 한 실시양태에서, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 천연 및 합성 아미노산 유도체를 비롯한, 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 N-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰이트, 니트라이드, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있다.
- [0119] 한 실시양태에서, 상기 C-말단 극성 헤드가 **Z'**는
- [0120] - 극성 작용기,
- [0121] 예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만)
- [0122] -COOH, -COOR, -COR, -CONHR 또는 -CONRR'(여기서, R 및 R'은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨)
- [0123] -NH₂, -OH, -SH, -CHO, 말레이미드, 이미도에스테르, 카보디이미드 에스테르, 이소시아네이트;

- [0124] - 소분자,
- [0125] 예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만) 당, 알코올, 하이드록시산, 아미노산, 비타민, 바이오틴, L-도파, 티록신;
- [0126] - (이에 제한되는 것은 아니지만) 에틸렌디아민, PEG, 카보디이미드 에스테르, 이미도에스테르와 같은 극성 작용기로 종결되는 링커;
- [0127] - 바이오틴, 당, 하이드록시산과 같은 소분자 또는 비타민에 커플링된 링커
- [0128] 로부터 선택되고,
- [0129] 여기서, 극성 헤드기 Z' 는 바람직하게는, 아마이드 기이다.
- [0130] 한 실시양태에서, C-말단 아미노산은 추가로 작용화된다.
- [0131] 한 실시양태에서, 극성 작용기(들)는
- [0132] 생리활성 분자 또는 모이어티,
- [0133] 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;
- [0134] 표지(들), 염료(들),
- [0135] 예컨대, 영상화용 조영제;
- [0136] 병원체,
- [0137] 예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;
- [0138] 마이크로입자 및 나노입자
- [0139] 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 1종 이상의 화합물의 화학적 접합 또는 커플링을 위해 사용될 수 있고,
- [0140] 여기서, 상기 화학적 접합은 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자기 조립 전 또는 후에 수행될 수 있다.
- [0141] 한 실시양태에서, 상기 C-말단 극성 헤드기 Z' 는 천연 및 합성 아미노산 유도체를 비롯한 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 C-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰아이드, 니트라이드, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있다.
- [0142] 한 실시양태에서, $b + c$ 는 2 이상, 바람직하게는, 2 내지 9, 더욱 바람직하게는, 3 내지 7, 또는 2 내지 7이다.
- [0143] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는, 자기 조립 동안의 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)의 입체구조적 변화(conformational change),
- [0144] 바람직하게는, 랜덤 코일 입체구조로부터 나선형 중간 구조(예컨대, α 나선형 피브릴)로, 그리고, 최종 베타 턴(beta turn) 또는 크로스 베타(cross beta) 입체구조, 예컨대, 추가로 (네트워크를 형성하는) 나노섬유로 추가로 응집되고/거나 축합되는 피브릴로의 입체구조적 변화를 포함하고,
- [0145] 여기서, 바람직하게는, 입체구조적 변화는 펩티드 농도, 이온 환경, pH 및 온도에 따라 달라진다.
- [0146] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 하이드로겔을 형성한다.
- [0147] 하이드로겔은 하기에 추가로 상세하게 설명되는 바와 같이, 펩티드 및/또는 펩티드의 자기 조립에 의해 형성된다.
- [0148] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)는 하이드로겔을 형성하는 데 사용된다.
- [0149] 바람직하게는, 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)란 그의 아미노산 서열, 극성 헤드기(들), 접합된/

커플링된 화합물(예컨대, 상이한 표지, 생리활성 분자 등) 또는 이들의 조합에서 차이가 나는 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)를 지칭한다.

- [0150] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는 본원에서 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자극 반응성 겔화를 포함하고,
- [0151] 여기서, 상기 자극/자극들 또는 겔화 조건(들)은 pH, 염 농도 및/또는 온도로부터 선택된다.
- [0152] 본원에서 사용되는 바, "자극 반응성 겔화"라는 용어는 염 용액의 첨가, pH 변화 및/또는 온도 변화에 의해 유발되거나, 증진되는 자기 조립을 의미한다. 이러한 하위부류의 펩티드 하이드로겔의 경우, 펩티드 용액은 상기 자극의 존재 하에서 유체로부터 하이드로겔로 전이된다.
- [0153] 한 실시양태에서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 극성 헤드기로서 염기성 아미노산(들), 예컨대, 리신 또는 리신 모방체 분자, 바람직하게는, 아미드화된 염기성 아미노산(들)을 포함하고,
- [0154] 상기 펩티드는 생리학적 조건(예컨대, 0.9% 식염수 및 PBS)에서 및/또는 (예컨대, NaOH 첨가에 의한) 생리학적 pH보다 높은 pH, 바람직하게는, pH 7 내지 10에서 염의 존재 하에 자극 반응성 겔화, 바람직하게는, 증진된 겔화를 보인다.
- [0155] 한 실시양태에서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 극성 헤드기로서 산성 아미노산(들)을 포함하고,
- [0156] 상기 펩티드는 생리학적 pH 7보다 낮은 pH, 바람직하게는, pH 2 내지 6에서 자극 반응성 겔화, 바람직하게는, 증진된 겔화를 보이고,
- [0157] 여기서, 상기 산성 아미노산(들)의 아미드화 또는 에스테르화가 상기 pH 민감성을 없앤다.
- [0158] 한 실시양태에서, 겔화 조건(들)(특히 pH, 염 농도 및/또는 온도)은, 얻어지는 하이드로겔의 특성, 예컨대, 그의 기계적 스티프니스(stiffness), 강성, 다공도에 영향을 준다.
- [0159] 한 실시양태에서, 본원에 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 물에 용해되고, 여기서, 얻어진 용액은 니들 및 프린트 헤드를 통해 디스펜싱될 수 있다.
- [0160] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는, 조립 후, 추가의 화합물(들)을, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에, 바람직하게는, 극성 작용기(들)에 접합 또는 커플링하는 것을 포함하고,
- [0161] 여기서, 상기 추가의 화합물(들)은
- [0162] 생리활성 분자 또는 모이어티,
- [0163] 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;
- [0164] 표지(들), 염료(들),
- [0165] 예컨대, 영상화용 조영제;
- [0166] 병원체,
- [0167] 예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;
- [0168] 마이크로입자 및 나노입자
- [0169] 또는 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [0170] 한 실시양태에서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 상기 하이드로겔의 총 중량에 대하여 0.1% (w/w) 내지 30% (w/w), 바람직하게는, 0.1% (w/w) 내지 20% (w/w), 더욱 바람직하게는, 0.1% (w/w) 내지 10% (w/w), 더욱 바람직하게는, 0.1% (w/w) 내지 5% (w/w), 더욱 더 바람직하게는, 0.1% (w/w) 내지 3% (w/w) 범위의 농도로 존재한다.
- [0171] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,
- [0172] 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자

샘플로부터 단리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,

- [0173] 바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함한다.
- [0174] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 단리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있다.
- [0175] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는
- [0176] (1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,
- [0177] (2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하며,
- [0178] 여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 동일하거나 또는 상이하고,
- [0179] 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 단리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있다.
- [0180] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 용도는 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 가교제를 첨가하는 것을 포함하고,
- [0181] 여기서, 상기 가교제는 바람직하게 단쇄 링커, 선형 및 분지형 중합체, 생리활성 분자 또는 모이어티와 접합된 중합체를 포함한다.
- [0182] 본 발명의 목적은 본원에 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액, 예컨대, 물 중에 또는 극성 용매, 예컨대, 에탄올 중에 용해시키는 단계를 포함하는, 하이드로겔을 제조하는 방법에 의해 해결된다.
- [0183] 한 실시양태에서, 본 발명의 방법은 본원에 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자극 반응성 겔화를 포함하고,
- [0184] 여기서, 상기 자극/자극들 또는 겔화 조건(들)은 pH, 염 농도 및/또는 온도로부터 선택된다.
- [0185] 한 실시양태에서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 극성 헤드기로서 염기성 아미노산(들), 예컨대, 리신 또는 리신 모방체 분자, 바람직하게는, 아미드화된 염기성 아미노산(들)을 포함하고,
- [0186] 겔화는 생리학적 조건(예컨대, PBS 또는 0.9% 식염수 및 PBS) 및/또는 (예컨대, NaOH 첨가에 의한) 생리학적 pH 보다 높은 pH, 바람직하게는, pH 7 내지 10에서 염의 존재 하에 수행된다.
- [0187] 한 실시양태에서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 극성 헤드기로서 산성 아미노산(들)을 포함하고,
- [0188] 겔화는 생리학적 pH 7보다 낮은 pH, 바람직하게는, pH 2 내지 6에서 수행된다.
- [0189] 한 실시양태에서, 용해된 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 추가로 가온 또는 가열되고, 여기서, 온도는 20℃ 내지 90℃, 바람직하게는, 약 30℃ 내지 70℃, 더욱 바람직하게는, 약 37℃ 내지 70℃ 범위이다.
- [0190] 한 실시양태에서, 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 100 mg/ml 의 농도로, 바람직하게는, 1 mg/ml 내지 50 mg/ml 의 농도로, 더욱 바람직하게는, 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml 의 농도로 용해된다.
- [0191] 본 발명의 목적은 본원에 정의된 바와 같은 1종 이상의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액, 예컨대, 물 중에 용해시키는 단계, 및
- [0192] 얻어진 용액을 니들, 프린트 헤드, 미세 배관 및/또는 미세유체 디바이스를 통해 완충된 용액, 예컨대, PBS로 디스펜싱하는 단계를 포함하는, 연속 섬유를 제조하는 방법에 의해 해결된다.
- [0193] 한 실시양태에서, 본 방법은 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함하고,
- [0194] 여기서, 상기 추가의 화합물(들)은
- [0195] 생리활성 분자 또는 모이어티,
- [0196] 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항

체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;

- [0197] 표지(들), 염료(들),
- [0198] 예컨대, 영상화용 조영제;
- [0199] 병원체,
- [0200] 예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;
- [0201] 양자점, 나노입자 및 마이크로입자,
- [0202] 또는 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.
- [0203] 한 실시양태에서, 본 방법은, 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,
- [0204] 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자 샘플로부터 단리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,
- [0205] 바람직하게는, (본원에 정의된 바와 같이) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)을 첨가하는 것을 포함한다.
- [0206] 한 실시양태에서, 본 방법은, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 것을 포함하고, 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 단리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있다.
- [0207] 한 실시양태에서, 본 방법은 하기 단계:
- [0208] (1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 단계, 및
- [0209] (2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 단계를 포함하며,
- [0210] 여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 동일하거나 또는 상이하고,
- [0211] 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 단리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있다.
- [0212] 한 실시양태에서, 본 방법은, 겔화/자기 조립 전, 중, 또는 후에, 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 가교제를 첨가하는 것을 포함하고,
- [0213] 여기서, 상기 가교제는 바람직하게 단쇄 링커, 선형 및 분지형 중합체, 생리활성 분자 또는 모이어티와 접합된 중합체(예컨대, 본원에서 정의된 것)를 포함하고,
- [0214] 여기서, 바람직하게는, 상기 가교제는 자기 조립 동안 펩티드 및/또는 펩티드 모방체(들)와 정전기적으로 상호작용한다.
- [0215] 한 실시양태에서, 본 방법은 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)의 사용을 포함한다.
- [0216] 바람직하게는, 상이한 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)란 그의 아미노산 서열, 극성 헤드기(들), 접합된/커플링된 화합물(예컨대, 상이한 표지, 생리활성 분자 등) 또는 이들의 조합에서 차이가 나는 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)를 지칭한다.
- [0217] 본 발명의 목적은 기재(substrate)를 매개로 한 유전자 전달을 위한 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도에 의해 해결되고,
- [0218] 여기서, 올리고뉴클레오타이드는 하이드로겔 내에 캡슐화되고, 세포는 상기 하이드로겔 내에 공동 캡슐화되거나 그 위에 시딩된다.
- [0219] 본 발명의 목적은 2D 미니-하이드로겔 어레이를 얻기 위한 본 발명에 따른 (바이오패브리케이션을 위한 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의) 용도, 또는 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도에 의해 해결되고,

- [0220] 바람직하게는, 프린터, 핀틀 및 미세접촉 프린팅 사용을 포함한다.
- [0221] 바람직하게는, 본 발명의 마이크로어레이는 상이한 생체분자, 약물, 화합물, 세포 등을 캡슐화하는 하이드로겔을 포함한다.
- [0222] 한 실시양태에서, 상기 용도는 2D 미니-하이드로겔을, 전류를 전도하는 전기 회로 또는 압전 표면 상에 프린팅하는 것을 포함한다.
- [0223] 본 발명의 목적은 예컨대, 퇴행성 추간판 질환 치료를 위한
- [0224] 주사제로서 또는 주사 요법을 위한 본 발명에 따른 (바이오패브리케이션을 위한 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의) 용도, 또는 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도에 의해 해결된다.
- [0225] 주사제는 바람직하게는, 주사 가능한 스캐폴드 또는 주사 가능한 임플란트 또는 이식 가능한 스캐폴드이다.
- [0226] 그의 자기 조립 특성에 의해, 본 발명의 자극 반응성인 초단쇄의 펩티드가 주사 가능한 스캐폴드를 위해 이상적인 후보물질이다. 상기 스캐폴드는 계내에서 조립을 완성하는 반점성 용액으로서 주사될 수 있다. 불규칙한 형상 결합은 천연 조직과의 스캐폴드 통합을 촉진시키면서, 완전하게 충전될 수 있다. 이러한 주사 가능한 제제는, 외과적으로 이식되어야 하는 나노섬유 스캐폴드를 제조하는 생체의 기법, 예컨대, 전기방사법보다 유의적인 이점을 제공한다. 계내 겔화 공정 동안, 겔화 속도를 조절할 수 있는 능력을 통해서 임상의는 하이드로겔 구성물을 적용을 위해 원하는 형상, 예컨대, 진피 충전제로 조각화할 수 있다. 추가로, 생체적합성 및 생체내 안정성이 수개월 동안 지속될 필요가 있는 임플란트에 좋은 징조가 된다. 강도 및 조절 가능한 기계적 특성을 고려할 때, 본 발명자들은 특히 기계적으로 지지하는 역할을 이행하는 주사 요법 및 이식 가능한 스캐폴드를 개발하는 것에 관심을 가지고 있다.
- [0227] 본 발명의 목적은 바이오프린팅, 예컨대, 3D 마이크로액적 프린팅, 및 바이오성형을 포함하는, 본 발명에 따른 (바이오패브리케이션을 위한 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의) 용도, 또는 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 얻은 하이드로겔의 용도에 의해 해결된다.
- [0228] 한 실시양태에서, 상기 용도는 3D 오가노이드 구조물 또는 3D 거대분자 생물학적 구성물을 얻기 위한 것이다.
- [0229] 오가노이드 구조물은 장기와 유사한 구조물이다.
- [0230] "3D 오가노이드 구조물" 또는 "3D 거대분자 생물학적 구성물"이란 각종 세포 유형이 천연 조직과 유사한 방식으로 각종 생화학적 큐(cue)를 함유하는 3D 스캐폴드로 통합되는 샘플을 지칭한다. 상기 구성물은 잠재적으로는 임플란트, 질환 모델 및 세포 대 세포 및 세포 대 기체의 상호작용을 연구하기 위한 모델로서 사용될 수 있다.
- [0231] 한 실시양태에서, 상기 용도는 하이드로겔을 3D로 패턴화하기 위한 몰드(예컨대, 실리콘으로 이루어진 몰드)의 사용을 포함한다.
- [0232] 한 실시양태에서, 상기 용도는
- [0233] 상이한 세포/세포 유형을 포함하고,
- [0234] 바람직하게는, 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 본원에서 정의된 것) 및/또는 가교제(예컨대, 본원에서 정의된 것)를 포함하는, 다세포 구성물을 얻기 위한 것이다.
- [0235] 한 실시양태에서, 상기 용도는 캡슐화된 세포, 및 프린팅된/형성된 스캐폴드의 표면 상에 침적 또는 프린팅된 세포를 포함하는, 3D 세포 구성물 또는 스캐폴드를 얻기 위한 것이다.
- [0236] 한 실시양태에서, 상기 용도는
- [0237] - 바람직하게는, 환자 표본 확인을 위한, 더욱 바람직하게는, 천연 표현형을 상실한 1차 세포를 감염시키지 않는 병원체(예컨대, 뎅기열, 말라리아, 노로바이러스)를 함유하는 환자 표본을 확인하기 위한, 세포 기반 검정법을 제작하기 위한 것;
- [0238] - 바람직하게는, 감염 메커니즘(들)을 규명하기 위해 및/또는 병원체 감염 및/또는 복제를 억제하는 분자를 디자인할 수 있도록 하기 위해, 관심있는 병원체(들)를 확인 및 증식시킬 목적으로 감염된 세포를 회수하기 위한 것이다.

- [0239] 본 발명의 목적은
- [0240] - 겔화/자기 조립 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 상이한 세포 또는 세포 유형을 첨가 또는 혼합하는 것을 포함하고,
- [0241] 여기서, 상기 세포는 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포 및 환자 샘플로부터 단리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)일 수 있고,
- [0242] 바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 본원에서 정의된 것)을 첨가하는 것을 포함하고,
- [0243] 임의적으로, 겔화/자기 조립 전 또는 중에 가교제(예컨대, 본원에서 정의된 것)를 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 첨가하는 것을 포함하는,
- [0244] 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 하이드로겔을 제조하는 단계,
- [0245] - 다세포 구성물을 얻는 단계를 포함하는, 다세포 구성물을 얻는 방법에 의해 해결된다.
- [0246] 본 발명의 목적은
- [0247] - 하기 단계:
- [0248] (1) 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 캡슐화된 세포를 첨가 또는 혼합하는 단계, 및
- [0249] (2) 이어서, 프린팅된 하이드로겔 상에 세포를 첨가하는 단계를 포함하며,
- [0250] 여기서, (1) 및 (2)의 상기 세포는 상이하고,
- [0251] 줄기 세포(성체, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포), 전환분화된 전구 세포, 및 (환자로부터 단리된) 1차 세포 및 세포주(예컨대, 상피, 뉴런, 조혈 및 암 세포)일 수 있고,
- [0252] 바람직하게는, 겔화 전 또는 중에, 하이드로겔에 의해 공동 캡슐화된 추가의 화합물(들)(예컨대, 본원에서 정의된 것)을 첨가하는 것을 포함하고,
- [0253] 임의적으로, 겔화/자기 조립 전 또는 중에 가교제(예컨대, 본원에서 정의된 것)를 펩티드(들) 및/또는 펩티드 모방체(들)에 첨가하는 것을 포함하는,
- [0254] 본 발명에 따른 (하이드로겔을 제조 및/또는 연속 섬유를 제조하는) 방법에 의해 하이드로겔을 제조하는 단계,
- [0255] - 다세포 구성물을 얻는 단계를 포함하는, 다세포 구성물을 얻는 방법에 의해 해결된다.
- [0256] 한 실시양태에서, 수득되는 다세포 구성물은 몰드(예컨대, 실리콘으로 이루어진 몰드)에서 형성된다.
- [0257] 본 발명의 목적은 바람직하게는 마이크로-도메인을 포함하는,
- [0258] 본원에 따른, 및 본원 상기에 기술된 바와 같은 다세포 구성물 수득 방법에 따라 얻어진 다세포 구성물에 의해 해결된다.
- [0259] 본 발명의 목적은
- [0260] - 생체분자 라이브러리를 스크리닝하기 위한, 세포 거동, 병원체의 감염성 및 질환 진행을 연구하기 위한, 감염된 환자의 샘플을 스크리닝하기 위한, 약물 효능 및 독성을 평가하기 위한 오가노이드 모델로서,
- [0261] - 재생 의학용 조직 공학적 임플란트로서, 및/또는
- [0262] - *시험관내* 질환 모델로서의, 본 발명에 따른 (3D 생물학적 구성물을 수득하는) 방법에 의해 얻은 3D 생물학적 구성물의 용도, 또는
- [0263] 본 발명에 따른 (다세포 구성물을 수득하는) 방법에 의해 얻은 다세포 구성물의 용도에 의해 해결된다.
- [0264] 한 실시양태에서, 상기 용도는
- [0265] - 바람직하게는, 환자 표본 확인을 위한, 더욱 바람직하게는, 천연 표현형을 상실한 1차 세포를 감염시키지 않는 병원체(예컨대, 뎅기열, 말라리아, 노로바이러스)를 함유하는 환자 표본을 확인하기 위한, 세포 기반 검정법을 제작하기 위한 것;

- [0266] - 바람직하게는, 감염 메커니즘(들)을 규명하기 위해 및/또는 병원체 감염 및/또는 복제를 억제하는 분자를 디자인할 수 있도록 하기 위해, 관심있는 병원체(들)를 확인 및 증식시킬 목적으로 감염된 세포를 회수하기 위한 것이다.
- [0267] 양친매성 펩티드
- [0268] 한 실시양태에서, 본 발명은, 하기 일반식 I을 가지고, (나노섬유) 하이드로겔을 자기 조립하고 형성할 수 있는 펩티드, 펩티드 모방체 및/또는 펩토이드의 용도를 제공한다:
- [0269] $Z_a-(X)_b-(Y)_c-Z'_d$ I
- [0270] 상기 식에서,
- [0271] Z 는 N-말단 보호기이고;
- [0272] a 는 0 또는 1, 바람직하게는 1이고;
- [0273] X 는, 각각의 경우에, 독립적으로 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고, 여기서, 전체 소수성은 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 감소하고;
- [0274] b 는 1 내지 7로부터 선택되는 정수이고;
- [0275] Y 는 극성 아미노산 및 극성 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0276] c 는 0이 아닌, 1 또는 2이고;
- [0277] Z' 는 C-말단 극성 헤드기이고;
- [0278] d 는 1이고,
- [0279] $b + c$ 는 2 이상이다.
- [0280] 상기 펩티드, 펩티드 모방체 및/또는 펩토이드는 물을 포집하여 하이드로겔을 형성하는 3차원 네트워크로 자기 조립되는 양친매성 펩티드 또는 펩티드 양친매성 물질을 지칭할 수 있다. 펩티드 양친매성 물질은 기술되는 화학식을 가지는 펩티드, 펩티드 모방체, 펩토이드 또는 펩티드 접합체일 수 있다.
- [0281] 하기에서는 c 가 0인
- [0282] 펩티드, 펩티드 모방체 및/또는 펩토이드를 이용한 실시양태를 추가로 개시한다:
- [0283] 소수성 펩티드
- [0284] 본 발명의 목적은, 하기 일반식 II를 가지고, (나노섬유) 하이드로겔을 형성할 수 있는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 의해 해결된다:
- [0285] $Z-(X)_a-Z'_b$ II
- [0286] 상기 식에서,
- [0287] Z 는 N-말단 보호기이고;
- [0288] X 는 지방족 아미노산의 소수성 아미노산 서열이고, 이는 각각의 경우에, 독립적으로 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되고;
- [0289] a 는 2 내지 6, 바람직하게는, 2 내지 5로부터 선택되는 정수이고;
- [0290] Z' 는 C-말단 기이고;
- [0291] b 는 0 또는 1이다.
- [0292] 본 발명자들은 상기 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체는 상기 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 전반적인 소수성 감소를 보여야 한다는 것을 발견하게 되었다.
- [0293] "펩토이드" 및 "펩티드 모방체"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 펩티드를 모방하도록 디자인된 분자를 의미한다. 펩토이드 또는 펩티드 모방체는 현존 펩티드의 변형으로부터, 또는 펩티드를 모방하는 유사 시스템을 디자인함으로써 생성될 수 있다. 이러한 변형으로는 천연적으로는 발생하지 않는 펩티드에의 변

화(예컨대, 변경된 골격 및/또는 비천연 아미노산 도입)를 포함한다. 상기를 참조할 수 있다.

- [0294] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산 및 지방족 아미노산 유도체는 D-아미노산 또는 L-아미노산이다.
- [0295] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산은 알라닌(Ala, A), 호모알릴글리신, 호모프로파길글리신, 이소류신(Ile, I), 노르류신, 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 바람직하게는, 알라닌(Ala, A), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 발린(Val, V) 및 글리신(Gly, G)으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0296] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산의 전부 또는 일부는 N-말단에서부터 C-말단 방향으로 아미노산 크기가 감소하는 순으로 배열되고, 여기서, 지방족 아미노산의 크기는 $I = L > V > A > G$ 로 정의된다.
- [0297] 한 실시양태에서, 아미노산 크기가 감소하는 순으로 배열된 상기 지방족 아미노산은 반복적 또는 비반복적 서열인 서열을 가진다.
- [0298] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산의 제일 첫번째 N-말단 아미노산(G, V 또는 A일 수 있다)은 덜 중요하다. 본 발명자들은 상기와 같은 특징의 첫번째 아미노산이 상기의 것 이외의 다른 요건인, N-말단에서부터 C-말단 방향으로 소수성 감소라는 필수요건을 지배하는 것은 아니라는 것을 발견하게 되었다.
- [0299] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산의 첫번째 N-말단 아미노산은 G, V 또는 A이다.
- [0300] 한 실시양태에서, 상기 지방족 아미노산은
- [0301] ILVAG(서열 번호 1),
- [0302] LIVAG(서열 번호 2),
- [0303] IVAG(서열 번호 3),
- [0304] LVAG(서열 번호 4),
- [0305] ILVA(서열 번호 5),
- [0306] LIVA(서열 번호 6),
- [0307] IVG(서열 번호 13),
- [0308] VIG(서열 번호 14),
- [0309] IVA(서열 번호 15),
- [0310] VIA(서열 번호 16),
- [0311] VI(서열 번호 17), 및
- [0312] IV(서열 번호 18)로부터 선택되는 서열을 가지고,
- [0313] 여기서, 임의적으로, 예컨대,
- [0314] AIVAG(서열 번호 7),
- [0315] GIVAG(서열 번호 8),
- [0316] VIVAG(서열 번호 9),
- [0317] ALVAG(서열 번호 10),
- [0318] GLVAG(서열 번호 11),
- [0319] VLVAG(서열 번호 12)와 같이, N-말단에서 상기 서열 앞에 G, V 또는 A가 존재한다.
- [0320] 한 실시양태에서, (X)_a는 서열 번호 1 내지 18로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열,
- [0321] 바람직하게는, 서열 번호 1 및 서열 번호 2를 가지는 서열을 가진다.
- [0322] 한 실시양태에서, 지방족 아미노산의 전부 또는 일부는 아미노산 크기가 동일한 순서로 배열되며, 바람직하게는, 여기서, 아미노산 크기가 동일한 순서로 배열된 상기 지방족 아미노산은 길이가 2 내지 4개의 아

미노산 길이인 서열을 가진다.

