(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0109207
(43) 공개일자 2017년09월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/50 (2006.01) *A61K 47/48* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C08B 37/00* (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/50 (2013.01)
A61K 47/61 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2016-0127597
(22) 출원일자 2016년10월04일
심사청구일자 2016년10월04일
(30) 우선권주장
1020160031952 2016년03월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울 동작구 흑석동 221
(72) 발명자
홍진기
서울특별시 동작구 흑석로 84 중앙대학교 화학신소재공학부 209동 502호
한의영
경기도 부천시 소사구 성주로 86-4 현대고층아파트 104동 303호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

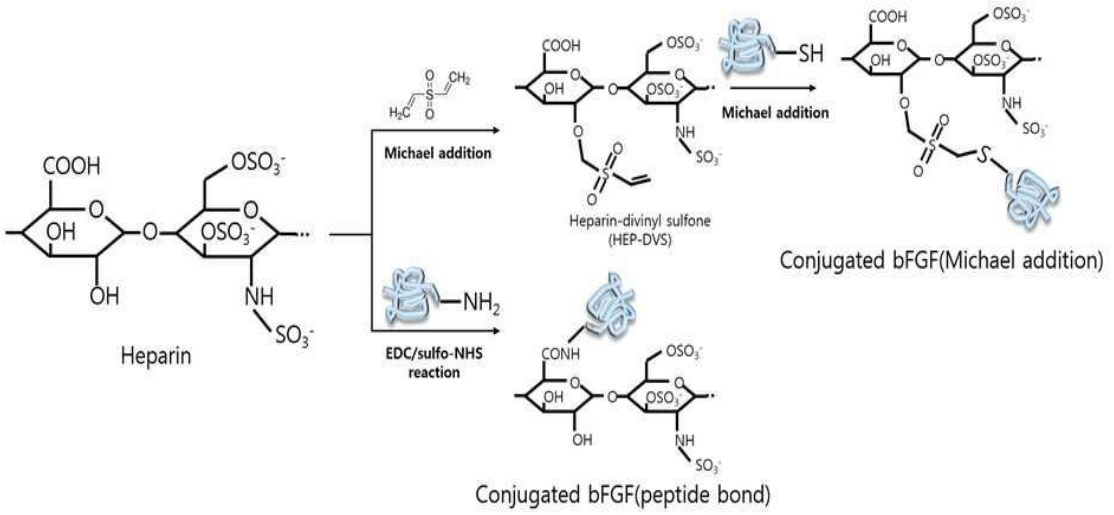
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **화학반응을 통하여 결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor, FGF)와 헤파린이 결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체에 관한 것이다. 구체적으로는 상기 결합은 (i) 섬유아세포 증식인자를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 라이신(lysine)의 아민기와 헤파린의 카복실기를, 또는 (ii) 섬유아세포 증식인자를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 시스테인(cysteine)의 티올기와 헤파린에 첨가된 바이닐기를 화학결합시켜 형성되는 것이다. 또한, 본 발명은 상기 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법을 제공한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
C08B 37/0075 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
C12N 2501/113 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9C6050104
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 서울대학교 산학협력단
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 (5차)만능유도줄기세포 플랫폼 개발을 위한 다기능성 나노구조체의 개발과 응용
기 여 율 1/5
주관기관 중앙대학교 산학협력단
연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI14C3266030015
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 연세대학교 산학협력단
연구사업명 첨단의료기술개발
연구과제명 선택조립형 나노필름을 이용한 cell sheet 다기능화 기술 개발
기 여 율 1/5
주관기관 중앙대학교 산학협력단
연구기간 2014.12.01 ~ 2018.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A1076126
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)한국연구재단
연구사업명 이공분야기초연구사업
연구과제명 다기능성 하이드로젤/다층박막 통합형 암 재발방치 패치의 개발
기 여 율 1/5
주관기관 중앙대학교 산학협력단
연구기간 2013.12.01 ~ 2016.11.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016K000133
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 (재)연구성과실용화진흥원
연구사업명 과학기술기반조성사업
연구과제명 줄기세포 기능 및 분화 증대를 위한 세포 표면 다기능성 다층박막 코팅기술
기 여 율 1/5
주관기관 중앙대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.04 ~ 2018.05.03이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ009986012016
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 농촌진흥청
연구사업명 공동연구사업
연구과제명 [아로미]단일줄기세포의 다기능화를 위한 세포표면 나노 박막 개발에 관한 연구
기 여 율 1/5
주관기관 중앙대학교 산학협력단
연구기간 2014.02.01 ~ 2016.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor, FGF)를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 라이신(lysine)의 아민기(-NH_2)와 헤파린의 카복실기(-COOH)가 화학결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 2

섬유아세포 증식인자를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 시스테인(cysteine)의 티올기(-SH)와 헤파린에 첨가된 바이닐기(-$CHCH_2$)가 화학결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 섬유아세포 증식인자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 섬유아세포 증식인자인 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 화학결합은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 위치 27, 30, 35, 55, 61, 75, 86, 95, 119, 128, 134, 138, 144 및 154로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 라이신의 아민기에서 일어나는 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 5

제 2 항에 있어서,

상기 헤파린에 첨가된 바이닐기가 바이닐설포닐메틸기인 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 6

제 2 항에 있어서,

상기 화학결합은 서열번호 1의 아미노산 서열에서 위치 34, 78, 96 및 100로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 시스테인의 티올기에서 일어나는 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체.

청구항 7

(a) 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보이미드 하이드로클로라이드(EDC), 설포- N-하이드록시설포숙시니마이드(NHS) 및 헤파린을 용매에 용해시키는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 섬유아세포 증식인자를 혼합하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 결과물을 정제하여 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 섬유

아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 EDC 및 설포-NHS의 질량비는 2:1 내지 1:2인 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법.

청구항 9

(a) 헤파린을 물에 용해시킨 후, 염기성 수용액을 첨가하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 결과물에 바이닐기를 포함하는 화합물을 접촉시키는 단계;

(c) 상기 단계 (b)의 결과물에 산성 용액을 첨가하는 단계;

(d) 상기 단계 (c)의 결과물과 섬유아세포 증식인자를 혼합하는 단계; 및

(e) 상기 단계 (d)의 결과물을 정제하여 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 (d) 단계는 pH 7.4 내지 9에서 이루어지는 것인 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법.

청구항 11

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 포함하는 나노 구조체.

청구항 12

제 11 항에 있어서,

상기 나노 구조체는 다층 나노 박막 또는 나노 입자인 것인 나노 구조체.

청구항 13

제 12 항에 있어서

상기 다층 나노 박막은 층과층 적층 방식(layer-by-layer)에 의하여 형성되는 것인 나노 구조체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor, FGF)와 헤파린(heparin)이 화학반응을 통하여 결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체, 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아미노산으로 이루어진 폴리펩타이드 구조의 증식인자(growth factor)는 세포의 분열뿐만 아니라, 세포의 증식

(proliferation), 이동(migration), 분화(differentiation), 성숙(maturation)을 촉진하는 세포 간의 신호전달을 가능하게 해주는 물질이다. 증식인자의 종류 중 하나인 섬유아세포 증식인자는 섬유아세포뿐만 아니라, 혈관내피세포(endothelium cell), 신경계세포(neuron) 등 다양한 세포에 작용하고, 세포의 증식, 세포운동, 분화를 촉진하여 혈관재생과 창상치료(wound healing) 효과가 뛰어나, 각종 체내 이식 수술 및 기능성 화장품 등에 임상 응용되고 있다. 하지만, 체내 환경에서 증식인자의 구조가 쉽게 변형되어 활성이 감소함으로써 증식인자의 효과가 낮아진다는 문제점이 보고되어 왔다.

