

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0148425

(43) 공개일자 2023년10월24일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/475 (2006.01) *A61K 47/64* (2017.01)
A61P 25/00 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
C07K 14/50 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 14/475 (2013.01)
A61K 47/64 (2017.08)
- (21) 출원번호 10-2023-7032897
- (22) 출원일자(국제) 2022년02월23일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년09월25일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2022/017490
- (87) 국제공개번호 WO 2022/182737
 국제공개일자 2022년09월01일
- (30) 우선권주장
 63/152,498 2021년02월23일 미국(US)

- (71) 출원인
 노쓰웨스턴 유니버시티
 미국 60201 일리노이 에반스톤 클라크 스트리트 633
- (72) 발명자
 알바레즈 핀토, 자이다
 미국 일리노이 60208 에반스톤 클라크 스트리트 633 노쓰웨스턴 유니버시티 내
- 스튜, 사무엘 아이작
 미국 일리노이 60208 에반스톤 클라크 스트리트 633 노쓰웨스턴 유니버시티 내
- (74) 대리인
 특허법인다나

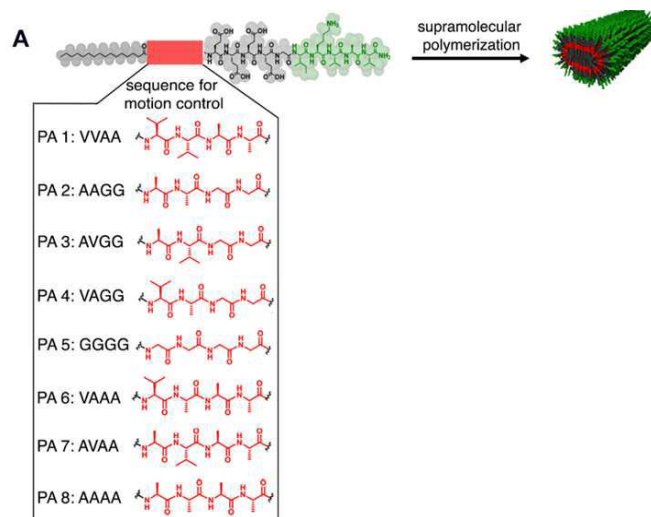
전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 발명의 명칭 동적 생활성 지지체 및 이의 중추신경계 손상 후 치료적 용도

(57) 요약

본원에서는 펩티드 양친매성 분자(PA), PA를 포함하는 초분자 어셈블리, PA를 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, IKVAV PA 및 성장 인자 모방 PA를 포함하는 초분자 어셈블리가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 신경계 손상을 치료하는 방법에 사용된다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 25/00 (2018.01)

C07K 14/001 (2013.01)

C07K 14/50 (2013.01)

C07K 2319/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자(peptide amphiphiles)를 포함하는 초분자 어셈블리(supramolecular assembly)로서,

상기 적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자는

- a. 소수성 세그먼트(hydrophobic segment), 구조성 펩티드 세그먼트(structural peptide segment), 하전된 펩티드 세그먼트(charged peptide segment), 및 아미노산 서열 IKVAV(서열 번호: 1)를 포함하는 생활성 펩티드(bioactive peptide)를 포함하는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자; 및
- b. 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드(growth factor mimetic peptide) 양친매성 분자를 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 0.3 미만의 형광 이방성 값(fluorescence anisotropy value)을 가지는 초분자 어셈블리.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $4s^{-1}$ 미만의 양성자 이완 속도(proton relaxation rate)($^1H-R_2$)를 가지는 초분자 어셈블리.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소수성 세그먼트는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 소수성 세그먼트는 16개 탄소 알킬 사슬(C_{16})을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조성 펩티드 세그먼트는 A_2G_2 를 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 하전된 펩티드 세그먼트는 E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 생활성 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착되는 초분자 어셈블리.

청구항 9

제8항에 있어서,
상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기인 초분자 어셈블리.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, V_2A_2 또는 A_2G_2 를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 12

제11항에 있어서,
상기 성장 인자 모방 서열은 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 모방 서열, 섬유아세포 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF-2) 모방 서열, 신경교세포 유래 신경영양 인자(Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 모방 서열, 뇌 유래 신경영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 모방 서열, 또는 네트린-1(Netrin-1) 모방 서열인 초분자 어셈블리.