- [0323] 예를 들어, 크기가 동일한 순서로 배열된 상기 지방족 아미노산은 LLLL, LLL, LL, IIII, III, II, VVV, VV, VV, AAAA, AAA, AA, GGGG, GGG, 및 GG로부터 선택되는 서열을 가진다.
- [0324] 한 실시양태에서, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 일반식 -C(O)-R을 가지고, 여기서, R은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되고,
- [0325] 여기서, R은 바람직하게는, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸 및 이소부틸로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0326] 한 실시양태에서, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 아세틸 기이다.
- [0327] 한 실시양태에서, 상기 N-말단 보호기 **Z**는 천연 및 합성 아미노산 유도체를 비롯한, 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 N-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰아이드, 니트라이드, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있다.
- [0328] 한 실시양태에서, 상기 C-말단 기 **Z'**는 비아미노산, 바람직하게는, 소분자, 작용기 및 링커로 이루어진 군으로부터 선택되는 비아미노산이다. 상기 C-말단 기 **Z'**는 본 발명의 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 작용화시키는데 사용되는 극성 또는 비극성 모이어티일 수 있다.
- [0329] 한 실시양태에서, 상기 C-말단 기 **Z'**는
- [0330] - 작용기, 예컨대, 극성 또는 비극성 작용기,
- [0331] 예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만)
- [0332] -COOH, -COOR, -COR, -CONHR 또는 -CONRR'(여기서, R 및 R'은 H, 비치환 또는 치환된 알킬, 및 비치환 또는 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택됨)
- [0333] -NH₂, -OH, -SH, -CHO, 말레이미드, 이미도에스테르, 카보디이미드 에스테르, 이소시아네이트;
- [0334] - 소분자,
- [0335] 예컨대, (이에 제한되는 것은 아니지만) 당, 알코올, 하이드록시산, 아미노산, 비타민, 바이오틴, L-도파, 티록신;
- [0336] - (이에 제한되는 것은 아니지만) 에틸렌디아민, PEG, 카보디이미드 에스테르, 이미도에스테르와 같은 극성 작용기로 종결되는 링커;
- [0337] - 바이오틴, 당, 하이드록시산과 같은 소분자 또는 비타민에 커플링된 링커
- [0338] 로부터 선택된다.
- [0339] 한 실시양태에서, 여기서, 상기 C-말단 기 **Z'**는
- [0340] 생리활성 분자 또는 모이어티,
- [0341] 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;
- [0342] 표지(들), 염료(들),
- [0343] 예컨대, 형광성 또는 방사성 표지(들), 영상화용 조영제;
- [0344] 병원체,
- [0345] 예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;
- [0346] 마이크로입자 및 나노입자
- [0347] 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 1종 이상의 화합물의 화학적 접합 또는 커플링을 위해 사용될 수 있고,

- [0348] 여기서, 상기 화학적 접합은 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자기 조립 전 또는 후에 수행될 수 있다.
- [0349] 한 실시양태에서, 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 C-말단은 예컨대,
- [0350] 생리활성 분자 또는 모이어티,
- [0351] 예컨대, 성장 인자, 사이토카인, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬, 프로드럭, 약물, 비타민, 항원, 항체, 항체 단편, 올리고뉴클레오타이드(DNA, 메신저 RNA, 짧은 헤어핀 RNA, 소형 간섭 RNA, 마이크로RNA, 펩티드 핵산, 압타머를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 당류;
- [0352] 표지(들), 염료(들),
- [0353] 예컨대, 형광성 또는 방사성 표지(들), 영상화용 조영제;
- [0354] 병원체,
- [0355] 예컨대, 바이러스, 박테리아 및 기생충;
- [0356] 마이크로입자 및 나노입자
- [0357] 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 1종 이상의 화합물의 화학적 접합 또는 커플링에 의해 (C-말단 기 또는 링 커를 사용하지 않고) 작용화되고,
- [0358] 여기서, 상기 화학적 접합은 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 자기 조립 전 또는 후에 수행될 수 있다.
- [0359] 한 실시양태에서, 상기 C-말단 기 Z' 는 천연 및 합성 아미노산 유도체를 비롯한 펩티드 모방체 분자이고, 여기서, 상기 펩티드 모방체 분자의 C-말단은 카복실산, 아마이드, 알코올, 알데히드, 아민, 이민, 니트릴, 우레아 유사체, 포스페이트, 카보네이트, 술페이트, 니트레이트, 말레이미드, 비닐 술폰, 아지드, 알킨, 알켄, 탄수화물, 이미드, 퍼옥시드, 에스테르, 아릴, 케톤, 술폰아이드, 니트라이트, 포스포네이트, 및 실란으로 이루어진 군으로부터 선택되는 작용기로 변형될 수 있다.
- [0360] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 1일 내지 적어도 6개월, 바람직하게는, 적어도 8개월, 더욱 바람직하게는, 적어도 12개월 범위의 기간 동안 주위 온도 하에 생리학적 조건에서 수용액 중에서 안정하다.
- [0361] 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 90℃ 이하의 온도 하에 생리학적 조건에서 수용액 중에서 적어도 1시간 동안 안정하다.
- [0362] 본 발명의 목적은
- [0363] (a) 1종 이상의, 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체, 및
- [0364] (b) 1종 이상의, 하기 일반식을 가지고, 하이드로겔을 형성할 수 있는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 조성물 또는 혼합물에 의해 해결된다:
- [0365] $Z-(X)_a-N'_b$
- [0366] 상기 식에서,
- [0367] Z 는 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대해 본원에 정의된 바와 같고;
- [0368] X 는 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대해 본원에 정의된 바와 같고;
- [0369] a 는 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대해 본원에 정의된 바와 같고;
- [0370] N' 은 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대하여 본원에 정의된 바와 같은 극성 C-말단 기인 Z' 와 다른 비극성 C-말단 기이고;
- [0371] 바람직하게는, 카복실산, 아마이드, 알코올, 바이오틴, 말레이미드, 당, 및 하이드록시산이고,
- [0372] b 는 0 또는 1이다.
- [0373] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 하이드로겔에 의해 해결된다.

- [0374] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 적어도 7일, 바람직하게는, 적어도 2 내지 4주, 더욱 바람직하게는, 적어도 1 내지 6개월의 기간 동안 주위 온도 하에 수용액 중에서 안정하다.
- [0375] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 손실 탄성률(loss modulus) G'' 에 대한 저장 탄성률(storage modulus) G' 의 비가 2 초과인 것을 특징으로 한다.
- [0376] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 0.02 Hz 내지 16 Hz 범위의 주파수에서 저장 탄성률 G' 가 100 Pa 내지 80,000 Pa인 것을 특징으로 한다.
- [0377] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 콜라겐 또는 그의 가수분해된 형태(젤라틴)보다 더 큰 기계적 스티프니스를 가진다.
- [0378] 본 발명의 목적은
- [0379] (a) 1종 이상의, 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체, 및
- [0380] (b) 1종 이상의, 비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 하이드로겔에 의해 해결된다.
- [0381] 상기의 1종 이상의, "비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체"는 하이드로겔을 형성할 수 있으며, 하기 일반식을 가진다:
- [0382] $Z-(X)_a-N'_b$
- [0383] 상기 식에서,
- [0384] Z , X 및 a 는 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대하여 본원에 정의된 바와 같고;
- [0385] N' 는 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에 대하여 본원에 정의된 바와 같은 극성 C-말단 기인 Z' 와 다른 비극성 C-말단 기이고;
- [0386] 바람직하게는, 카복실산, 아마이드, 알코올, 바이오틴, 말레이미드, 당, 및 하이드록시산이고,
- [0387] b 는 0 또는 1이다.
- [0388] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 섬유, 또는 상기 정의된 바와 같은 비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체의 섬유를 포함하고, 상기 섬유는, 미생물, 바이러스 입자, 펩티드, 펩토이드, 단백질, 핵산, 올리고당, 다당류, 비타민, 무기 분자, 합성 중합체, 소형 유기 분자, 마이크로입자 또는 나노입자 또는 약학적으로 활성인 화합물 중 적어도 하나를 포집할 수 있는 네트워크를 한정한다.
- [0389] 한 실시양태에서, 하이드로겔은, 소수성 중합체의 섬유의 네트워크에 의해 포집되는 미생물, 바이러스 입자, 펩티드, 펩토이드, 단백질, 핵산, 올리고당, 다당류, 비타민, 무기 분자, 합성 중합체, 소형 유기 분자, 마이크로입자 또는 나노입자 또는 약학적으로 활성인 화합물 중 적어도 하나를 포함한다.
- [0390] 한 실시양태에서, 소수성 중합체의 섬유는 양친매성 중합체의 섬유의 네트워크에 의해 포집되는 미생물, 바이러스 입자, 펩티드, 펩토이드, 단백질, 핵산, 올리고당, 다당류, 비타민, 무기 분자, 합성 중합체, 소형 유기 분자, 마이크로입자 또는 나노입자 또는 약학적으로 활성인 화합물 중 적어도 하나에 커플링된다.
- [0391] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 연료 전지, 태양 전지, 전자 전지, 바이오센싱 장치, 의료용 디바이스, 임플란트, 약학 조성물 및 화장품 조성물 중 적어도 하나에 포함된다.
- [0392] 한 실시양태에서, 하이드로겔은 주사 가능한 것이다.
- [0393] 본 발명의 목적은 하기:
- [0394] 약학적으로 활성인 화합물의 방출 및/또는 생리활성 모이어티의 전달,
- [0395] 의료 도구 키트,
- [0396] 연료 전지,
- [0397] 태양 전지,

- [0398] 전자 전지,
- [0399] 재생 의학 및 조직 재생,
- [0400] 상처 치유,
- [0401] 2D 및 3D 합성 세포 배양용 기재,
- [0402] 줄기 세포 치료,
- [0403] 주사 요법,
- [0404] 바이오센서 개발,
- [0405] 바이오기능화된 표면,
- [0406] 바이오프린팅과 같은 바이오패브리케이션, 및
- [0407] 유전자 치료 중 적어도 하나에 있어서의 본 발명에 따른 하이드로겔의 용도에 의해 해결된다.
- [0408] 상기 용도를 위해, 본 발명자들은 바이오패브리케이션 및 후속되는 실시양태 및 방법에서의 상기 기술된 용도를 언급하며, 이는 또한 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체에도 적용된다.
- [0409] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액 중에 용해시키는 단계를 포함하는, 하이드로겔을 제조하는 방법에 의해 해결된다.
- [0410] 한 실시양태에서, 수용액 중에 용해된 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 추가로 일정 온도에 노출되고, 여기서, 온도는 20℃ 내지 90℃, 바람직하게는, 20℃ 내지 70℃ 범위이다.
- [0411] 한 실시양태에서, 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체는 농도 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 내지 100 mg/ml 의 농도로, 바람직하게는, 1 mg/ml 내지 50 mg/ml 의 농도로, 더욱 바람직하게는, 약 1 mg/ml 내지 약 20 mg/ml 의 농도로 용해된다.
- [0412] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체, 및 본원에 정의된 바와 같은 비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 수용액 중에 용해시키는 단계를 포함하는, 하이드로겔을 제조하는 방법에 의해 해결된다.
- [0413] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 하이드로겔을 포함하는 상처 드레싱제 및 상처 치유제에 의해 해결된다.
- [0414] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 하이드로겔에 의해 형성된 펩티드 및/또는 펩티드 모방체 스캐폴드를 포함하는 외과용 임플란트 또는 스텐트에 의해 해결된다.
- [0415] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 제약 및/또는 화장품 조성물 및/또는 생체의료용 디바이스 및/또는 전자 디바이스에 의해 해결된다.
- [0416] 본 발명의 목적은 본 발명의 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체 및 본원에 정의된 바와 같은 비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 제약 및/또는 화장품 조성물 및/또는 생체의료용 디바이스 및/또는 전자 디바이스에 의해 해결된다.
- [0417] 한 실시양태에서, 제약 및/또는 화장품 조성물 및/또는 생체의료용 디바이스, 및/또는 전자 디바이스는 약학적으로 활성인 화합물을 추가로 포함한다.
- [0418] 한 실시양태에서, 제약 및/또는 화장품 조성물은 국소용 겔 또는 크림, 스프레이, 분말제, 또는 시트, 패치 또는 멤브레인의 형태로 제공되거나,
- [0419] 여기서, 제약 및/또는 화장품 조성물은 주사액의 형태로 제공된다.
- [0420] 한 실시양태에서, 제약 및/또는 화장품 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함한다.
- [0421] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 제1 용기, 및 수용액을 포함하는 제2 용기를 포함하는, 부품 키트에 의해 해결된다.
- [0422] 한 실시양태에서, 키트는 본원에 정의된 바와 같은 비극성 헤드기를 갖는 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 제3 용기를 추가로 포함한다.
- [0423] 한 실시양태에서, 제2 용기의 수용액은 약학적으로 활성인 화합물을 추가로 포함하고/하거나,

- [0424] 여기서, 소수성 펩티드 및/또는 펩티드 모방체를 포함하는 제1 및/또는 제3 용기는 약학적으로 활성인 화합물을 추가로 포함한다.
- [0425] 본 발명의 목적은
- [0426] (a) 본 발명에 따른 하이드로겔을 제공하는 단계,
- [0427] (b) 상기 하이드로겔을, 재생된 조직을 형성할 세포에 노출시키는 단계,
- [0428] (c) 상기 세포를 상기 하이드로겔 상에서 증식시키는 단계를 포함하는, 시험관내 또는 생체내 조직 재생 방법에 의해 해결된다.
- [0429] 한 실시양태에서, 본 방법은 단계 (a)에서 생체내에서 수행되고, 상기 하이드로겔은 체내의 조직 재생을 의도하는 곳에 제공되고,
- [0430] 여기서, 상기 단계 (a)는 바람직하게는, 상기 하이드로겔을 체내의 조직 재생을 의도하는 곳에 주사함으로써 수행된다.
- [0431] 본 발명의 목적은
- [0432] 유효량의 본 발명에 따른 하이드로겔 또는 본 발명에 따른 약학 조성물을 상처에 적용하는 단계를 포함하는, 상처 치료 및 상처 치유 방법에 의해 해결된다.
- [0433] 본 발명의 목적은, 시험관내 및/또는 생체내 사용을 위한,
- [0434] 바람직하게는, 경구 투여, 주사 및/또는 국소 투여를 위한, 본 발명에 따른 하이드로겔을 포함하는 바이오이미징 디바이스에 의해 해결된다.
- [0435] 본 발명의 목적은 본 발명에 따른 하이드로겔을 포함하는 2D 또는 3D 세포 배양용 기체에 의해 해결된다.

도면의 간단한 설명

- [0436] 이제 본 도면을 참조한다:

도 1. 초단쇄의 펩티드/펩티드 모방체의 거대분자 나노섬유 하이드로겔로의 자기 조립.

(a) 상기 양친매성 펩티드는 특징적인 모티프를 가지고, 여기서, 지방족 아미노산은 Ac-LIVAGK-NH₂에 의해 예시되는 바와 같이, N-말단으로부터 소수성이 감소되는 순으로 배열된다. 자기 조립 동안 펩티드는 역평행 방식으로 회합되어 원편광 이색성에 의해 검출되는 α 나선형 중간체 구조물을 생성하는 것으로 가정된다. (b) 펩티드 농도가 증가함에 따라, 랜덤 코일(검은색 선)로부터 α 나선형 중간체(적색 선)으로, β 피브릴(청색 선)로의 입체구조적 변화가 관찰된다. 인서트를 통해 후자의 입체구조를 더욱 잘 설명할 수 있다. β 피브릴로의 전이 농도는 삼량체인 경우에 더 높기는 하지만, 상기 현상은 육량체, 예컨대, Ac-LIVAGK-NH₂ 및 삼량체(Ac-IVK-NH₂)에 대하여 관찰된다. 이어서, 펩티드 이량체는 나노섬유 및 시트로 응집되는 피브릴로 적층하고, 이는 물을 포집하여 하이드리젤을 형성한다. c, 전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법을 사용하여 관찰된 바, 나노섬유 구조는 세포외 기질과 유사하다. 섬유는 밀리미터 범위까지로 이어진다. 육량체, 예컨대, Ac-LIVAGK-NH₂(2 mg/mL)의 나노섬유는 시트로 쉽게 축합되는 반면, Ac-IVK-NH₂(15 mg/mL)의 경우 개별 섬유가 더욱 쉽게 관찰된다. 섬유는 다공성인 상호연결된 3차원 스캐폴드를 형성한다.

도 2. 자극 반응성 겔화를 나타내는 펩티드/펩티드 모방체의 하위부류의 예.

도 3. 1차 아민 기를 함유하는 아미드화된 펩티드/펩티드 모방체의 자극 반응성 겔화.

(a) C-말단에 극성 잔기로서 리신을 포함하는 초단쇄의 펩티드의 하위부류는 염 용액 중에서 더욱 쉽게 하이드로겔을 형성하고 - 최소 겔화 농도는 유의적으로 더 낮고, 겔화 반응 속도론은 가속화된다. Ac-LIVAGK-NH₂는 물 중 20 mg/mL, 식염수 중 12 mg/mL, PBS 중 7.5 mg/mL, 및 10 mM NaOH 중 10 mg/mL에서 하이드로겔을 형성한다. (b) 20 mg/mL Ac-LIVAGK-NH₂ 하이드로겔의 강성(저장 탄성률(G'))로 표현)은 물에 용해되었을 때 1 kPa인 것과 비교하여, 생리 식염수 중에 용해되었을 때 10 kPa로 10배만큼 증가한다. 포스페이트 완충 식염수(PBS: phosphate buffered saline) 중에서 G'는 40 kPa로 증가한다. 펩티드 농도에 따라 강도 또한 증가한다. (c) 수산화나트륨(NaOH) 첨가시 20 mg/mL Ac-LIVAGK-NH₂ 하이드로겔의 강성은 물 중에서의 1 kPa로부터 80 kPa로 증강

된다. 강성은 NaOH 농도에 따라 증가한다. (d) 동부피의 펩티드 용액(예컨대, 10 mg/mL Ac-ILVAGK-NH₂) 및 소분자 함유 PBS를 함유함으로써 다양한 크기의 하이드로겔 액적 어레이를 수득하였다. 생리활성 모이어티 또한 캡슐화될 수 있다; 녹색 식용 색소 및 488 nm 방출 양자점을 포함하는 1 μ L의 액적, 적색 식용 색소 및 2차 항체에 접합된 568 nm 방출 형광단을 포함하는 2 μ L 액적, 및 메틸렌 블루 및 DAPI를 포함하는 5 μ L 액적. (e) 5 mg/mL Ac-ILVAGK-NH₂ 용액을 27 게이지 니들을 통해 진한 염 배쓰로 압출시킴으로써 하이드로겔 "누들"을 수득한다.

도 4. 펩티드 하이드로겔은 화합성이 매우 높고, 이는 세포의 시험관내 성장을 지지한다. 세포는 예컨대, 분화 유도 및 스크리닝 검정법용의 다양한 적용을 위해 펩티드 하이드로겔 내에 캡슐화될 수 있고, 고정화될 수 있다.

(a) 5 mg/mL Ac-ILK6-NH₂ 하이드로겔로 이루어진 2 μ L 액적 내로의 인간 간엽 줄기 세포 캡슐화. (ai) 25 mm 커버 슬립 상의 미니-하이드로겔 사진. (aii) 단일 미니-하이드로겔의 형광 현미경 검사법을 사용하여 시각화된 세포 캡슐화(여기서, 세포를 팔로이딘-FITC(세포골격은 녹색으로 염색) 및 Dapi(핵은 청색으로 염색)로 염색. (aiii) 캡슐화된 세포는 10X 확대 배율의 상기 2D 투사형 영상으로 입증되는 바와 같은 장방형 형태를 취한다. 세포는 상이한 초점면 상에 위치한다. (aiv) 초점 접착(적색)을 보여주는 더 높은 고배율 영상(63X). (b) 하이드로겔 필름 상에서 배양된 인간 간엽 줄기 세포는 또한 (c) 유리 커버 슬립 상에서 배양된 것과 비교하여 장방형 형태를 취한다.

도 5. 올리고뉴클레오타이드, 예컨대, DNA, mRNA, siRNA는 기재 매개 유전자 전달을 위해 하이드로겔 내에 캡슐화될 수 있다. 이어서, 세포는 상기 하이드로겔 내에 공동 캡슐화되거나, 그 위에 시딩될 수 있다.

(a) 하이드로겔은 올리고뉴클레오타이드를 뉴클레아제 분해로부터 보호한다. (b) 하이드로겔은 시간이 경과함에 따라 캡슐화된 DNA를 방출한다. (c) GFP mRNA를 캡슐화한 하이드로겔 상에서 배양된 세포는 2일 경과 후 관심의 대상이 되는 단백질(GFP)을 발현한다.

도 6. 다양한 적용을 위해 2D 미니-하이드로겔 어레이.

현행 기술, 예컨대, 프린터, 핀틀 및 미세접촉 프린팅을 사용하여 상기 2D 어레이를 생성할 수 있다. (a) 어레이는 전기 또는 자기 자극, 예컨대, 전기장 또는 점 자극을 받을 수 있다. 미니-하이드로겔은 또한 전류를 전도하는 전기 회로 또는 압전 표면 상에 프린트될 수 있다. (b) 상이한 소분자 또는 올리고뉴클레오타이드는 캡슐화되어 생화학적 구배를 생성할 수 있다. (c) 상이한 세포는 상이한 미니-하이드로겔에 캡슐화되고, 벌크 매질 중에 용해된 동일한 약물/생리활성 분자로 처리될 수 있다. 별법으로, 캡슐화된 세포의 유전자 발현을 변경시키기 위해 상이한 약물 또는 생화학적 규가 도입될 수 있다.

도 7. 미니-하이드로겔의 안정성 및 기계적 특성은 또한 단쇄 링커, 선형 및 분지형 중합체를 비롯한 가교제의 첨가를 통해 추가로 증강될 수 있다.

상기 복합 중합체-펩티드 하이드로겔은 자기 조립 동안 초단쇄의 펩티드와 정전기적으로 상호작용할 수 있는 (a) 선형 및 (b) 분지형 중합체를 도입함으로써 제조된다. 생성된 하이드로겔은 (가교 결합 및 탄성 증가에 기인하여) 우수한 기계적 특성을 가지고, (c) 면역 및 생리학적 반응을 조정하는 생리활성 작용기를 도입할 수 있는 기회를 제공한다.

도 8. 독특한 다중기능성 마이크로니치가 있는 생물학적 구성물을 생성하는 3D 바이오프린팅 또는 성형 기법.

하이드로겔이 상이한 세포 유형을 공간적으로 국한시킬 수 있는 바, 다세포 구성물 또한 수득할 수 있다.

도 9. 하이드로겔로 자기 조립되는 소수성 펩티드의 신규한 부류.

(a) 상기 소수성 펩티드는 특징적인 모티프를 가지고, 여기서, 지방족 아미노산은 Ac-ILVAG에 의해 예시되는 바와 같이, N-말단으로부터 소수성이 감소되는 순으로 배열된다. (b) 펩티드 Ac-ILVAG(5 mg/mL)로 이루어진 하이드로겔은 C-말단에 극성 작용기로서 카복실산을 가진다.

도 10. 소수성 펩티드의 C-말단 작용화.

(a) 자기 조립을 유도하는 특징적인 펩티드성 모티프는 다른 작용기, 링커, 및 소분자에 커플링함으로써 자기 조립되는 접합체를 수득할 수 있다. (b) Ac-ILVAG-바이오틴의 FESEM 영상은 그의 나노섬유 구조를 보여주며, 이를 통해 C-말단에서의 작용화가 나노섬유 구조를 파괴시키지 않는다는 것을 확인할 수 있다.

도 11. 캡슐화된 H1 인간 배아 줄기 세포는 증식되고, 그의 다능성을 유지하며, 이는 3D로 배양하는 것이 1차 세포의 천연 표현형을 보존한다는 것을 입증한다.

(a) 다능성 유지는 관련된 줄기 세포 바이오마커에 대한 1차 항체를 사용하여 염색된 샘플의 공초점 영상화에 의해 입증되었다.

(b) 역전사 정량적 PCR을 이용한 유전자 발현 분석. 매트릭셀(Matrigel) 상에서 배양된 세포(대조군)와 비교하여 펩티드 하이드로겔에 캡슐화된 H1 배아 줄기 세포의 3D 배양물이 야마나카(Yamanaka) 인자를 비롯한, 다능성 마커를 더 높은 수준으로 발현하였다.

도 12. 세포는 또한 바이오프린팅된 하이드로겔의 표면 상에 프린트될 수 있다. 3D로 배양하는 것이 1차 세포의 천연 표현형을 더욱 잘 보존하며, 세포가 더 높은 고밀도로 배양되도록 할 수 있을 것이다.

(a) 전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법에 미세 용모 구조물의 존재로 관찰된 바, 펩티드 하이드로겔 상에 증착된 장 상피 Caco2 세포는 장 중의 천연 장세포와 유사한 표현형상의 형태학적 특징을 발생하였다. 비교해보면, 유리 커버 슬립 상에서 배양된 세포는 융합성 또는 돌출형 미세 용모를 가지지 않는다. 코닝(Corning) 트랜스웰 막 상에서 배양된 세포는 양성 대조군으로서 사용하였다.

(b) 유리 커버 슬립 상에서 배양된 구성물과 비교하였을 때, 하이드로겔 상에서 배양된 Caco2 세포 또한 첨단 표면 수용체 FUT2A(적색 염색)를 더 높은 수준으로 발현한다. 3 μ m 트랜스웰 막 상에서 배양된 세포는 양성 대조군으로서의 역할을 한다.

(c) 하이드로겔 상에서 배양된 Caco2 세포는 21일 동안 배양 후 연속 단일층을 형성한다. 그의 형태는 기저층 부위의 세포 핵 및 첨단 부위의 미세 용모 구조물에 의해 입증되는 바와 같이, 생체내 세포와 유사하다(인서트).

도 13. 펩티드 하이드로겔은 우수한 시험관내 및 생체내 생체적합성 및 안정성을 입증한다.

30 μ l의 하이드로겔 중간판을 C57BL/6 마우스 내로 피하로 이식하여 생체내 생체적합성 및 안정성을 평가하였다. 이식 후, 하이드로겔(검은색 화살표 표시)은 여전히 상기 전형적 H&E 섹션에서 근육층 아래의 무정형 굴절 물질로서 그대로 관찰될 수 있다. 하이드로겔은 편광성이다(백색 화살표 표시). 염증성 관이 피부 표피로부터 골격근(삼각)으로 확장되는 것으로부터 명백하게 드러나는 바, 이식 수술은 면역 반응을 유도하였다. 피하 하이드로겔 임플란트에 대한 염증성 반응은 최소 내지 경미한 정도였다. 몇몇 다핵 거대 세포 조직구(검은색 화살표 표시)가 수개의 임플란트 부근에서 관찰되었다. 캡슐 형성은 없었고, 하이드로겔 임플란트는 대식세포에 의해 부분적으로 분해되었다.

도 14. 퇴행성 추간판 질환을 앓는 토끼 모델에서의 주사 요법 평가

(a) 상기 동물 모델에서, L3 내지 L6 척추골 사이의 3개의 요추 추간판을 편집하고, 그의 수핵(NP: nucleus pulposus) 내용물을 흡인하였다. 손상 후 1개월이 경과하였을 때, 2개의 상이한 처치를 NP 공간 내로 주사하였다. 제1 처치는 PBS 중 20 mg/mL의 Ac-LIVAGK-NH₂ 및 T1 MRI 조영제인 가돌리늄-DTPA(Gd-DTPA)로 이루어진다. 제2 요법은 PBS 중 20 mg/mL의 Ac-LIVAGK-NH₂에 캡슐화된 표지된 도너 토끼의 NP 세포로 이루어졌다. 세포를 T2 MRI 콘트라스트포어(contrastophore)인 FITC 접합된 산화철 나노입자로 표지하였다. 남은 추간판은 비처리 대조군으로서의 역할을 하였다.

(b) 동물 R245의 시상 단면의 생체의 자기 공명 영상화(MRI: magnetic resonance imaging)를 통해 (처리 후 2개월째) 상이한 추간판의 수분 함량을 나타낸다.

(c) NP는 관상 MRI 슬라이스(동물 R245)에서 더욱 잘 시각화된다. 더욱 밝은 T1 신호에 의해 입증되는 바와 같이, 건강한 추간판(N)의 NP(황색 삼각형 표시)는 수분 함량이 높다. 비교해 볼 때, 손상된 비처리 추간판(D)은 더 어둡다. 하이드로겔 처리(H)는 부분적으로는 Gd-DTPA의 존재에 기인하여, T1 신호를 유의적으로 증폭시켰다. T2 가중 실험에서, 세포 요법 샘플(c)의 경우에 더욱 큰 대조가 관찰되었으며, 이는 표지된 주사된 세포가 존재한다는 것을 시사한다.

(d) 상이한 추간판의 조직 단편은 하이드로겔 및 세포 처리가 조직과 통합되었고, 면역 반응을 유도하지 않았다는 것을 나타내었다. 건강한 추간판은 동물 R245(추간판 L2/L3)로부터 입수한 반면, 손상된 추간판은 R334(L4/L5)로부터 입수하였다. 영상화된 하이드로겔 처리된 추간판은 R245로부터의 L3/L4이고, 세포 요법 추간판은 R328의 L5/L6으로부터의 것이다. 더 높은 확대 배율로 관찰하였을 때, 세포 요법을 받은 추간판의 경우,

희미하게 형광성을 띠는 세포를 관찰할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0437] 추가 정의

[0438] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 당업계의 숙련자가 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본원에 기술된 것과 유사하거나, 또는 동일한 임의의 방법 및 물질이 본 발명을 실시 또는 시험하는 데 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질을 기술한다.

[0439] "펩티드" 및 "펩티드 모방체"라는 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 펩티드를 모방하도록 디자인된 분자를 의미한다. 펩티드 또는 펩티드 모방체는 현존 펩티드의 변형으로부터, 또는 펩티드를 모방하는 유사 시스템을 디자인함으로써 생성될 수 있다. 이러한 변형으로는 천연적으로는 발생하지 않는 펩티드에의 변화(예컨대, 변경된 골격 및/또는 비천연 아미노산 도입)를 포함한다. 상기를 참조할 수 있다.

[0440] "아미노산"이라는 용어는 카복실산 기가 에스테르(오르토 에스테르 포함), 실릴 에스테르, 아마이드, 하이드라지드, 옥사졸, 1,3-옥사졸린 또는 5-옥소-1,3,-옥사졸리딘 형태의 보호기에 의해 차폐된 화합물을 포함한다. "아미노산"이라는 용어는 또한 $-NH_2$ 또는 $-NHR^1$ 형태의 아미노 기(상기)가 보호기에 의해 차폐된 화합물을 포함한다. 적합한 아미노 보호기로는 카바메이트, 아마이드, 술폰아마이드, 이민, 이미드, 히스티딘, N2,5,-디메틸 피롤, N1,1,4,4-테트라메틸-디실릴-아자사이클로헥탄 부가물, N1,1,3,3-테트라메틸-1,3-디실리소인돌린, N디페닐실릴디에틸렌, 1,3,5-디옥사진, N[2-(트리메틸실릴)에톡시]메틸아민, N(5,5-디메틸-3-옥소-1-사이클로헥세닐)아민, N4,4,4-트리프로옥소-3-옥소-1-부테닐아민, N9-보라비사이클로노난 및 니트로아민을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예컨대, 2,2-디메틸-4-알킬-2-실라-5-옥소-1,3-옥사졸리딘의 형태로 아미노 기 및 카복실 기, 둘 모두를 차폐하는 보호기 또한 존재할 수 있다. 아미노산의 알파 탄소 원자는 전형적으로는 수소 원자를 추가로 포함한다. 실제로 카복실산의 연속된 주쇄로서, 알파 탄소 원자에 부착된, 소위 "측쇄"라는 하는 것은 선형 또는 분지형일 수 있는 지방족 모이어티이다. "측쇄"라는 용어는 펩티드(상기) 중 아미노산의 존재를 의미하고, 여기서, 골격은 복수 개의 아미노산을 커플링함으로써 형성된다. 이어서, 상기 펩티드에 포함된 아미노산의 α 탄소 원자에 결합된 지방족 모이어티가 골격에 대해 상대적인 측쇄를 정의한다. 상기 설명된 바와 같이, 아미노산의 아미노 기에 결합된 지방족 모이어티에도 동일 내용기 적용되며, 이는 유사하게 펩티드의 골격에 대해 상대적인 측쇄를 정의한다.