[0004] 이러한 증식인자의 효율적인 전달을 위하여서는 효과적인 약물 전달체에 활성도를 유지한 증식인자를 싣는 기술이 필요하다. 따라서, 다양한 방법을 통하여 증식인자를 고정화 또는 안정화시켜 체내 표적 세포로 전달을 하기 위한 기술들이 개발되고 있다. 대표적으로, 증식인자를 운반 지지체들과 결합하거나, 증식인자를 포함하는 마이크로스페어(microsphere), 나노 입자, 나노 박막을 제작하여 서서히 방출되도록 함으로써 증식인자의 안정성을 증대시킨 기술들이 공지되어 있다.

[0005] 한편, 섬유아세포 증식인자는 헤파린(heparin)과 특이적 결합력이 존재하여, 헤파린 결합성 증식인자로도 불린다. 또한, 헤파린이 1:1:1(FGF:FGFR:헤파린) 혹은 2:2:1 비율로 증식인자와 수용체(FGFR)의 이합체화(dimerization)에 도움을 주어 증식인자-수용체 결합을 증가시킨다. 따라서, 증식인자가 세포에게 주는 신호 전달 효율이 증대되어, 더 높은 활성도와, 세포 증식 효과를 가진다는 연구가 보고되어 있다.

[0006] 일반적으로 섬유아세포 증식인자-헤파린은 비공유 결합으로 복합체를 형성하는 것으로 알려져 있다. 헤파린과 결합하는 염기성 섬유아세포(basic fibroblast growth factor, bFGF)의 결합 부위는 Lys-27, Arg-42, Arg-118, Lys-119, Lys-128, Lys-134 부근에 한정된다. 하지만, 화학반응으로 섬유아세포 증식인자와 헤파린을 결합시키려는 시도는 보고되지 않았고, 이렇게 제조된 증식인자의 안정성 및 효율 또한 알려져 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2011-0061639호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개 제10-2012-0058671호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 섬유아세포 증식인자와 헤파린이 화학반응을 통하여 결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 구조적 안정성 및 세포 증식 효과가 개선된 섬유아세포 증식인자를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양상은 섬유아세포 증식인자와 헤파린이 화학반응을 통하여 결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 제공한다. 상기 화학반응을 통하여 형성된 결합은 공유결합일 수 있으며, 정전기적 인력, 수소결합 등과 같은 비공유적 결합보다 강한 인력으로 연결될 수 있다. 섬유아세포 증식인자는 아민기, 카르복시기, 티올기 등 다양한 작용기들을 포함하고 있으며, 헤파린은 L-이듀론산, D-글루쿠론산, D-글루코사민 다당 사슬로 구성되어 있어, 카복실기, 히드록시기, 황산기 등의 작용기 포함하고 있다. 이러한 작용기들 간의 반응은 증식인자-헤파린의 결합을 강화시켜 증식인자 전달을 위한 약물 전달체를 합성할 때 제약이 줄어들게 되며, 또한 작용기에 따른 선택적인 공유결합 생성이 가능하다.

[0012] 본 발명의 일 양상은 섬유아세포 증식인자(fibroblast growth factor, FGF)를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 라이신(lysine)의 아민기($-NH_2$)와 헤파린의 카복실기(-COOH)가 화학결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 제공한다.

[0013] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 섬유아세포 증식인자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 섬유아세포 증식인자일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학결합은 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필) 카보디이미드 하이드로클로라이드(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC) 및 설포-N-하이드록시설포숙시니마이드(sulfo-N-hydroxysulfosuccinimide, 설포-NHS)를 사용함으로써 일어날 수 있다. 상기 섬유아세포 증식인자의 아민기와 헤파린의 카복실기는 EDC 및 설포-NHS 반응을 거쳐 펩티드 결합을 형성한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 섬유아세포 증식인자, 특히 염기성 섬유아세포 증식인자의 아미노산 서열 위치 27, 30, 35, 55, 61, 75, 86, 95, 119, 128, 134, 138, 144 및 154에는 라이신이 위치하고 있어, 상기 화학결합은 상기 위치들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 라이신의 아민기에서 일어날 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 양상은 섬유아세포 증식인자를 구성하는 아미노산 중 하나 이상의 시스테인(cysteine)의 티올기(-SH)와 헤파린에 첨가된 바이닐기(-$CHCH_2$)가 화학결합된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 섬유아세포 증식인자는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 인간 섬유아세포 증식인자일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 섬유아세포 증식인자, 특히 염기성 섬유아세포 증식인자의 아미노산 서열 위치 34, 78, 96 및 100에는 시스테인이 위치하고 있어, 상기 화학결합은 상기 위치들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 시스테인의 티올기에서 일어날 수 있다.

[0019] 그러나, 헤파린에는 활성화될 수 있는 바이닐기가 존재하지 않으므로, 헤파린에 바이닐기의 첨가가 우선적으로 요구된다. 상기 헤파린에 바이닐기의 첨가를 위하여 사용될 수 있는 물질은 헤파린에 마이클 첨가 반응에 의하여 첨가되어 마이클 수용체 잔기를 형성할 수 있는 물질일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "마이클 수용체 잔기"는 마이클 반응에 참여할 수 있는 관능기를 의미하고, 이때 마이클 수용체 잔기 및 도너 잔기 사이에 새로운 공유결합이 형성된다. 마이클 수용체 잔기는 친전자성이며, "도너 잔기"는 친핵성이다. 바이닐설포닐메틸기는 마이클 수용체 잔기의 비제한적인 예이다. 상기 헤파린에 바이닐기의 첨가를 위하여 사용될 수 있는 물질은 두 개의 바이닐 기를 가지며 첨가 후 전자끄는 기로 작용할 수 있는 물질일 수 있다. 예컨대, 두 개의 바이닐기를 갖는 디바이닐설폰(divinyl sulfone, DVS)을 과량으로 첨가하여, 헤파린의 히드록시기를 디바이닐설폰의 하나의 바이닐기에 첨가할 수 있다. 이와 같은 경우, 분자 내 전자 끄는 기가 존재하여 활성화 될 수 있는 바이닐기를 포함한 헤파린-디바이닐설폰(HEP-DVS)을 수득할 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 첨가된 바이닐기는 바이닐설포닐메틸기, 알릴설포닐메틸기, 바람직하게는 바이닐설포닐메틸기이다.

[0021] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 화학결합은 마이클 첨가 반응에 의하여 일어나는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 양상은 (a) EDC, 설포-NHS 및 헤파린을 용매에 용해시키는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 결과물에 섬유아세포 증식인자를 혼합하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 결과물을 정제하여 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법에서는 단계 (a) 및 (b)에서 혼합된 화합물들이 접촉함으로써 EDC/설포-NHS 반응을 진행하여 섬유아세포 증식인자와 헤파린이 펩티드 결합으로 연결된 복합체를 수득할 수 있다.

[0023] 상기 단계 (a)에서 사용되는 "용매"는 고체 상태의 화합물을 용해시킬 수 있는 액상의 화합물을 의미하며, 물, 알코올, 벤젠, 헥산 또는 완충액 등 유기 또는 무기 용매일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 2-(모폴리노) 에탄설폰산(2-morpholinoethanesulfonic acid, MES) 완충액이 바람직하다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 EDC 및 설포-NHS의 질량비는 2:1 내지 1:2인 것일 수 있는데, EDC/설포-NHS 반응은 EDC와 설포-NHS의 질량비가 1:2 내지 2:1인 경우 성공적으로 진행된다. 상기 EDC와 설포-NHS, 및 헤파린의 질량비는 최소 2:1:2 내지 1:2:2일 수 있으며, 또는 상기 범위보다 헤파린이 과량 첨가된 것일 수 있다. 상기 제조 방법에서 성장인자는 한계반응물의 역할을 하므로, 헤파린을 과량 넣어주는 것은 문제되지 않는다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 "정제"는 목적 물질을 제외한 불순물을 제거하는 과정을 지칭, 구체적으로는 투석, 염석, 크로마토그래피, 전기영동의 방법이 존재하며, 이에 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 투석에 의하여 수행된다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 투석은 탈이온수 상에서 수행될 수 있다.

