



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0128411

(43) 공개일자 2015년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/06 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0055759

(22) 출원일자 2014년05월09일

심사청구일자 2014년05월09일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박용두

서울특별시 성북구 보국문로30길 15, 107동 202호 (정릉동, 정릉대우아파트)

이재연

서울특별시 중랑구 용마산로115길 127, 101동 2102호 (망우동, 한일써너스빌리젠시1단지)

송명진

서울특별시 도봉구 도봉로150가길 27, 퍼스티안 1304호 (방학동)

(74) 대리인

이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

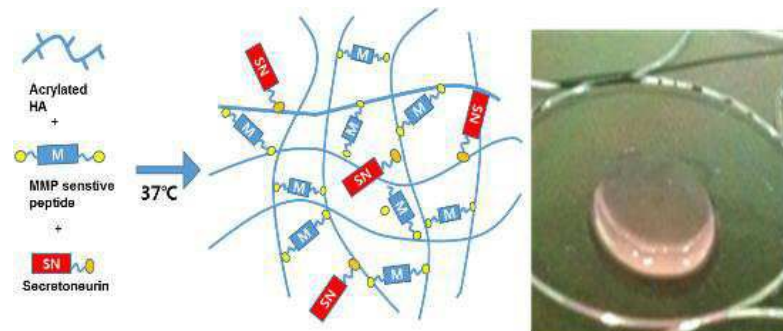
(54) 발명의 명칭 심근경색 재생을 위한 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 심근경색에서 심장 및 조직의 재생촉진을 위한 하이드로젤 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 아크릴화된 히알루론산에 고정화된 심장 조직 재생 촉진용 하이드로젤 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 혈관생성능을 갖는 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤이 체내에서 분해됨에 따라 세크레토뉴린 펩타이드가 서방출됨으로써, 세포의 활성을 자극하여 심근경색 재건에 사용가능한 조직재생용 조성물로 유용하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345198588

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 혈관생성인자/morphogen이 포함된 주사형 스마트 지지체의 개발 및 심근경색에의 적용

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2013.05.01 ~ 2014.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

다음 단계를 포함하는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법:

- (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및
- (b) 상기 혼합물을 젤화시켜 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화된 하이드로젤을 제조하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 가교제는 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline) 펩타이드, MMP(matrix metalloprotease)에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 아크릴화된 히알루론산에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (a)단계에서 PEG(poly ethylene glycol)를 추가로 혼합하는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화되어 있는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤.

청구항 6

제5항의 하이드로젤을 유효성분으로 함유하는 심장조직 재생촉진용 조성물.

청구항 7

다음 단계를 포함하는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법:

- (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및
- (b) 상기 혼합물에 줄기세포를 추가로 혼합한 다음, 젤화시켜 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린과 줄기세포가 고정화된 하이드로젤을 제조하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서, 가교제는 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline) 펩타이드, MMP(matrix metalloprotease)에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린과 줄기세포가 아크릴화된 히알루론산에 공유결합되어 있는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 (a)단계에서 PEG(polyethyleneglycol)를 추가로 혼합하는 것을 특징으로 하는 하이드로젤의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 심근경색에서 심장 및 조직의 재생촉진을 위한 하이드로젤 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 아크릴화된 히알루론산에 고정화된 심장 조직 재생 촉진용 하이드로젤 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

조직공학 및 재생의학의 목표는 치료 물질인 세포 및 성장인자들의 적절한 전달을 통하여 손상된 조직과 재생을 복원하는데 있다. 또한 조직 재건은 작고 단순한 조직의 재건 및 재생이 아니라, 크고 복잡한 조직에서 손상이 가해졌을 때 그것을 치료하기 위한 기술을 목표로 하고 있다. 특히 급성, 아급성의 심근경색의 경우 줄기세포 혹은 성장인자를 처리하여, 전임상 및 임상에서 개선 효과를 얻었으나, 리모델링이 완료된 만성 심근경색에서는 줄기세포 및 성장인자의 치유 효과 및 재생능이 미미해 이에 대한 새로운 물질의 탐색 및 이를 이용한 심근경색 치료법이 요구되고 있다.

[0003]

생체 조직 및 기관의 발달과정을 보면, 조직에 있어 필요한 혈관의 경우 혈관의 생성은 신경의 생성과 같이 발생하며, 신경 형성과 혈관형성은 복잡한 조직을 발달과정에서 만들거나 조직 손상과정에서 재생하는데 중요한 역할을 한다. 세크레토뉴린(secretoneurin) 펩타이드는 현재까지 신경세포의 이동 및 활성을 촉진하는 물질로 알려져 왔지만, 최근 들어 이 단백질이 혈관형성을 촉진하는 기능이 있는 것으로 확인되었다 (Circulation, 109:777-783, 2004).