[0441] "지방족"이라는 용어는 달리 언급되지 않는 한, 포화, 또는 단일 또는 다중불포화일 수 있는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 채를 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "헤테로원자"라는 용어는 탄소 또는 수소 이외의 다른 임의 원소의 원자를 의미한다. 불포화 지방족 기는 하나 이상의 이중 및/또는 삼중 결합(알케닐 또는 알킬닐 모이어티)을 포함한다. 탄화수소 채의 분지는 선형 채 뿐만 아니라, 비방향족 사이클릭 원소를 포함할 수 있다. 탄화수소 채는 달리 언급되지 않는 한, 임의 길이일 수 있고, 임의 개수의 분지를 포함할 수 있다. 전형적으로, 탄화수소 채(주쇄)는 1 내지 5개, 내지 10개, 내지 15개, 또는 내지 20개의 탄소 원자를 포함한다. 알케닐 라디칼의 예로는 하나 이상의 이중 결합을 함유하는 직쇄 또는 분지형 분지형 탄화수소 라디칼이 있다. 알케닐 라디칼은 일반적으로 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자, 및 하나 이상, 예를 들어, 2개의 이중 결합, 예컨대, 약 2 내지 약 10개의 탄소 원자, 및 1개의 이중 결합을 포함한다. 알킬닐 라디칼은 보통 약 2 내지 약 20개의 탄소 원자, 및 하나 이상, 예를 들어, 2개의 삼중 결합, 바람직하게는, 예컨대, 2 내지 10개의 탄소 원자, 및 1개의 삼중 결합을 포함한다. 알킬닐 라디칼의 예로는 하나 이상의 삼중 결합을 포함하는 직쇄 또는 분지형 탄화수소 라디칼이 있다. 알킬 기의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 헥실, 헵틸, 옥틸, 노닐, 데실, 상기 라디칼의 n 이성질체, 이소프로필, 이소부틸, 이소펜틸, sec-부틸, tert-부틸, 네오펜틸, 3,3 디메틸부틸이 있다. 예를 들어, N, O, S, Se 또는 Si 또는 탄소 원자가 상기 헤테로원자에 의해 치환될 수 있는 바, 이에 주쇄 뿐만 아니라, 분지쇄, 둘 모두 헤테로원자를 추가로 포함할 수 있다.

[0442] 지방족 모이어티는 하나 이상의 작용기로 치환될 수 있거나, 또는 치환되지 않을 수 있다. 치환기는 임의의 작용기, 예를 들어, 제한하는 것은 아니지만, 아미노, 아미도, 아지도, 카보닐, 카복실, 케토, 시아노, 이소시아노, 디티안, 할로젠, 하이드록실, 니트로, 유기금속, 유기보론, 셀레노, 실릴, 실라노, 술폰일, 티오, 티오시아노, 트리프로옥시메틸 술폰일, p-톨루엔술폰일, 브로모벤젠술폰일, 니트로벤젠술폰일, 및 메탄술폰닐일 수 있다.

[0443] 상기 내용으로부터 자명해지는 바와 같이, 본원에 기술된 펩티드/펩티드 중의 아미노산의 측쇄의 길이는 0 내

지 약 5개, 내지 약 10개, 내지 약 15개, 내지 약 20개의 탄소 원자로 이루어진 길이일 수 있다. 이는 분지형일 수 있으며, 불포화 탄소 대 탄소 결합을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 천연 아미노산이 펩티드 또는 펩토이드에 포함된다. 상기 천연 아미노산은 천연적으로 발생된 단백질의 20종의 빌딩 블록 중 하나일 수 있다.

[0444] 본원에 개시된 펩티드/펩토이드를 비롯한, 펩티드 또는 펩토이드는 제1 아미노산의 카복실 기와 제2 아미노산의 아미노 기 사이의 아미드 결합을 통해 공유적으로 커플링된다.

[0445] 양친매성이라는 용어는 극성 및 비극성 유체 둘 모두 중에서 가용성인 화합물을 의미한다. 이는 또한 다상 화합물들을 포함한다. 펩티드 및/또는 펩토이드의 양친매성 특성은 동일한 펩티드 및/또는 펩토이드 내의 극성 및 비극성 모이어티 둘 모두의 존재에 기인한다. 이와 관련하여, 펩티드 및/또는 펩토이드는 계면활성제의 성질을 가질 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 펩티드 및/또는 펩토이드의 극성 특성은 극성 모이어티에 기초로 한다. 상기 두 모이어티는 $-COOH$ 측쇄 기, 특히, 하전된 COO^- 기 형태의 것 및 아미노 기이다. 상기와 같은 추가의 모이어티는 유리형의 비보호된 형태로 존재한다면, 이는 C-말단 $-COOH$ 기이다. 일반적으로, 계면활성제 분자는, 비극성인, 전형적으로 탄화수소 모이어티에 부착되는 극성인, 전형적으로 친수성인 헤드를 포함한다. 펩티드 또는 펩토이드의 비극성 모이어티는 작용기를 포함하지 않는 탄화수소 쇄를 포함한다.

[0446] 따라서, 본원에 개시된 펩티드 및/또는 펩토이드에 포함되는 양친매성 선형 배열은 극성 모이어티 및 비극성 모이어티를 포함한다. 극성 모이어티로는 극성 기, 예컨대, 하이드록실 기, 티올 기, 셀레노 기, 아미노 기, 아미드 기, 에테르 기, 티오에테르 기 또는 셀레노 에테르 기를 포함하는 지방족 아미노산을 포함한다. 따라서, 극성 모이어티는 양성자를 포함하는 극성 작용기, 예컨대, 하이드록실, 티올, 셀레놀, 아민 또는 아미드를 포함하는 아미노산을 포함할 수 있다. 극성 모이어티는 또한 펩티드 및/또는 펩토이드의 C-말단 또는 N-말단을 포함할 수 있다. 상기 경우에서 C-말단 또는 N-말단은 각각 유리 카복실 또는 아미노 기의 형태, 즉, 보호기가 없는 형태로 존재할 수 있다.

[0447] 일반적으로, 본원에 개시된 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드의 선형 양친매성 서열의 극성 모이어티는 펩티드/펩토이드의 비극성 모이어티에 커플링되는 단일 아미노산에 의해, 2개의 연속적인 아미노산들에 의해 또는 3개의 연속적인 아미노산들에 의해 정의된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 펩티드/펩토이드의 극성 모이어티는 아미드 결합을 통해 공유적으로 커플링된 2개의 아미노산으로 이루어지며, 상기 두 아미노산 모두 극성 펩티드/펩토이드 측쇄를 보여한다. 상기 두 아미노산 중에서 하나는 N 또는 C-말단을 정의하는 펩티드/펩토이드의 말단 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 양친매성 펩티드/펩토이드는 비극성 모이어티를 정의하는 펩티드/펩토이드의 잔여 부분이 있는 극성 측쇄를 포함하는 단일 아미노산을 가진다. 일부 실시양태에서, 펩티드/펩토이드의 잔여 부분이 비극성 모이어티를 정의하는 반면에, 양친매성 펩티드/펩토이드는 극성 측쇄를 가지는 2개의 아미노산을 포함한다. 각각의 극성 측쇄의 3가지 예시적인 예로서 4-메틸-4-티오-펜틸, 6-에톡시카보닐-4,5-디메틸-헥실 및 6-하이드록시-4-(1-하이드록시에틸)-헥실 기가 알맞을 수 있다. 본원에서 사용되는 바, 상응하는 펩티드/펩토이드 측쇄의 넘버링은 아미노산의 α 탄소 원자에 공유 결합으로 결합되거나, 아미노산의 아미노 기에 공유 결합으로 결합되는 탄소 원자에서 "1"로 시작한다. 극성 모이어티에 포함되는 아미노산은 이에 제한되는 것은 아니지만, 아스파르트산, 아스파라긴, 글루탐산, 4-프루오로-글루탐산, 2 아미노아피딘산, γ -카복시-글루탐산, 4-tert-부틸 아스파르트산, 글루타민, 5-N-에틸-글루타민(테아닌), 시트룰린, 티오-시트룰린, 시스테인, 호모시스테인, 메티오닌, 에티오닌, 셀레노메티오닌, 텔루로메티오닌, 트레오닌, 알로-트레오닌, 세린, 호모세린, 아르기닌, 호모아르기닌, 오르니틴, 리신, 5-하이드록시-리신 및 N(6)-카복시메틸리신이거나, 또는 그를 포함할 수 있다. 임의의 상기 아미노산은 L 또는 D 형태로 존재할 수 있다

[0448] 본원에 개시된 양친매성 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열은 n 개의 아미노산을 가지는 것으로 정의될 수 있다. 극성 측쇄를 가지는 단일 아미노산이 양친매성 선형 서열에 포함되는 경우, 이때 비극성 모이어티는 $n-1$ 개의 아미노산을 가지는 것으로 간주될 수 있다. 이 경우, 극성 모이어티는 정확하게 1개의 아미노산으로 이루어지며, 상기 아미노산은 상기 단락의 임의의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 극성 측쇄를 가지는 2개의 연속되는 아미노산이 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열에 포함되는 경우, 이때 비극성 모이어티는 $n-2$ 개의 아미노산을 가지는 것으로 간주될 수 있다. 이 경우, 극성 모이어티는 정확하게 2개의 아미노산으로 이루어진다. 극성 측쇄를 가지는 3개의 연속되는 아미노산이 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열에 포함되는 경우, 이때 비극성 모이어티는 $n-3$ 개의 아미노산을 가지는 것으로 간주될 수 있다. 이 경우, 극성 모이어티는 정확하게 3개의 아미노산으로 이루어진다. 극성 모이어티가 2개의 아미노산으로 이루어지는 실시양태에서, 극성 모이어티는 Asn-Asn, Asp-Asp, Glu-Glu, Gln-Gln, Asn-Gln, Gln-Asn, Asp-Gln, Gln-Asp, Asn-Glu, Glu-Asn,

Asp-Glu, Glu-Asp, Gln-Glu, Glu-Gln, Asp-Asn, Asn-Asp, Thr-Thr, Ser-Ser, Thr-Ser, Ser-Thr, Asp-Ser, Ser-Asp, Ser-Asn, Asn-Ser, Gln-Ser, Ser-Gln, Glu-Ser, Ser-Glu, Asp-Thr, Thr-Asp, Thr-Asn, Asn-Thr, Gln-Thr, Thr-Gln, Glu-Thr, Thr-Glu로부터 선택되는 서열을 가질 수 있다. 극성 모이어티가 3개의 아미노산으로 이루어지는 실시양태에서, 극성 모이어티는 몇 개만 예를 들자면, Asn-Asn-Asn, Asn-Asn-Asp, Asn-Asp-Asn, Asp-Asn-Asn, Asp-Asp-Asn, Asp-Asn-Asp, Asp-Asp-Asp, Asn-Asn-Glu, Asn-Asn-Gln, Asn-Glu-Asn, Asn-Gln-Asn, Glu-Glu-Glu, Gln-Gln-Gln, Asn-Gln-Gln, Asn-Glu-Gln, Asp-Asn-Glu, Gln-Asn-Asn, Gln-Asn-Asn, Glu-Asp-Gln, Asp-Gln-Asp, Asn-Glu-Asp, Glu-Asn-Gln, Asp-Glu-Gln, Asn-Glu-Gln, Glu-Asp-Asn, 및 Gln-Asp-Asn, Thr-Thr-Thr, Ser-Ser-Ser, Asn-Thr-Thr, Asn-Ser-Ser, Asn-Ser-Thr, Asn-Thr-Ser, Asp-Asn-Ser, Ser-Asn-Asn, Thr-Asn-Asn, Ser-Asp-Thr로부터 선택되는 서열을 가질 수 있다.

[0449] 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열은 생리학적 pH에서 순 전하를 가진다. "생리학적 pH"라는 용어는 전형적으로 pH 값이 7.4인 혈액의 pH 값을 의미하는 것으로 당업자에게 공지되어 있다. 양친매성 선형 서열이 펩티드/펩토이드의 C 또는 N-말단에 배열되어 있는 실시양태에서, 각 말단은 상응하는 순 전하를 제공할 수 있다. 양친매성 선형 서열이 펩티드/펩토이드의 C 또는 N-말단에 배열되어 있지 않은 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 극성 모이어티는 생리학적 pH에서 하전되는 작용기를 가진 측쇄가 있는 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 각 작용기의 예시적인 예로는 아미노, 니트로, 구아니디노, 에스테릴, 술폰일 또는 카복실 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 순 전하는 양 또는 음 전하로서 그의 극성 모이어티에 포함된 아미노산의 개수와 같거나, 또는 그보다 작다. 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 순 전하는 -3, -2 또는 -1 중 하나이다. 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 순 전하는 +1, +2 또는 +3 중 하나이다.

[0450] 아미노산(상기)의 α 탄소 원자에 및/또는 그의 아미노 기에 커플링된, 극성 모이어티의 아미노산의 각각의 극성 측쇄는 전형적으로 1 내지 약 20개(1 내지 약 15개, 1 내지 약 10개 또는 1 내지 약 5개 포함)의 탄소 원자를 포함하는 주쇄에 의해 정의될 수 있다. 명확하게 하기 위해, "측쇄"라는 용어는 펩티드 및/또는 펩토이드의 골격에 대해 상대적인 것으로 사용되는 것으로 언급된다. 상기펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄는 분지형일 수 있고, 따라서, 주쇄 및 분지쇄에 의해 정의될 수 있다. 펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄의 주쇄 및 분지쇄, 둘 모두는 존재할 경우, 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합(상기)을 포함할 수 있다. 측쇄의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 프로페닐, 프로피닐, 부틸, 부테닐, *sec*-부틸, *tert*-부틸, 이소부틸, 펜틸, 네오펜틸, 이소펜틸, 펜테닐, 헥실, 3,3 디메틸-부틸, 헵틸, 옥틸, 노닐 또는 데실 기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 극성 작용기는 이러한 펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄에 결합한다.

[0451] 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 극성 모이어티는 2개의 동일한 아미노산을 포함한다. 이들 아미노산이 천연적으로 발생된 아미노산인 경우, 이는 예를 들어, 서열 Lys-Lys, Gln-Gln, Glu-Glu, Asp-Asp, Asn-Asn, Met-Met, Thr-Thr, Arg-Arg 또는 Ser-Ser 중 하나를 정의할 수 있다. 이와 관련하여 "천연적으로 발생된"이라는 용어는 유전자 코드가 임의의 유기체에 의해 직접적으로 20개의 아미노산으로 번역되었다는 것을 의미한다. 상기 2개의 동일한 극성 아미노산은 예를 들어, 비극성 모이어티에 인접해 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열은 지방족 아미노산의 소수성 테일 및 하전된, 아미노산 헤드기를 비롯한, 1종 이상의 극성 아미노산 헤드기를 가진다.

[0452] 비극성 모이어티는 작용기를 포함하지 않는 탄화수소를 가지는 아미노산, 일반적으로 2개 이상의 아미노산을 포함한다. 아미노산(상기)의 α 탄소 원자에 커플링된 각각의 측쇄는 0 내지 약 20개, 또는 1 내지 약 20개(0 내지 약 15개, 1 내지 약 15개, 0 내지 약 10개, 1 내지 약 10개, 1 내지 약 5개 또는 0 내지 약 5개 포함)의 탄소 원자를 포함하는 주쇄를 가질 수 있다. 따라서, 비극성 모이어티는 측쇄가 없는 아미노산, 즉, 글리신을 포함할 수 있다. 펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄는 분지형(상기)일 수 있고, 하나 이상의 이중 또는 삼중 결합(상기)을 포함할 수 있다. 펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄의 예로는 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 프로페닐, 프로피닐, 부틸, 부테닐, *sec*-부틸, *tert*-부틸, 이소부틸, 펜틸, 네오펜틸, 이소펜틸, 펜테닐, 헥실, 3,3 디메틸-부틸, 헵틸, 옥틸, 노닐 또는 데실 기를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 몇몇 예시적인 일례로서, 비극성 모이어티는 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 노르류신, 노르발린, 2-(메틸아미노)-이소부티르산, 2 아미노-5-헥신산의 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 아미노산은 임의의 원하는 입체배치로 존재할 수 있다. 펩티드/펩토이드의 C-말단 또는 N-말단은 또한 비극성 모이어티에 결합될 수 있다. 상기과 같은 경우에서, 전형적으로, C-말단 또는 N-말단은 보호기(상기)에 의해 차폐된다.

[0453] 일부 실시양태에서, 비극성 모이어티는 크기가 감소 또는 증가하는 순으로 배열된 아미노산의 서열을 포함한다. 그러므로, 비극성 모이어티의 아미노산의 일부는 크기가 감소 또는 증가하는 일반 서열로 배열된 아미노산의 서열을 포함한다. 따라서, N-말단에서부터 C-말단으로, 또는 C-말단에서 N-말단으로의 방향 기준으로 상기과 같은

일반 서열은 크기가 감소하는 순인 것으로 간주될 수 있다. 크기가 감소 또는 증가하는 "일반 서열"이라는 용어는 크기가 일반적으로 감소 또는 증가하는 한, 인접한 아미노산은 크기가 거의 동일한 것인 실시양태에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 크기가 감소하는 일반 서열 내에서 비극성 모이어티의 인접하는 아미노산의 크기는 크기가 감소하는 일반 서열의 방향으로 동일하거나 더 작아지게 된다. 일부 실시양태에서, 크기가 감소 또는 증가하는 일반 서열은 비반복적 서열이다.

[0454] 예시적인 예로서, 아미노산의 각 부분이 5개의 아미노산으로 이루어진 서열일 경우, 제1 아미노산은 3,4-디메틸-헥실 측쇄를 가질 수 있다. 제2 아미노산은 네오펜틸 측쇄를 가질 수 있다. 제3 아미노산은 펜틸 측쇄를 가질 수 있다. 제4 아미노산은 부틸 측쇄를 가질 수 있다. 제5 아미노산은 글리신일 수 있고, 즉, 측쇄를 가질 수 없다. 비록 네오펜틸 및 펜틸 측쇄의 크기가 동일할지라도, 이러한 비극성 펩티드 부분의 일반 서열은 크기가 감소한다. 비극성 모이어티 중의 크기가 감소하는 일반 서열의 추가의 예시적인 일례로서, 각각의 비극성 부분은 3개의 아미노산으로 이루어진 서열일 수 있다. 제1 아미노산은 n-노닐 측쇄를 가질 수 있다. 제2 아미노산은 3-에틸-2-메틸-펜틸 측쇄를 가질 수 있다. 제3 아미노산은 tert-부틸 측쇄를 가질 수 있다. 비극성 모이어티 중의 크기가 감소하는 일반 서열의 또 다른 추가의 예시적인 예로서, 비극성 모이어티는 9개의 아미노산으로 이루어진 서열일 수 있다. 제1 아미노산은 4-프로필-노닐 측쇄를 가질 수 있다. 제2 아미노산은 n-도데실 측쇄를 가질 수 있다. 제3 아미노산은 6,6-디에틸-3-옥테닐 측쇄를 가질 수 있다. n-도데실 측쇄 및 6,6-디에틸-3-옥테닐 측쇄, 둘 모두 12개의 탄소 원자를 가지고, 따라서, 이는 유사한 크기를 가진다. 그럼에도 불구하고, 6,6-디에틸-3-옥테닐 기는 불포화 탄소 대 탄소 결합을 포함하고, 이에 크기가 도데실 기 크기보다 약간 더 작다. 제4 아미노산은 2-메틸-노닐 측쇄를 가질 수 있다. 제5 아미노산은 3-프로필-헥실 측쇄를 가질 수 있다. 제6 아미노산은 n-헥실 측쇄를 가질 수 있다. 제7 아미노산은 2-부틸닐 측쇄. 제8 아미노산은 이소프로필 측쇄를 가질 수 있다. 제9 아미노산은 메틸 측쇄를 가질 수 있다.

[0455] 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열로 배열된 비극성 모이어티의 아미노산의 일부가 오직 (D 또는 L 형태인지 여부와 상관 없이) 천연적으로 발생된 아미노산만을 함유하는 경우, 이는 예컨대, 서열 류신-이소류신-발린-알라닌-글리신 또는 이소류신-류신-발린-알라닌-글리신과 같이, 예를 들어, 5개의 아미노산으로 이루어진 길이를 가질 수 있다. 오직 천연 아미노산으로만 이루어진, 크기가 감소하는 일반 서열은 또한 4개의 아미노산으로 이루어진 길이를 가질 수 있다. 예시적인 예로는 서열 이소류신-류신-발린-알라닌, 류신-이소류신-발린-알라닌, 이소류신-발린-알라닌-글리신, 류신-발린-알라닌-글리신, 류신-이소류신-알라닌-글리신, 류신-이소류신-발린-글리신, 이소류신-류신-알라닌-글리신 또는 이소류신-류신-발린-글리신을 포함한다. 오직 천연 아미노산으로만 이루어진, 크기가 감소하는 일반 서열은 또한 3개의 아미노산으로 이루어진 길이를 가질 수 있다. 예시적인 예로는 서열 이소류신-발린-알라닌, 류신-발린-알라닌, 이소류신-발린-글리신, 류신-발린-글리신, 류신-알라닌-글리신, 이소류신-알라닌-글리신 또는 이소류신-류신-알라닌을 포함한다. 오직 천연 아미노산으로만 이루어진, 크기가 감소하는 일반 서열은 또한 2개의 아미노산으로 이루어진 길이를 가질 수 있다. 예시적인 예로는 서열 이소류신-발린, 류신-발린, 이소류신-알라닌, 류신-알라닌, 류신-글리신, 이소류신-글리신, 발린-알라닌, 발린-글리신 또는 알라닌-글리신을 포함한다.

[0456] 일부 실시양태에서, 크기가 감소하는 상기 정의된 일반 서열의 크기가 감소하는 방향은 양친매성 선형 서열의 극성 모이어티 쪽으로 향하는 방향이다. 따라서, 상기 실시양태에서, 비극성 모이어티의 상기 부분 내의 인접한 아미노산의 크기는 이에 따라 극성 모이어티의 방향으로 동일하거나 작아진다. 따라서, 상기 실시양태에서의 일반적인 경향으로서 양친매성 선형 서열의 극성 모이어티에 가까울수록, 크기가 감소하는 각 일반 서열 전역에 걸쳐 펩티드 및/또는 펩토이드 측쇄의 전체 크기는 작아지게 된다. n-노닐, 3-에틸-2-메틸-펜틸 및 tert-부틸 측쇄를 포함하는 3개의 아미노산으로 이루어진 일반 서열에 관한 상기의 예시적인 예에서, 다음 아미노산은 극성 작용기가 있는 펩티드/펩토이드 측쇄를 포함한다는 점에서 극성일 수 있다. 예시적인 예에서, 펩티드/펩토이드 내의 tert-부틸 측쇄에 인접하게 3-카복시-n-부틸 측쇄가 존재할 수 있다.

[0457] 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드 또는 양친매성 선형 서열의 전체 비극성 모이어티는 각각 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열로 이루어진다. 상기 실시양태에서, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열의 길이는 n-m개의 아미노산으로 이루어진 길이일 수 있다(상기 참조). 일부 실시양태에서, 크기가 감소 또는 증가하는 일반 서열은 펩티드/펩토이드의 추가의 비극성 측쇄 측면에 위치한다. 한 실시양태에서, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열의 길이는 n-m-1개의 아미노산으로 이루어진 길이이다. 본 실시양태에서, 비극성 펩티드/펩토이드 측쇄를 제공하는, 하나의 추가의 아미노산은 펩티드/펩토이드 내에 포함되어 있다. 상기 아미노산은 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열과 극성 아미노산 사이에 위치할 수 있고, 극성 아미노산은 상기 추가의 비극성 아미노산과 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열 사이에 위치할 수 있거나, 크기가

감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 극성 아미노산과 상기 추가의 사이에 위치할 수 있다. 전형적으로, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 극성 아미노산과 상기 추가의 비극성 아미노산 사이에 위치한다. 추가의 비극성 아미노산은 예를 들어, 펩티드/펩토이드의 N-말단을 정의할 수 있으며, 이는 보호기, 예컨대, 아미드, 예컨대, 프로피온산 아실 또는 아세틸 기에 의해 차폐될 수 있다. 상기에서 정의된 바와 같은 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열과 함께, 펩티드/펩토이드의 비극성 부분을 정의할 수 있다. 극성 아미노산은 펩티드/펩토이드의 C-말단을 정의할 수 있다. 따라서, 상기 예에서, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 한쪽은 극성 아미노산 측면에 위치하고, 나머지 다른 한쪽은 추가의 비극성 아미노산 측면에 위치한다. 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열의 길이가 $n-m-1$ 개의 아미노산으로 이루어진 길이인 한 실시양태에서, $n-m$ 개의 아미노산으로 이루어진 비극성 모이어티의 잔여 비극성 아미노산은 알라닌 및 글리신 중 하나이다.

[0458] 상기 설명된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 양친매성 선형 서열의 극성 모이어티는 2개 또는 3개의 연속적인 아미노산에 의해 정의될 수 있다. 극성 모이어티는 m 개의 지방족 아미노산을 포함한다. 각각의 m 개의 지방족 아미노산은 독립적으로 선택되며 독립적으로 선택된 극성 기를 포함한다. m 이라는 기호는 1, 2 및 3으로부터 선택되는 정수를 나타낸다. 따라서, 적어도 본질적으로는 비극성 모이어티(상기)는 $n-m$ 개, 즉, $n-1$, $n-2$ 또는 $n-3$ 개의 아미노산을 가진다. 일부 실시양태에서, n 은 $m + 2$ 이상이다. 상기 실시양태에서, 따라서, m 은 $n-2$ 이하인 수치를 나타낼 수 있다.

[0459] 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드의 전체 비극성 모이어티가 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열(상기)로 이루어진 것인 실시양태에서, 따라서, 상기 비극성 모이어티의 길이는 $n-2$ 또는 $n-3$ 개의 아미노산으로 이루어진 길이일 수 있다. 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드가 크기가 감소 (또는 증가)하는 비극성 모이어티 이외에 추가의 비극성 측쇄를 가지는 것인 한 실시양태에서, 상기 추가의 비극성 측쇄는 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열의 아미노산에 직접 결합된 아미노산 포함될 수 있다. 따라서, 비극성 모이어티는 크기가 감소 (또는 증가)하는 비극성 모이어티 및 비극성 측쇄가 있는 각각의 추가의 아미노산에 의해 정의될 수 있다. $m = 1$ 인 상기의 한 실시양태에서, 따라서, 비극성 모이어티의 길이는 $n-2$ 개의 아미노산으로 이루어진 길이일 수 있고, 그 중 크기가 감소 (또는 증가)하는 비극성 모이어티의 길이는 $n-3$ 개의 아미노산으로 이루어진 길이이다. 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 2개의 극성 아미노산과 상기 추가의 비극성 아미노산 사이에 위치할 수 있거나, 또는 추가의 비극성 아미노산은 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열과 2개의 극성 아미노산 사이에 위치할 수 있다. 전형적으로, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 2개의 극성 아미노산과 상기 추가의 비극성 아미노산 사이에 위치한다. 상기 언급된 바와 같이, 2개의 극성 아미노산 중 하나는 펩티드/펩토이드의 C-말단을 정의할 수 있다. 따라서, 상기 예에서, 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열은 한쪽은 2개의 연속되는 극성 아미노산 측면에 위치하고, 나머지 다른 한쪽은 추가의 비극성 아미노산 측면에 위치할 수 있다. 또한, 일부 실시양태에서, $m = 1$ 일 경우, 2개의 연속되는 극성 아미노산은 또한 크기가 감소 (또는 증가)하는 일반 서열과 추가의 비극성 아미노산 사이에 위치할 수 있으며, 이 경우, 비극성 모이어티는 길이가 $n-3$ 개의 아미노산으로 이루어진 길이인 제1 부분 및 1개의 아미노산으로 이루어진 추가의 부분을 가진다.

[0460] 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드를 비롯한, 상기 정의된 바와 같은 양친매성 선형 서열 사이의 정전기적 힘, 수소 결합 및 반데르발스 힘은 상기 양친매성 선형 서열이 서로 커플링되게 한다. 이론으로 한정하지 않으면서, 이에, 하이드로겔이 형성될 수 있도록 허용하는 가교 효과가 발생된다. 이와 관련하여, 본 발명자들은 나선형 구조물에 기초한 섬유 형성을 관찰할 수 있었다.

[0461] 본원에 개시된 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드의 양친매성 선형 서열로 형성된 섬유는 전형적으로 큰 기계적 스티프니스를 보이는 바, 그에 기인하여 상기 섬유는 예를 들어, 손상된 조직의 대체와 같은 조직 재생 적용에 특히 유용한 것이 된다. 본원에 개시된 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드는 일반적으로 콜라겐 섬유와 유사한 섬유 구조물로 조립되는 것으로 관찰되었다. 동물 및 인체 내의 연조직의 성분인 콜라겐은 조직의 인장 강도의 대부분을 제공하는 섬유상 단백질이다. 본원에 개시된 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드의 섬유의 기계적 스티프니스는 전형적으로 콜라겐의 가수분해된 형태인 젤라틴의 콜라겐의 것보다 훨씬 더 높은 것으로 나타났다(도면 참조). 따라서, 본원에 개시된 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드는 손상되거나, 또는 이화된 조직의 영구적 또는 일시적 인공 장기 대체로서 사용되는 하이드로겔에 포함될 수 있다.