[0026] 본 명세서의 일 양상은 (a) 헤파린을 물에 용해시킨 후, 염기성 수용액을 첨가하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의

결과물에 바이닐기를 포함하는 화합물을 접촉시키는 단계; (c) 상기 단계 (b)의 결과물에 산성 용액을 첨가하는 단계; (d) 상기 단계 (c)의 결과물과 섬유아세포 증식인자를 혼합하는 단계; 및 (e) 상기 단계 (d)의 결과물을 정제하여 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 수득하는 단계를 포함하는 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 제조 방법을 제공한다. 상기 방법에서는 단계 (a) 내지 (c)에서 마이클 첨가 반응 의하여 헤파린에 바이닐기를 첨가한 후, 단계 (d)에 의하여 개질된 헤파린과 섬유아세포 증식인자가 접촉함으로써 마이클 첨가 반응을 진행하여 섬유아세포 증식인자와 헤파린이 결합된 복합체를 수득할 수 있다.

[0027] 본 명세서에서 사용되는 "물"은 탈이온수, 정제수, 증류수를 포함한다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 "염기성 수용액"은 OH^- 이온을 포함하는 수용액으로서, NaOH, KOH 또는 NH_4OH 수용액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 NaOH 수용액이다. 본 명세서에서 사용되는 "산성 수용액"은 H^+ 이온을 포함하는 수용액으로서, HCl, H_2SO_4 또는 CH_3COOH 수용액일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 바람직하게는 HCl 수용액이다. 본 발명에서 염기성 수용액은 마이클 첨가 반응을 개시 및 진행하기 위한 이온을 제공하는 역할을 하며, HCl 용액은 반응을 종결시키는 역할을 한다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 (d) 단계는 pH 7.4 내지 9에서 이루어질 수 있다. pH 9 이상의 염기 조건에서는 섬유아세포 증식인자의 활성도가 낮아지고, pH 7.4 이하의 산성 조건에서는 상기 (d) 단계에서 섬유아세포 증식인자와 헤파린 사이의 마이클 첨가 반응 효율이 낮다.

[0030] 본 발명의 일 양상은 상기 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 포함하는 각종 나노 구조체를 제공한다. 상기 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체는 화학결합으로 결합된 것으로부터 기인하여 전체적으로 -50 내지 -40mV의 음전하를 나타내기 때문에, 다른 고분자 물질과 정전기적 결합이 가능하다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노 구조체는 다층 나노 박막 또는 나노 입자일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 다층 나노 박막은 층과층 적층 방식(layer-by-layer)에 의하여 형성된 것일 수 있다. 상기 다층 나노 박막은 기판의 제약이 적어 다양한 2차원 형태의 플레이트 및 나노 입자 다양한 종류의 기판 표면에 박막을 형성할 수 있다. 예컨대, 산화철 자성 나노 입자, Si 웨이퍼(wafer), PET 필름, 세포 배양 용기(폴리카보네이트(Poly carbonate)로 이루어짐) 상에 박막을 형성할 수 있으나, 이제 한정되는 것은 아니다. 상기 다층 나노 박막은 형성 후 판 형상 그대로 사용하는 것도 가능하며, 관, 롤, 입체형상 등으로 형성 후 가공을 통하여 사용하는 것 또한 가능하다.

[0033] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 나노 입자는 헤파린과 결합할 수 있는 전해질 고분자인 폴리(알릴아민 하이드로클로라이드)(poly(allylamine hydrochloride), 폴리에틸렌이민(polyethylenimine), 콜라겐(collagen), 또는 가교결합 물질인 EDC, 설포-NHS 등을 이용하여 제조될 수 있다.

[0034] 상기 나노 구조체들은 기능성 의료용 고분자 물질 혹은 바이오 물질로의 응용이 가능하다.

발명의 효과

[0036] 본 발명에 따라 헤파린과 섬유아세포 증식인자를 화학반응으로 결합시켜 제조한 복합체는, 체내 조건 혹은 세포 배양조건에서 구조변형이 쉬워, 짧은 활성 반감기를 가지는 섬유아세포 증식인자의 단점을 보완하여, 기존의 물리적 결합으로 연결된 증식인자-헤파린보다 더 우수한 구조적 안정성 및 세포 증식 효과를 나타낸다. 또한 제조된 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체는 마이셀, 나노 박막, 하이드로젤 등 다양한 약물 전달체를 통하여 생체 내부 환경 및 배양 세포 환경에서 지속적으로 방출될 수 있다. 따라서, 본 발명은 혈관 재생, 상처 치료 등의 의료 분야에 활용이 가능할 뿐만 아니라, 줄기세포 배양 플랫폼, 세포 증식, 분화, 운동 등을 촉진하는 기능성 바이오 물질로의 응용도 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 마이클 첨가 및 EDC/설포-NHS 반응 경로를 통한 헤파린과 섬유아세포 증식인자(bFGF)의 공유 결합에 대한 모식도를 나타낸다.

도 2는 반응하지 않은 헤파린(상)와 헤파린에 디바이닐설폰(DVS)을 관능화시킨 헤파린(HEP-DVS)(하)의 H-NMR 결과를 나타낸다.

도 3은 글리세롤(glycerol) 용매 내에서 섬유아세포 증식인자(bFGF)의 구조적 안정성에 대한 시뮬레이션 결과를 나타낸다.

도 4는 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 DLS(Dynamic light scattering) 결과를 나타낸다.

도 5는 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 웨스턴 블로팅(Western blot) 결과(A: reducing SDS-PAGE, 및 B: Native PAGE)를 나타낸다.

도 6은 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 효소면역측정법을 이용한 시간에 따른 활성도 변화를 나타낸다.

도 7은 성체중간엽줄기 세포배양에서 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 증식 촉진 효과를 보여주는 이미지(A) 및 그래프(B)를 나타낸다.

도 8은 정상섬유아세포 세포배양에서 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 증식 촉진 효과를 보여주는 이미지(A) 및 그래프(B)를 나타낸다.

도 9는 본 발명의 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체가 포함된 나노 입자(a), 박막 형태로 코팅된 나노 입자(b), 다양한 표면 상에 형성된 나노 박막(c: Si 웨이퍼, d: PET 필름, e: 폴리카보네이트 세포 배양 용기)을 나타내며, 코팅된 나노 박막의 표면(f) 및 단면(g)의 주사전자현미경 이미지를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 하나 이상의 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 실시예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실시예 1. 디바이닐설폰 관능화 헤파린의 합성**

[0042] 먼저, 헤파린 0.1g을 탈이온수(DI water) 10mL에 용해시킨 후, 상기 헤파린 용액을 교반하면서 0.25M의 NaOH 수용액 6.66mL를 첨가하였다. 1분 후, 디바이닐설폰 용액(97%) 0.36mL 및 탈이온수 2.64mL를 첨가하고, 2분 후 6M HCl 0.27mL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종료된 시료를 MWCO 14,000 튜브를 이용하여 탈이온수 상에서 3일간 투석시켜 정제된 관능화 헤파린을 수득하고, 동결 건조를 통하여 용매를 제거하였다.

[0044] **실시예 2. 합성된 디바이닐설폰 관능화 헤파린의 분석**

[0045] 상기 실시예 1에서 합성된 디바이닐설폰 관능화 헤파린(HEP-DVS)을 H-NMR을 통하여 규명하였다(도 2 참조). 반응하지 않은 헤파린의 히드록시기의 H 피크(peak) 일부가 디바이닐설폰 관능화 헤파린에서는 사라진 것을 확인할 수 있었다. 또한, 합성된 관능화 헤파린의 색깔이 투명한 헤파린에 비하여 옅은 갈색을 띄는 것을 확인하였다.

[0047] **실시예 3. EDC/설포-NHS 반응을 통한 헤파린과 증식인자의 공유결합 형성**

[0048] EDC, 설포-NHS 및 헤파린을 2:1:2의 질량비로 혼합하고, 이를 0.5M의 2-(모폴리노) 에탄설폰산 완충액(MES 완충액)에 녹인 후, 상온에서 45분 동안 반응시켰다. 상기 용액 100㎕와 섬유아세포 증식인자(bFGF) 1.5㎍을 상온에서 15분 동안 혼합시켰다. 반응이 끝난 시료를 MWCO 14,000 튜브를 이용하여 탈이온수 상에서 30분씩 3회 투석시켜 EDC 및 설포-NHS를 제거하였다.