[0004]

줄기세포의 생착률 및 분화조절능을 생체 내에서 극대화시키기 위해 지지체를 이용한 다양한 방법이 개발되고 있다. 조직은 다양한 세포가 복잡한 조직체를 이루고 있는 일종의 시스템이다. 따라서 특정 조직을 재생하는데 있어 이상적인 조직의 형태나 세포 구성 등이 존재하며 지지체는 이러한 세포의 융합된 조직체를 이루는데 일종의 틀 역할을 수행한다. 또한 손상된 조직은 비정형의 손상 형태를 갖고 있기 때문에 단순히 세포를 주입하는 것만으로 손상 부위를 재생하는 데는 한계가 있다. 예컨대, 화상 환자의 병변은 세포 수준에서 보았을 때 광범위하며 이를 세포만으로 치료하기에는 적용할 수 있는 세포의 수라든지 세포의 병변 내 고정화와 생존, 증식에 있어서 제한 요소가 될 수 있고, 치료 효과도 미미할 것이다. 따라서 효과적인 조직재생을 위하여 세포들이 안착하여 생존하고, 증식할 수 있는 구조적 지지체가 필수적이다.

[0005]

지지체는 현재 단순히 세포 및 성장인자를 전달하는 기능인 1세대의 물질 개발에서, 생물학적으로 활성이 있는 물질을 포함시켜 능동적으로 생체 내에서 조직재생을 돕는 2세대 3세대 물질이 개발되고 있다. 특히, 최근에는 지지체중의 하나인 하이드로젤에 다양한 펩타이드 및 성장인자를 포함시켜, 하이드로젤의 분해되는 속도에 따라 성장인자의 서방출을 유도하고, 이에 따른 조직의 재건능을 증대시키는데 이용되어 왔다(한국특허 제1,110,317

호). 효과적인 조직 재생을 위해서는 손상된 조직에 혈관이 생성되어야 하는데, VEGF(Vascular endothelial growth factor), FGF(Fibroblast growth factor), PDGF(Platelet-derived growth factor) 이나 EGF(Epidermal growth factor) 등의 다양한 성장인자를 포함시켜 혈관생성을 촉진시키는 기술들이 개발되어, 급성 또는 아급성 심근경색에서 개선의 효과를 볼 수 있었다(*PLoS One.*, 7;4(10):7325, 2009). 하지만 만성심근경색 모델에서는 전임상 실험에서조차 뚜렷한 효과를 입증하는 기술들은 없었다. 만성심근경색 모델의 경우 약화조성물이 서방출 되는 시스템에서도, 단순한 성장인자가 아닌 혈관 및 신경의 생성을 동시에 촉진시키는 펩타이드의 전달 및 지지체에 의한 서방출 시스템에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0006]

이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 노력한 결과, 혈관생성능을 갖는 펩타이드인 세크레토뉴린이 고정화된 하이드로젤을 이용하여 다른 성장인자 없이 지지체와 결합된 펩타이드만으로도 만성심근경색에서 심장 및 조직의 재생이 촉진되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

본 발명의 목적은 혈관생성능을 갖는 펩타이드인 세크레토뉴린이 고정화된 심장조직 재생촉진용 하이드로젤 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008]

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물을 젤화시켜, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화된 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조하는 단계를 포함하는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.

[0009]

본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제조된, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화되어 있는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤 및 상기 하이드로젤을 유효성분으로 함유하는 심장조직 재생촉진용 조성물을 제공한다.

[0010]

본 발명은 또한, (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물에 줄기세포를 추가로 혼합한 다음, 젤화시켜 C' 말단에 세크레토뉴린과 줄기세포가 고정화된 하이드로젤의 제조하는 단계를 포함하는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011]

본 발명에 따르면, 혈관생성능을 갖는 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤이 체내에서 분해됨에 따라 세크레토뉴린 펩타이드가 서방출됨으로써, 세포의 활성을 자극하여 심근경색 재건에 사용가능한 조직재생용 조성물로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 개발된 펩타이드를 포함한 지지체의 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 펩타이드가 고정된 하이드로젤 내에서의 세포의 모양을 현미경사진으로 관찰한 결과이다. Control(a), Secretoneurin(b)

도 3은 펩타이드의 신혈관생성을 평가하기 위해 sprouting assay 한 후 형광염색한 결과이다. Control(a), Secretoneurin(b)

도 4는 형광염색 결과를 바탕으로 sprout 된 개수를 정량화한 결과이다. Control(a), Secretoneurin(b)

도 5는 형광염색 결과를 image J 이용해 sprouting 길이를 측정하여 정량화한 결과이다. Control(a),

Secretoneurin(b)

도 6은 펩타이드가 고정된 하이드로젤 내에서의 세포의 혈관분화를 확인하기 위해 RT-PCR 실시하고 정량화한 결과이다. Control(a), Secretoneurin(b)

도 7은 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 일회심박출량 (Stroke volume, SV) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 심박출량 (Cardiac output, CO) 측정 결과를 나타낸 것이다.