청구항 13

제12항에 있어서,
상기 성장 인자 모방 서열은 FGF-2 모방 서열인 초분자 어셈블리.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 FGF-2 모방 서열은 YRSRKYSSWYVALKR(서열 번호: 2)을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 성장 인자 모방 서열은 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착되는 초분자 어셈블리.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기인 초분자 어셈블리.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 초분자 어셈블리.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 초분자 어셈블리를 포함하는 조성물.

청구항 21

a. 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 하전된 펩티드 세그먼트, 및 아미노산 서열 IKVAV(서열 번호: 1)를 포함하는 생활성 펩티드를 포함하는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자; 및

b. 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 조성물로서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 상호작용하여 조성물 내에서 초분자 어셈블리를 형성하는 조성물.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 0.3 미만의 형광 이방성 값을 가지는 조성물.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $4s^{-1}$ 미만의 양성자 이완 속도($^1H-R_2$)를 가지는 조성물.

청구항 24

제21항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소수성 세그먼트는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서,

상기 소수성 세그먼트는 16개의 탄소 알킬 사슬(C_{16})을 포함하는 조성물.

청구항 26

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 구조성 펩티드 세그먼트는 A_2G_2 를 포함하는 조성물.

청구항 27

제21항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하전된 펩티드 세그먼트는 E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함하는 조성물.

청구항 28

제21항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생활성 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착되는 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서,

상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기인 조성물.

청구항 30

제21항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함하는 조성물.

청구항 31

제21항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, VVAA 또는 AAGG를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, EE, EEE, 또는 EEEE를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함하는 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서,

상기 성장 인자 모방 서열은 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 모방 서열, 섬유아세포 성장 인자 2(FGF-2) 모방 서열, 신경교세포 유래 신경영양 인자(GDNF) 모방 서열, 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF) 모방 서열, 또는 네트린-1 모방 서열인 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서,

상기 성장 인자 모방 서열은 FGF-2 모방 서열인 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서,

상기 FGF-2 모방 서열은 YRSRKYSSWYVALKR(서열 번호: 2)을 포함하는 조성물.

청구항 35

제31항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 성장 인자 모방 서열은 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착되는 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서,

상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기인 초분자 어셈블리.

청구항 37

제21항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는

$C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 조성물.

청구항 38

제21항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAVAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAVAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함하는 조성물.

청구항 40

제21항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

대상체의 신경계 손상을 치료하는 방법에 사용하기 위한 조성물.

청구항 41

제40항에 있어서,

상기 신경계 손상은 중추신경계 손상인 조성물.

청구항 42

제41항에 있어서,

상기 중추신경계 손상은 척수 손상인 조성물.

청구항 43

제21항 내지 제39항 중 어느 한 항의 조성물을 대상체에게 제공하는 것을 포함하는, 대상체의 신경계 손상을 치료하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서,

상기 신경계 손상은 중추신경계 손상인 방법.

청구항 45

제44항에 있어서,

상기 중추신경계 손상은 척수 손상인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미 공군 연구소(Air Force Research Laboratory)에서 부여한 계약 번호 FA8650-15-2-5518, 미국 국립 노화 연구소(National Institute on Aging)에서 부여한 과제 번호 R01NS104219, 및 미국 국립 신경질환 뇌졸중 연구소(National Institute on Neurological Disorders and Stroke)에서 부여한 과제 번호 R21NS107761 및 R21NS107761-01A1에 따라 정부 지원을 받아 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대한 특정 권리를 갖는다.

[0002] 본 출원은 2021년 2월 23일에 출원된 미국 가출원 제63/152,498에 대한 우선권을 주장하며, 그 전체 내용은 모든 목적을 위해 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0003] 본원에서는 펩티드 양친매성 물질(peptide amphiphiles, PAs), PA를 포함하는 초분자 어셈블리, PA를 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, IKVAV PA 및 성장 인자 모방 PA를 포함하는 초분자 어셈블리가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 신경계 손상을 치료하는 방법에 사용된다.