[0049] 증식인자와 헤파린의 결합 정도를 달리하기 위하여, EDC/설포-NHS 대신 EDC만을 사용하여 상기 과정을 반복하였다.

[0051] **실시예 4. 마이클 첨가를 통한 헤파린과 증식인자의 결합**

[0052] 증식인자와 헤파린의 결합 효율을 달리하기 위해서는 D-PBS의 pH를 바꾸어 반응시켜야 하므로, pH 7.4의 D-PBS를 NaOH 수용액을 이용하여 pH 9까지 적정하였다. 0.1M, pH 7.4 내지 pH 9의 범위의 D-PBS를 각각 1mM의 EDTA와 혼합한 후, 상기 D-PBS(pH 7.4 내지 pH 9)+EDTA의 용액 90㎕에 각각 증식인자(bFGF) 1㎕을 혼합시켰다. 이를 4℃의 항온기 내에서 16시간 동안 반응시키고, 반응이 종료된 시료를 MWCO 14,000 튜브를 이용하여 탈이온수 상에서 30분씩 3회 투석시켜 EDTA 및 NaOH를 제거하였다.

[0053] 상기 실시예 1, 3 및 4의 과정을 보여주는 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0055] **실시예 5. 글리세롤 용매 내에서 증식인자의 구조적 안정성 유지 효과를 확인하기 위한 시뮬레이션**

[0056] 모든 시뮬레이션 및 분석은 GROMACS4.6.7 simulation package, OPLS all-atom force field (FF) 및 TIP4P water model을 이용하여 수행하였다. bFGF에 대한 정보는 단백질 정보 은행(Protein Data Bank)의 정보를 사용하였으며, 글리세롤의 경우에는 Coleman 등의 potential parameters를 이용하였다. 시뮬레이션은 (i) 물에 분산시킨 bFGF(대조군) 및 (2) 물과 글리세롤을 7:3으로 혼합한 용매에 분산시킨 bFGF를 이용하여, 온도 310K, 압력 1bar의 조건에서 1.3㎲ 동안 수행하였다. 그 결과는 도 3에 나타내었으며, 하기와 같은 결과를 도출하였다:

[0057] 1. bFGF의 구조는 β-시트(sheet)와 회전(turn) 구조가 우세하였고, 시간이 경과함에 따라, 글리세롤이 존재하는 경우 β-시트는 보다 많이, 불규칙 코일(random coil)은 더 적게 나타났다.

[0058] 2. RDF 분석 결과, 글리세롤이 주로 음이온성 잔기(Glu, Asp)와 강하게 상호작용(interaction)을 하며, 소수성 잔기와는 상호작용이 거의 존재하지 않음을 확인할 수 있었다. 또한, 글리세롤이 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우, 음이온 잔기 간의 상호작용의 강도가 상당히 많이 바뀌는 것을 확인하였다.

[0059] 3. 결론적으로, 글리세롤이 음이온성 잔기와 상호작용하면서, bFGF의 음이온성 잔기 간의 척력을 약화시키고, 그러한 요인으로 인해 bFGF의 구조를 안정하게 만들며 펼쳐지지(unfolding) 않게 만든다는 것을 확인하였다.

[0061] **실시예 6. 웨스턴 블롯을 통한 증식인자-헤파린 복합체의 형성 규명**

[0062] 상기 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체를 규명하기 위하여 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하였으며, 음성대조군으로서 bFGF, 양성대조군으로서 헤파린+bFGF 혼합물을 사용하였다.

[0063] 상기 시료들을 각각 10% SDS 폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동으로 분리하고, 니트로셀룰로오즈 막(membrane) 상으로 전기영동을 통하여 이동시켰다. 상기 막을 1시간 동안 5% 탈지유(skim milk)로 블로킹한 후, 정제된 Tb7 항체(antibody)를 사용하여 4시간 동안 반응시켰다. 그 후, 2차 항체로서 항-토끼 IgG 항체를 사용하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역반응이 완료된 단백질을 화학 발광 검출 시스템(chemiluminescence detection system, PIERCE사)을 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 시각화하였다(도 5 참조).

[0065] **실시예 7. 효소면역측정법을 통한 증식인자-헤파린 복합체의 활성도 분석**

[0066] 상기 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 구조적 안정성을 확인하기 위하여, 효소면역측정법(ELISA)을 37℃ PBS 조건 하에서 수행하여 활성도의 감소 정도를 검증하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 대조군으로서 처리하지 않은 bFGF를 사용하여, 상기 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체와 비교하였다.

[0067] 그 결과, 처리하지 않은 bFGF는 48시간 후의 활성도가 20% 정도로 감소한 반면, 증식인자-헤파린 복합체는 60 내지 70% 정도의 활성도를 유지하였다. 따라서, 37℃ PBS 조건에서 증식인자-헤파린 복합체의 구조적 안정성이 순수한 bFGF에 비하여 보다 높다는 것을 확인할 수 있었다.

[0069] **실시예 8. 성체중간엽 줄기세포 배양에서의 증식인자-헤파린 복합체의 효능 분석**

[0070] 상기 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 세포 증식 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0071] 세포 배양 계대수(Cell passage number)가 5인 성체중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cell, MSC)를 12-웰 플

레이트에 5×10^3세포/웰의 농도로 분주한 후, 세포 부착을 위하여 24시간 동안 배양액 1mL(90% DMEM, 10% FBS 및 1% PS, Gibco사), 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다(n=3). 세포 부착을 확인한 후, 상기 배양액에 5가지 시료를 넣어 필터링한 후, 배양액을 교체하였으며, 상기 5가지의 시료는 하기와 같았다: (1) 처리하지 않은 배양액, (2) bFGF(20ng/mL), (3) bFGF(20ng/mL)+헤파린(1.2㎍/mL) 혼합액, (4) 증식인자-헤파린 복합체 1(bFGF_1, bFGF 20ng/mL, 헤파린 1.2㎍/mL) 및 (5) 증식인자-헤파린 복합체 2(bFGF_2, bFGF 20ng/mL, 헤파린 1.2㎍/mL). 이때, 증식인자-헤파린 복합체 1은 실시예 3의 결과물이고, 증식인자-헤파린 복합체 2는 실시예 4의 결과물로 준비하였다.

[0072] 이후 3일 동안 세포배양을 수행하고, 1, 2 및 3일차에 각 웰의 세포 이미지를 관찰하였다. 또한, 트립신 처리 및 원심분리를 통하여 세포를 분리한 후, 트리판 블루(trypan blue)로 염색하여 혈구계(hemocytometer)로 생존한 세포 수를 확인하였다.

[0073] 그 결과, 세포 이미지 및 성장 그래프를 얻을 수 있었으며(도 7 참조), 이를 통하여 대조군 < bFGF < 증식인자-헤파린 복합체 2 < bFGF+헤파린 혼합액 < 증식인자-헤파린 복합체 1 순서로 세포 증식이 증가한 것을 확인하였다. 이로써, 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체는 기존의 bFGF에 비해 높은 성체중간엽 세포의 증식 효과를 갖는다는 것을 검증하였다.

[0075] **실시예 9. 정상섬유아세포 배양에서의 증식인자-헤파린 복합체의 효능 분석**

[0076] 추가적으로 상기 실시예 3 및 4에서 합성한 섬유아세포 증식인자-헤파린 복합체의 세포 증식 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다.