도 9은 마손트리크롬염색 (Masson's Trichrom)에 의한 각 군의 좌심실 형태를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0014] 본 발명의 일 관점에서, (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물을 젤화시켜, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화된 심장 조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조하는 단계를 포함하는 심장 조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 제조된 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 고정화되어 있는 심장 조직 재생촉진용 하이드로젤 및 상기 하이드로젤을 유효성분으로 함유하는 심장 조직 재생촉진용 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명에 있어서 세크레토뉴린은 4생체 내에 존재하는 아주 작은 크기의 단백질로서 신경활성 및 혈관생성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 세크레토뉴린은 주입 시 시스테인에 의해 지지체에 결합되어 있지만, 지지체가 체내에서 MMP에 의해 분해됨에 따라 서방출되어 심근재건에 필요한 혈관 조성을 증대시키는 역할을 하는 것을 확인하였다.
- [0017] 본 발명에 있어서 하이드로젤이란 약물전달체계, 생체 조직적 합성재료 등 의료용 재료로 사용 가능한 수팽윤성 고분자로 친수성고분자를 의미하며, 본 발명에서는 히알루론산(hyaluronic acid, HA) 하이드로젤을 사용하였다.
- [0018] 본 발명에 있어서 가교제는 티로신 베타-4 유래 Ac-SDKP (N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline) 펩타이드, MMP(matrix metalloprotease)에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하며, 그 중 MMP에 의해 절단 가능한 것을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0019] 본 발명에 있어서 MMP(matrix metalloprotease)는 세포외 기질을 용해하는 효소를 의미하는 것이다. 상기의 히알루론산 기반의 하이드로젤은 생분해 가능한 가교제로써 MMP를 포함하며, 완충용액 혼합물을 37℃에서 30분간 노출시키면 고체형 하이드로젤이 만들어지므로 주사형 지지체로 만들 수 있는 특징이 있다.
- [0020] 또한, 본 발명에 있어서 하이드로젤은 PEG(poly ethylene glycol)를 더 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 PEG는 가교제로 사용하였으며, 사용한 PEG의 티올기와 생체내 환경 (pH 8, 37℃)에서 Michael type addition 반응에 의해 10분 이내에 젤이 만들어지므로 주사형 지지체로 만들 수 있다. 주사형 지지체는 약물이 손상조직에 천천히 방출되도록 속도를 조절함으로써 약물의 농도를 오랫동안 치료 부위에 유지시킬 수 있으며 국소적으로 약물을 환부에 전달시킬 수 있는 특징이 있다.
- [0021] 본 발명에서 히알루론산 기반의 하이드로젤은 아크릴화(Acrylate)된 것을 특징으로 할 수 있으며, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 아크릴화된 히알루론산에 공유결합되어 형성되는 것이 바람직하다. 더욱 자세히 하기는 하이드로젤의 아크릴(Acryl)기와 하이드로젤에 고정화된 합성 펩타이드의 C' 말단에 결합된 시스테인 아미노산의 SH기가 아마이드 결합되어 형성되는 특징이 있다.
- [0022] 본 발명의 일 제조예에서, 아크릴화된 히알루론산에 가교제로 생분해 가능한 MMP sensitive 펩타이드와 세크레토뉴린 펩타이드를 혼합물을 37℃에서 30분간 노출시켜, 합성 펩타이드가 고정된 고체형 하이드로젤을 제조하였다(도 1).
- [0023] 본 발명의 일 실시예에서, 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 내에서 체대혈 유래 중간엽 줄기세포

(CB-MSCs) 배양 실험을 진행한 결과, 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되어 있지 않은 하이드로젤 그룹에서는 줄기세포 배양이 미미했으나, 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 그룹에서는 7일째부터 작은 군집을 형성하기 시작하여 14일째 네트워크를 형성하는 것이 확인되었다.