배경 기술

[0004] 성인 중추신경계(CNS)에서 손상된 축삭은 재생되지 않기 때문에 외상성 손상 후 영구적인 마비를 피할 수 있는 치료법의 개발은 여전히 주요 과제이다. 새로운 신호 전달 전략으로 떠오르는 것은 치료용 화물을 전달하기 위해 특정 세포를 표적으로 하는 나노 구조 또는 세포의 공간에서 생활성 지지체 역할을 하는 물질을 사용하는 것이다. 그러나 전달된 화물의 높은 생활성을 가능하게 하는 나노 구조의 설계를 최적화하는 방법에 대한 이해가 부족하여 성공이 제한되고, 현재까지 매우 효과적인 치료법이 부족하다.

발명의 내용

[0005] 일부 측면에서, 초분자 어셈블리가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자(peptide amphiphiles)를 포함하는 초분자 어셈블리가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자는 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 하전된 펩티드 세그먼트, 및 아미노산 서열 IKVAV를 포함하는 생활성 펩티드를 포함하는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자; 및 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 0.3 미만의 형광 이방성 값(fluorescence anisotropy value)을 가진다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $4s^{-1}$ 미만의 양성자 이완 속도(proton relaxation rate)($^1H-R_2$)를 가진다.

[0006] 일부 구현예에서, 상기 소수성 세그먼트는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 소수성 세그먼트는 16개의 탄소 알킬 사슬(C_{16})을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 구조성 펩티드 세그먼트는 A_2G_2 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하전된 펩티드 세그먼트는 E_2 , E_3 또는 E_4 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 생활성 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기이다. 일부 구현예에서, 상기 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함한다.

[0007] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, V_2A_2 또는 A_2G_2 를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 혈관 내피 성장 인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 모방 서열, 섬유아세포 성장 인자 2(fibroblast growth factor 2, FGF-2) 모방 서열, 신경교세포 유래 신경 영양 인자(Glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF) 모방 서열, 뇌 유래 신경 영양 인자(brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 모방 서열, 또는 네트린-1(Netrin-1) 모방 서열이다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 FGF-2 모방 서열이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 FGF-2 모방 서열은 YRSRKYSSWYVALKR(서열번호 2)을 포함한다. 일

부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기이다.

[0008] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다.

[0009] 일부 측면에서, 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 초분자 어셈블리를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 하전된 펩티드 세그먼트, 및 아미노산 서열 IKVAV를 포함하는 생활성 펩티드를 포함하는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자; 및 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 상호작용하여 조성물 내에서 초분자 어셈블리를 형성한다.

[0010] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 0.3 미만의 형광 이방성 값을 가진다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $4s^{-1}$ 미만의 양성자 이완 속도($^1H-R_2$)를 가진다. 일부 구현예에서, 상기 소수성 세그먼트는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서 상기 소수성 세그먼트는 16개의 탄소 알킬 사슬(C_{16})을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 구조성 펩티드 세그먼트는 A_2G_2 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하전된 펩티드 세그먼트는 E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 생활성 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기이다. 일부 구현예에서, 상기 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAV$ 를 포함한다.

[0011] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, V_2A_2 또는 A_2G_2 를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_2 , E_3 , 또는 E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 모방 서열, 섬유아세포 성장 인자 2(FGF-2) 모방 서열, 신경교세포 유래 신경영양 인자(GDNF) 모방 서열, 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF) 모방 서열, 또는 네트린-1 모방 서열이다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 FGF-2 모방 서열이다. 일부 구현예에서, 상기 FGF-2 모방 서열은 YRSRKYSSWYVALKR(서열번호 2)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 펩티드는 링커에 의해 상기 하전된 펩티드 세그먼트에 부착된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 단일 글리신(G) 잔기이다.

[0012] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKAV$ 를 포함하고, 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다.

[0013] 본원에 기술된 조성물은 대상체의 신경계 손상을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 신경계 손상은 중추신경계 손상이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 상기 중추신경계 손상은 척수 손상이다.

[0014] 일부 측면에서, 대상체의 신경계 손상을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조성물을 대상체에게 제공하는 것을 포함하는, 대상체의 신경계 손상을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 신경계 손상은 중추신경계 손상이다. 일부 구현예에서, 상기 중추신경계 손상은 척수 손상이다.