[0077] 세포 배양 계대수가 6인 정상섬유아세포(Human dermal fibroblast cell, HDFC)를 12-웰 플레이트에 5×10^2세포/웰의 농도로 분주한 후, 세포 부착을 위하여 24시간 동안 배양액 1mL(90% DMEM, 10% FBS 및 1% PS, Hydroclone사), 37℃, 5% CO_2 조건 하에서 배양하였다(n=3). 세포 부착을 확인한 후, 상기 배양액에 4가지 시료를 넣어 필터링한 후, 배양액을 교체하였으며, 상기 4가지의 시료는 하기와 같았다: (1) bFGF(20ng/mL), (2) bFGF(20ng/mL)+헤파린(1.2㎍/mL) 혼합액, (3) 정제하지 않은 증식인자-헤파린 복합체(bFGF 20ng/mL, 헤파린 1.2㎍/mL) 및 (4) 정제한 증식인자-헤파린 복합체(bFGF 20ng/mL, 헤파린 1.2㎍/mL). 이때, 증식인자-헤파린 복합체는 실시예 3의 결과물로 준비하였다.

[0078] 이후 6일 동안 세포배양을 수행하고, 3일차에 배양액을 교체하면서 각 시료를 처리하였으며, 2, 4 및 6일차에 각 웰의 세포 이미지를 관찰하였다. 또한, 트립신 처리 및 원심분리를 통하여 세포를 분리한 후, 트리판 블루로 염색하여 혈구계로 생존한 세포 수를 확인하였다.

[0079] 그 결과, 세포 이미지 및 성장 그래프를 얻을 수 있었으며(도 8 참조), 이를 통하여 bFGF < bFGF+헤파린 혼합액 < 정제하지 않은 증식인자-헤파린 복합체 < 정제한 증식인자-헤파린 복합체 순서로 세포 증식이 증가한 것을 확인하였다. 또한, 일원분산분석법(ANOVA)과 사후검정(tukey method) 통계분석 과정을 통하여 각 결과의 유의성을 확인하였다. 이로써, EDC/설포-NHS 반응을 통하여 합성된 증식인자-헤파린 복합체는 기존의 bFGF 및 헤파린+증식인자 혼합물에 비하여 높은 정상섬유아세포의 증식 효과를 갖는다는 것을 검증하였다.

[0081] **실시예 10. 증식인자-헤파린 복합체의 응용 : 나노 입자 및 나노 박막의 제조**

[0082] **10.1. 나노 입자 : 마이셀**

[0083] 마이셀을 합성하기 위하여, 폴리스티렌-블록-폴리(아크릴산)(Polystyrene-block-poly(acrylic acid), PS-b-PAA) 블록 공중합체 1mg을 THF 2mL에 용해시킨 후, pH 10 조건에서 탈이온수 48mL를 강하게 교반시키면서 상기 PS-b-PAA 용액을 한 방울씩 첨가하였다. 6시간 동안 더 교반시킨 후, 3일 동안 투석 과정을 거쳐 THF 및 미반응 물질들을 제거함으로써, 50㎚ 크기의 구형 나노 입자를 수득하였다.

[0084] 상기 합성된 마이셀 용액에 계면활성제인 4-디메틸아미노피리딘(4-Dimethylaminopyridine, DMAP) 1 내지 2mg을 첨가한 후, 투석 과정을 통하여 한 더 정제하였다. 해당 마이셀에 증식인자-헤파린 복합체를 첨가하여 정전기적 인력으로 마이셀과 증식인자-헤파린을 결합시켰다. 이러한 증식인자-헤파린 복합체가 포함된 마이셀 나노 입자를 TEM 이미지로 관찰하였다(도 9의 a).

[0086] **10.2. 나노 입자 : 산화철 자성 나노 입자**

[0087] $FeCl_4$ 0.19g을 탈이온수 10mL에 용해시키고, 도데실아민(dodecylamine) 0.93mL를 탈이온수 90mL에 가열하며 용해시켰다. 상기 도데실아민 용액에 $FeCl_4$ 용액을 첨가하여 $FeCl_4$가 산화되며 검은색으로 변화된 산화철 자성 나노 입자 용액을 수득하였다. 그 후 85℃ 조건에서 4시간 동안 교반하고, 8000rpm 조건에서 원심분리하여 산화철 나노 입자를 수득하였다. 이렇게 제조된 산화철 자성 나노 입자는 20 내지 30㎚ 크기를 가졌다.

[0088] 상기 산화철 자성 나노 입자 표면에 폴리(β-아미노 에스터)(poly(?-amino ester), PBAE), 콜라겐, 증식인자-헤파린 복합체를 층과층 적층법을 통하여 나노 박막을 형성함으로써, 나노 박막이 코팅된 나노 입자를 제작하였다. 먼저, PBAE와 콜라겐을 4:6의 질량비로 혼합하고, 100mM 아세트산 나트륨 버퍼(sodium acetate buffer, pH 5.5)에 1mg/mL로 용해시킨 후, 증식인자-헤파린 복합체 용액 또한 같은 방법으로 제조하였다. pH 5.5 조건에서 양 전하를 갖는 자성 나노 입자를 1mg/mL의 증식인자-헤파린 복합체 용액에 분산시킨 후, 8000rpm으로 원심분리하여 증식인자-헤파린 층이 흡착된 자성 나노 입자를 수득하였다. 이어서, 같은 방법으로 자성 나노 입자를 1mg/mL의 PBAE와 콜라겐 혼합 용액에 분산 및 원심분리하여, PBAE와 콜라겐이 흡착된 나노 입자를 수득하였다. 상기 과정을 반복하여, 상기 나노 입자 표면에 (증식인자-헤파린/PBAE+콜라겐)이 반복되는 구조의 박막을 형성하였다. 제조된 산화철 자성 나노 입자 표면에 코팅된 나노 박막을 TEM 이미지를 통하여 시각화하였다(도 9의 b).

[0090] **10.3. 나노 박막 : 기판의 다양화**

[0091] 폴리(β-아미노 에스터)(PBAE)와 콜라겐을 4:6의 질량비로 혼합하고 100mM 아세트산 나트륨 버퍼에 1mg/mL로 용해시킨 후, 증식인자-헤파린 복합체 용액 또한 같은 방법으로 제조하였다.

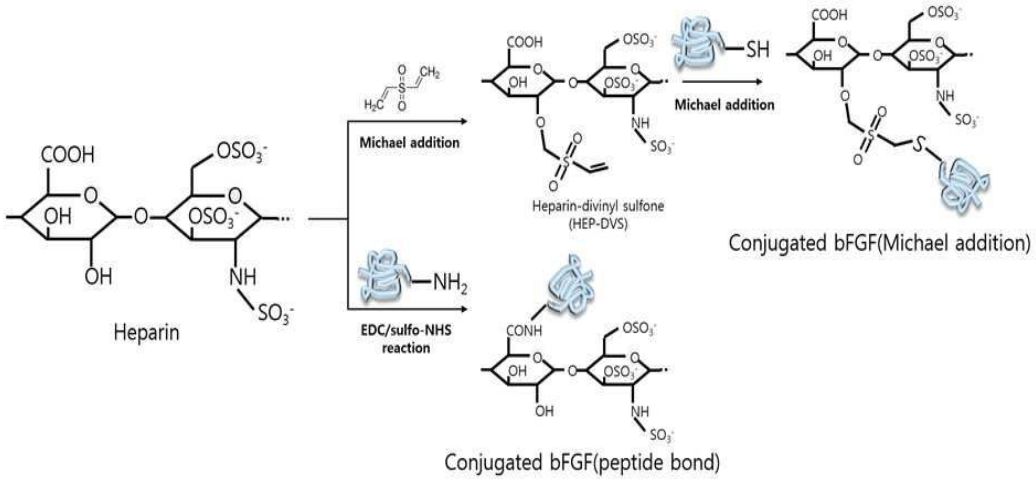
[0092] Si 웨이퍼, OHP 필름 및 세포 배양 용기 멤브레인(폴리카보네이트)의 세 종류의 기판에 4분 동안 산소 플라즈마 처리를 하여 음전하의 표면을 생성하였다.