[0462] 전체 양친매성 펩티드/펩토이드(상기)를 나타낼 수 있는 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열은 심지어 승온에서도 생리학적 조건에서 현저한 안정성을 보인 것으로 나타났다. 일부 실시양태에서, 1일 내지 1개월 이상인 범위의 기간 동안 주위 온도 하에 생리학적 조건에서 수용액 중에서 안정하다. 일부 실시양태에서, 90℃하에 생리학적 조건에서 수용액 중에서 1시간 이상, 2시간 이상, 3시간 이상, 4시간 이상, 또는 5시간 이상 동안 안정할 수 있다. 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드를 비롯한, 양친매성 펩티드 및/또는 펩토이드의 양친매성

선형 서열은 생리학적 조건하에 수용액 중에서 α 나선형 섬유를 자기 조립할 수 있다. L 또는 D 형태의 펩티드/펩토이드(전형적으로 3-7-mers)는 생물학적 물질, 예컨대, 콜라겐을 모방하는 망 유사 구조물로 조직화되는 초분자 나선형 섬유로 자기 조립될 수 있다. X선 결정학에서 반복되는 알라닌을 함유하는 서열 및 아세틸화된 C-말단을 가지는 3 내지 6개의 아미노산의 길이의 펩티드가 나선형 입체구조를 취한다는 점이 앞서 관찰되었다(문헌 [Hatakeyama, Y, et al, Angew. Chem. Int. Ed. (2009) 8695-8698]). 양친매성 서열인 Ac-LD₆ (L)이 있는 펩티드를 이용하였을 때, 예를 들어, 이미 0.1 mg/ml에서 응집체의 형성이 관찰되었다. 펩티드의 농도가 1 mg/ml로 증가함에 따라, 펩티드 단량체는 섬유상의 구조물을 형성하도록 정렬되는 것으로 나타났다. 2 mM 미만의 농도에서 생리학적 조건하에 섬유가 형성되는 경우, 펩티드/펩토이드는 생리학적 조건하에서 하이드로겔을 형성할 수 있는 주사 가능한 하이드로겔 물질로서 매우 적합하다. 조직 공학을 위한 상기 정의된 바와 같은 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드 뿐만 아니라, 각각의 양친매성 선형 펩티드 및/또는 펩토이드를 주사하는 것을 비롯한, 그를 적용하는 것을 포함하는 조직 공학 방법 또한 본원에서 개시한다.

[0463] 하이드로겔은 전형적으로 현저한 강성을 특징으로 하고, 일반적으로 생체적합성이며, 비독성이다. 이들 하이드로겔은 선택된 펩티드/펩토이드 서열에 따라 열 반응성 또는 요변성 특징을 나타낼 수 있다. 펩티드/펩토이드 조립 조건에 의존하여, 섬유는 두께 및 길이를 달리한다. 일반적으로, 다양한 1차 인간 세포의 배양에 매우 적합화된 강성 하이드로겔이 수득되며, 이는 다양한 조직의 수복 및 대체에 유용할 수 있는 펩티드/펩토이드 스케폴드를 제공한다. 상기 하이드로겔을 제조하는 방법 또한 개시한다. 적용, 예컨대, 세포 배양, 조직 공학, 성형 수술, 약물 전달, 경구 적용, 화장품, 포장 등에서의, 그 뿐만 아니라, 예를 들어, 태양 전지 또는 연료 전지를 포함할 수 있는 전자 디바이스에서의 사용을 위한 것과 같은 기술적 적용에서의 상기 하이드로겔의 예시적인 용도를 기술한다.

[0464] 펩티드/펩토이드의 양친매성 선형 서열과 같이, 하이드로겔은 생리학적 조건에서, 심지어, 승온에서도 높은 안정성을 보인다. 일부 실시양태에서, 상기 하이드로겔은 적어도 7일, 적어도 14일, 적어도 1개월 이상, 예컨대, 적어도 1 내지 약 6개월의 기간 동안 주위 온도에서 수용액 중에서 안정하다.

[0465] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 하이드로겔은 예컨대, 형광 염료를 비롯한 마커와 같이 특징적인 스펙트럼 또는 형광특성 특징을 가진, 양자점을 비롯한 입자 또는 분자에 커플링된다. 예를 들어, 각 분자를 통해 하이드로겔의 운명, 위치 및/또는 완전성을 모니터링할 수 있다.

[0466] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 하이드로겔은 선택된 표적 분자, 예컨대, 미생물, 바이러스 입자, 펩티드, 펩토이드, 단백질, 핵산, 펩티드, 올리고당, 다당류, 무기 분자, 합성 중합체, 소형 유기 분자 또는 약물에 대한 결합 친화도를 가진 분자에 커플링된다.

[0467] 본원에서 사용되는 바, "핵산 분자"라는 용어는 임의의 가능한 입체배치(configuration), 예컨대, 단일 가닥, 이중 가닥 또는 이들의 조합의 임의의 핵산을 의미한다. 핵산은 예를 들어, DNA 분자(예컨대, cDNA 또는 게놈 DNA), RNA 분자(예컨대, mRNA), 뉴클레오타이드 유사체 또는 핵산 화학법을 이용하여 생성된 DNA 또는 RNA의 유사체, 잠금 핵산 분자(LNA: locked nucleic acid), 및 단백질 핵산 분자(PNA: protein nucleic acid)를 포함한다. DNA 또는 RNA는 게놈 또는 합성 기원일 수 있고, 단일 또는 이중 가닥일 수 있다. 본 발명의 실시양태의 본 발명에서, 반드시 그러한 것은 아니지만, 전형적으로는 RNA 또는 DNA 분자가 사용될 것이다. 상기 핵산은 예컨대, mRNA, cRNA, 합성 RNA, 게놈 DNA, cDNA 합성 DNA, DNA 및 RNA의 공중합체, 올리고뉴클레오타이드 등일 수 있다. 각 핵산은 추가로 비천연 뉴클레오타이드 유사체를 함유할 수 있고/거나, 친화성 태그 또는 표지에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 단리, 강화, 또는 정제될 수 있다. 핵산 분자는 예를 들어, cDNA 클로닝에 의해 또는 감수 하이브리드화에 의해 천연 공급원으로부터 단리될 수 있다. 천연 공급원은 포유동물, 예컨대, 인간, 혈액, 정액, 또는 조직일 수 있다. 핵산은 또한, 예컨대, 트리에스테르 방법에 의해, 또는 자동 DNA 합성 장치에 의해 합성될 수 있다.

[0468] 다수의 뉴클레오타이드 유사체가 공지되어 있으며, 이는 본 발명의 예시적인 실시양태의 방법에서 사용되는 핵산 및 올리고뉴클레오타이드에서 사용될 수 있다. 뉴클레오타이드 유사체는 예를 들어, 염기, 당, 또는 포스페이트 모이어티에 변형을 함유하는 뉴클레오타이드이다. 염기 모이어티에서의 변형은 A, C, G, 및 T/U, 상이한 퓨린 또는 피리미딘 염기, 예컨대, 우라실-5-일, 히포크산틴-9-일, 및 2 아미노아데닌-9-일 뿐만 아니라, 비퓨린 또는 비피리미딘 뉴클레오타이드 염기의 천연 및 합성 변형을 포함한다. 다른 뉴클레오타이드 유사체는 범용 염기로서의 역할을 한다. 범용 염기는 3-니트로피롤 및 5-니트로인돌을 포함한다. 범용 염기는 임의의 다른 염기와 염기쌍을 형성할 수 있다. 염기 변형은 대개 예를 들어, 당 변형, 예컨대, 2'-O-메톡시에틸과 조합됨으로써 예컨대, 독특한 특성, 예컨대, 이중 안정성을 달성할 수 있다.

- [0469] 펩티드는 합성 기원이거나, 당업계에 널리 공지된 방법에 의해 천연 공급원으로부터 분리될 수 있다. 천연 공급원은 포유동물, 예컨대, 인간, 혈액, 정액, 또는 조직일 수 있다. 폴리펩티드를 비롯한 펩티드는 예를 들어, 자동 폴리펩티드 합성 장치를 사용하여 합성될 수 있다. 폴리펩티드의 예시적인 예는 항체, 그의 단편, 및 항체 유사 작용을 가진 단백질성 결합 분자이다. (재조합) 항체 단편의 예로는 Fab 단편, Fv 단편, 단일 체 Fv 단편 (scFv: single-chain Fv), 디아바디, 트리아바디(문헌 [Iliades, P., et al., FEBS Lett (1997) 409, 437-441]), 데카바디(문헌 [Stone, E., et al., Journal of Immunological Methods (2007) 318, 88-94]) 및 다른 도메인 항체(문헌 [Holt, L.J., et al., Trends Biotechnol. (2003), 21, 11, 484-490])가 있다. 항체 유사 작용을 가진 단백질성 결합 분자의 예로는 리포칼린 계열의 폴리펩티드에 기초한 뮤테인이 있다(WO 03/029462, [Beste et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1999) 96, 1898-1903]). 리포칼린, 예컨대, 빌린 결합 단백질, 인간 호중구 젤라티나제 결합 리포칼린, 인간 아포리포단백질 D 또는 글리코텔린은 합텐으로 공지된 선택된 소형 단백질 영역에 결합하도록 변형될 수 있는 천연 리간드 결합 부위를 보유한다. 다른 단백질성 결합 분자의 예로는 소위 글루타디로 불리는 것(예컨대, 국제 특허 출원 WO 96/23879 참조), 안키린 스캐폴드(문헌 [Mosavi, L.K., et al., Protein Science (2004) 13, 6, 1435-1448]), 또는 결정질 스캐폴드(예컨대, 국제 특허 출원 WO 01/04144)에 기반한 단백질, 문헌 [Skerra, J. Mol. Recognit. (2000) 13, 167-187]에 기술된 단백질, 아드넥틴(AdNectin), 테트라넥틴 및 아비머가 있다. 아비머는 수개의 세포 표면 수용체 중의 다중 도메인 스트링으로서 존재하는, 소위 A 도메인으로 불리는 것을 함유한다(문헌 [Silverman, J., et al., Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-1561]). 인간 피브로넥틴의 도메인으로부터 유래된 아드넥틴은 표적에의 면역글로불린 유사 결합을 위해 조작될 수 있는 3개의 루프를 포함한다(문헌 [Gill, D.S. & Damle, N.K., Current Opinion in Biotechnology (2006) 17, 653-658]). 각각의 인간 동종삼량체 단백질로부터 유래된 테트라넥틴은 유사하게 원하는 결합을 위해 조작될 수 있는, C형 렉틴 도메인 중에 루프 영역을 포함한다(상기 문헌 동일). 원하는 경우, 임의의 또는 특정 형태, 부류 등의 표적 물질에 대한 각 모이어티의 친화도를 추가로 증가시키는 개질제가 사용될 수 있다.
- [0470] 항체 유사 작용을 가진 핵산 분자의 예로는 압타머가 있다. 압타머는 정의된 3차원 모티프로 폴딩되고, 주어진 표적 구조에 대하여 높은 친화도를 보인다. 따라서, 당업계의 표준 기법, 예컨대, 고상 합성법을 사용함으로써, 특정 표적에 대해 친화도를 가지는 압타머를 형성할 수 있고, 본 발명의 실시양태의 중공 입자 상에 고정화시킬 수 있다.
- [0471] 추가의 예시적인 예로서, 연결 모이어티, 예컨대, 친화성 태그는 각 분자를 고정화시키는 데 사용될 수 있다. 상기 연결 모이어티는 질소, 인, 황, 탄소(carben), 할로젠 또는 슈도할로젠 기, 또는 그의 일부를 포함하는 탄화수소 기반(중합체 포함) 분자와 같은 분자일 수 있다. 예시적인 예로서, 하이드로겔에 포함된 펩티드/펩토이드는 예를 들어, 펩티드/펩토이드의 측쇄 상에 생체분자, 예를 들어, 분자, 예컨대, 단백질, 핵산 분자, 다당류 또는 그의 임의 조합의 공유 부착을 허용하는 작용기를 포함할 수 있다. 각 작용기는 차폐된 형태로 제공될 수 있고, 원하는 조건하에서 유리될 수 있는 보호기에 의해 보호될 수 있다. 각 작용기의 예로는 아미노 기, 알데히드 기, 티올 기, 카복시 기, 에스테르, 무수물, 술포네이트, 술포네이트 에스테르, 이미도 에스테르, 실릴 할라이드, 에폭시드, 아지리딘, 포스포라미다이트 및 디아조알칸을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0472] 친화성 태그의 예로는 바이오틴, 디니트로페놀 또는 디곡시게닌, 올리고히스티딘, 폴리히스티딘, 면역글로불린 도메인, 말토스 결합 단백질, 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 칼모듈린 결합 펩티드(CBP: calmodulin binding peptide), FLAG'-펩티드, T7 에피토프(Ala-Ser-Met-Thr-Gly-Gly-Gln-Gln-Met-Gly), 말토스 결합 단백질(MBP: maltose binding protein), 단순 헤르페스 바이러스 당단백질 D의 서열 Gln-Pro-Glu-Leu-Ala-Pro-Glu-Asp-Pro-Glu-Asp의 HSV 에피토프, 서열 Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala의 헤마글루티닌(HA) 에피토프, 서열 Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu의 전사 인자 c-myc의 "myc" 에피토프, 또는 올리고뉴클레오타이드 태그를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 올리고뉴클레오타이드 태그는 예를 들어, 상보성 서열을 가진 고정화된 올리고뉴클레오타이드에 하이브리드화하는 데 사용될 수 있다. 연결 모이어티의 추가 예로는 항체, 그의 단편, 또는 항체 유사 기능을 가진 단백질성 결합 분자가 있다(또한 상기 참조).
- [0473] 연결 모이어티의 추가 예로는 쿠키비투릴, 또는 쿠키비투릴과 복합체를 형성할 수 있는 모이어티가 있다. 쿠키비투릴은 전형적으로 글리코루틸 및 포름알데히드의 산 촉매성 축합 반응으로부터 자기 조립된, 글리코루틸 단위를 포함하는 거대고리 화합물이다. n개의 글리코루틸 단위를 포함하는 쿠키비트[n]우릴(CB[n])은 전형적으로 극성 우레이도 카보닐 기를 포함하는 2개의 포탈을 가진다. 상기 우레이도 카보닐 기를 통해 쿠키비투릴은 관심의 대상이 되는 이온 및 분자에 결합할 수 있다. 예시적인 예로서, 쿠키비트[7]우릴 (CB[7])은 페로센메틸암모늄 또는 아다만틸암모늄 이온과 강한 복합체를 형성할 수 있다. 쿠키비트[7]우릴 또는 예컨대, 페로센메틸암모

높은 생체분자에 부착될 수 있는 반면, 나머지 결합 파트너(예컨대, 각각 페로센메틸암모늄 또는 쿠키비트[7]우릴)는 선택된 표면 상에 결합될 수 있다. 이어서, 생체분자를 표면과 접촉시키면, 생체분자는 고정화될 수 있다. 알칸티올레이트를 통해 금 표면에 결합된 작용화된 CB[7] 단위는 예를 들어, 페로센메틸암모늄 단위를 보유하는 단백질을 고정화시키는 것으로 밝혀졌다(문헌 [Hwang, I., et al., J. Am. Chem. Soc. (2007) 129, 4170-4171]).

[0474] 연결 모이어티의 추가 예로는 올리고당, 올리고펩티드, 바이오틴, 디니트로페놀, 디콕시게닌 및 금속 킬레이터 (또한 하기 참조)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예시적인 예로서, 각 금속 킬레이터, 예컨대, 에틸렌디아민, 에틸렌-디아민-테트라아세트산(EDTA), 에틸렌 글리콜 테트라아세트산(EGTA), 디에틸렌트리아민펜타아세트산(DTPA), N,Nbis(카복시메틸)글리신(이는 또한 니트릴로트리아세트산, NTA로도 불림), 1,2-비스(o-아미노페녹시)에탄-N,N,N',N'-테트라아세트산(BAPTA), 2,3-디메르캅토-1-프로판올(디메르카프롤), 포르핀 또는 헴은 표적 분자가 금속 이온인 경우에 사용될 수 있다. 예로서, EDTA는 대부분의 1가, 2가, 3가, 및 4가 금속 이온, 예컨대, 은(Ag^+), 칼슘(Ca^{2+}), 망간(Mn^{2+}), 구리(Cu^{2+}), 철(Fe^{2+}), 코발트(Co^{3+}) 및 지르코늄(Zr^{4+})과 복합체를 형성하는 반면, BAPTA는 Ca^{2+} 에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 각 금속 이온 또는 금속 이온들과의 복합체 중의 각 금속 킬레이터가 연결 모이어티를 정의한다. 상기 복합체는 예를 들어, 정의된 서열로 이루어진 펩티드에 대한 수용체 분자이며, 이는 또한 단백질에 포함될 수도 있다. 예시적인 예로서, 당업계에서 사용되는 표준 방법은 올리고히스티딘 태그와, 구리(Cu^{2+}), 니켈(Ni^{2+}), 코발트(Co^{2+}), 또는 아연(Zn^{2+}) 이온 사이의 복합체 형성이며, 이는 킬레이터 니트릴로트리아세트산(NTA)에 의해 제시된다.

[0475] 아비딘 또는 스트렙타아비딘은 예를 들어, 비오티닐화된 핵산을 고정화시키는 데 사용될 수 있거나, 또는 금의 바이오틴 함유 단일층이 사용될 수 있다(문헌 [Shumaker-Parry, J.S., et al., Anal. Chem. (2004) 76, 918]). 추가의 또 다른 예시적인 예로서, 생체분자는 예를 들어, 피롤-올리고뉴클레오타이드 패튼을 통해 예컨대, 주사형 전기화학적 현미경 검사법에 의해 국소적으로 증착될 수 있다(예컨대, 문헌 [Fortin, E., et al., Electroanalysis (2005) 17, 495]). 다른 실시양태에서, 특히 생체분자가 핵산일 경우, 생체분자는 예를 들어, 광활성화 및 탈활성화를 사용하여 고정화 단위의 표면 상에서 직접 합성될 수 있다. 예시적인 예로서, 선택된 표면 부위 상에서 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드 합성법(소위 "고상" 합성법으로 불리는 것)은 전극을 사용하는 전기화학적 반응을 이용함으로써 수행될 수 있다. (Egeland & Southern)(문헌 [Nucleic Acids Research (2005) 33, 14, e125])에 의해 기술된 바와 같은 전기화학적 탈차단 단계가 예를 들어, 상기 목적을 위해 사용될 수 있다. 적합한 전기화학적 합성법은 또한 미국 특허 출원 US 2006/0275927에 개시되어 있다. 일부 실시양태에서, UV 결합 또는 광 의존식 5'-탈보호화를 포함하는, 생체분자, 특히 핵산 분자의 광 유도 합성법이 수행될 수 있다.

[0476] 선택된 표적 분자에 대하여 결합 친화성을 가지는 분자는 임의 수단에 의해 나노결정 상에 고정화될 수 있다. 예시적인 예로서, 각 모이어티를 포함하는 올리고 또는 폴리펩티드는 예를 들어, ω 작용화된 티올을 사용함으로써 티오-에테르 결합을 통해 나노결정의 표면 상에 공유적으로 연결될 수 있다. 본 발명의 실시양태의 나노결정을 선택된 결합 친화성을 가지는 분자에 연결시킬 수 있는 임의의 적합한 분자는 그를 나노결정 상에 고정화시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, (이작용성) 결합체, 예컨대, 에틸-3-디메틸아미노카보디이미드, N-(3-아미노프로필) 3-메르캅토-벤즈아미드, 3-아미노프로필-트리메톡시실란, 3-메르캅토프로필-트리메톡시실란, 3-(트리메톡시실릴) 프로필-말레이미드, 또는 3-(트리메톡시실릴) 프로필-하이드라지드가 사용될 수 있다. 결합체와의 반응 전에 나노결정의 표면은, 추후에 결합체를 통하여 분석물 결합 파트너와의 공유적인 커플링을 위해 사용될 수 있는 유리 메르캅토아세트산 기를 생성하기 위해 예를 들어, 메르캅토 빙초산 처리에 변형될 수 있다.

[0477] 본 발명의 실시양태는 또한 수 팽윤성 수 불용성 중합체 물질로 간주될 수 있는 하이드로겔을 포함한다. 하이드로겔은 상기 정의된 바와 같은 펩티드 및/또는 펩토이드를 포함한다(그를 함유 및 그로 이루어지는 것을 포함). 하이드로겔은 3차원 구조를 유지하는 바, 본 발명의 실시양태의 하이드로겔은 다양한 적용을 위해 사용될 수 있다. 하이드로겔은 수분 함량이 높고, 아미노산을 포함하기 때문에, 전형적으로 탁월한 생체접합성을 띤다.

[0478] 본 발명의 실시양태에 따른 하이드로겔은 자기 조립에 의해 형성된다. 본 발명자들은 펩티드/펩토이드가, 망 유사 구조물을 형성하는 섬유로 조립된다는 것을 관찰하였다. 이론으로 제한하지 않으면서, 펩티드/펩토이드의 비극성 부위 사이의 소수성 상호작용이 상기 자기 조립 과정에 도움을 준다고 고려된다.

[0479] 하이드로겔을 형성하는 방법은 펩티드/펩토이드를 수용액 중에 용해시키는 단계를 포함한다. 펩티드/펩토이드의 용해를 촉진시키는 데에는 교반, 예를 들어, 혼합, 예컨대, 교반 및/또는 초음파 처리가 사용될 수 있다. 일부

실시양태에서, 그 안에 펩티드/펩티드를 포함하는 수용액은 주위 온도 미만의 온도, 예컨대, 약 2℃ 내지 약 15℃에서 선택되는 온도에 노출된다. 일부 실시양태에서, 그 안에 펩티드/펩티드를 포함하는 수용액은 승온, 즉, 주위 온도 초과 온도에 노출된다. 전형적으로, 수용액은 그가 노출되는 온도를 달성할 수 있도록 허용된다. 수용액은 예를 들어, 약 25℃ 내지 약 85℃ 이상이 온도, 예컨대, 약 25℃ 내지 약 75℃, 약 25℃ 내지 약 70℃, 약 30℃ 내지 약 70℃, 약 35℃ 내지 약 70℃, 약 25℃ 내지 약 60℃, 약 30℃ 내지 약 60℃, 약 25℃ 내지 약 50℃, 약 30℃ 내지 약 50℃, 또는 약 40℃ 내지 약 65℃, 예컨대, 약 40℃, 약 45℃, 약 50℃, 약 55℃, 약 60℃ 또는 약 65℃인 온도에 노출될 수 있다. 그 안에 펩티드/펩티드를 포함하는 수용액은 약 5분 내지 약 10시간 이상, 예컨대, 약 10분 내지 약 6시간, 약 10분 내지 약 4시간, 약 10분 내지 약 2.5시간, 약 5분 내지 약 2.5시간, 약 10분 내지 약 1.5시간 또는 약 10분 내지 약 1시간, 예컨대, 약 15분, 약 20분, 약 25분, 약 30분, 약 35분 또는 약 40분의 기간 동안 상기 온도에서 유지될 수 있다.

[0480] 일부 실시양태에서, 약학적으로 허용되는 하이드로겔을 비롯한, 본원에 개시된 하이드로겔은 생체적합성이다. 본원에서 사용되는 바, "생체적합성"이라는 용어(이는 또한 "조직 적합성"으로도 언급될 수 있다)는 하이드로겔이 생체내에서 사용되었을 때, 임의의 유해한 생물학적 반응을 거의 일으키지 않는다는 것이다. 따라서, 상기 용어는 일반적으로 하이드로겔은 인간을 비롯한, 동물 신체를 비롯한 세포에서 측정가능할 정도로 유해한 생물학적 반응을 촉진시킬 수 있는 능력이 없다는 것을 의미한다. 생체적합성 하이드로겔은 하기 특성들: 비독성, 비돌연변이 유발성, 비알레르기성, 비암유발성, 및/또는 비자극성인 특성들 중 하나 이상의 것을 가질 수 있다. 생체적합성 하이드로겔은 적어도 무해성이고, 각 세포 및 신체는 그에 대해 내성을 가질 수 있다. 생체적합성 하이드로겔은 그 단독으로도 또한 신체내에서 하나 이상의 작용을 개선시킬 수 있다.

[0481] 하이드로겔에 포함된 펩티드/펩티드에 포함된 아미노산에 의존하여, 각 하이드로겔은 생체분해성일 수 있다. 생체분해성 하이드로겔은 시간이 경과함에 따라, 예컨대, 수개월 또는 수년 이내에 점진적으로 분해되거나, 또는 생체내에서 흡수된다. 분해는 예를 들어, 가수분해를 통해 발생할 수 있고, 이는 효소에 의해 촉매화될 수 있으며, 조직, 혈관, 또는 그의 세포를 비롯한, 인간 또는 동물 신체에서 하이드로겔이 노출된 조건에 의해 도움을 받을 수 있다. 펩티드가 전적으로 천연 아미노산으로 구성된 경우, 각 펩티드는 일반적으로 인간/동물 신체의 효소에 의해 분해될 수 있다.

[0482] 본 발명의 실시양태에 따른 하이드로겔은 또한 예컨대, 약물과 같은, 약학적으로 활성인 화합물에 대한 데포로서의 역할을 할 수 있다. 본 발명의 실시양태에 따른 하이드로겔은 유기체, 예컨대, 인간 또는 동물 신체의 천연 세포의 기질을 모방하도록 디자인될 수 있다. 각 하이드로겔을 비롯한, 본 발명의 실시양태의 펩티드/펩티드로부터 형성된 섬유는 생물학적 스캐폴드로서의 역할을 할 수 있다. 본 발명의 실시양태의 하이드로겔은 임플란트 중에, 콘택트 렌즈 중에 포함될 수 있거나, 또는 조직 공학에서 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 펩티드는 전형적으로 3-7개의 아미노산으로 이루어지며, 물 또는 수용액 중에 용해되었을 때, 하이드로겔로서 관찰되는 복합 섬유 스캐폴드로 자기 조립될 수 있다. 상기 하이드로겔은 최대 99.9%까지 수분을 보유할 수 있으며, 충분히 큰 기계적 스티프니스를 보유한다. 따라서, 상기 하이드로겔은 면역원성의 위험 없이 다양한 천연 조직에 대한 인공 치환물로서 작용할 수 있다. 본 발명에 따른 하이드로겔은 적합한 1차 세포를 배양하는 데 사용될 수 있고, 따라서, 새로 형성된 세포 기질을 생체내에서 이식 또는 재이식시키기 위한 주사 가능한 세포 기질 화합물을 확립할 수 있다. 그러므로, 본 발명에 따른 하이드로겔은 특히 조직 재생 또는 조직 공학 적용을 위해 유용하다. 본원에서 사용되는 바, "임플란트" 또는 "이식"이라고 언급하는 것은 하이드로겔 함유 장치를 인간 또는 동물, 예컨대, 포유동물의 신체 또는 사지 내로 외과적으로 또는 관절경 방식으로 이식하는/이식하기 위한 용도 및 적용을 의미한다. 본원에서 관절경 기법은 외과적 기법의 서브세트로서 간주되며, 수술, 외과적 등으로 언급되는 임의의 것은 관절경 기법, 방법 및 장치를 포함한다. 본 발명의 실시양태에 따른 하이드로겔을 포함하는 외과용 임플란트는 펩티드 및/또는 펩티드 스캐폴드를 포함할 수 있다. 상기 펩티드 및/또는 펩티드 스캐폴드는 각 하이드로겔에 의해 정의될 수 있다. 본 발명의 실시양태의 하이드로겔은 또한 치유를 촉진시키기 위해 상처를 습윤 상태로 유지시키는 역할을 하는, 상처 커버제, 예컨대, 거즈 또는 시트에 포함될 수 있다.

[0483] 펩티드/펩티드에서 사용되는 아미노산 서열에 의존하여, 하이드로겔은 감온성일 수 있다. 예를 들어, 더 낮은 임계 용해 온도 또는 상기의 더 낮은 임계 용해 온도에 상응하는 온도 범위를 가지고, 그를 초과할 경우, 물 분자가 겔로부터 유리됨에 따라 물 분자에 의한 수소 결합이 유리되는 바, 이에 겔은 붕괴된다.

[0484] 개시된 주제는 또한 매우 바람직한 물질 특성을 가진 펩티드/펩티드 하이드로겔로 조립되는 개선된 키랄 양친매성 천연 기반 펩티드 및/또는 펩티드를 제공한다. 이러한 펩티드/펩티드 하이드로겔의 장점은 각종의 상이한 1차 인간 세포에 의해 수용되며, 이로써, 각종 조직의 수복 및 대체에서 유용할 수 있는 펩티드 스캐폴드를 제공한다는 점이다. 펩티드 단량체의 키랄성에 의존하여, 하이드로겔의 특징은 비록 여전히 생체적합성임에

도 안정성은 더 크고, 분해되는 경향이 더 작아지도록 디자인될 수 있다.