[0015] 본 개시의 다른 측면 및 구현에는 첨부된 자료 및 도면을 참조하여 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1A-1E는 조사된 IKVAV PA 분자의 라이브러리를 보여준다. (A) 사용된 IKVAV PA 분자의 특정 화학 구조와 IKVAV 생활성 신호를 표시하는 초분자 나노섬유의 분자 그래픽 표시. (B) 라이브러리에 있는 IKVAV PA의 Cryo-TEM 현미경 사진 및 단일 IKVAV PA 필라멘트에 대한 RMSF 값을 색상으로 구분하여 표시한 것. (C) 다양한 IKVAV PA 분자의 평균 RMSF 값에 대한 막대 그래프 (오차 막대는 3개의 독립적인 시뮬레이션에 해당함; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (D) SAXS 패턴 및 (E) 다양한 IKVAV PA 나노섬유의 WAXS 프로파일 (명확성을 위해 산란 강도를 수직으로 오프셋함; 약 1.35Å의 β -시트 간격에 해당하는 브래그 피크(Bragg peak)는 회색 상자 안에 표시됨). 스케일 바: 200nm.

도 2A-2J는 초분자 운동이 인비트로에서 hNPC 신호전달에 미치는 영향을 보여준다. (A) 형광 탈분극 측정에서 프로브로 사용되는 DPH의 화학적 구조와 위치를 나타내는 IKVAV PA 나노섬유의 분자 그래픽 표시(상단); IKVAV PA 용액의 형광 이방성 막대 그래프 (오차 막대는 3개의 독립적인 실험에 해당함; n.s. 유의하지 않음, *** $P < 0.0001$, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (B) NMR로 프로브된 K 잔기를 강조하는 IKVAV 펩티드 서열의 화학 구조(상단); 조사된 다양한 IKVAV PA에 대한 K 이완 시간(relaxation time)의 막대 그래프 (오차 막대는 조건당 3회 실행에 해당함; *** $P < 0.0001$ vs IKVAV PA1, # $P < 0.05$, ### $P < 0.0001$ vs IKVAV PA2 및 + $P < 0.05$, +++ $P < 0.0001$ vs IKVAV PA5, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (C) hNPC에 사용되는 분화 조건. (D) IKVAV PA1, PA2, PA4 및 PA5로 처리된 hNPC의 대표적인 현미경 사진; NESTIN-줄기 세포(빨간색), ITGB1-수용체(녹색) 및 DAPI-핵(파란색). (E) 라미닌(laminin) 및 다양한 IKVAV PA로 처리된 hNPC에서 ITGB1, p-FAK, FAK, ILK 및 TUB-1의 WB 결과. (F) IKVAV PA1, PA2, PA4 및 PA5로 처리된 hNPC의 대표적인 공초점 현미경 사진; NESTIN-줄기 세포(빨간색), SOX-2-줄기 세포(녹색), TUB-1-뉴런(흰색) 및 DAPI-핵(파란색). 다양한 IKVAV PA로 처리된 (G, H) SOX-2⁺ 및 NESTIN⁺-줄기 세포(G) 및 TUB-1⁺ 신경 세포(H)의 백분율에 대한 막대 그래프 (오차 막대는 3개의 독립적인 분화에 해당함; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IKVAV PA2 및 ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs IKVAV PA5, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (I) 칼슘 이온의 없을 때(No Ca²⁺) 또는 있을 때(Ca²⁺) IKVAV PA2 나노섬유에 대해 얻은 형광 이방성 (왼쪽) 및 K 잔류물 이완 시간 (오른쪽) (*** $P < 0.001$, 스튜던트 t-검정). (J) Ca²⁺의 없을 때(-) 또는 있을 때(+)에서 IKVAV PA2로 처리된 hNPC에서 ITGB1, p-FAK, FAK 및 ILK의 WB 결과. 스케일 바: (D) 10mm, (F) 100mm.