[0093] 상기 기판을 (PBAE+콜라겐) 용액, 세척 용액, 증식인자-헤파린 복합체 용액, 세척 용액 등의 순서로 용액에 반복적으로 담지하여, 기판 표면에 나노 박막을 형성하였다(도 9의 c 내지 e). 코팅된 나노 박막의 표면 및 단면은 전자주사현미경으로 관측하였다(도 9의 g 및 f).

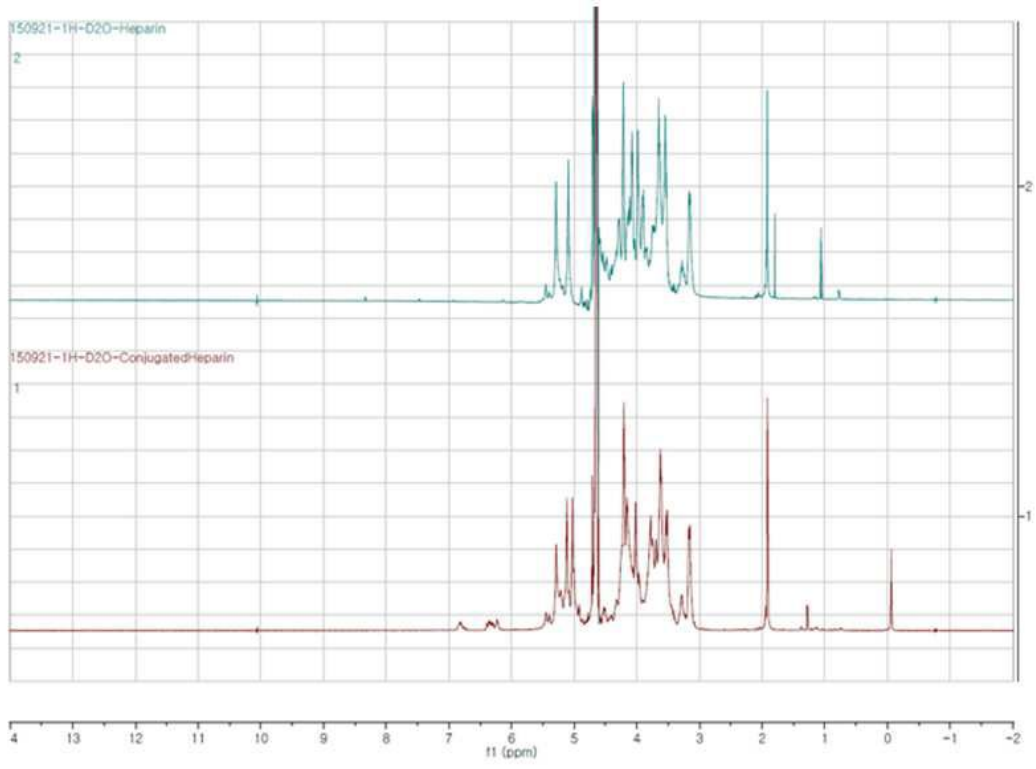
[0095] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로, 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

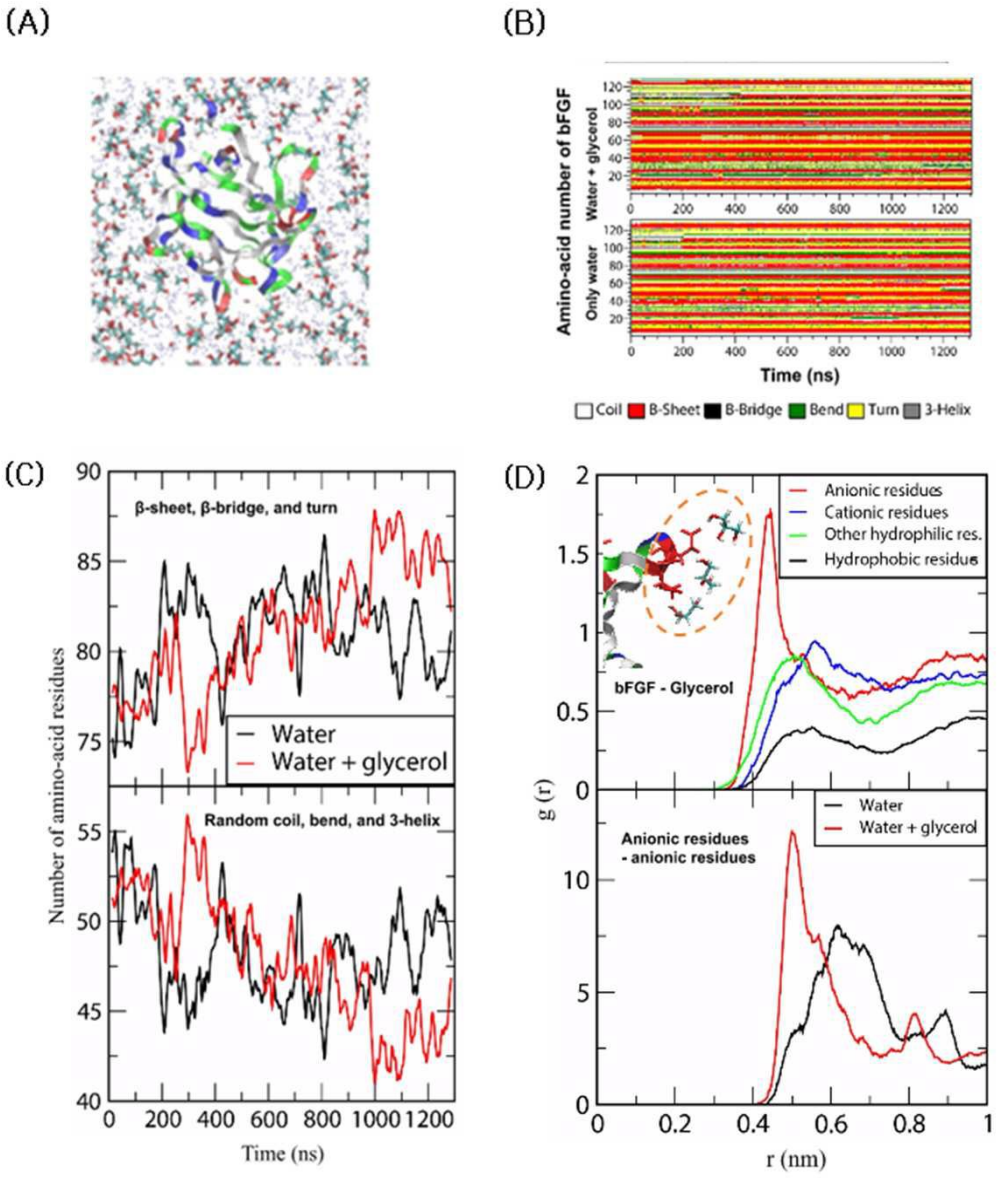
도면1


Heparin
Michael addition
EDC/sulfo-NHS reaction
Heparin-divinyl sulfone (HEP-DVS)
Michael addition
Conjugated bFGF(Michael addition)
Conjugated bFGF(peptide bond)

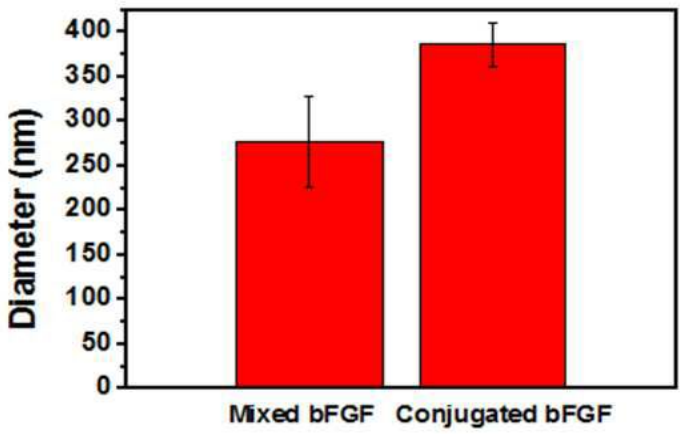
도면2


150921-1H-D2O-Heparin
150921-1H-D2O-ConjugatedHeparin
f1 (ppm)