- [0485] 본원에 기술된 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드는 인간 환자 그 자체를 비롯한 유기체에게 투여될 수 있거나, 또는 약학적으로 활성인 성분 또는 적합한 담체 또는 부형제(들)를 포함하거나, 또는 그와 혼합될 수 있는 약학 조성물로 투여될 수 있다. 각 하이드로겔 또는 펩티드/펩토이드의 제제화 및 투여 기법은 당업계에 널리 확립되어 있는 저분자량 화합물의 것과 유사하거나, 또는 그와 동일하다. 예시적인 경로로는 경구, 경피, 및 비경구적 전달을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 하이드로겔 또는 펩티드/펩토이드는 캡슐 또는 관을 충전시키는 데 사용될 수 있거나, 펠렛과 같은 압착된 형태로 제공될 수 있다. 펩티드/펩토이드 또는 하이드로겔은 또한 예를 들어, 각 펩티드/펩토이드의 현탁제와 같은, 주사 가능한 또는 분무가능한 형태로 사용될 수 있다.
- [0486] 본 발명의 실시양태의 하이드로겔은 예를 들어, 피부 상에, 또는 상처 상에 도포될 수 있다. 추가의 적합한 투여 경로로는 예를 들어, 데포, 경구, 직장, 경점막, 또는 장내 투여; 비경구적 전달(근육내, 피하, 정맥내, 골수내 주사 뿐만 아니라, 경막내, 직접 심실내, 복강내, 비내, 또는 안구내 주사 포함)을 포함할 수 있다. 이와 관련하여 마이크로입자 투여를 위해 외과적 처리를 필요로 하지 않다는 점에 주목한다. 마이크로입자가 생체분해성 중합체를 포함할 경우, 항암제 방출 후, 장치를 제거할 필요가 없다. 그럼에도 불구하고, 마이크로입자는 스캐폴드, 코팅, 패치, 복합 물질, 겔 또는 플라스틱 중, 또는 그 위에 포함될 수 있다.
- [0487] 일부 실시양태에서, 전신 방식보다는 국소 방식으로 예를 들어, 주사를 통해 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드를 투여할 수 있다.
- [0488] 본 발명의 실시양태의 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드를 포함하는 약학 조성물은 그 자체가 공지되어 있는 방식으로, 예컨대, 종래의 혼합, 용해, 과립화, 당의정 제조, 연화, 유화, 캡슐화, 포집 또는 동결건조 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0489] 따라서, 본 발명의 실시양태에 따른 용도를 위한 약학 조성물은 종래 방식으로, 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드의 공정을 용이하게 하는 부형제 및 보조제를 비롯한 하나 이상의 생리학상 허용되는 담체를 사용하여 약학적으로 사용될 수 있는 제제로 제제화될 수 있다. 적절한 제제는 선택된 투여 경로에 의존한다.
- [0490] 주사용으로, 본 발명의 실시양태의 펩티드/펩토이드는 수용액 중, 예를 들어, 생리학상 화학성인 완충제, 예컨대, 행크 용액(Hanks's solution), 링커액(Ringer's solution) 또는 생리학적 식염수 완충제 중에서 제제화될 수 있다. 경점막 투여용인 경우, 침투되는 장벽에 적절한 침투제가 제제에 사용된다. 상기 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있다.
- [0491] 경구 투여용인 경우, 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드는 그를, 당업계에 널리 공지된 약학적으로 허용되는 담체와 조합함으로써 쉽게 제제화될 수 있다. 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드 뿐만 아니라, 약학적으로 활성인 화합물은 상기 담체를 통해 치료하고자 하는 환자가 경구적으로 섭취할 수 있는 정제, 환제, 당의정, 캡슐제, 액제, 겔, 시럽제, 슬러리, 현탁제 등으로 제제화될 수 있다. 경구용 제약 제제는 고체 부형제를 첨가하고, 임의적으로, 생성된 혼합물을 분쇄하고, 원하는 경우, 적합한 보조제를 첨가한 후, 과립의 혼합물을 프로세싱하여 정제 또는 당의정 코어를 수득함으로써 얻을 수 있다. 적합한 부형제는 특히, 충전제, 예컨대, 당(락토스, 수크로스, 만니톨, 또는 소르비톨 포함); 셀룰로스 제제, 예컨대, 예를 들어, 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분, 젤라틴, 트라가칸트 검, 메틸 셀룰로스, 하이드록시프로필메틸-셀룰로스, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 및/또는 폴리비닐피롤리돈(PVP)이다. 원하는 경우, 예컨대, 가교된 폴리비닐피롤리돈, 아가, 또는 알긴산 또는 그의 염, 예컨대, 알긴산 나트륨과 함께 붕해제가 첨가될 수 있다.
- [0492] 당의정 코어에 적합한 코팅제가 제공된다. 이러한 목적을 위해, 임의적으로, 아라비아 검, 탈크, 폴리비닐피롤리돈, 카르보폴 겔, 폴리에틸렌 글리콜, 및/또는 이산화티타늄, 래커 용액, 및 적합한 유기 용매 또는 용매 혼합물을 함유할 수 있는 진한 당 용액이 사용될 수 있다. 활성 화합물 용량의 상이한 조합을 확인하기 위해, 또는 그의 특징을 규명하기 위해 정제 또는 당의정 코팅제에 염료 또는 안료가 첨가될 수 있다.
- [0493] 경구적으로 사용될 수 있는 제약 제제는 젤라틴으로 제조된 압입형 캡슐제 뿐만 아니라, 가소화제, 예컨대, 글리세롤 또는 소르비톨, 및 젤라틴으로 제조된 연질, 밀봉된 캡슐제를 포함한다. 압입형 캡슐제는 충전제, 예컨대, 락토스, 결합제 예컨대, 전분, 및/또는 윤활제, 예컨대, 탈크 또는 스테아린산 마그네슘, 및 임의적으로, 안정제와 함께 혼합된 활성 성분을 함유할 수 있다. 연질 캡슐제에서, 펩티드/펩토이드는 적합한 액체, 예컨대, 지방 오일, 액체 파라핀, 또는 액체 폴리에틸렌 글리콜 중에 현탁될 수 있다. 추가로, 안정제가 첨가될 수 있다. 경구 투여용의 모든 제제는 상기 투여에 적합한 제형이어야 한다. 협측 투여용인 경우, 조성물은 종래 방식으로 제제화된 정제 또는 로젠지 형태를 취할 수 있다.

- [0494] 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드는 주사에 의한, 예컨대, 근육내 주사, 또는 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구적 투여용으로 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 첨가된 보존제와 함께 단일 투여 형태로, 예컨대, 앰플 중 또는 다회 투약용 용기 중의 것으로 제공될 수 있다. 각 조성물은 오일성 또는 수성 비히클 중 현탁제, 액제 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있다. 제제화제, 예컨대, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제를 함유할 수 있다.
- [0495] 하이드로겔 및/또는 펩티드/펩토이드는 다른 약물 전달 시스템, 예컨대, 임플란트 또는 경피용 패치 또는 스텐트용으로 제제화될 수 있다.
- [0496] 제1 측면에서, 본 발명은 바이오패브리케이션에서의 하이드로겔을 형성하는 펩티드/펩토이드/펩티드 모방체의 용도를 제공한다.
- [0497] 펩티드 자기 조립은 정돈된 3차원 나노바이오물질을 디자인하기 위한 것으로서 정밀하고, 편리한 "상향식" 접근법이다. 재생 가능한 거대분자 나노구조물은 자기 조립을 지배하는 고도로 특이적인 상호작용에 기인하여 수득될 수 있다. 아미노산 서열이 펩티드 2차 구조를 결정하고, 다른 분자와 상호작용함으로써, 이는 결과적으로는 고차 거대분자 구조를 지시한다.
- [0498] 자기 조립된 나노피브릴 펩티드 스캐폴드는 재생 의학에서의 적용을 위한 것으로서 큰 관심의 대상이 되고 있다. 그의 나노섬유 표면 형상이 세포의 기질과 유사하기 때문에, 세포 성장 및 거동을 조절하는 공간적 및 시간적 큐를 제공하는, 생체모방 스캐폴드로서 광범위하게 적용되어 왔다. 세포 및 다른 생화학적 큐를 도입하는, 공간적으로 정의된 대규모 3차원 스캐폴드는 3D 마이크로액적 바이오프린팅 및 성형 기법에 의해 수득될 수 있다. 자기 조립 펩티드, 펩티드 모방체 및 펩티드 접합체는 캡슐화된 세포의 성장을 지지하는 생체적합성 거대분자 스캐폴드의 프린팅 또는 성형을 위한 빌딩 블록으로서의 역할을 할 수 있다.
- [0499] 본 개시내용은 생체적합성인 다공성 나노섬유 스캐폴드를 형성하는, 수성 조건하에서 자기 조립을 촉진시키는 특징적인 모티프를 가진, 신규한 부류의 초단쇄의 펩티드/펩티드 모방체/접합체를 기술한다(도 1). 수개의 하위 부류가 자극 반응성 겔화를 입증하고(도 2), 이는 미니-하이드로겔 어레이 및 3D 기관형 생물학적 구성물의 바이오프린팅을 위해 사용될 수 있다. 자극 반응성 성질은 또한 염 용액 배쓰로의 압출을 통해 하이드로겔 섬유 또는 "누들"을 제조하는 데에도 사용될 수 있다. 생성된 섬유는 잠재적으로는 식물 및 정렬된 섬유 스캐폴드를 생성하기 위해 수집되고, 사용될 수 있다.
- [0500] 자기 조립을 유도하는 특징적인 모티프는 C-말단 쪽으로 소수성이 감소되는 순으로 배열된, 2 내지 7개의 천연 지방족 아미노산으로 이루어진 N-말단 "트레일"로 구성된다(도 1). C-말단의 극성 "헤드"기는
- [0501] - 극성 아미노산(특히, 양친매성 서열을 함유하지 않는 소수성 펩티드의 경우),
- [0502] - 작용기(예컨대, 카복실산, 아민, 에스테르, 알코올, 알데히드, 케톤, 말레이미드),
- [0503] - 소분자(예컨대, 당, 알코올, 비타민, 하이드록실산, 아미노산) 및/또는
- [0504] - 단쇄 극성 링커일 수 있다.
- [0505] 아미노산이 쌍을 형성한 후, 이어서, α 나선형 피브릴로 적층될 때, 수성 조건하에서의 자기 조립이 일어난다(도 1). 피브릴의 나노섬유의 3D 네트워크로의 추가 응집이 물을 포집할 때, 하이드로겔이 수득된다(도 3a).
- [0506] 작용기가 존재하면, 조립 전 및 후의 화학적 변형이 이루어질 수 있다. 예를 들어, 생리활성 모이어티, 예컨대, 성장 인자, 지질, 세포 수용체 리간드, 호르몬 및 약물은 조립 후 스캐폴드에 접합될 수 있고, 이로써 작용화된 하이드로겔을 형성할 수 있다.
- [0507] 상기 펩티드/펩티드 모방체/접합체의 여러 하위부류가 자극 반응성 겔화를 입증한다(도 2). 특히, 극성 헤드기로서 리신 또는 리신 모방체 분자를 포함하는 펩티드의 하위부류는 염의 존재 및 상승된 pH에서 증진된 겔화 및 강성을 보인다(도 3a, b, 및 c). 겔화 지속 기간은 펩티드 및 염 농도를 적정함으로써 조정될 수 있다. 이는 바이오프린팅 개발을 위한 길을 열어주는 것이고, 여기서, 겔화는 염 용액의 공동 주사를 통하여 제어되고, 원하는 영역으로까지 한정될 수 있다.
- [0508] 추가로, 겔화 공정은 약간의 흡열성을 띠며, 이는 감온성인 요소를 부가하며, 캡슐화된 세포에의 열적 손상 가능성을 제거한다. 겔화 공정 동안, 겔화 지속 기간을 조정할 수 있는 능력을 통해 하이드로겔 구성물을 재생 의학에서의 적용을 위해 바람직한 형상으로 조각화할 수 있다. 펩티드 하이드로겔의 상기 하위부류의 기계적 특성은 염 농도 및 pH 증가에 의해 증진된다. 강도 및 조정 가능한 기계적 특성을 통하여 아미드화된 펩티드 하이드

로겔의 상기 하위부류는 기계적으로 지지하는 역할을 이행하는 생물학적 구성물 개발을 위해 이상적인 후보물질이 될 수 있다. 이온성 완충제 및 염기를 적절히 첨가함으로써, 세포 이동을 지지하기 위해 다공성을 유지하면서, 등가인 기계적 스티프니스를 얻는 데 보다 소량의 펩티드를 사용할 수 있다. 기계적 특성 및 다공도를 조절할 수 있는 능력은 천연 조직의 것과 유사한 기계적 특성을 가지는 기관형 구성물을 생성하는 데 필수적이다. 비교해 보면, 자기 조립 α 나선, β 헤어핀($G' \leq 2$ kPa) 및 β 시트($G' \leq 2$ kPa)에 기초한 다른 펩티드 하이드로겔은 상기와 같이 높은 강성을 획득할 수 없다.

[0509] (참고 문헌: α 나선:

[0510] [Banwell, E. F. et al. Rational design and application of responsive alpha-helical peptide hydrogels. Nat Mater 8, 596-600 (2009)].

[0511] [Yan, C. & Pochan, D. J. Rheological properties of peptide-based hydrogels for biomedical and other applications. Chem Soc Rev 39, 3528-3540 (2010)].

[0512] β 헤어핀::

[0513] [Yan, C. et al. Injectable solid hydrogel: mechanism of shear-thinning and immediate recovery of injectable β -hairpin peptide hydrogels. Soft Matter 6, 5143 (2010)].

[0514] [Schneider, J. P. et al. Responsive hydrogels from the intramolecular folding and self-assembly of a designed peptide. J Am Chem Soc 124, 15030-15037 (2002)].

[0515] 참고 문헌: β 시트:

[0516] [Zhang, S., Holmes, T., Lockshin, C. & Rich, A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3334-3338 (1993)].

[0517] [Liu, J., Zhang, L., Yang, Z. & Zhao, X. Controlled release of paclitaxel from a self-assembling peptide hydrogel formed in situ and antitumor study in vitro. Int J Nanomedicine 6, 2143-2153 (2011)].

[0518] [Aggeli, A. et al. Responsive gels formed by the spontaneous self-assembly of peptides into polymeric beta-sheet tapes. Nature 386, 259-262 (1997)].

[0519] 개념 증명으로서, 상기 하위부류의 펩티드를 사용하여, 스크리닝 및 재생 의학을 위한 미니-하이드로겔 어레이 및 3D 오가노이드 구조물 개발을 위한 바이오프린팅의 실현 가능성을 입증하였다. 상기 하위부류의 펩티드는 우수한 수용해도를 나타내어, 점도가 낮은 용액을 형성한다. 이는 프린팅을 촉진시키며, 니들/프린터 막힘을 방지한다. 생리학적 염 용액(예컨대, 포스페이트 완충 식염수, PBS)과의 상호작용시, 펩티드 용액은 즉각 겔화된다. 도 3d에 제시된 바와 같이, 이크로액적의 어레이는 PBS로 세척할 때, 유리 또는 폴리스티렌 표면 상에 부착되는 미니-하이드로겔을 형성할 것이다.

[0520] 펩티드/펩티드 모방체는 생체적합성이다. 디스펜싱 공정 동안 줄기 세포(간엽, 전구, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포) 및 환자 샘플로부터 단리된 1차 세포(섬유아세포, 수핵)를 펩티드와 혼합할 수 있다(도 4). 겔화 후, 세포는 상기 액적에 고정화된다. 나노입자, 소분자 약물, 올리고뉴클레오타이드, 및 단백질은 유사하게 공동 캡슐화될 수 있다(도 4 및 5).

[0521] 슬라이드 스캐너를 이용하는 고속대량의 조직학적 스크리닝의 출현과 함께, 상기 기술은 단일 현미경 슬라이드 상에서 최소 개수의 세포를 사용하여 상이한 테스트 화합물을 평가하는 데 사용될 수 있다(도 6).

[0522] 가교제를 도입함으로써, 본 발명자들은 상기 미니-하이드로겔의 기계적 안정성을 개선시킬 수 있다. 중합체와의 혼합 또는 그와의 가교 결합을 통해 생리활성 작용기 또한 도입될 수 있다(도 7).

[0523] 본 발명자들은 상이한 펩티드/펩티드 모방체/접합체를 자기 조립을 위한 그의 성향은 손상시키지 않으면서, 그를 혼합할 수 있다. 이를 통해 본 발명자들은 상이한 화합물을 조합함으로써 접합을 위해 상이한 작용기에 접근시킬 수 있고, 벌크 특성을 다르게 할 수 있다.

[0524] 기술을 3D 마이크로액적 프린팅 및 성형 쪽으로 확장하면, 독특한 다중기능성 마이크로니치가 있는 생물학적, 기관형 구성물을 수득할 수 있다(도 8). 프린팅 공정 동안 하이드로겔이 상이한 세포 유형을 공간적으로 국한시킬 수 있는 바, 다세포 구성물 또한 수득할 수 있다. 펩티드/펩티드 모방체/접합체 스캐폴드는 기계적으로 안정적인 공동 캡슐화된 세포를 제공할 것이다. 유전자, 소분자 및 성장 인자를 공동으로 전달하여 세포 생존을 증

진시키고, 줄기 세포 분화를 촉진시키고, 숙주 면역 반응을 조절할 수 있다. 생성된 3D 생물학적 구성물은 약물을 스크리닝하기 위한, 세포 거 및 질환 진행을 연구하기 위한 오가노이드 모델로서, 그뿐만 아니라, 재생 의학 용 조직 공학적 임플란트로서 사용될 수 있다.

- [0525] 마이크로액적 이외에도, 펩티드성 용액을 고농도 염 용액으로 압출시킴으로써 섬유("누들")를 수득할 수 있다(도 3e). 세포 및 생리활성 모이어티를 공동으로 캡슐화할 수 있다. 섬유성 미세환경으로 예컨대, 식물 스캐폴드, 정렬된 스캐폴드, 및 3D로 패턴화된 공동 배양 스캐폴드와 같은 새로운 적용이 이루어질 수 있다.
- [0526] 본 발명의 하이드로겔에 캡슐화된 세포, 예컨대, 인간 배아 줄기 세포는 증식되고, 그의 다능성을 유지하며, 이를 통해 3D로 배양하는 것이 1차 세포의 천연 표현형을 보존한다는 것이 입증된다(도 11 참조). 세포는 또한 본 발명의 바이오프린팅된 하이드로겔의 표면 상에 프린트될 수 있다. 3D로 배양하는 것이 1차 세포의 천연 표현형을 더욱 잘 보존하고, 이는 세포가 더 높은 고밀도로 배양되도록 할 수 있을 것이다(도 12 참조).
- [0527] 나노섬유 하이드로겔은 생체적합성이며, 이는 1차(토끼 상피 섬유아세포, 인간 진피 섬유아세포, 및 신장 관 세포) 및 줄기 세포(간엽, 배아 및 유도 다능성 줄기 세포)의 증식을 지지한다. 세포를 하이드로겔 코팅 상에서 배양할 수 있거나, 하이드로겔 내로 캡슐화할 수 있다(도 4). 후자의 경우, 세포는 그의 천연 상태와 더 유사한 3D 형태를 취한다. 나노섬유 스캐폴드는 세포 부착 및 생존을 촉진시키는 기계적 및 표면 형상 큐를 제공한다.
- [0528] 천연 조직과 유사한 조직 배양물을 필요로 하는 것은 여러 방식으로 병원체 감염성 및 전염에 관한 연구를 제한한다. 첫번째로, 시험을 위해 이용가능한 병원체 스톡의 양을 제한한다 - 병원체는 생체내에서 증폭되어야 하며, 이는 특히 병원체가 오직 인간 숙주만을 감염시킬 때에 도전과제가 된다. 이는 예컨대, 말라리아, 뎅기열 및 노로바이러스와 같은 질환인 경우에 그러하다. 두번째로, 도너 조직은 확인을 위해 수득되어야 하기 때문에, 바이러스 감염의 메커니즘(표적 세포 내로의 진입 및 복제)을 정확하게 찾아내는 것이 도전과제가 된다. 3D로 배양하는 것이 1차 세포의 천연 표현형을 더욱 잘 보존하고, 이는 또한 세포가 더 높은 고밀도로 배양되도록 할 수 있을 것이다. 예를 들어, 펩티드 수용체 FUT2A 상에서 배양된 Caco2 세포를 유리 커버 슬립 상에서 배양된 구성물과 비교하였다(도 12). FUT2A가 노로바이러스 감염성에 대해 연루되어 있다는 관점에서 볼 때, 조직 배양용 폴리스티렌 및 유리 커버 슬립 상에서 배양된 단일층은 바이러스 감염성에 관한 연구를 입증하지도, 병원체 증식을 허용하지도 않는다. Caco2 세포를 배양한 후, 이어서, 그를 감염시켜 바이러스를 증폭시키기 위해 회전식 생체 반응 장치에서 사이토텍스(Cytodex) 마이크로캐리어를 사용하고자 하는 시도는 제한적인 성공을 거둔 것으로 나타났다. 상기 텍스트란 마이크로캐리어는 불투명하고, 흡광도 및 형광성 기반 진단용 검정법에 적합하지 않다. 따라서, 바이러스의 장세포 내로의 진입 및 복제 메커니즘을 연구하기 위한 세포 모델을 개발하는 것이 시험 프로토콜, 효과적인 감각화 방법 및 신속한 진단 검사의 개발을 촉진시킨다.
- [0529] 중요한 특징:
- [0530] · 나노섬유 스캐폴드, 특히 3D 나노섬유 스캐폴드로 자기 조립될 수 있는, 오직 2 내지 7개의 아미노산으로만 이루어진 신규한 부류의 펩티드/펩티드 모방체/접합체. 다른 자기 조립 펩티드/접합체 기술과 비교하였을 때, 유의적으로 더 짧은 서열이 비용이 더 저렴하고, 합성 및 정제가 용이함을 나타낸다.
- [0531] · 수성 조건 및 극성 용매 중에서의 (생체모방) 나노섬유 스캐폴드로 자기 조립되는 흥미로운 메커니즘. 상기 스캐폴드는 세포 및 조직 재생에 대한 및/또는 세포 증식, 이동 및 거동에 영향을 미치는 기계적 및 표면 형상 큐를 제공할 수 있다.
- [0532] · 상이한 방식으로 제제화될 수 있는 다용도 물질. 일부 하위부류는 자극 반응성이며, 이는 바이오프린팅 기술의 개발을 촉진시킨다. 수개의 하위부류는 자극 반응성 거동을 보이는데, 이는 다양한 적용에 이용될 수 있다.
- [0533] · 펩티드의 하위부류는 염 및 pH 반응성 겔화를 보인다. 특히, 생리학상 화합성인 염 용액에의 노출시 즉각적으로 겔화될 수 있다.
- [0534] · 물 중에 용해되었을 때, 펩티드성 용액은 낮은 점도를 가지고, 니들 및 프린트 헤드를 통하여 쉽게 디스펜싱될 수 있다. 이를 통해 막힐 가능성은 최소화된다.
- [0535] · 자극 반응성은 또한 하이드로겔 섬유/'누들'을 생성하는 데에도 사용될 수 있다. 이어서, 상기 섬유를 정렬하고, 식물화하여 조직 공학 및 질환 모델을 위한 혁신적인 스캐폴드를 생성할 수 있다.
- [0536] · 대규모로, 본 발명자들은 또한 몰드(예컨대, 실리콘으로 제조된 것)를 사용하여 3D 방식으로 하이드로겔을 패턴화할 수 있다.

- [0537] · 하이드로겔은 생체적합성이고, 세포를 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 겔화시, 생성된 하이드로겔은 안정적이고, 쉽게 해리되지 않는다. 그러므로, 캡슐화된 세포는 빠져나가지 못한다. 세포는 하이드로겔 중에서 및/또는 그 위에서 배양될 수 있다.
- [0538] · 세포는 프린팅된/형성된 스캐폴드 상에 프린트/증착될 수 있다. 세포는 또한 프린팅 공정 동안 캡슐화될 수 있고, 이어서, 추가 세포는 표면 상에 증착될 수 있다. 이는 사실적인 세포 배양 모델, 예컨대, 장 및 피부 상피를 개발하기 위한 차후의 적용을 위해 도움이 된다.
- [0539] · 초기 세포 생존을 최대화하고, 차후의 세포 증식 및 천연 조직과 유사한 조직 배양물의 발생을 촉진시키기 위해 1차 세포를 3차원적으로 캡슐화하는 독특한 방법. 하이드로겔의 기계적 특성은 또한 천연 표현형의 유지를 증진시키기 위하여 천연 조직의 것과 매칭되도록 조정될 수 있다.
- [0540] · 천연 조직과 유사하고, 병원체 감염 및 복제에 대해 영향을 받기 쉬운 세포 모델이 개발될 수 있도록 하는 기술. 이는 병원체 진입 및 증식을 촉진시킬 수 있으며, 이로써, 시험 프로토콜, 효과적인 위생 처리 방법 및 신속한 진단 검사 개발을 가능하게 한다. 인간 숙주를 이환시키고, 현존 세포 배양물 및 동물 모델에서는 불충분한 복제를 나타내는 질환, 예컨대, 말라리아, 뎅기열 및 노로바이러스에 필수적이다.
- [0541] · 생각건대, 세포 배양 모델은 약물 스크리닝 및 시험관내 기술 쪽으로 적용될 수 있다.
- [0542] · 펩티드 하이드로겔은 광학상 투명하고, 흡광도 측정, 형광 및 명시야 영상화를 위한 표준 기법을 사용할 수 있게 한다. 복잡한 세포 집단의 생물학적 성질을 규명하고, 일시적인 방식의 다양한 자극에 대한 그의 반응을 정량화하기 위한 고속대량 현미경 검사법 및 생화학적 검정법을 사용하는 세포 기반 연구 또한 실현 가능하다.
- [0543] · 구성물은 기계적 및 효소적 간섭없이 회합되지 않기 때문에, 장기간의 배양 기간 동안 안정적이며, 따라서, 장기간 연구가 가능하다.
- [0544] · 생리활성 모이어티, 예컨대, 올리고뉴클레오타이드, 단백질(성장 인자, 항체 및 사이토카인) 및 소분자 약물 뿐만 아니라, 나노입자 및 마이크로입자는 공동 캡슐화될 수 있고, 이로써 세포 거동에 영향을 미칠 수 있다. 캡슐화된 생체분자의 방출 또한 다공성 및 다양한 분자 상호작용에 의해 조절될 수 있다.
- [0545] · 작용기가 존재하기 때문에 조립 후 변형이 실현 가능하다. 생리활성 모이어티, 예컨대, 성장 인자 또한 접합체 상의 펩티드성 골격 또는 작용기에 접합될 수 있고, 이로써 생물학적 거동을 조절할 수 있다.
- [0546] · 펩티드의 자극 반응성 성질에 기인하여, 스캐폴드 및 줄기 세포는 대규모 3D 세포 배양, 세포 기반 고속대량 스크리닝 및 재생 의학 적용을 위한 플랫폼 기술 개발을 위해 특정 형상으로 바이오프린트 또는 성형될 수 있다.
- [0547] 제2 측면에서, 본 발명은 신규한 부류의 하이드로겔을 형성하는 소수성 펩티드/펩티드 모방체를 제공한다.
- [0548] 본 발명자들은 극성 헤드기, 예컨대, 친수성 아미노산(들)의 부재를 통해 단지 소수성 아미노산으로만 이루어진 소형 펩티드를 수득할 수 있다는 이점 및 특성을 발견하게 되었다.
- [0549] C-말단에 극성기가 존재하지 않으면, 현재까지 개시된 초단쇄의 펩티드 부류와 다른 특성을 가진 새로운 부류의 자기 조립 펩티드를 얻을 수 있다. 단지 아미노산의 소수성 서열만이 섬유 스캐폴드로 자기 조립되어, 결국 하이드로겔이 될 수 있다는 것이 최신 기술을 잘 알고 있는 사람에게도 명확하지는 않았다. 현재 조사되고 있는 초단쇄의 펩티드 유형에 관하여 현재까지 조사된 조립 공정은 단지 양친매성 서열에만 의존하는 것으로 간주되었다. 극성 헤드기의 부재가 연성 고체 물질이 아닌, 미셀 유사 구조물을 생성할 것으로 예측될 가능성이 더 컸다. 또한, 극성 헤드기의 부재는 새로운 물질 특성을 유도하고, 현재까지 조사되지 않았던 가능성을 제공함으로써 신규의 스마트한 바이오펜을 생성한다.
- [0550] 물질 특성의 새로운 이점은 비아미노산, 예컨대, 소분자, 작용기 및 단쇄 링커의 접합을 통한 작용화에 의해 디자인될 수 있다. 이러한 소분자/작용기/단쇄 링커는 새로운 물질 특성, 예컨대, 생체접착성 및 수용체 표적화를 부여한다. 새로운 펩티드 서열 특징을 통해 새로운 (그리고 현재까지 개발되어 왔던 것과는 다른) 적용이 개발될 수 있다. 또한 원하는 화합물의 정제를 간소화할 수 있다. 펩티드 그 자체와 비교하였을 때, C-말단에 작용기/단쇄 링커가 존재하면, 작용화의 용이성 및 다중 생리활성 분자(예컨대, 사이토카인, 프로드럭 등)를 단일 펩티드 모방체/펩티드 접합체에 화학적으로 접합시킬 수 있는 능력은 증진된다. 본 발명자들은 또한 원치않는 부반응 및 관심의 대상이 되는 생리활성 분자와 펩티드 모방체/펩티드 접합체 사이의 비특이 상호작용을 제거할 수 있다.