도 3A-3L은 2개의 동일한 생활성 서열을 갖는 2개의 화학적으로 다른 PA 지지체가 SCI 후 피질척수 축삭의 성장에 차이를 나타냄을 보여준다. (A) 사용된 두 PA 분자의 화학 구조. (B) 두 개의 생활성 신호를 표시하는 초분자 나노섬유의 분자 그래픽 표시(상단); FGF2 PA(FGF2 PA1 및 FGF2 PA2)와 공동-조립된 IKVAV PA2의 cryo-TEM 현미경 사진(하단). (C) IKVAV PA2(녹색) 및 FGF2 PA(FGF2 PA1, 빨간색 및 FGF2 PA2, 파란색)와 공동 조립된 각각의 저장 탄성물. (D) Alexa 647로 공유결합되어 표시된 IKVAV PA2+FGF2 PA1(빨간색)이 주입된 척수(녹색)의 형광 현미경 사진. (E) 이식 후 시간에 따른 PA 지지체 부피의 점 플롯. (F) BDA 및 PA 주입 부위를 보여주는 모식도(왼쪽); NeuN-뉴런(녹색), BDA-표지 뉴런(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색) 뇌 피질의 형광 현미경 사진(상단, 오른쪽); 및 GFAP-성상교세포(녹색), BDA-표지 하강 축삭(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색)에 대해 염색된 횡단 척수 단면의 형광 현미경 사진 (하단, 오른쪽). (G) 대조군(sham), IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2 그룹의 세로 척수 단면의 형광 현미경 사진; GFAP-성상교세포(녹색), BDA-표지 축삭(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색); 세로 흰색 점선은 근위 경계(PB), 원위 경계(DB) 및 병변의 중앙 부분(LC)을 나타낸다. (H) G의 대표적인 확대 이미지. (I) 표시된 각 위치에서 교차하는 축삭의 수를 세는 데 사용되는 개략적인 병변 부위 및 수직선(상단); 교차 축삭 수의 플롯(하단) (오차 막대는 그룹당 6마리의 동물에 해당함; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 대조군 및 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs IKVAV PA2 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2 그룹, Bonferroni를 사용한 양방향 ANOVA의 반복 측정). (J) 대조군, IKVAV PA2, IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2의 WB 결과(왼쪽) 및 GAP43 및 MBP 단백질에 대한 정규화된 값의 점 플롯(오른쪽) (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 대조군 및 ### $P < 0.001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (K) BDA-표지 축삭 재성장(빨간색) 및 미엘린 기저 단백질(MBP, 녹색)(왼쪽) 및 라미닌(흰색)(오른쪽)의 대표적인 3D 형광 현미경 사진. (L) J에 기술된 조건

에서 WB 결과(왼쪽)와 라미닌 및 피브로넥틴 발현에 대한 표준화된 값의 점 플롯(오른쪽) (** $P < 0.001$ vs 대조군 및 $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). E의 데이터 포인트는 그룹당 3마리의 동물에 해당하고 J 및 L의 데이터 포인트는 그룹당 4마리의 동물에 해당한다. 스케일 바: (D, G) 1500 μm , (F) 25 μm (상단) 및 200 μm (하단), (H) 100 μm , (K) 2 μm .

도 4A-4D는 2개의 동일한 생활성 서열을 갖는 2개의 화학적으로 다른 PA 지지체가 혈관신생의 차이를 나타낸다는 것을 보여준다. (A) 손상되지 않은 IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 대조군(sham) 그룹의 횡단 척수 단면의 형광 현미경 사진; GFAP-성상교세포(녹색), DiI-표지 혈관(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색). (B) A 그룹의 횡단면에서 혈관 면적 비율, 관류된 혈관 길이 및 가지 수의 점 플롯($^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.0001$ vs 대조군 및 $^{\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#}P < 0.0001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (C) IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2를 주입한 동물의 병변 중앙에 있는 $\text{BrdU}^+/\text{CD31}^+$ 세포의 형광 이미지; CD31-혈관(녹색), BrdU-새로 생성된 세포(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색). (D) IKVAV PA2 단독, IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 식염수(대조군)로 처리한 그룹에서 mm^2 당 $\text{BrdU}^+/\text{CD31}^+$ 세포 수의 점 플롯 ($^*P < 0.05$, $^{***}P < 0.001$ vs 대조군 및 $^{\#\#\#}P < 0.0001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (E) WB 결과(왼쪽) 및 CD31 단백질에 대한 표준화된 값의 점 플롯(오른쪽)($^{**}P < 0.001$, $^{***}P < 0.0001$ vs 대조군 및 $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). B와 D의 데이터 포인트는 그룹당 6마리의 동물에 해당하고 E의 데이터 포인트는 그룹당 4마리의 동물에 해당한다. 스케일 바: (A) 200 μm , (C) 25 μm