[0024] 본 발명의 다른 실시예에서, 세크레토뉴린 펩타이드의 신생혈관생성 능력을 sprouting assay를 통해 평가한 결과, 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되지 않은 그룹에 비해 세크레토뉴린 펩타이드가 함유된 그룹에서 sprouting 개수와 길이가 많은 것으로 나타나, 세크레토뉴린이 신생혈관생성(angiogenesis)에 영향을 주는 것으로 확인되었다.

[0025] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 내에서도 CB-MSCs가 혈관세포 계열로의 분화 실험한 결과, 혈관세포 관련 유전자 모두 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되지 않은 하이드로젤 그룹에 비해 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 그룹에서 2배정도 높게 발현되는 것으로 확인되었다.

[0026] 본 발명의 다른 제조예에서, 마취된 6주령 Sprague-dawley 수컷의 좌측 가슴 부분에 개흉을 실시하여 관상동맥의 한 부분인 2~3mm 좌전하행지 (lift anterior descending, LAD) 말단부분을 7-0 폴리프로필렌 봉합사로 묶어, 좌심실에 색변화가 일어나는 것을 관찰하여 심근경색이 만들어졌음을 확인하였다.

[0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 심근경색 모델 동물의 심장기능 분석 실험을 진행한 결과, 히알루론산 기반의 하이드로젤만으로는 심장기능 회복에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타난 반면, 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되지 않은 하이드로젤 그룹에서 유의적으로 기능이 개선되었음을 확인하였다.

[0028] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤을 이용한 생체내 조직재생 실험을 진행한 결과, 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되지 않은 그룹에 비해 세크레토뉴린 펩타이드를 포함하는 그룹에서 심근의 두께가 두꺼워졌음을 확인하였다.

[0029] 본 발명의 또 다른 관점에서, (a) 아크릴화된 히알루론산, C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린 및 가교제를 혼합하는 단계; 및 (b) 상기 혼합물에 줄기세포를 추가로 혼합한 다음, 젤화시켜 C' 말단에 세크레토뉴린과 줄기세포가 고정화된 하이드로젤의 제조하는 단계를 포함하는 심장조직 재생촉진용 하이드로젤의 제조방법에 관한 것이다.

[0030] 0.25 mmole로 용해된 히알루론산 (Lifecore Biomedical Co., Chaska, MN, USA)에 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (0.24 g, 1.25 mmole)와 HOBT(1-hydroxybenzotriazole hydrate) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (0.17 g, 1.25 mmole)을 반응 한 후, ADH(adipic acid dihydrazide) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (2.2g, 12.5 mmole)을 넣고 2시간 동안 반응하였다.

[0031] 상기 제조된 반응물은 100 mM의 NaCl과 증류수에서 각 1일씩 투석과정을 거친 후, 투석시킨 결과물에 formamide 40ml에 녹인 NAN 0.5g (N-Acryloxysuccinimide) (Polyscience, Inc, Warrington, PA, USA) (0.5 g, 3 mmole)을 첨가하여 12시간 동안 반응 하였다. 이 후, 다시 한 번 투석 과정을 실시해 주고 최종적으로 남은 반응물을 3일 동안 동결건조 하였다.

[0032] 이렇게 얻어진 아크릴화 된 히알루론산에 완충용액(TEA; 0.3 M, pH 8)에 넣고 용해시킨 후, 가교제로 생분해 가능한 MMP (matrix metalloprotease) sensitive 펩타이드를 넣어주고 세크레토뉴린 펩타이드 역시 TEA용액에 녹여 섞어주면 하이드로젤의 위한 액체상태의 혼합물(mixture)을 얻을 수 있다.

[0033] 이 혼합물을 37℃에서 30분간 노출시켜주면 펩타이드가 고정된 고체형 하이드로젤을 제조할 수 있다(도 1).

[0034] 본 발명에 있어서 줄기세포는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(CB-MSCs: cord blood mesenchymal stem cells) 또는 지방유래 중간엽 줄기세포를 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기의 줄기세포와 C' 말단에 시스테인을 가지는 세크레토뉴린이 심장조직 재생촉진용 하이드로젤에 고정화되어 있는 것을 특징으로 한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 조직재생용 약학적 조성물은 통상적으로 사용되는 생체조직재생 기능을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 상기 조직재생은 심장재생인 것을 의미한다.

[0036] 본 발명의 조성물은 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들은 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거

나 경구 투여될 수 있으며, 바람직하게는 주사제로 제조되는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 치료용 약제는 1일 0.1~1000mg으로, 더욱 바람직하게는 성인기준 1일 0.1 ~ 100 mg이 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0039] 제조예 1: 합성 펩타이드(세크레토뉴린 함유)가 고정화된 하이드로젤의 제조

[0040] 0.25 mmole로 용해된 히알루론산 (Lifecore Biomedical Co., Chaska, MN, USA)에 EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (0.24 g, 1.25 mmole)와 HOBT(1-hydroxybenzotriazole hydrate) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (0.17 g, 1.25 mmole)을 반응 한 후, ADH(adipic acid dihydrazide) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (2.2g, 12.5 mmole)을 넣고 2시간 동안 반응하였다.