- [0551] **실시예**
- [0552] 본 발명의 예시적인 실시양태의 기술적 측면을 예시하기 위해 실험을 수행하였다. 하기 실시예는 실험 방법 및 결과로 기술된다. 당업자는 본 실시예는 예시를 위한 것이며, 본 발명의 범주를 한정하고자 하는 것이 아님을 쉽게 이해할 것이다.
- [0553] **실험 방법 및 결과**
- [0554] **펩티드**
- [0555] 펩티드 서열은 친수성 헤드기 및 소수성 테일을 함유하는 양친매성 펩티드 구조물을 나타내도록 디자인되었다. 펩티드 디자인을 위한 이론적 설명은 원뿔형 구조물과 유사하게 크기가 감소되는 형태의 펩티드 단량체를 생성하는 것이었다. 소수성 테일은 상이한 지방족 아미노산을 사용함으로써 차이를 보인다. 이는 하기 지방족 아미노산, 예컨대, 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신을 이루어지고, 친수성 헤드기는 1 또는 2개의 극성 또는 하전된 아미노산으로 이루어진다. 소수성 테일의 서열 순서는 상이한 지방족 아미노산을 사용함으로써 차이를 보였다. 펩티드는 GL 바이오켄(GL Biochem: 중국 상해)으로부터 상업적으로 합성되었다. 펩티드 하이드로겔 형성 거동의 재현가능성을 확인하기 위해, 펩티드를 다른 회사(바이오매틱 코포레이션(Biomatik Corp.: 미국), 아나스펙. 인크(Anaspec. Inc.: 미국))로부터도 또한 합성하였다. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC: High-performance liquid chromatography) 및 질량 분석법에 의해 확인된 바, 펩티드의 순도는 여러 개로 95% 이상이다. 펩티드 스톡 용액을 5 내지 10 mg/ml로 물에 용해시켰다. 펩티드 대부분은 N-말단에서 아세틸화되었다.
- [0556] 펩티드 기반 하이드로겔 제조
- [0557] 미성숙한 펩티드 응집을 피하기 위해 모든 펩티드(GL 바이오켄: 중국 상해, 순도 $\geq 98\%$)를 새로 제조하였다. 펩티드를 물에 용해시키고, 하이드로겔이 형성되도록 실온에서 방치하였다. 펩티드 농도에 따라, 즉시, 수시간 이내 또는 심지어 수일 이내에(겔화를 위한 실험상의 기간) 자기 조립 과정이 일어났다. 펩티드 농도가 더 높은 경우에는 펩티드를 와동시켜 밀리Q 워터(milliQ water)에 용해시켰다. 가압식 및 가속형 하이드로겔 제조가 필요한 경우, 펩티드 용액을 수조에서 초음파 처리하였다(반스테드 랩라인 9319 울트라소닉LC60H(Barnstead Labline 9319 UltrasonicLC60H)). 자기 조립을 통해 제조된 하이드로겔과, 초음파 처리에 의해 조립이 촉진된 것 사이에 구조상의 어떤 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 극소수의 펩티드는 승온, 즉, 50°C에서 더욱 쉽게 하이드로겔을 형성하였다.
- [0558] 농도 차이에 따른 효과를 연구하기 위해, AcLD₆(L) 및 AcID3(L) 하이드로겔, 둘 모두를 상기 명시된 바와 같이 다양한 농도로 제조하였다. 1가 및 2가 양이온의 효과를 연구하기 위해, 10, 50, 100 및 150 mM NaCl 및 CaCl₂ 용액에 펩티드를 용해시킴으로써 AcLD₆(L) 하이드로겔을 제조하였다. 상기 하이드로겔의 형태 및 강도를 특징 규명하기 위하여 FESEM 및 레올로지 연구를 추가로 수행하였다.
- [0559] 젤라틴 및 콜라겐 겔 제조: 먼저 밀리Q 워터에 젤라틴을 용해시키고, 겔화가 관찰될 때까지 가열 후 냉각시킴으로써 젤라틴(A형, G1890; 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)) 하이드로겔을 제조하였다. 콜라겐(소로부터 유래된 I형, 어드밴스드 바이오매트릭스(Advanced Biomatrix: 미국))를 농도가 1.5 mg/ml가 되도록 PBS 완충제로 희석시키고, 0.1 M NaOH를 사용하여 pH 7.4로 적정하였다. 용액을 37°C에서 1시간 동안 인큐베이션시켜 겔화를 달성하였다.
- [0560] **원편광 이색성(CD: Circular dichroism) 분광법**
- [0561] 아비브 원편광 이색성 분광계(Aviv Circular Dichroism Spectrometer), 모델 410을 이용하여 타원율 스펙트럼을 측정함으로써 2차 펩티드 구조물을 분석하였다. 스톡 펩티드 용액(5-10 mg/ml)을 물 중에 희석시킴으로써 CD 샘플을 제조하였다. 희석된 펩티드 용액을 경로 길이가 1 mm인 큐벳에 채우고, 스펙트럼을 획득하였다. 블랭크 참조로서 물을 사용하고, 물 타원율을 계산하기 전에 원 데이터로부터 참조값을 감산하였다. 하기 식: $[\Theta]_{\lambda} = \Theta_{\text{관측치}} \times 1/(10 \text{ Lcn})$ (여기서, $[\Theta]_{\lambda}$ 는 λ 에서의 물 타원율(deg cm² d/mol)이고, λ 에서의 타원율 관측치(mdeg)이고, L은 경로 길이(cm)이고, c는 펩티드의 농도(M)이고, n은 펩티드 중 아미노산의 개수이다)에 기초하여 계산하였다. CDNN 소프트웨어를 이용하여 2차 구조 분석을 수행하였다.
- [0562] **환경형 주사 전자 현미경 검사법(ESEM: Environmental Scanning Electron Microscopy)**
- [0563] 샘플을 FEI 쿼타 200 환경형 주사 전자 현미경(FEI Quanta 200 Environmental Scanning Electron Microscopy)

의 샘플 홀더 상에 놓았다. 이어서, 4℃ 온도에서 10 kV의 가속 전압을 이용하여 관심의 대상이 되는 표면을 조사하였다.

[0564] **전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법(FESEM: Field Emission Scanning Electron Microscopy)**

[0565] 샘플을 -20℃에서 냉동시킨 후, -80℃로 냉동시켰다. 냉동된 샘플을 추가로 냉동 건조시켰다. 냉동 건조된 샘플을 전도성 테이프를 이용하여 샘플 홀더에 고정시키고, JEOL JFC 1600 고해상도 스퍼터 코터(JEOL JFC 1600 High Resolution Sputter Coater)에서 상단 및 측면, 둘 모두로부터 백금으로 스퍼터링하였다. 사용된 코팅 전류는 30 mA였고, 상기 과정을 60 sec 동안 지속하였다. 이어서, 5-10 kV의 가속 전압을 이용하여 JEOL JSM-7400F 전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법 시스템으로 관심의 대상이 되는 표면을 조사하였다.

[0566] **레올로지 측정**

[0567] 펩티드 기반 하이드로겔의 점탄성 특성을 측정하기 위해, 간극 거리가 0.8 mm이고, 직경이 25.0 mm인 티타늄 평행판 지오메트리가 있는 ARES-G2 유량계 (TA 인스트루먼트(TA Instruments: 미국 뉴저지주 피츠카타웨이))를 이용하여 하이드로겔에 대해 동적 시간, 변형 및 주파수 스위프 실험을 수행하였다. 다양한 농도의 펩티드를 이용하여 펩티드 기반 하이드로겔의 강도를 비교하기 위해, 또는 1가 또는 2가 이온의 존재하의 펩티드에 대해 진동 주파수 연구를 수행하였다. 진동 주파수 스위프 연구는 25℃ 및 50℃에서 0.1-100 rad/s 주파수 및 0.1% 변형률로 수행하였다.

[0568] Ac-LD₆ [L]:

[0569] 펩티드 서열: Ac-LIVAGD-COOH

[0570] 분자량: 629.56

[0571] (1) Ac-LD₆(L)에 대한 온도 스위프 연구:

[0572] (a) 이어서, 펩티드 혼합물을 유량계의 하단 플레이트에 놓았다. 하기 파라미터를 최적화시켰다:

[0573] 두 플레이트 사이의 간극: 1 mm

[0574] 변형률: 10%

[0575] 주파수: 6.28 rad/sec

[0576] 온도 스캔: 4℃ 내지 60℃

[0577] 샘플 부피: 500 μ l

[0578] (2) Ac-LD₆(L)에 대한 주파수 스위프 연구:

[0579] 주파수 스위프 연구를 수행하는 필요한 최적화된 파라미터

[0580] 두 플레이트 사이의 간극: 0.8 mm

[0581] 변형률: 0.1%

[0582] 온도: 25℃ 및 50℃

[0583] 샘플 부피: 1 ml

[0584] 주파수 스캔: 0.1 rad/sec 내지 100 rad/sec

[0585] 하이드로겔 중 Ac-LD-6(L) 농도: 10 mg/ml

[0586] (3) Ac-LD₆(L)의 농도 변동이 겔 강도에 미치는 효과:

[0587] 겔 강도를 측정하는 주파수 스위프 연구를 수행하는 데 필요한 최적화된 파라미터는 하기와 같다:

[0588] 두 플레이트 사이의 간극: 0.8 mm

[0589] 변형률: 0.1%

[0590] 온도: 25℃ 및 50℃

- [0591] 샘플 부피: 1 ml
- [0592] 주파수 스캔: 0.1 rad/sec 내지 100 rad/sec
- [0593] 하이드로겔 중 Ac-LD₆(L)의 농도: 물 중 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml 및 20 mg/ml 및 30 mg/ml.
- [0594] (4) 염화나트륨(NaCl)이 Ac-LD₆(L)의 겔 강도에 미치는 효과:
- [0595] 하이드로겔을 형성하는 데 최적화된 방법을 사용하여 다양한 농도의 NaCl 용액, 예를 들어, 10 mM, 50 mM, 100 mM 및 150 mM의 NaCl 용액 중에 10 mg의 Ac-LD-6(L)을 분산시켜 제조된 하이드로겔에 대해 주파수 스위프 연구를 수행함으로써 염화나트륨이 Ac-LD₆(L) 기재 하이드로겔에 미치는 효과를 연구하였다. NaCl의 존재 하에서 겔 강도를 측정하는 주파수 스위프 연구를 수행하는 데 필요한 최적화된 파라미터는 하기와 같다:
- [0596] 두 플레이트 사이의 간극: 0.5 mm 및 0.8 mm
- [0597] 변형률: 각각 10% 및 0.1%
- [0598] 온도: 25°C 및 50°C
- [0599] 샘플 부피: 1 ml
- [0600] 주파수 스캔: 0.1 rad/sec 내지 100 rad/sec
- [0601] 10 mg/ml의 Ac-LD-6(L) 하이드로겔을 제조하는 데 사용된 NaCl 용액의 농도: 10 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM NaCl 용액.
- [0602] Ac-LIVAGK-NH₂[L] 및 Ac-ILVAGK-NH₂[L]:
- [0603] **하이드로겔 제조.** 상기 하위부류의 펩티드 하이드로겔을 제조하기 위해, 동결건조된 펩티드 분말을 먼저 냉 밀리Q 워터에 용해시키고, 30초 동안 와동시켜 혼합함으로써 균질 용액을 수득하였다. 이어서, 겔화 평가를 위해 10% 부피의 9% 염화나트륨 또는 10배 포스페이트 완충 식염수를 첨가하고, 생성된 용액을 추가로 30초 동안 와동시켰다. 겔화는 펩티드 농도 및 사용된 완충제에 의존하여 수분 내지 밤새도록 일어났다. 겔화는 초음파처리 또는 가열에 의해 촉진될 수 있다.
- [0604] 하이드로겔 샘플을 폴리디메틸실록산 몰드에서 제조하여 두께가 대략 1 mm이고, 직경이 대략 8 mm인 추간판을 수득하였다. 8 mm 티타늄 평행판 지오메트리가 있는 ARES-G2 유량계(TA 인스트루먼트: 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 이용하여 동적 변형 및 진동 주파수 스위프 실험을 수행하였다. 하기와 같이 수개의 다양한 파라미터가 점탄성 특성에 미치는 효과를 연구하였다:
- [0605] (1) 다양한 농도가 미치는 효과,
- [0606] (2) 다양한 이온 강도의 용액이 미치는 효과(물 대 식염수 대 PBS),
- [0607] (3) 다양한 pH가 미치는 효과.
- [0608] **27 게이지 니들로부터의 압출**
- [0609] 27 게이지 니들이 장착된 1 mL 시린지로부터 4°C의 5 mg/mL의 Ac-ILVAGK-NH₂ 용액을 실온 10X PBS 용액으로 압출하였다.
- [0610] **하이드로겔 액적 제조**
- [0611] 본 발명자들은 간단하게 펩티드 용액의 소량의 액적(0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μ l)을 디스펜싱한 후, 이어서, PBS와 혼합 또는 PBS로 세척하여 하이드로겔 어레이를 수득하였다. 겔화시 점도 및 강성은 유의적으로 증가하게 되며, 이는 높은 형상 충실도를 부여하며, 이를 통해 본 발명자들은 하이드로겔 액적을 증착 부위에 국재화할 수 있고, 내부 조성물을 제어할 수 있으며, 바이오잉크에 대해 중요한 2가지 기준인 캡슐화된 세포 또는 생리활성 모이어터를 현탁시킬 수 있다. 현재까지, 본 발명자들은 소분자, DNA, mRNA, 나노입자, 단백질 및 세포를 캡슐화하는 다양한 부피의 하이드로겔 액적 어레이를 생성해왔다.
- [0612] **인간 간엽 줄기 세포의 캡슐화**
- [0613] 인간 간엽 줄기 세포를 론자(Lonza: 스위스 바젤)로부터 입수하고, 20% 우태아 혈청, 2% L-글루타민 및 1% 페니

실린-스트렙토마이신을 포함하는 α -MEM 배지 중에서 배양하였다. 트립신 처리시, 세포를 PBS 중에 현탁시킨 후, (PBS 중) 펩티드 용액 내로 또는 그 위에 첨가하였다. 이어서, 배지에 첨가하기 전에 15분 동안 37°C에서 구성물을 겔화시켰다.

[0614] **나노섬유 하이드로겔로 자기 조립되는 소수성 펩티드**

[0615] **물질.** 본 연구에서 사용된 모든 펩티드는 아메리칸 펩티드 컴퍼니(American Peptide Company: 미국 캘리포니아주 서니베일)에 의해 고상 펩티드 합성을 사용하여 수동으로 합성하고, HPLC를 통해 >95%로 정제하였다. 아미노산 및 펩티드 함량 분석을 수행하였다.

[0616] **하이드로겔 제조.** 펩티드 하이드로겔을 제조하기 위해, 먼저 동결건조된 펩티드 분말을 밀리Q 워터 중에 용해시키고, 30초 동안 와동시켜 혼합함으로써 균질 용액을 수득하였다. 겔화는 펩티드 농도에 의존하여 수분 내지 밤새도록 일어났다. 겔화는 초음파처리 또는 가열에 의해 촉진될 수 있다.

[0617] **C-말단의 작용화.** C-말단을 작용화시키기 위해, 먼저 Fmoc 보호된 전구체를 Wang 또는 Rink 아미드 수지에 반응시킴으로써 고상 펩티드 합성 동안 바이오틴 및 L-DOPA를 도입하였다. 최종 생성물을 HPLC/MS를 이용하여 정제하고, 동결건조시키고, 겔화에 대해 평가하였다.

[0618] **전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법.** 하이드로겔 샘플을 액체 질소 중에서 급냉시킨 후, 동결건조시켰다. 동결건조된 샘플을 JEOL JFC 1600 고해상도 스퍼터 코터에서 백금으로 스퍼터링하였다. 확실히 완전하게 코팅될 수 있도록 다른 각도에서 3회에 걸쳐 코팅을 수행하였다. 이어서, 2-5 kV의 가속 전압을 이용하여 JEOL JSM-7400F FESEM 시스템으로 코팅된 샘플을 조사하였다.

[0619] **실시예 2**

[0620] **2.1 방법**

[0621] **물질.** 본 연구에서 사용된 모든 펩티드는 아메리칸 펩티드 컴퍼니(미국 캘리포니아주 서니베일)에 의해 고상 펩티드 합성을 사용하여 수동으로 합성하고, HPLC를 통해 >95%로 정제하였다. 아미노산 및 펩티드 함량 분석을 수행하였다. 모든 세포 배양 시약은 인비트로젠(Invitrogen: 미국 캘리포니아주 칼즈배드)으로부터 구입하였다.

[0622] **하이드로겔 제조.** 펩티드 하이드로겔을 제조하기 위해, 먼저 동결건조된 펩티드 분말을 냉 밀리 Q 워터 중에 용해시키고, 30초 동안 와동시켜 혼합함으로써 균질 용액을 수득하였다. 이어서, 겔화 평가를 위해 10% 부피의 9% 염화나트륨 또는 10배 포스페이트 완충 식염수를 첨가하고, 생성된 용액을 추가로 30초 동안 와동시켰다. 겔화는 펩티드 농도 및 사용된 완충제에 의존하여 수분 내지 밤새도록 일어났다. 겔화는 초음파처리 또는 가열에 의해 촉진될 수 있다.

[0623] **원편광 이색성 분광법.** 광학 경로 길이가 5 mm인 직사각형 석영 수프라실(suprasil) 큐벳을 이용하여, 펠티에(Peltier) 온도 조절기가 장착된 아비브 410 CD 분광계를 이용하여 CD 스펙트럼을 수집하였다. 1.0 nm의 스펙트럼 대역폭으로 190-260 nm의 파장 범위에서 1.0 nm 간격으로 데이터를 획득하였다. 매회 측정을 위해 샘플을 새로 제조하였고, 큐벳 중 샘플의 부피는 1.6 mL로 일정하게 유지시켰다. 모든 스펙트럼은 기준선으로서 밀리Q 워터를 이용하여 기준선에 준하여 보정하였다.

[0624] **전계 방출형 주사 전자 현미경 검사법.** 하이드로겔 샘플을 액체 질소 중에서 급냉시킨 후, 동결건조시켰다. 동결건조된 샘플을 JEOL JFC 1600 고해상도 스퍼터 코터에서 백금으로 스퍼터링하였다. 확실히 완전하게 코팅될 수 있도록 다른 각도에서 3회에 걸쳐 코팅을 수행하였다. 이어서, 2-5 kV의 가속 전압을 이용하여 JEOL JSM-7400F FESEM 시스템으로 코팅된 샘플을 조사하였다.

[0625] **레올로지.** 하이드로겔 샘플을 폴리디메틸실록산 몰드에서 제조하여 두께가 대략 1 mm이고, 직경이 대략 8 mm인 추간판을 수득하였다. 8 mm 티타늄 평행판 지오메트리가 있는 ARES-G2 유량계(TA 인스트루먼트: 미국 뉴저지주 피츠카타웨이)를 이용하여 동적 변형 및 진동 주파수 스윙 실험을 수행하였다.

[0626] **세포 배양.** 인간 간엽 줄기 세포를 톤자(스위스 바젤)로부터 입수하고, 20% 우태아 혈청, 2% L-글루타민 및 1% 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 α -MEM 배지 중에서 배양하였다. 본 실험에서 사용된 세포는 2 내지 6 세대의 것이었다. 토끼 수핵 세포는 승인받은 동물 프로토콜하에 싱가포르 국립대 병원(National University Hospital of Singapore)으로부터 입수하였다. 바이오폴리스 공용 시설(Biopolis Shared Facilities)(A*STAR: 싱가포르)의 어드밴스드 마이크로스코피 라보라토리(Advanced Microscopy Laboratory)에서 자이스(Zeiss) LSM 510 현미경을 사용하여 공초점 현미경 검사법을 수행하였다.

- [0627] **생체내 생체적합성.** 수컷 C57BL6 마우스에 30 μ l 하이드로겔 샘플을 피하로 이식함으로써 최대 2개월 동안 생체 적합성을 평가하였다. 안락사시킨 후, 조직학적 분석을 위해 이식 부위를 절개하였다. A*STAR의 생물 자원 시설 (A*STAR's Biological Resource Facility)로부터 승인받은 IACUC 프로토콜하에 실험을 수행하였다. ISO 표준 10993-10에 개요된 GLP 조건하에서 위탁 연구 전문 기관인 톡시콘(Toxikon)에 의해 기니아 피그 극대화 연구를 수행하였다.
- [0628] **유도된 추간판 퇴행 토끼 모델.** 동물 1마리당 3개의 요추 추간판(L3/L4, L4/L5 및 L5/L6)에서의 퇴행성 추간판 질환을 모의하기 위해, 뉴질랜드 화이트 토끼의 섬유륜을 편창하고, 흡인에 의해 수핵을 수거하였다²⁷. 싱가포르 국립대(National University of Singapore)로부터 승인받은 IACUC 프로토콜하에 실험을 수행하였다. 손상 후 1개월째, 손상된 추간판 중 2개에 하이드로겔 및 세포 요법 처치를 주사하고, 하나는 비처리 대조군으로서 남겨 두었다. 손상 후 2개월째, 동물을 안락사시키고, 생체외 MRI 실험 및 조직학적 연구를 위해 조직 샘플을 수집하였다. 7T 브루커 클린스캔 MRI 시스템(7T Bruker Clinscan MRI system) 중에서 MRI 실험을 수행하고, 트랜스미트/리시브(Transmit/Receive) 72 mm 볼륨 코일을 이용하여 영상을 획득하였다. 각각 하기 획득 파라미터: TR/TE=400/12 ms 및 TR/TE=1500/67 ms를 이용하여 T1 및 T2 가중 영상을 획득하였다. 다른 관련 실험 파라미터는 FOV 70 mm, 슬라이스 두께 1 mm를 포함하였고, 최종 영상은 평균 4였다.
- [0629] **2.2 시험관내 및 생체내 생체적합성**
- [0630] 펩티드 하이드로겔은 임플란트에 중요한 고려 사항인 우수한 생체내 안정성을 보였다. 이상적으로는 하이드로겔은 단기간 내에 처리를 반복할 필요 없이, 생리학적 조건하에서 적어도 6 내지 12개월 동안 안정적인 상태 그대로 유지되어야 한다. 건강한 C57BL/6 마우스에서 하이드로겔 추간판의 피하 이식은 2개월 이상 지속되었고, 이는 근육층 아래 무정형 호산성 편광성 물질로서 관찰되었다(도 13). 편광 광학 현미경 검사법에 관찰된 복굴절은, 심지어 외부 자극, 예컨대, 자기장 또는 전기장이 부재하는 경우에도 펩티드 섬유가 정렬되어 있다는 것을 제안한다. 다른 자기 조립 펩티드 양친매성 물질에 대해서도 유사한 결과가 관찰되었지만(문헌 [Wall, B. D. *et al.*, Adv Mater 23, 5009-5014, 2011]; [Zhang, S. *et al.* Nat Mater 9, 594-601, 2010]), 본 발명자들의 초단쇄의 펩티드의 합성이 유의적으로 더 저렴하고, 더 용이하다.
- [0631] 특히, 임플란트에 대한 면역 반응은 최소 내지 경미하였는데, 이는 모의 수술을 받은 마우스의 경우에 유사한 염증 반응이 관찰되었는 바, 이식 수술에 기인하는 것이었다. 몇몇 다핵 거대 세포 조직구가 수개의 임플란트 부근에서 관찰되었다(도 13). 하이드로겔 벌크가 중증의 면역 활성화를 유도하지 않았고, 심지어 2개월이 경과한 후에도 캡슐 형성은 없었다. 또한 펩티드 하이드로겔이 이식된 동물과 대조군 동물 사이에서도 적혈구 또는 백혈구 계수에 있어서도 어떤 관찰가능한 차이는 없었다. 혈청 효소 및 대사물질 농도에 관한 분석은 펩티드가 간 기능을 손상시키지 않았다는 것을 추가로 제안하였다. 기니아 피그에서 수행된 클리그먼(Kligman) 극대화 검정법에 의해 Ac-LIVAGK-NH₂의 탁월한 생체적합성을 확인하였다. Ac-LIVAGK-NH₂의 국부 적용 및 진피내 주사하는 24시간 경과 후에도 어떤 자극 또는 알레르기 반응도 유도하지 않았고, 27일 후 후속 면역 시험감염 후에도 어떤 반응도 관찰되지 않았다(하기 표 1). 동물은 독성에 관한 어떤 전신 징후도 보이지 않았다. 공동 수행된 유전독성 검정법을 통해 Ac-LIVAGK-NH₂가 돌연변이 유발성이 아니라는 것이 입증되었다(하기 표 2). 요약하면, 본 발명자들의 초단쇄의 펩티드는 시험관내 및 생체내에서 생체적합성이며, 이로 인해 상기 펩티드는 바이오잉크, 세포 배양용 기재 및 이식 가능한 스캐폴드로서 적용하는 데 매우 적합하다.

표 1

클리그먼 극대화 검정법을 통해 Ac-LIVAGK-NH₂가 생체내에서 생체적합성이며, 기니아 피그에서 어떤 면역학적 또는 생리학적 유해 사례도 유도하지 않았다는 것이 입증되었다. Ac-LIVAGK-NH₂ 및 식염수의 국소 적용 및 진피내 주사는 심지어 27일 후의 후속 시험감염에도 어떤 감각화 또는 면역 반응도 유발하지 않았다. 펩티드 처리된 동물 및 식염수 대조군에 대해 어떤 시각적 변화도 관찰되지 않았다. 디니트로클로로벤젠(DNCB)으로 처리된 모든 동물은 감각화 점수를 100%로 할 때, 패치(1 등급) 내지 중간 정도(2 등급)의 홍반을 보였다.

처리	동물 ID	성별	점수			감각화된 동물의 비율(%)	알레르기 잠재성
			25일째	26일째	27일째		
8.35 mg/mL Ac-LIVAGK-NH ₂	1	수컷	0	0	0	0 %	약함
	2	수컷	0	0	0		
	3	수컷	0	0	0		
	4	수컷	0	0	0		
	5	수컷	0	0	0		
	6	암컷	0	0	0		
	7	암컷	0	0	0		
	8	암컷	0	0	0		
	9	암컷	0	0	0		
	10	암컷	0	0	0		
식염수 (음성 대조군)	11	수컷	0	0	0	0 %	약함
	12	수컷	0	0	0		
	13	수컷	0	0	0		
	14	암컷	0	0	0		
	15	암컷	0	0	0		
디니트로클로로벤젠 (양성 대조군)	16	수컷	2	2	1	100 %	극한 정도
	17	수컷	2	2	1		
	18	암컷	1	1	0		
	19	암컷	2	1	1		
	20	암컷	1	0	0		

[0632]

표 2

Ac-LIVAGK-NH₂로 예시되는 아마이드화된 펩티드는 돌연변이 유발성이 아니다. 대사 활성인자의 (a) 부제 및 (b) 존재하에 차이니즈 햄스터 난소 세포를 이용하여 염색체 이상 검정법을 수행하였다. 평가된 상이한 유형의 이상으로는 크로마티드 차이(TG), 염색체 차이(SG), 크로마티드 파손(TB), 염색체 파손(SB), 결실(D), 삼방사 재배열(TR), 사방사 재배열(QR), 복합 재배열(CR), 고리 재배열(R), 이동원체 염색체(DC), 미소 쌍(DM), 및 미분(PV)을 포함한다. 일부 세포는 이상 유형을 1개 초과로 포함한다.

a.

처리	분석된 세포 개수	차이		파손			염색체간 재배열					다른 이상		이상(차이 제외)을 포함하는 세포
		T G	SG	TB	SB	D	TR	Q R	C R	R	D C	D M	PV	
8.35 mg/mL Ac-LIVAGK-NH ₂	200	3	2	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	5
0.075 µg/mL 미토마이신 C (양성 대조군)	100	3	1	17	9	1	0	4	0	0	0	4	0	26
배양 배지 (음성 대조군)	200	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1

b.

처리	분석된 세포 개수	차이		파손			염색체간 재배열					다른 이상		이상(차이 제외)을 포함하는 세포
		T G	SG	TB	SB	D	TR	Q R	C R	R	D C	D M	PV	
8.35 mg/mL Ac-LIVAGK-NH ₂	200	6	1	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
0.075 µg/mL 미토마이신 C (양성 대조군)	100	3	0	33	7	2	10	2	2	0	0	0	0	30
배양 배지 (음성 대조군)	200	6	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

[0633]

[0634]

2.3 주사 가능한 스캐폴드

[0635]

자극 반응성인 초단쇄의 펩티드는 그의 자기 조립 특성에 의해 주사 가능한 스캐폴드에 대해 이상적인 후보물질이 된다. 상기 스캐폴드는 계내에서 조립을 완료하는 반점성 용액으로서 주사될 수 있다. 불규칙한 형상 결함은 천연 조직과의 스캐폴드 통합을 촉진시키면서, 완전하게 충전될 수 있다. 이러한 주사 가능한 제제는, 외과적으로 이식되어야 하는 나노섬유 스캐폴드를 제조하는 생체의 기법, 예컨대, 전기방사법보다 유의적인 이점을 제공한다. 계내 겔화 공정 동안, 겔화 속도를 조정할 수 있는 능력을 통해서 임상의는 하이드로겔 구성물을 적용을 위해 원하는 형상, 예컨대, 진피 충전제로 조각화할 수 있다. 추가로, 생체적합성 및 생체내 안정성이 수개월 동안 지속될 필요가 있는 임플란트에 좋은 징조가 된다. 강도 및 조정 가능한 기계적 특성을 고려할 때, 본 발명자들은 특히 기계적으로 지지하는 역할을 이행하는 주사 요법 및 이식 가능한 스캐폴드를 개발하는 것에 관심을 가지고 있다. 비교해 보면, 자기 조립 α 나선, β 헤어핀($G' \leq 2$ kPa) 및 β 시트($G' \leq 2$ kPa)에 기초한 다른 펩티드 하이드로겔은 상기와 같이 높은 강성을 획득할 수 없었다.