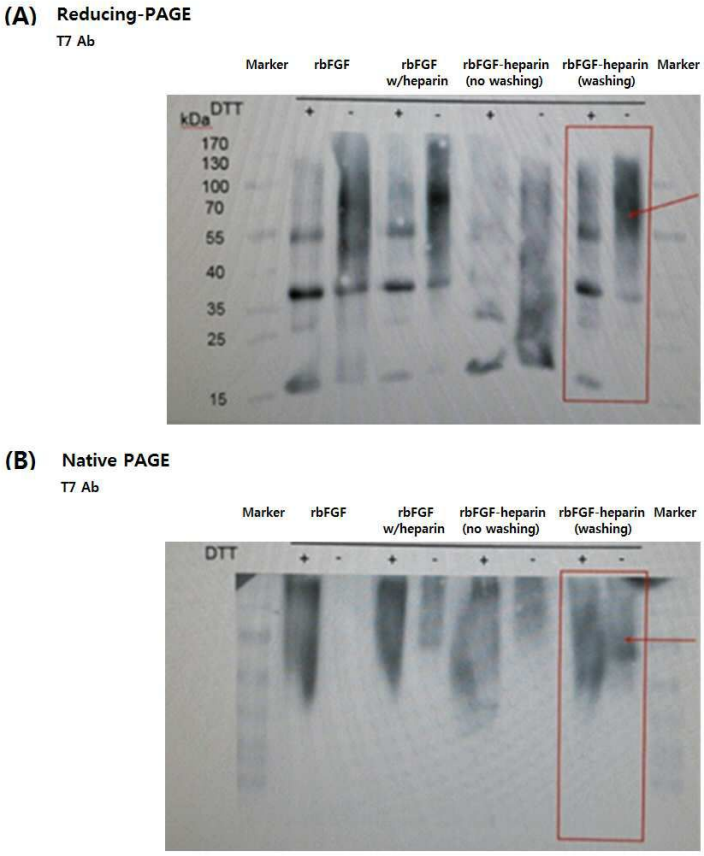
도면3


(A)
(B)
Amino-acid number of bFGF
Water + glycerol
Only water
Time (ns)
Coil
B-Sheet
B-Bridge
Bend
Turn
3-Helix
(C)
β-sheet, β-bridge, and turn
Water
Water + glycerol
Random coil, bend, and 3-helix
Number of amino-acid residues
Time (ns)
(D)
Anionic residues
Cationic residues
Other hydrophilic res.
Hydrophobic residus
bFGF - Glycerol
Water
Water + glycerol
Anionic residues
- anionic residues
g (r)
r (nm)

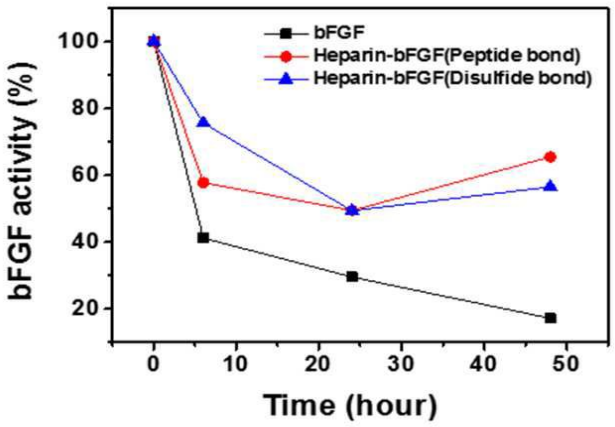
도면4


Diameter (nm)
Mixed bFGF
Conjugated bFGF

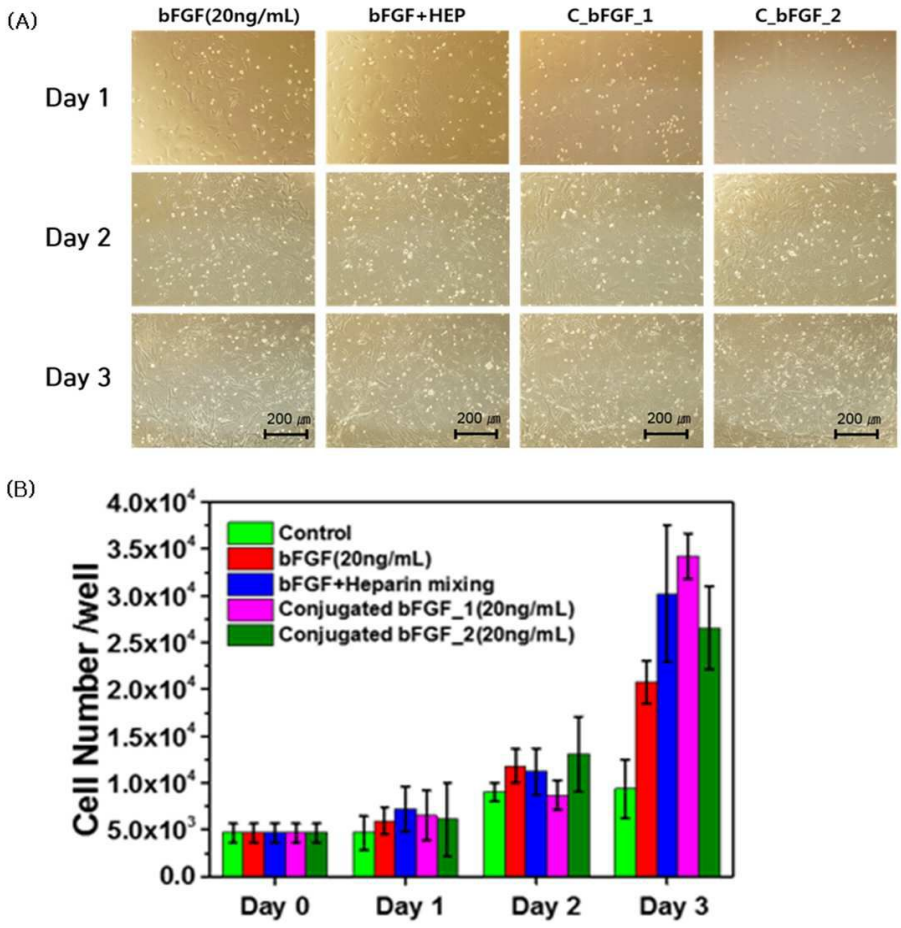
도면5


(A) Reducing-PAGE
T7 Ab
Marker
rbFGF
rbFGF w/heparin
rbFGF-heparin (no washing)
rbFGF-heparin (washing)
Marker
kDa
DTT
170
130
100
70
55
40
35
25
15
(B) Native PAGE
T7 Ab
Marker
rbFGF
rbFGF w/heparin
rbFGF-heparin (no washing)
rbFGF-heparin (washing)
Marker
DTT