[0041] 상기 제조된 반응물은 100 mM의 NaCl과 증류수에서 각 1일씩 투석과정을 거친 후, 투석시킨 결과물에 formamide 40ml에 녹인 NAN 0.5g (N-Acryloxysuccinimide) (Polyscience, Inc, Warrington, PA, USA) (0.5 g, 3 mmole)을 첨가하여 12시간 동안 반응 하였다. 이 후, 다시 한 번 투석 과정을 실시해 주고 최종적으로 남은 반응물을 3일 동안 동결건조 하였다.

[0042] 이렇게 얻어진 아크릴화 된 히알루론산에 완충용액(TEA; 0.3 M, pH 8)에 넣고 용해시킨 후, 가교제로 생분해 가능한 MMP (matrix metalloprotease) sensitive 펩타이드를 넣어주고 세크레토뉴린 펩타이드 역시 TEA용액에 녹여 섞어주면 하이드로젤의 위한 액체상태의 혼합물(mixture)을 얻을 수 있다.

[0043] 이 혼합물을 37℃에서 30분간 노출시켜주면 펩타이드가 고정된 고체형 하이드로젤을 제조할 수 있다(도 1).

[0044] 실시예 1: 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 내에서 줄기세포 실험

[0045] 제조 1의 과정을 통해 얻은 액체상태의 혼합물(mixture)에 제대혈 유래 중간엽 줄기세포(CB-MSCs: cord blood mesenchymal stem cells)를 5×10^5 /50ml 로 섞어 37℃ 에서 30분간 젤화하였다. CB-MSCs가 포함된 하이드로젤이 형성되는 것을 확인한 후, DMEM과 EGM-2가 1:1로 섞여있는 배양배지를 넣고 37℃, 5% CO₂조건하의 인큐베이터 안에서 14일간 배양하였다. 7일째와 14일째 현미경을 통해 세포를 관찰한 결과이다.

[0046] 현미경 관찰 결과, 펩타이드가 들어있지 않은 하이드로젤 그룹 CON(a)에서는 하이드로젤 내에서 CB-MSCs가 잘 뻗어나가지 않는 것에 비해 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 그룹 SN(b)에서는 CB-MSCs가 7일째부터 작은 군집을 형성하기 시작해 14일째 되면 군집끼리 네트워크를 형성하는 것으로 확인되었다(도 2).

[0047] 실시예 2: 세크레토뉴린 펩타이드의 신생혈관생성(angiogenesis) 능력 평가

[0048] 모든 data는 평균과 표준오차 (mean $\pm$ standard deviation (SD))이며, 데이터 분석은 OriginPro 7.5 (OriginLab Co., Northampton, MA, USA)을 사용하여 수행하였다. 두 그룹 사이의 비교분석은 스튜던트 t-test를 이용하여 수행하였다. $P < 0.05$ 를 유의한 차이가 있는 값으로 해석하였다.

[0049] Neuropeptide로 알려진 세크레토뉴린이 신생혈관생성(angiogenesis) 능력이 있는지를 평가해 보기 위해 sprouting assay를 실시하였다. Hangin drop 방법을 이용하여 CB-MSCs를 spheroid로 만들고 2mg/ml의 농도로 만들어진 콜라겐 젤 안에 넣었다. 이 후, 0.6mg/ml 농도로 secretoneurin을 DMEM에 녹여 spheroid가 포함된 콜라겐 젤 위에 넣어주고 16시간 배양했다. 16시간동안 sprouting 된 CB-MSCs spheroid를 calcein AM으로 염색하고 현미경 하에서 sprouting 개수를 확인하고 imageJ 프로그램으로 sprouting 길이를 측정하였다.

[0050] 세크레토뉴린 펩타이드가 함유되지 않은 그룹 CON(a)에 비해 세크레토뉴린 펩타이드가 함유된 그룹 SN(b)에서 sprouting 개수와 길이가 많은 것으로 나타나, 세크레토뉴린이 신생혈관생성(angiogenesis)에 영향을 주는 것으로 확인되었다(도 3, 4, 5).