[0636]

본 발명자들은 조기 단계의 퇴행성 추간관 질환에 대한 최소 침습적 치료를 제제화하는 것을 선택하였다. 50세 이상의 집단 중 85%가 상기 만성 질환을 앓고 있으며, 이는 요추 척추간 추간관의 진행성인 구조적 및 기능적 퇴행이 원인이 된다(문헌 [O'Halloran, D.M. & Pandit, A.S. Tissue Eng 13, 1927-1954, 2007]). 수행(NP) EC 메서의 연령 관련 변화(도 14a)가 추간관 안정성에 영향을 미치며, 이는 척수 신경이 측면 척추에 의해 편칭되었을 때에는 중증의 하부 요통 및 하지 마비를 유도한다. 중재적 치료는 없으며, 현행 치료 옵션은 대개 금속 또는 세라믹 임플란트를 이용한 추간관 대치술 또는 척추 융합 형태의 외과적 중재를 필요로 한다(문헌 [Lewis, G. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 100, 1702-1720, 2012]). 이상적인 중재적 치료는 최소로 침습적이고, 생체적합성이되, 퇴행된 추간관이 질환 진행을 지연시킬 수 있도록 임시 기계적 보조 장치를 제공할 수 있어야

한다.

[0637] 적절한 펩티드 후보 물질을 선별하는 데 있어서 기계적 특성 및 겔화 반응 속도론이 주된 고려 사항이었다. 펩티드 서열, 농도, 반대 이온 및 용액의 염 농도를 달리함으로써 천연 조직을 모방하도록 하이드로겔의 기계적 특성을 조정할 수 있다. Ac-LIVAGK-NH₂ 및 Ac-ILVAGK-NH₂의 저장 탄성률은 인간 NP에 대하여 문헌상 보고된 값이 2 내지 10 kPa에 가깝다. 본 발명자들은 앞서 돼지 NP의 강성이 대략 100 Pa인 것으로 측정하였다(문헌 [Mishra, A. *et al.* Nano Today 6, 232-239, 2011]). 그렇더라도, 본 발명자들은 필요할 경우에는 큰 동물 모델의 것에 매칭되도록 펩티드 하이드로겔 강성을 감소시킬 수 있다. 현재 개발 중인 다른 주사 요법(문헌 [O'Halloran, D.M. & Pandit, A.S. Tissue Eng 13, 1927-1954, 2007])은 전형적으로 천연 및 변형된 중합체, 예컨대, 알기네이트, 콜라겐, 젤라틴 및 하이드록시부틸 키토산을 이용한다. 다수의 상기 바이오물질들은 동물 공급원으로부터 유래되는 바, 잠재적인 면역원성 및 배치마다 다른 편차에 기인하는 규제 승인에 영향을 줄 수 있는 상기 물질의 화학적 조성에 대한 정의는 불충분하다. 그의 기계적 특성 또한 비교불가능하다 - 콜라겐 I 및 젤라틴의 저장 탄성률은 100 Pa 미만이다(문헌 [Mishra, A. *et al.* Nano Today 6, 232-239, 2011]). 강도가 더 높은 하이드로겔이 압착, 및 퇴행 ECM과의 혼합에 기인하는 회식 효과를 더욱 잘 견뎌낼 수 있기 때문에 더 많은 이점을 제공할 것이다. 추가로, 본 발명자들은 시간이 경과함에 따라 하이드로겔 강성이 감소될 수 있다고 예상하고 있다. 그러나, 이는 조직이 회복됨에 따라 ECM 생산으로 상쇄될 수 있다.

[0638] 본 발명자들은 주사 요법을 디자인하였고, 여기서, 본 발명자들의 자극 반응성 펩티드 Ac-LIVAGK-NH₂를, 이어서 계내에서 겔화되는 저점도 용액으로서 투여하였다. 추간판 퇴행을 모의하는 유도성 추간판 퇴행 토끼 모델에서 상기 요법을 평가하였다. 3개의 추간판의 NP를 흡인하였다(문헌 [Ho, G., Leung, V. Y., Cheung, K. M. & Chan, D. Connect Tissue Res 49, 15-21, 2008]). 손상 후 1개월째, 토끼를 펩티드 하이드로겔 단독, 또는 토끼 NP 세포를 캡슐화한 하이드로겔로 처리하였다(하기 표 3). 겔화 시점에 그의 높은 강성 및 감온성 겔화 관점에서 PBS 중에 용해된 20 mg/mL의 Ac-LIVAGK-NH₂를 선택하였다. 얼음 상에서 유지된 펩티드 용액은 그의 유동성을 유지하였다. 저점도로 인해 직경이 더 작은 (25G) 게이지 니들을 사용할 수 있었으며, 이로써 주위 섬유륜에 대한 부수적인 손상을 감소시킬 수 있었다. 대략 100 μ L의 펩티드 용액을 손상된 NP로 주사하였을 때, 5분 이내에 겔화가 일어났고, 임상의는 니들을 적당한 위치에 놓고, 유체가 NP 공간을 완전하게 채울 수 있게 하였다. 니들을 다시 뽑아낼 때, 주변 조직으로의 유출은 없었다.

표 3

3개의 요추 추간판에서 유도성 퇴행성 추간판 질환을 앓는 6마리의 토끼에게 제공된 처리에 대한 실험상 설정.

2개의 다른 처리: (1) 20 mg/mL Ac-LIVAGK-NH₂ 펩티드 하이드로겔, 및 (2) 도너 토끼 수핵(NP) 세포를 캡슐화한 20mg/mL Ac-LIVAGK-NH₂ 펩티드 하이드로겔을 평가하였다. 본 실험에서 임플란트를 용이하게 모니터링할 수 있도록 하기 위해, 펩티드 하이드로겔에 T1 MRI 조영제인 가돌리늄-DTPA(Gd³⁺-DTPA)를 로딩 하고; 이식된 NP 세포는 T2 가중 실험을 위해 FITC 접합된 산화철 나노입자(IONDEX)로 표지하였다. 실험적 편향성을 제거하기 위해 다른 동물의 경우 주어진 추간판 내로 주사되는 처리를 달리하였다.

토끼 ID	L3/L4	L4/L5	L5/L6
R245	펩티드 하이드로겔	펩티드 하이드로겔 + 표지된 rNP 세포	비처리
R328	비처리	펩티드 하이드로겔	펩티드 하이드로겔 + 표지된 rNP 세포
R331	펩티드 하이드로겔 + 표지된 rNP 세포	비처리	펩티드 하이드로겔
R332	펩티드 하이드로겔	펩티드 하이드로겔 + 표지된 rNP 세포	비처리
R333	비처리	펩티드 하이드로겔	펩티드 하이드로겔 + 표지된 rNP 세포
R334	비처리		

[0639]

[0640]

생체내 영상화가 조직 공학 및 세포 임플란트를 모니터링하는 데 있어서 점점 더 중요한 역할을 하고 있다는 관점에서 볼 때, 본 발명자들의 하이드로겔 구성물을 표지할 수 있는 능력을 통하여 본 발명자들을 펩티드의 생체 분포를 추론할 수 있고, 질환 환경에서의 생체내 안정성을 평가할 수 있을 것이다. 자기 공명 영상화(MRI)는 추간판 질환 진행을 모니터링하는 데 일반적으로 사용되는 비침습성 진단이다. 통상, MRI는 조직내 수분 함량에 의존하고, 신호 강도는 물의 세로(T1) 및 가로(T2) 완화 시간에 의존한다. MR 영상은 조영제의 사용으로 증강될 수 있다. 본 실험에서 임플란트를 용이하게 모니터링할 수 있도록 하기 위해, 영상을 브라이트닝화하는 T1 MRI 조영제인 가돌리늄-DTPA(Gd³⁺-DTPA)를 펩티드 하이드로겔에 적재하였다. 이식된 NP 세포를 FITC 접합된 산화철 나노입자(IONDEX) 콘트라스트포어로 표지하였고, 이는 T2 가중 실험에서 더 어두운 영상을 생성한다(도 14b).

[0641]

처리 후 2개월째, 본 발명자들은 동물을 안락사시키고, 생체외 MRI를 위해 그의 척추를 수거하였다(도 14c). 건강한 NP의 수분 함량이 더 높고, 따라서, 관상 T1 슬라이스로부터 시각화되는 바와 같이, 밝은 신호를 나타낸다. 동일한 획득 파라미터에 대하여 하이드로겔로 처리된 손상된 추간판은 Gd³⁺-DTPA에 기인하여 더 밝게 나타난 반면, 비처리 추간판은 상대적으로 낮은 T1 콘트라스트를 보인다. 하이드로겔 처리된 표본에서 더 밝은 신호는 조영제가 누출되지 않았고, 따라서, NP 공간에 하이드로겔이 잔류한다는 것을 제안한다. 이를 통해서 환자에서 장기간 동안 하이드로겔을 모니터링하기 위해 진단용 영상화제를 도입할 수 있다는 것 또한 확인할 수 있다. 이러한 개념은 세포 증식 및 ECM 생산을 위해 생리활성 모이어티를 캡슐화하는 것을 포함하는 것으로 추론될 수 있다. 소분자 치료제, 진단제, 핵산 및 나노입자는 펩티드 용액으로 도입될 수 있다. 계내 겔화 후, 하이드로겔은 NP 재생을 자극하는 치료제의 지속적인 조절형 방출을 위한 저장소로서의 역할을 할 것이다.

[0642]

세포, 예컨대, MSC 및 도너 NP 세포는 조직 재생을 자극시키기 위해 공동 투여될 수 있다. 자가 조직성 또는 동종이계 MSC는 잠재적으로 더 많은 ECM을 분비하거나, 또는 NP 세포 분화되도록 천연 세포를 자극하는 인자를 분비할 수 있다. 건강한 도너 NP 세포는 퇴행된 NP를 잠재적으로 재증식시킬 수 있다³³. NP의 무혈관 성질에 기인하여, 이는 면역 특권을 가지고 있으며, 외래 조직 이식편은 우수한 내성을 띤다. 제2 실험적 처리는 표지된 (토끼) NP 세포와 함께 공동 투여된 펩티드 하이드로겔로 이루어진 세포 요법이었다. 대조군 추간판과 비교하였을 때 IONDEX 입자가 보이는 T2 콘트라스트는 처리된 NP에 표지된 세포가 존재한다는 것을 확인시켜 준다(도

14c). 본 발명자들의 실험을 통해 하이드로겔로 구현된 표지된 세포를 추적할 수 있는 잠재성이 입증된다. 2개의 추간판을 절개하였을 때, 세포를 도입한 하이드로겔로 처리된 추간판의 경우에 상당량의 NP 매스가 관찰되었다. 비교해 보면, 비처리 손상된 추간판은 육안상 어떤 NP 내용물도 가지고 있지 않은 반면, 하이드로겔 처리된 추간판의 내용물은 더 큰 유동성을 보였다. 이는 세포 요법이 NP 재생을 촉진시키는 데 있어서 더욱 효과적이었고, 하이드로겔이 도너 NP 세포의 생존가능성을 효과적으로 유지시킬 수 있다는 것을 제안하였다. 처리된 NP의 조직 단면을 조사하였을 때, 펩티드 하이드로겔 및 세포 요법 처리, 둘 모두 우수한 내성을 보였다. 어떤 유해한 세포 면역 반응도 관찰되지 않았고, 조직구는 존재하지 않았다. 모든 처리된 추간판의 경우, 주사된 펩티드 용액은 천연 ECM과 통합되었다(도 14d). 세포 요법을 받은 손상된 추간판의 경우, 2개월 경과 후, 희미하게 형광성을 띠는 세포를 관찰할 수 있었으며, 이는 이식된 세포가 생존한다는 것을 암시하는 것이다.

[0643] 리신 잔기를 포함하는 초단쇄의 펩티드의 염 증강 특성을 이용하여, 본 발명자들은 쉽게 제조되고, 멸균화되고, 투여될 수 있는 퇴행성 추간판 질환용의 주사 가능한 치료를 개발하게 되었다. 펩티드 용액은 임의의 결합을 채울 수 있고, 숙주 조직과 잘 통합하는 반점성 유체로서 주사될 수 있다. 겔화는 체온에서 또는 생리학적으로 완충된 식염수의 공동 주사에 의해 일어날 수 있다(그리고, 수분 이내에 완료될 수 있다). 생성된 나노섬유 하이드로겔은 안정적이고, 생체적합성이며, 공동 투여된 세포의 성장을 지지한다. 상기 주사 요법은 오늘날 진료소에서 이용가능한 외과용 대체물과 비교하였을 때 침습성이 현저히 더 낮고, 이는 잠재적으로는 수술의 필요성을 지연시키는 조기 단계의 중재적 치료법으로서 제공될 수 있다.

[0644] 펩티드가 부족함에도 불구하고, 하이드로겔은 퇴행된 추간판을 위한 임시 기계적 보조 장치를 제공할 수 있는 큰 기계적 스티프니스를 가진다. 추가로, 기계적 특성은 펩티드 서열, 농도 및 이온 환경을 조정함으로써 숙주 조직의 것과 매칭되도록 조정될 수 있다. 저장 탄성률이 1,000배만큼 조정될 수 있다고 고려해 볼 때, 상기 생체모방 하이드로겔은 다른 조직 유형에도 적용될 수 있다. 본 발명자들은 이식된/주사된 구성물 뿐만 아니라, 조직 재생을 촉진시키는 세포 및 다른 생리활성 시약의 모니터링을 용이하게 하기 위해 영상화용 조영제를 도입한다. 세포 부착, 증식, 및 분화는 소분자, 단쇄 펩티드 모티프, 사이토카인, 성장 인자 및 올리고뉴클레오타이드를 접합 또는 캡슐화함으로써 증진될 수 있다. 앞으로 나아가, 본 발명자들은 가교 결합(문헌 [Seow, W. Y. & Hauser, C. A. Adv Healthc Mater 2, 1219-1223, 2013]) 및 작용화(문헌 [Loo, Y., Zhang, S. & Hauser, C. A. Biotechnol Adv 30, 593-603, 2012]; [Wu, E. C., Zhang, S. G. & Hauser, C. A. E. Funct. Mater. 22, 456-468, 2012])를 통해 기계적 안정성을 증진시킬 수 있고, 생리활성 특성을 도입할 수 있다.

[0645] 자극 반응성 펩티드의 상기 하위부류는 약물 전달용 매트릭스에서부터 조직 공학용 생체모방 임플란트로부터, 줄기 세포용의 화학적으로 잘 정의된 합성 세포 배양용 기재로까지, 및 고속대량 스크리닝, 기관형 질환 모델 및 임플란트용의 바이오프린팅 다세포 구성물을 위한 펩티드 잉크로까지의 다양한 생체의학 적용을 위한 흥미로운 플랫폼 기술이다.

[0646] 본 명세서에서 앞서 공개된 문헌의 목록 또는 논의는 상기 문헌이 종래 기술 내용의 일부이거나, 또는 통상적인 일반 지식이라는 것을 인정하는 것으로 반드시 이해되어야 하는 것은 아니다. 열거된 모든 문헌은 그 전문이 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 포함된다.

[0647] 본원에 예시적으로 기술된 본 발명의 예시적인 실시양태는 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재하에서 적합하게 수행될 수 있다. 따라서, 예를 들어, "포함하는(comprising)," "비롯한(including)," "함유하는(containing)"이라는 용어 등은 제한 없이 광범위하게 판독되어야 한다. 추가로, 본원에서 사용된 용어 및 표현은 한정하는 것이 아니라, 기술하기 위한 용어로서 사용되었고, 제시되고, 기술된 특징을 나타내는 임의의 등가물 또는 그의 일부를 배제하는 용어 및 표현으로 사용하고자 하는 것이 아니며, 다양한 수정이 청구하는 본 발명의 범주내에서 가능한 것으로 이해된다. 따라서, 비록 본 발명이 예시적인 실시양태 및 임의적 특징에 의해 구체적으로 개시되기는 하였지만, 본원에 개시된 그 안에서 구현된 본 발명의 수정 및 변형은 당업자에 의존할 수 있으며, 상기와 같은 수정 및 변형은 본 발명의 범주내에 포함되는 것으로 간주된다는 것을 이해하여야 한다.

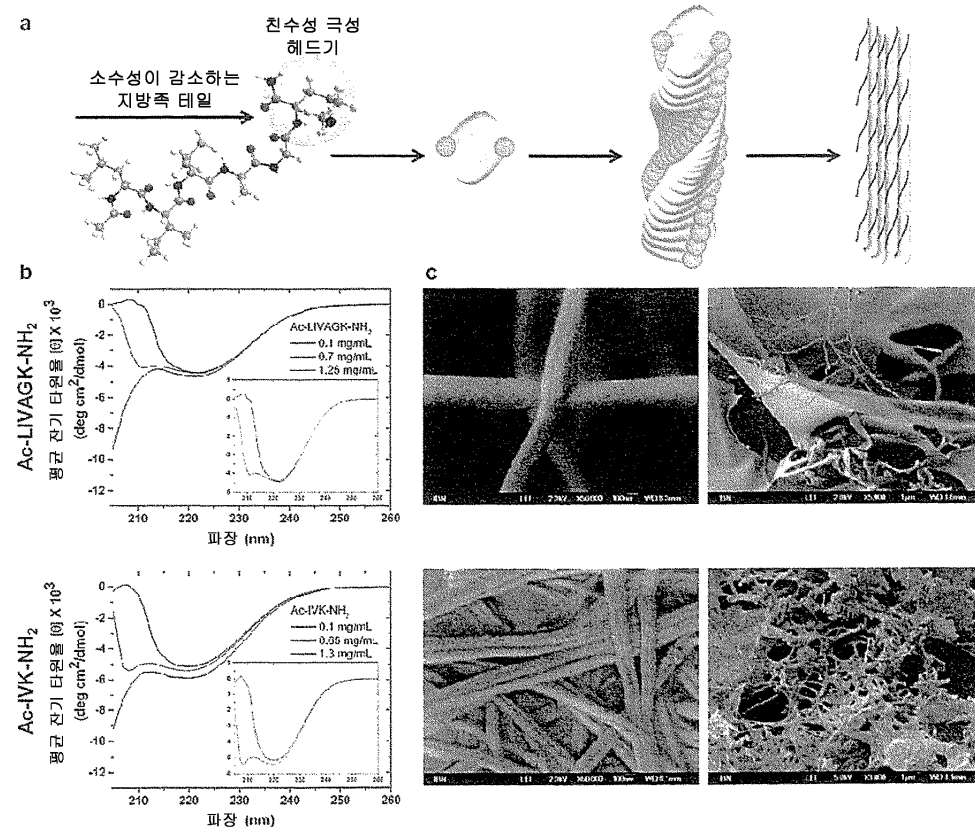
[0648] 본 발명은 본원에서 광범위하게 및 포괄적으로 기술되었다. 포괄적 개시내용에 포함되는 각각의 협의의 종 및 하위 군 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 삭제된 물질이 본원에서 구체적으로 언급되었는지 여부와 상관없이, 본 발명의 부류로부터 임의의 대상 물질을 소거한다는 것을 조건부로, 또는 그러한 부정적 한정하에 본 발명의 포괄적 기술내용을 포함한다.

[0649] 다른 실시양태도 하기 청구범위에 포함된다. 추가로, 본 발명의 특징 또는 측면이 마쿠쉬(Markush) 군에 기술된 경우, 당업자는 본 발명 또한 그에 의해 마쿠쉬 군을 이루는 임의의 개별 구성원 또는 구성원의 서브군에 의해

기술된다는 것을 이해할 것이다.

도면

도면1



- 극성 헤드리로서 산성 아미노산을 갖는 하위부류
- 낮은 pH에서의 자극 반응성 겔화
 - 아미드화 또는 에스테르화가 pH에 대한 민감성을 없애지만, 하이드로겔은 여전히 얻을 수 있다.

극성 헤드리로서 아미드화된 염기성 아미노산을 갖는 하위부류


- 생리학적 농도의 염(0.9% 식염수 및 PBS)의 존재 하에서의 자극 반응성 겔화

최소 겔화 농도		
펩티드	물	PBS
Ac-IK3-NH ₂	>30	10
Ac-IK6-NH ₂	10	3
Ac-LK6-NH ₂	15	6

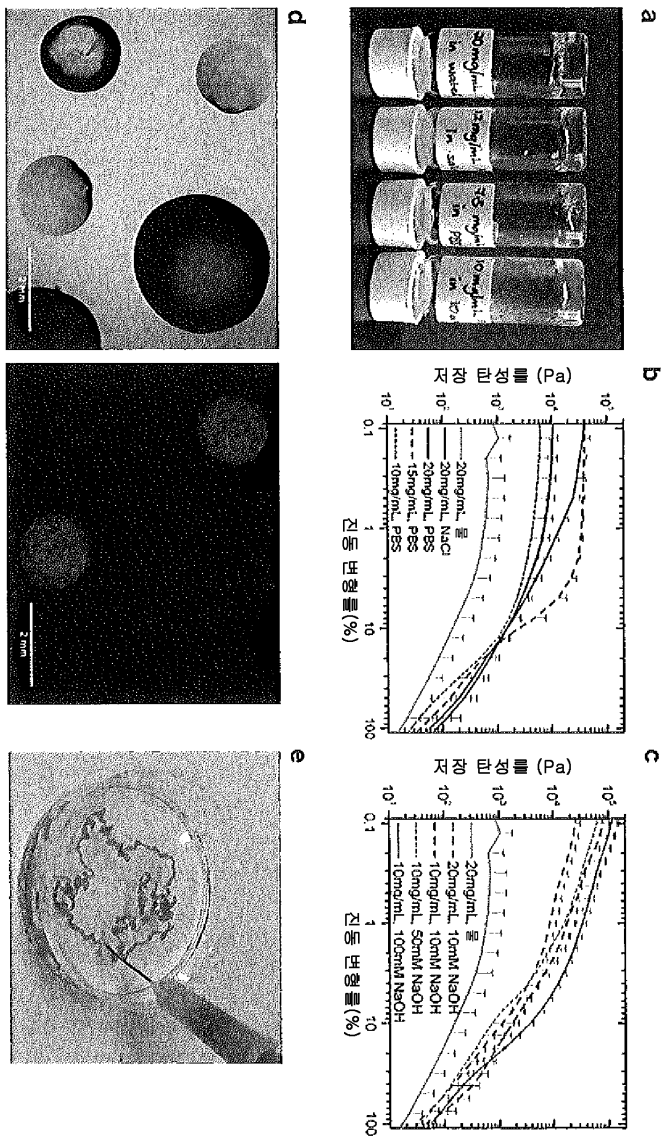
함성 아미노산에 의한 치환

- 지방족 아미노산 잔기의 서열이 겔화에 영향을 미친다:

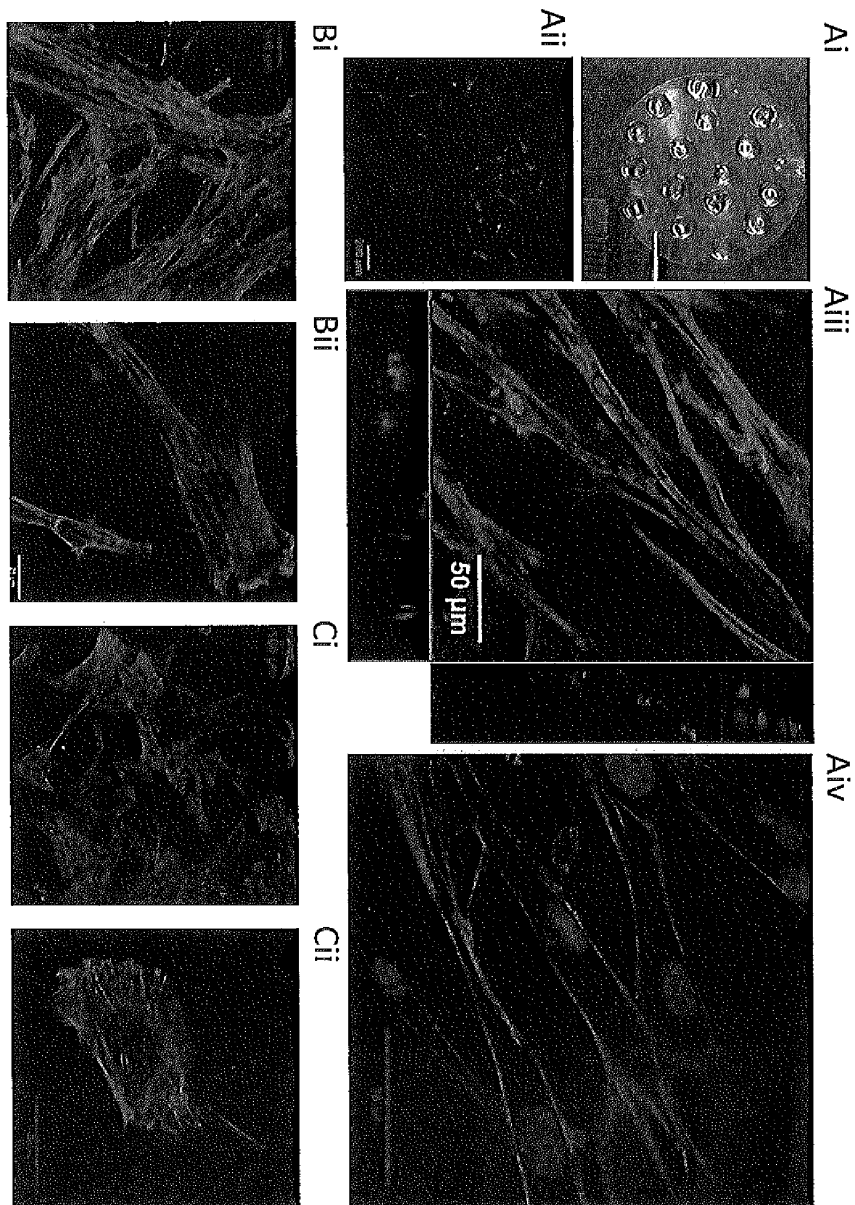
PBS 중 6량체의 최소 겔화 농도		
헤드리	I-시리즈	L-시리즈
L-리신	3	6
L-오르니틴	5	6
2,4-디아미노부티르산	5	6



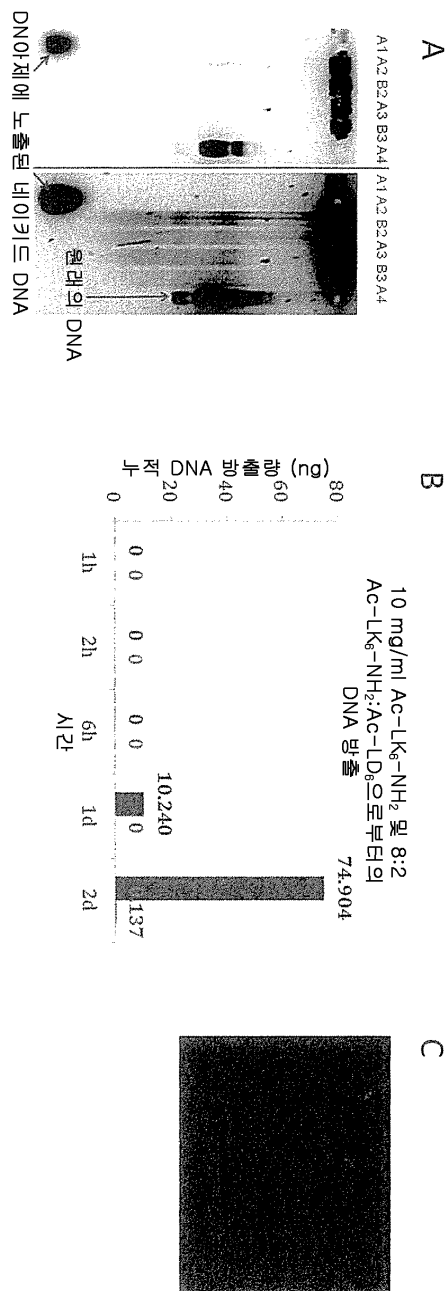
도면3



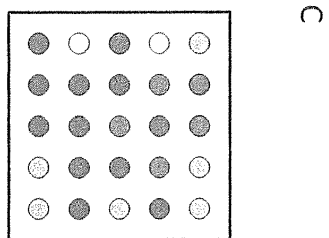
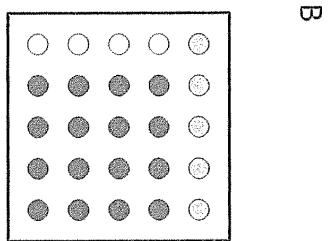
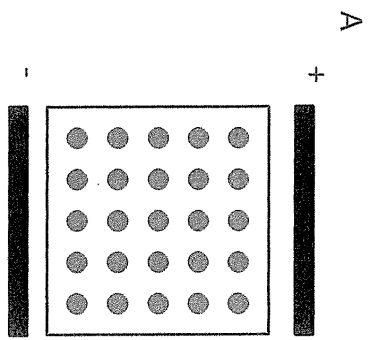
도면4