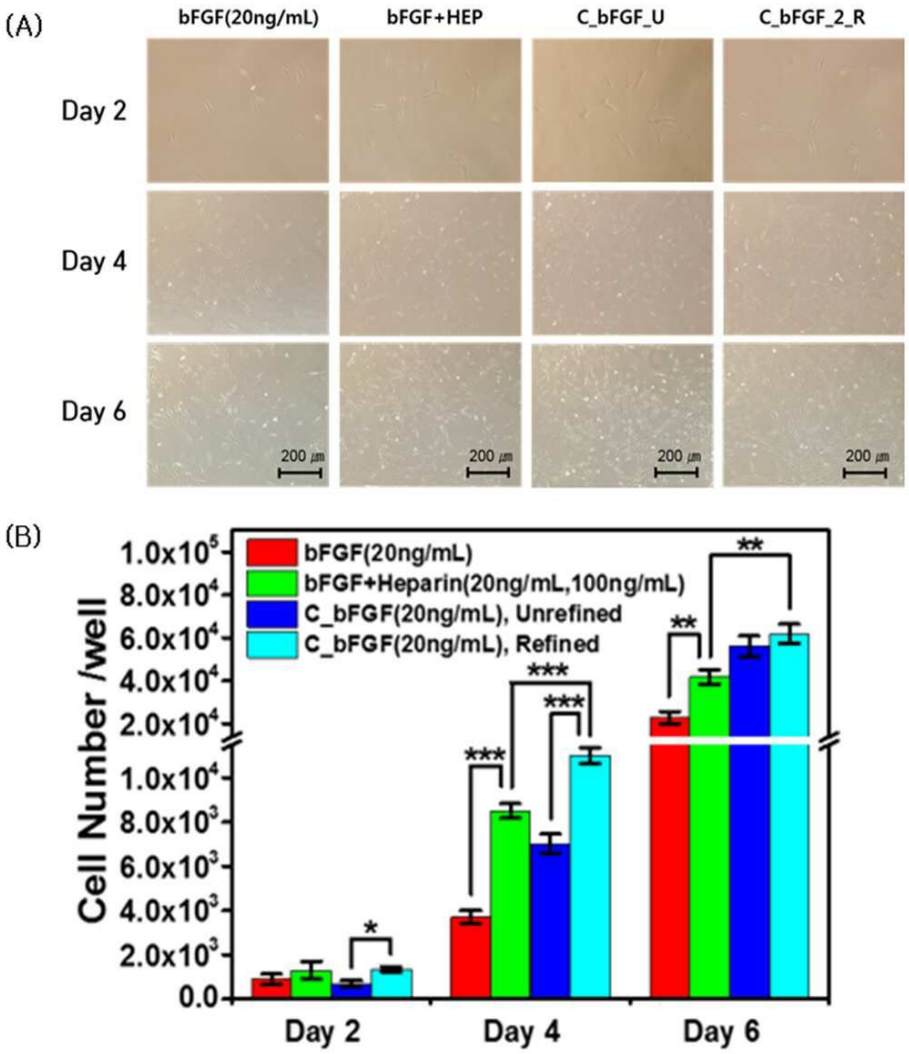
도면6


bFGF
Heparin-bFGF(Peptide bond)
Heparin-bFGF(Disulfide bond)
bFGF activity (%)
100
80
60
40
20
0
10
20
30
40
50
Time (hour)

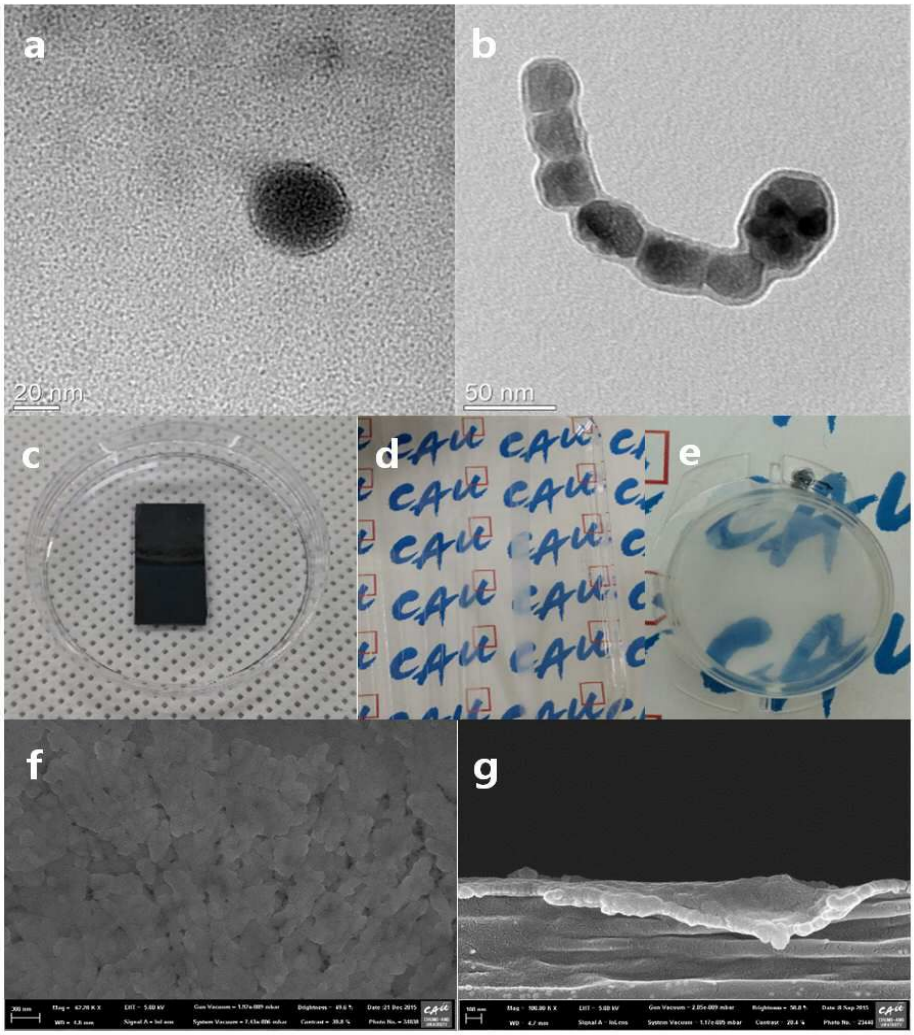
도면7


(A)
bFGF(20ng/mL)
bFGF+HEP
C_bFGF_1
C_bFGF_2
Day 1
Day 2
Day 3
200 μm
(B)
Cell Number /well
4.0x10^4
3.5x10^4
3.0x10^4
2.5x10^4
2.0x10^4
1.5x10^4
1.0x10^4
5.0x10^3
0.0
Control
bFGF(20ng/mL)
bFGF+Heparin mixing
Conjugated bFGF_1(20ng/mL)
Conjugated bFGF_2(20ng/mL)
Day 0
Day 1
Day 2
Day 3

도면8


(A)
bFGF(20ng/mL)
bFGF+HEP
C_bFGF_U
C_bFGF_2_R
Day 2
Day 4
Day 6
200 μm
(B)
bFGF(20ng/mL)
bFGF+Heparin(20ng/mL,100ng/mL)
C_bFGF(20ng/mL), Unrefined
C_bFGF(20ng/mL), Refined
Cell Number /well
1.0x10^5
8.0x10^4
6.0x10^4
4.0x10^4
2.0x10^4
1.0x10^4
8.0x10^3
6.0x10^3
4.0x10^3
2.0x10^3
0.0
*
***
**
Day 2
Day 4
Day 6

도면9



서 열 목 록

<110> CHUNG ANG University industry Academic Cooperation Foundation

<120> FIBROBLAST GROWTH FACTOR-HEPARIN COMPLEXES CONJUGATED BY CHEMICAL REACTION AND PREPARATION METHOD THEREOF

<130> P20160023

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Ala Gly Ser Ile Thr Thr Leu Pro Ala Leu Pro Glu Asp Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Ala Phe Pro Pro Gly His Phe Lys Asp Pro Lys Arg Leu

20 25 30

Tyr Cys Lys Asn Gly Gly Phe Phe Leu Arg Ile His Pro Asp Gly Arg

35 40 45

Val Asp Gly Val Arg Glu Lys Ser Asp Pro His Ile Lys Leu Gln Leu

50 55 60

Gln Ala Glu Glu Arg Gly Val Val Ser Ile Lys Gly Val Cys Ala Asn

65 70 75 80

Arg Tyr Leu Ala Met Lys Glu Asp Gly Arg Leu Leu Ala Ser Lys Cys

85 90 95

Val Thr Asp Glu Cys Phe Phe Phe Glu Arg Leu Glu Ser Asn Asn Tyr

100 105 110

Asn Thr Tyr Arg Ser Arg Lys Tyr Thr Ser Trp Tyr Val Ala Leu Lys

115 120 125

Arg Thr Gly Gln Tyr Lys Leu Gly Ser Lys Thr Gly Pro Gly Gln Lys

130 135 140

Ala Ile Leu Phe Leu Pro Met Ser Ala Lys Ser

145 150 155