[0051] **실시예 3: 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 내에서 줄기세포의 분화 평가**

[0052] 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 내에서도 CB-MSCs가 혈관세포 계열로 분화하는지를 평가하기 위하여, 실시예 1 에서 14일간 배양된 CB-MSCs를 가지고 Real-time PCR을 실시하였다. 유전자 발현 분석을 위해 TRIzol(Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 정량화한 RNA는 PrimeScriptTM RTreagentKit (TaKaRa, Dalian, China)을 이용하여 제조사의 지침서에 따라 template cDNA을 합성해 주었다. 각각의 real-time PCR 반응은 합성된 cDNA 2mL와 특정 유전자 프라이머를 포함한 SYBR premix Ex TaqTM (TaKaRa, Dalian, China) 20mL을 applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System을 이용해 증폭시켰고, 특정 유전자의 상대적인 양은 제조사의 추천에 따라 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법을 통하여 측정하여, 베타-액틴에 대한 비율로 정상화 하였다. 본 발명에 사용된 프라이머는 다음 표 1과 같다.

표 1

[0053] 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 내의 줄기세포 분화 실험에 사용된 프라이머

유전자		서열
vwf	서열번호 1	F 5' -CCAGCTTCTGAAGAGCACCT-3'
	서열번호 2	R 5' -GTACAGCACCATTCCTCCT-3'
CD105	서열번호 3	F 5' -ATTGGAAGTGCACCATCACG-3'
	서열번호 4	R 5' -ATGCCACAGCTGGAGTAAGG-3'
a-SMA	서열번호 5	F 5' -CCTATCCCCGGGACTAAGAC-3'
	서열번호 6	R 5' -AGGCAGTGTCTCTCTTCT-3'
b-actin	서열번호 7	F 5' -ATTGGCAATGAGCGGTC-3'
	서열번호 8	R 5' -GGATGCCACAGGACTCCAT-3'

[0054] 도 6에 나타난 바와 같이, 혈관세포 관련 유전자 vwf, CD105 그리고 vWF 모두 펩타이드가 들어있지 않은 하이드로젤 그룹 CON(a)에 비해 세크레토뉴린 펩타이드가 고정된 하이드로젤 그룹 SN(b)에서 2배정도 높게 발현되었다.

[0055]

[0056] **제조예2: 생체내(in vivo) 실험을 위한 심근경색 모델 제조**

[0057] 6주령 Sprague-dawley 수컷을 이소플루란(isoflurane) 으로 가마취를 시키고 기관 내 삽입을 시행한 후 2% 이소플루란과 0.3L/min 산소를 넣어주면서 마취를 유지하였다. 마취된 동물들은 분당 80사이클 비율의 호흡을 갖도록 2.5mL 부피의 산소를 공급하였다. 동물들의 좌측 가슴 부분에 개흉을 실시하여 관상동맥의 한 부분인 2~3mm 좌전하행지 (lift anterior descending, LAD) 말단부분을 7-0 폴리프로필렌 봉합사로 묶었다.

[0058] 그 결과, 좌심실에 색변화가 일어나는 것을 관찰하여 심근경색이 만들어졌음을 확인하였다. 폐를 확장 시킨 후 근육과 피부를 3-0 실크 봉합사로 봉합하였다. 감염 예방을 위해 수술한 직 후 5% 세파졸린 나트륨 (cefazolin sodium, Chong Kun Dang Pharm, Korea)을 근육 주사하였다. 동물들이 국부마취로부터 깨어날 때까지 물리적으로 환기하였다.

[0059] **실시예4: 심근경색 모델 동물의 심장기능 분석 실험**

[0060] 각 그룹의 동물들을 심근경색 유도 4주 후, 개흉을 하여 합성된 하이드로젤 (총 부피: 50uL)을 헤밀턴 주사기와 26-gage 침을 이용하여 경색부위 가장자리의 외심막에 주입하였다. 이어서, 주입 4주 후 밀러 카테터를 사용하여 심장기능을 측정하였다. 각 군의 동물들을 제조 예에서 제시된 방법과 동일한 방법으로 국소마취 하였다. 이어서, 2F pressure-volume 카테터를 좌심실 끝부분에 삽입하였다. 상기의 카테터를 압력전도성 시스템 (MPVS-

300, Millar instruments, USA)과 연결 시킨 후 압력 및 용량의 지속적인 신호들을 특수화된 소프트웨어(Chart 6 v6.4.2, ADInstruments, Australia)를 사용하여 실시간으로 모니터링 하였으며, 심장의 수축성(contractility)을 알 수 있는 지표인 심박출량(Cardiac output, CO), 일회심박출량 (Stroke volume, SV)의 매개 변수들을 분화된 심장의 압력-용량 분석(PVAN v3.6, Millar Instruments, USA)을 이용하여 측정하였다. 안정화 된 후 얻어진 신호를 바탕으로 좌심실 압력-용량 루프가 baseline을 기준으로 기록되었다.