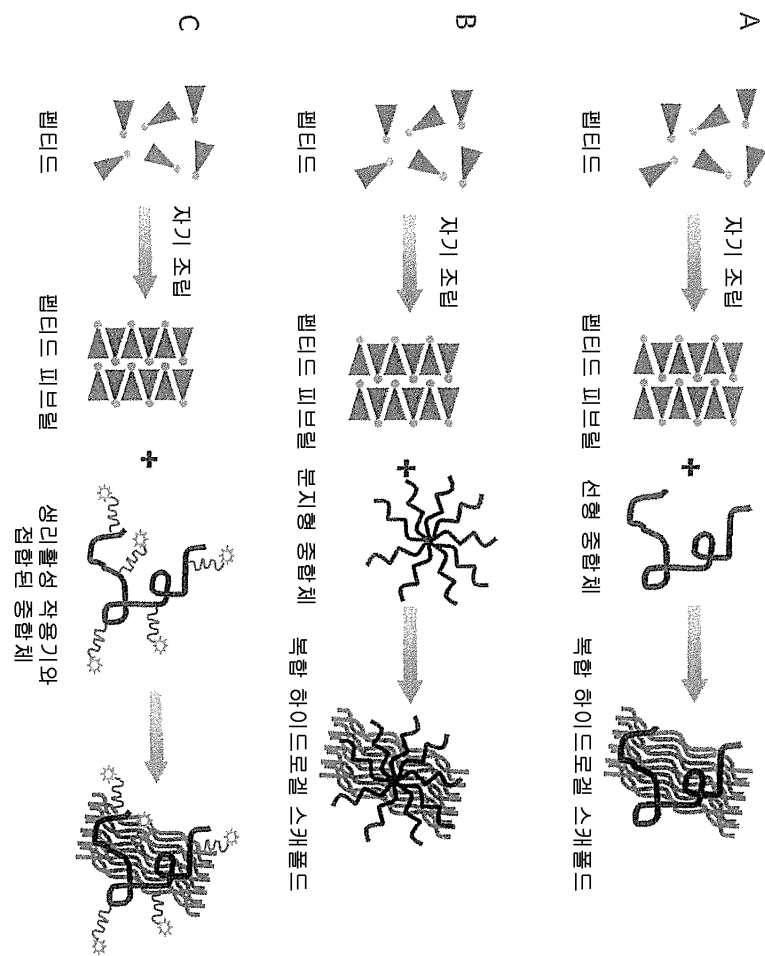
도면5



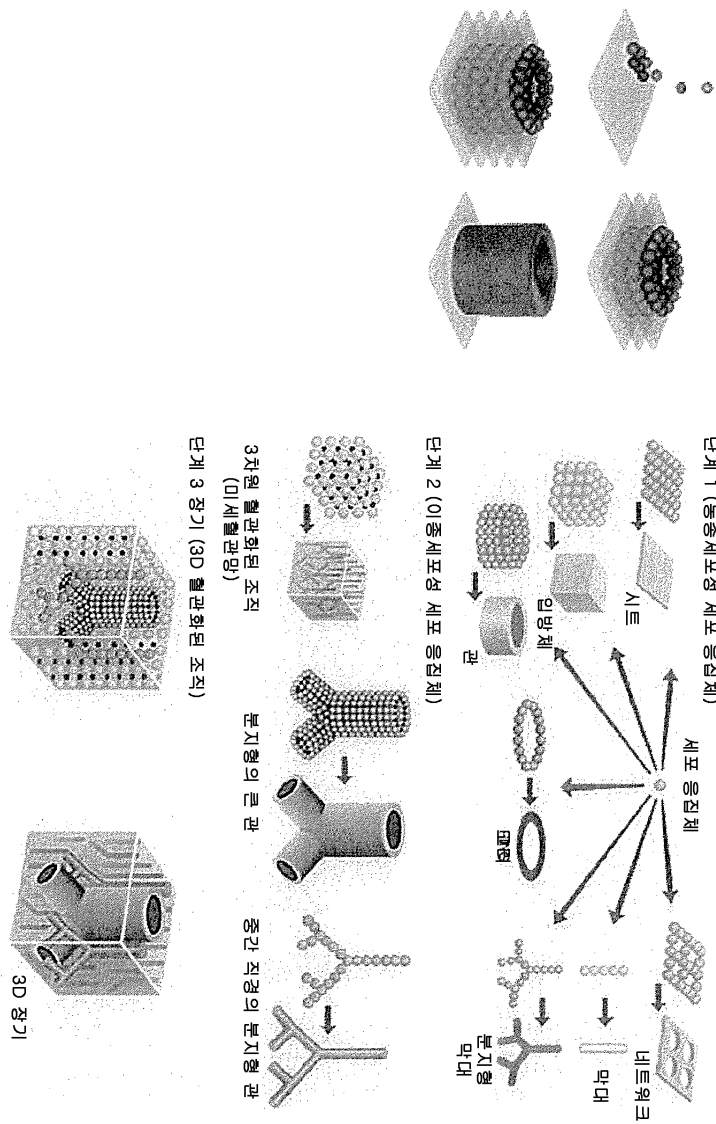
도면6



도면7



도면8



http://www.scllogs.com/metacognitive_oasis/3d-bioprinter/

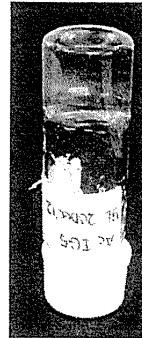
도면9

A

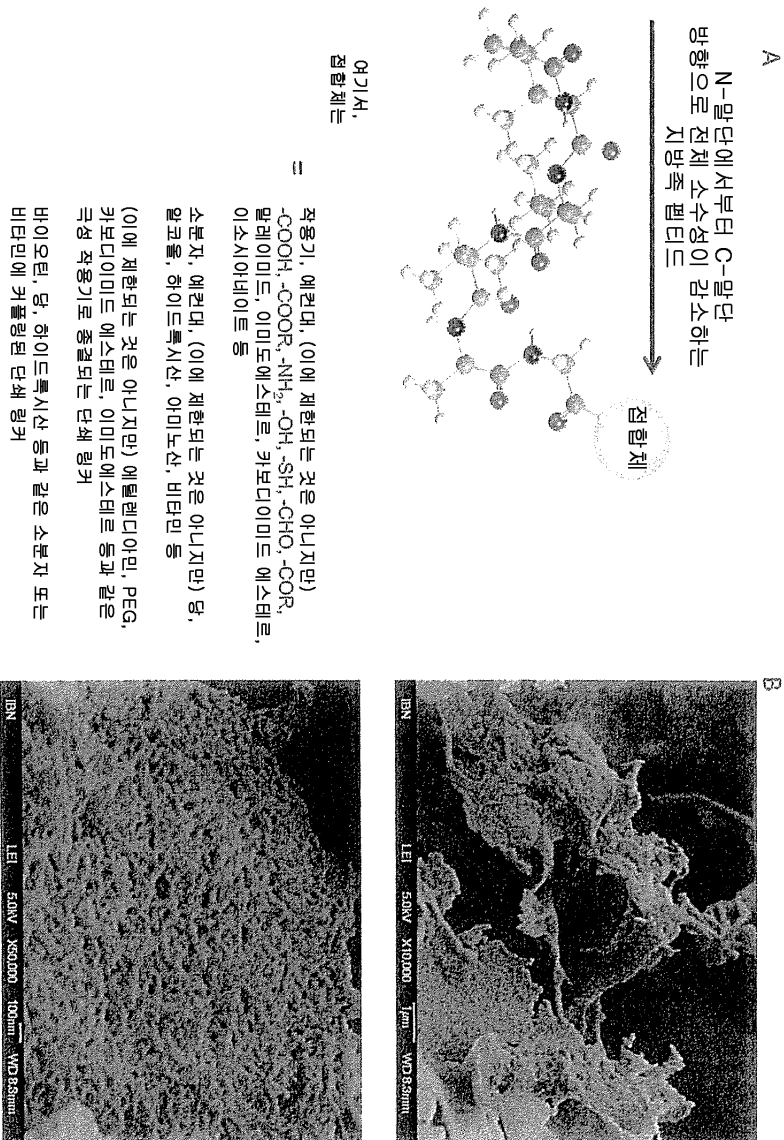


N-말단에서부터 C-말단 방향으로
전체 소수성이 감소하는 지방족 펩티드

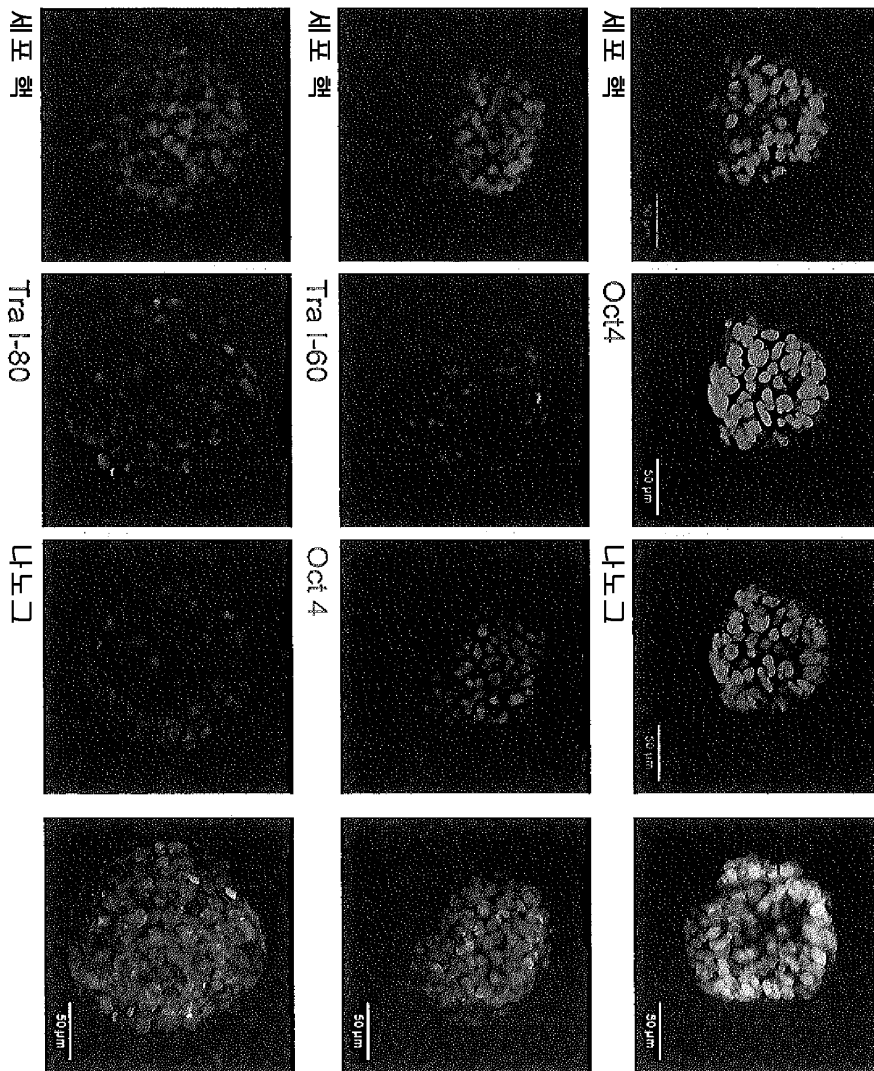
B



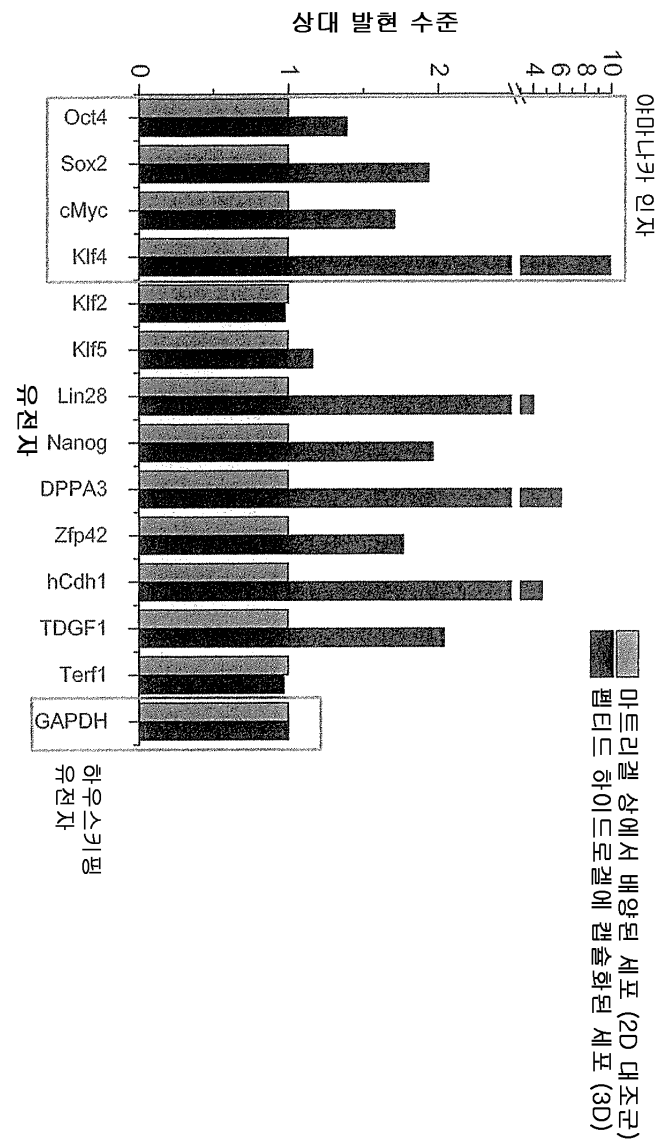
도면10



도면11a

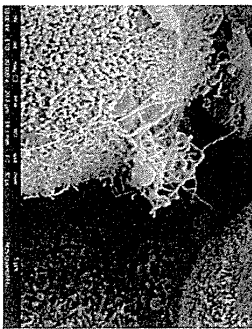
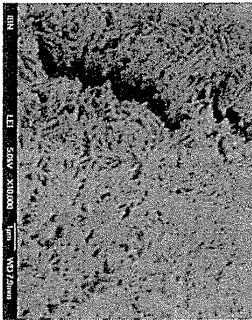
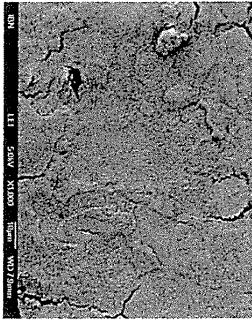


도면11b

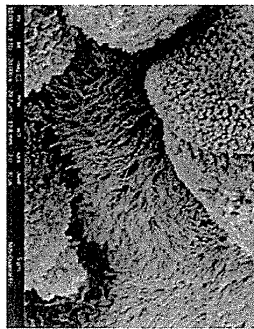
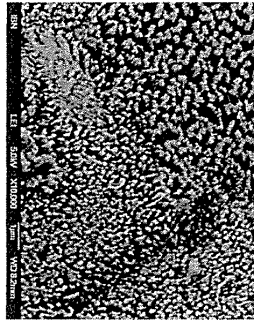
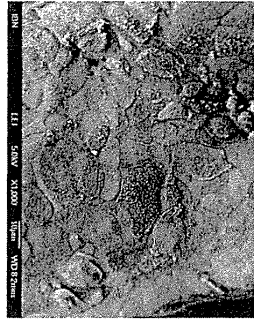


도면12a

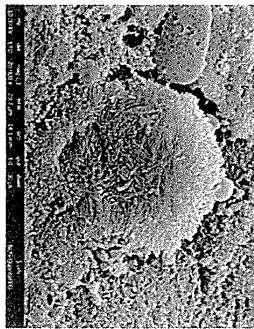
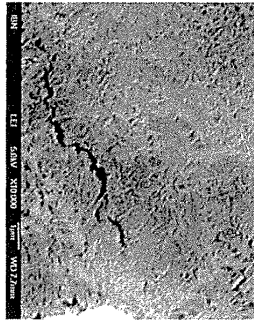
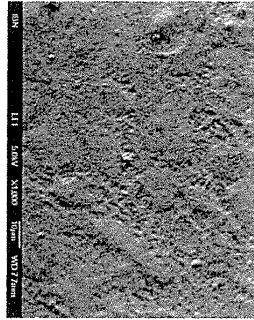
트랜스웰
막



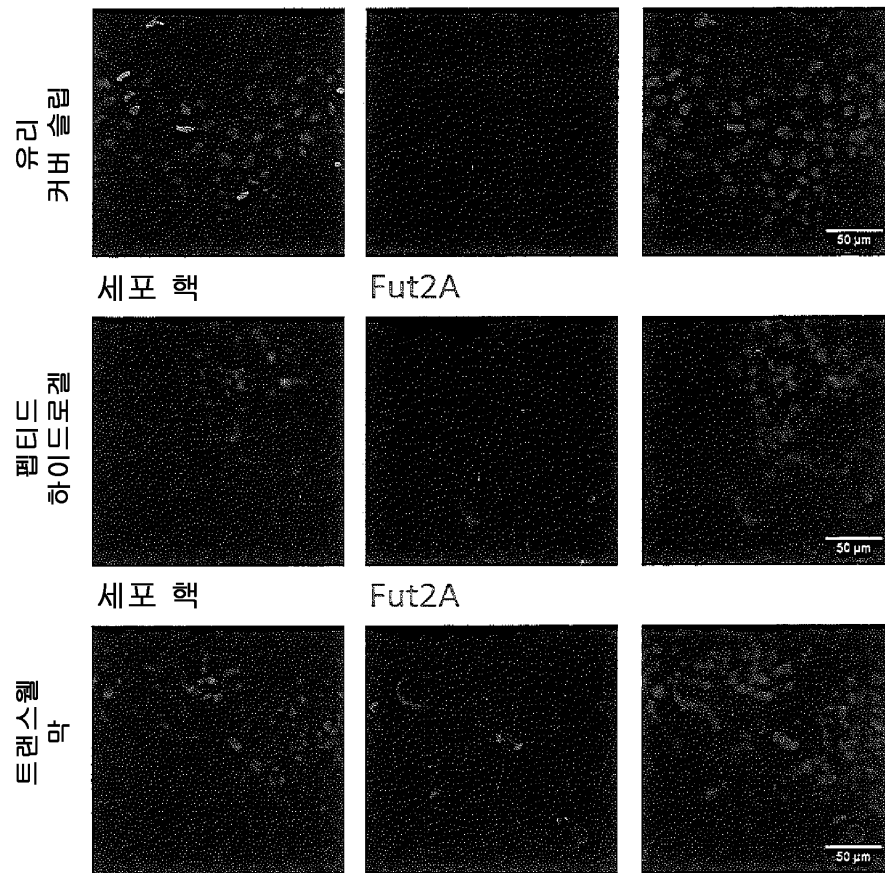
펩티드
하이드로겔



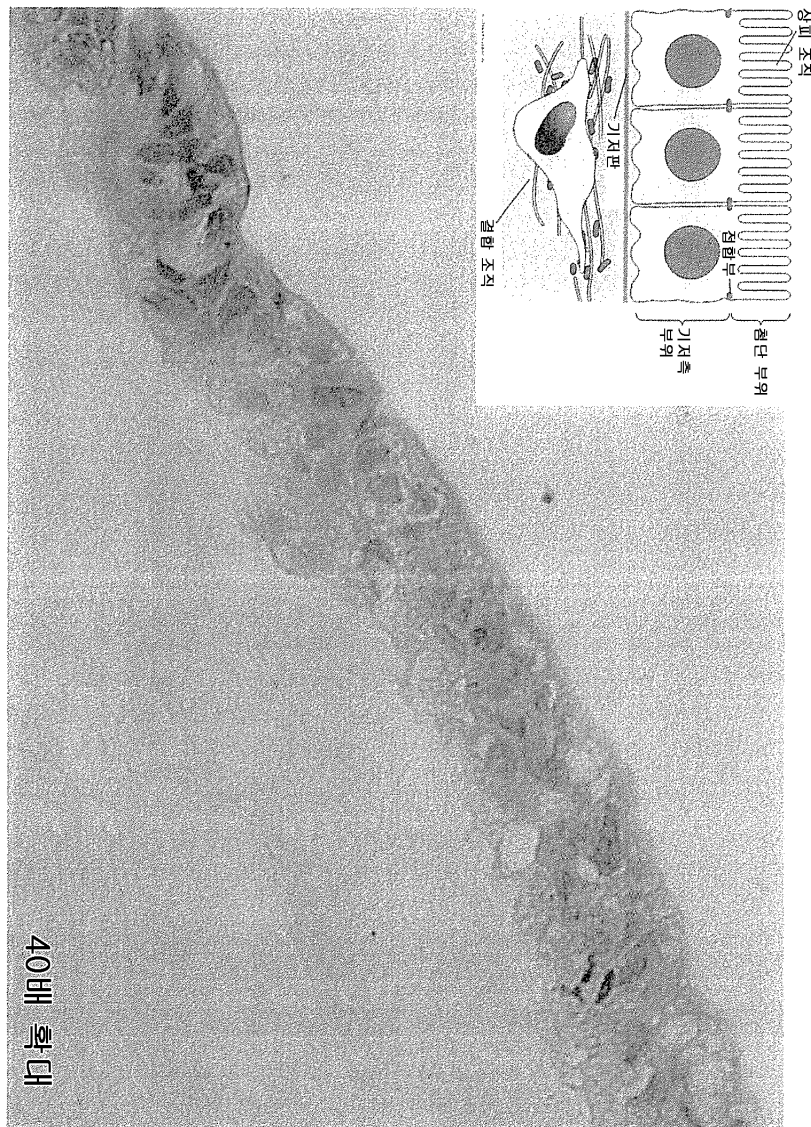
유리
커버 슬립



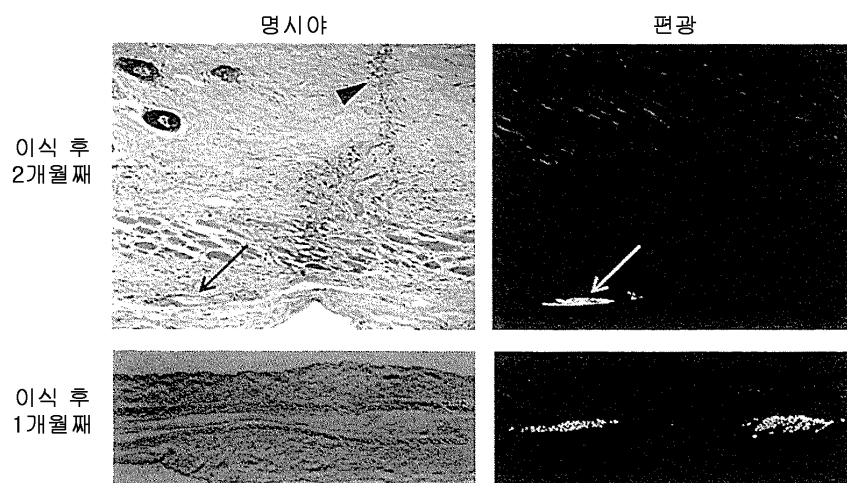
도면12b



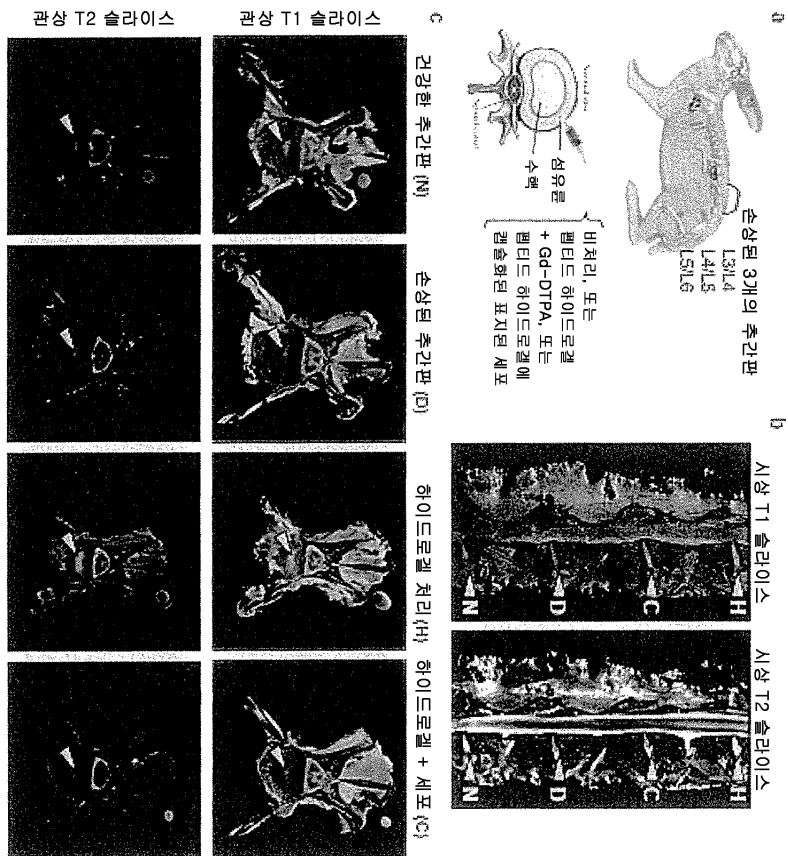
도면12c



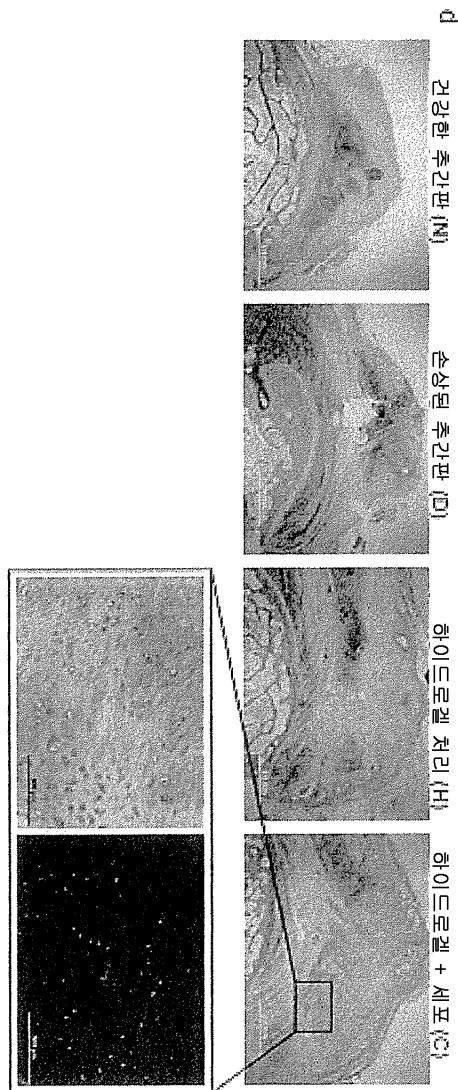
도면13



도면14a



도면14b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Agency for Science, Technology and Research
- <120> Self-assembling peptides, peptidomimetics and peptidic conjugates
as building blocks for biofabrication and printing
- <130> A32495W0
- <150> SG 201308891-9
- <151> 2013-11-29
- <160> 46
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 5

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aliphatic sequence
 <400> 1
 Leu Ile Val Ala Gly
 1 5
 <210> 2
 <211
 > 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aliphatic sequence
 <400> 2
 Ile Leu Val Ala Gly
 1 5
 <210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aliphatic sequence
 <400> 3
 Leu Ile Val Ala Ala
 1 5
 <210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aliphatic sequence
 <400> 4
 Leu Ala Val Ala Gly
 1 5
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> aliphatic sequence

<400> 5

Ala Ile Val Ala Gly

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 6

Gly Ile Val Ala Gly

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 7

Val Ile Val Ala Gly

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 8

Ala Leu Val Ala Gly

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 9

Gly Leu Val Ala Gly

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 10

Val Leu Val Ala Gly

1 5

<210> 11

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 11

Ile Val Ala Gly

1

<210> 12

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 12

Leu Ile Val Ala

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aliphatic sequence

<400> 13

Leu Ile Val Gly

1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 14

Leu Ile Val Ala Gly Asp

1 5

<210> 15

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 15

Ile Leu Val Ala Gly Asp

1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 16

Leu Ile Val Ala Ala Asp

1 5

<210> 17

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 17

Leu Ala Val Ala Gly Asp

1 5

<210> 18

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 18
 Ala Ile Val Ala Gly Asp

1 5
 <210> 19
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 19
 Leu Ile Val Ala Gly Glu

1 5
 <210> 20
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 20
 Leu Ile Val Ala Gly Lys

1 5
 <210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 21
 Ile Leu Val Ala Gly Lys

1 5
 <210> 22
 <211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 22

Leu Ile Val Ala Gly Thr

1 5

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 23

Ala Ile Val Ala Gly Thr

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 24

Ala Ile Val Ala Gly Lys

1 5

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 25

Leu Ile Val Ala Asp

1 5

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 26

Leu Ile Val Gly Asp

1 5

<210> 27

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 27

Ile Val Ala Asp

1

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> amphiphilic sequence

<400> 28

Ile Val Ala Lys

1

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 29

Ile Ile Ile Asp

1

<210> 30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence

<400> 30

Ile Ile Ile Lys

1

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Orn

<220><221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 31

Leu Ile Val Ala Xaa

1 5

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Orn

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 32

Ile Leu Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 33

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Orn

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 33

Ala Ile Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Dab

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 34

Leu Ile Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amphiphilic sequence with X = Dab

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 35

Ile Leu Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Dab

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 36

Ala Ile Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 37

<211> 6

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Dap

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 37

Leu Ile Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Dap

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 38

Ile Leu Val Ala Gly Xaa

1 5

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amphiphilic sequence with X = Dap

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(6)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 39

Ala Ile Val Ala Gly Xaa

1 5
 <210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 40
 Leu Ile Val Ala Gly Asp Asp

1 5
 <210> 41
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 41
 Leu Ile Val Ala Gly Glu Glu

1 5
 <210> 42
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 42
 Leu Ile Val Ala Gly Lys Cys

1 5
 <210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 43
 Leu Ile Val Ala Gly Ser

1 5
 <210> 44

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220
 ><223> amphiphilic sequence
 <400> 44
 Ile Leu Val Ala Gly Ser
 1 5
 <210> 45
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 45
 Ala Ile Val Ala Gly Ser
 1 5
 <210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> amphiphilic sequence
 <400> 46
 Ile Leu Val Ala Gly Thr
 1 5