[0061] 좌심실 기능의 관찰 결과, CMI그룹의 기능이 확실히 떨어진 것을 확인 하였으며, 히알루론산 기반의 하이드로젤 만으로는 심장기능 회복에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 반면, 하이드로젤과 세크레토뉴린을 같이 넣어준 그룹에서는 CMI그룹에 비해 유의적으로 기능이 개선되었다(도 7, 8).

[0062] 실시예 5: 세크레토뉴린 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 이용한 생체내(in vivo) 조직재생 실험

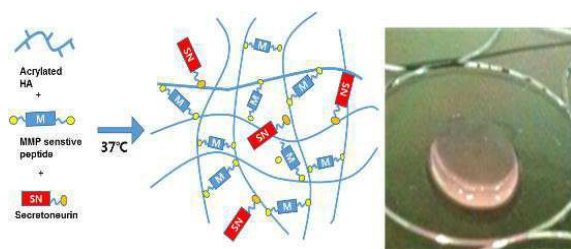
[0063] Masson' s Trichrom 염색을 통해 심근의 섬유화가 발현된 정도를 확인하기 위하여 각각의 동물들의 심장을 적출 하여 수집하였다. 심장확장기에 적출을 하기 위하여 포르말린(formalin)을 주입하였고 정지시킨 심장을 절단 시킨 후, 포르말린으로 고정화하였다. 이어서, 좌심실로부터 3mm 두께의 슬라이스를 얻고 파라핀(paraffin)으로 처리한 후 모든 슬라이스는 5um의 두께로 절단시켰다. 좌심실 조직은 마손트릭롬(Masson' s Trichrom) 염색으로 얻었다.

[0064] 광학현미경을 통해 이미지를 얻고 4X의 배율로 관찰한 결과, CMI그룹에서 현저히 좌심실 심근이 얇아지고 경색의 부위가 큰 것을 확인하였다. 하이드로젤만 넣은 그룹의 경우 CMI그룹과 큰 차이가 없었으나, 하이드로젤과 세크레토뉴린을 같이 넣어준 그룹에서는 심근이 확실히 두꺼워졌음이 관찰되었다(도 9).

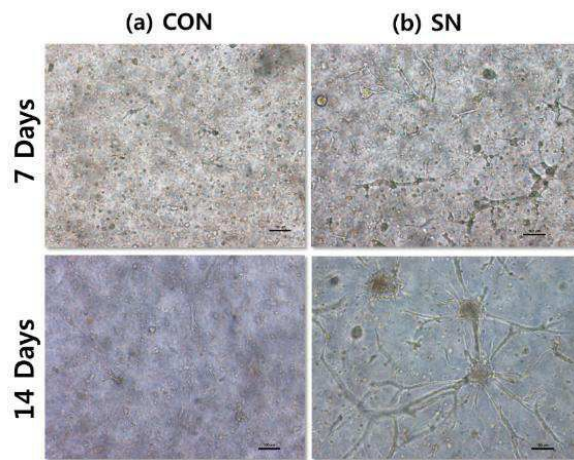
[0065] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

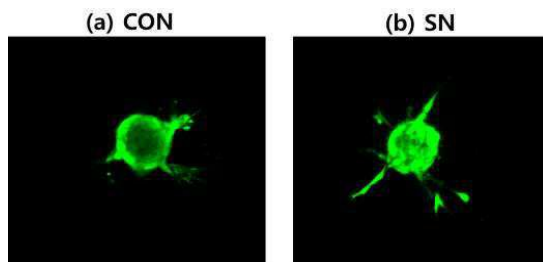
도면1



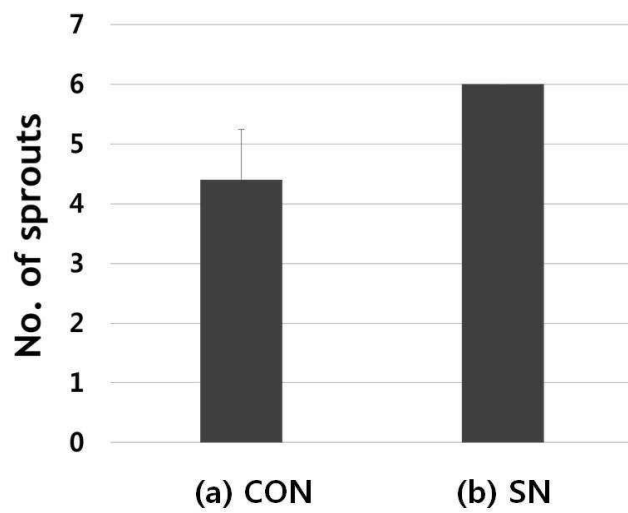
도면2



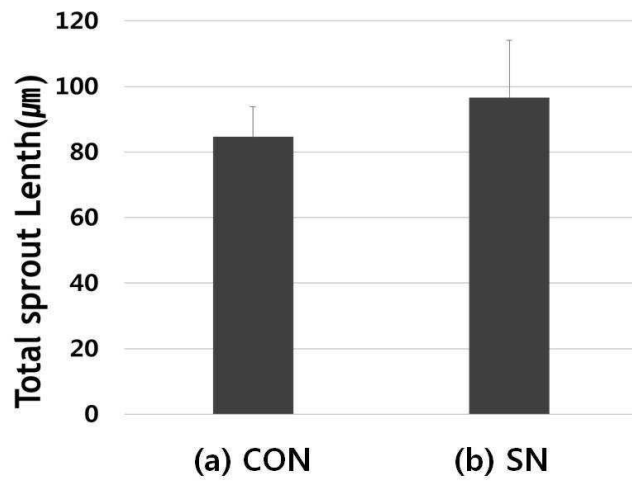
도면3



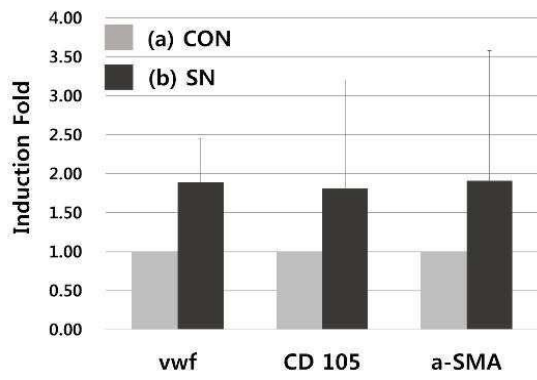
도면4



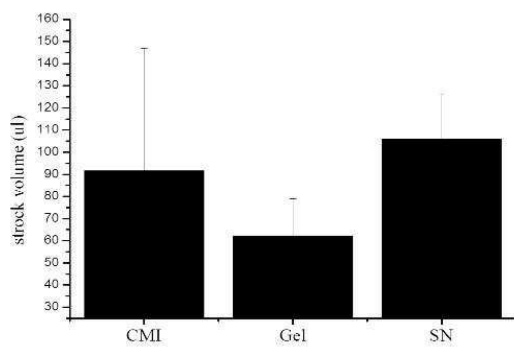
도면5



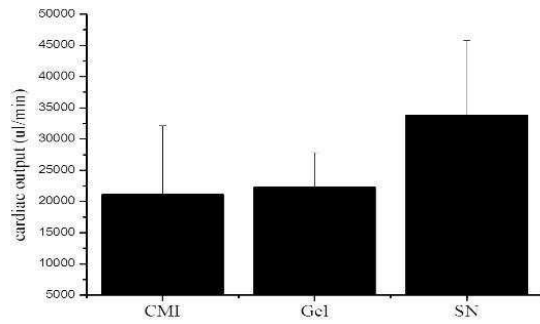
도면6



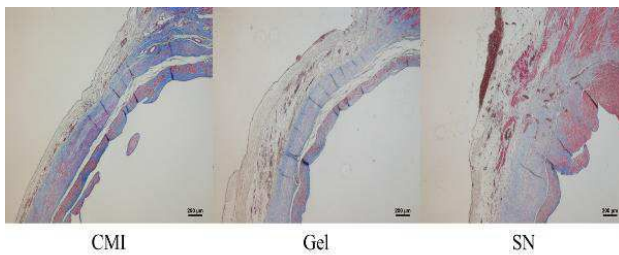
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> Korea University Research and Business Foundation

<120> Hydrogel Immobilized with Secretoneurin Peptide for Regeneration
of Myocardial Infarction and Method for Preparing the same

<130> P14-B132

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

ccagcttctg aagacacct

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400>	2	
gtacagcacc attccctcct		20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	3	
atttgaagtg caccatcacg		20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	4	
atgccacagc tggagtaagg		20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	5	
cctatccccg ggactaagac		20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	6	
aggcagtget gtcctcttct		20
<210>	7	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> primer

<400> 7

attggcaatg agcggttc

18

<210> 8

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

ggatgccaca ggactccat

19