도 5A-5D는 2개의 동일한 생활성 서열을 갖는 화학적으로 다른 2개의 PA 지지체가 뉴런 생존 및 기능 회복에 차이를 나타낸다는 것을 보여준다. (A) 손상되지 않은 IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 대조군 그룹에 해당하는 횡단 척수 단면의 형광 현미경 사진; NeuN-뉴런(녹색), DiI-표지 혈관(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색), 점선은 회백질(뿔)을 나타낸다. (B) A의 슬라이스에 대한 전각(ventral horn) 영역의 고배율 이미지(왼쪽); NeuN-뉴런(녹색), DiI-표지 혈관(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색); ChAT-운동 뉴런(녹색), DiI-표지 혈관(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색)(오른쪽). (C) 횡단면당 NeuN^+ (왼쪽) 및 ChAT^+ (오른쪽) 세포의 수를 보여주는 점 플롯(데이터 포인트는 총 48개 단면에 해당함; 동물당 8개 단면 및 그룹당 6개 동물; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs 대조군 및 $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (D) 운동을 위한 생체 내 실험의 실험 타임라인(상단) 및 Basso Mouse Scale(BMS)(하단)(오차 막대는 그룹당 38마리의 동물에 해당함; $^{**}P < 0.001$, $^{***}P < 0.0001$ 모든 PA 그룹 vs 대조군 및 $^{\#\#\#}P < 0.0001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 IKVAV PA2 그룹(Bonferroni를 사용한 양방향 ANOVA의 반복 측정). 스케일 바: (A) 200 μm , (B) 25 μm .

도 6A-6J는 서로 다른 초분자 운동을 나타내는 2개의 PA 지지체 사이의 시험관 내 세포 신호 전달 차이를 검증하는 데이터를 보여준다. (A) IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2로 처리된 HUVEC의 공초점 현미경 사진; ACTIN-세포골격(빨간색), DAPI-핵(파란색). (B) 라미닌+FGF-2, IKVAV PA2 단독, IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2로 처리된 HUVEC의 가지 수에 대한 막대 그래프. (C) WB 결과(왼쪽)와 B의 조건을 사용하여 활성화 FGFR1(p-FGFR1) 대 총 FGFR1(FGFR1) 및 활성화 ERK1/2(p-ERK1/2)에 대한 정규화된 값의 막대 그래프(오른쪽). (D) IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2 코팅에 대한 hNPC의 공초점 현미경 사진; EDU-증식 마커(빨간색), SOX-2-신경 줄기세포 마커(녹색) 및 DAPI-핵(파란색). (E) 다양한 코팅의 $\text{EDU}^+/\text{SOX-2}^+$ 세포 비율에 대한 막대 그래프. (F) WB 결과(왼쪽) 및 활성화 FGFR1(p-FGFR1) 대 총 FGFR1(FGFR1) 및 b1 INTEGRIN(ITGB1)에 대한 정규화된 값의 막대 그래프(오른쪽). (G) 6.81ppm의 FGF2 모방 신호에서 Y 및 W 아미노산의 방향족 양성자의 ^1H -NMR 스핀-스핀 이완 시간(실선은 단일 선형 최적 적합선). (H) G로 측정된 방향족 이완 시간의 막대 그래프(오차 막대는 조건당 3회 실행에 해당함, $^*P < 0.05$ 스튜던트 t-검정). (I) Cy3 염료로 화학적으로 변형된 FGF2 PA의 형광 이방성(오차 막대는 3개의 독립적인 실험에 해당함, $^{***}P < 0.001$ 스튜던트 t-검정). (J) FGF2 PA 클러스터의 RMSF 값을 색상으로 구분하여 표시한 그림(왼쪽)과 이에 대응하는 막대 그래프(오른쪽)(IKVAV PA2 분자는 투명 회색으로 표시되고 이온과 물 분자는 명확성을 위해 제거했으며 시뮬레이션 상자는 파란색으로 표시됨)(오차 막대는 5개의 독립적인 시뮬레이션에 해당함; $^{**}P < 0.01$ 스튜던트 T-검정). B와

E의 오차 막대는 3개의 독립적인 실험에 해당하고 C와 F의 오차 막대는 조건당 4개의 독립적인 실험에 해당함.

*** $P < 0.0001$ vs Laminin+FGF2 및 $^{###}P < 0.0001$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA. 스케일 바: (A) 200 μm , (D) 100 μm .

도 7은 IKVAV PA의 화학 구조(왼쪽)와 질량 스펙트럼(오른쪽)을 보여준다.

도 8은 IKVAV PA의 시간에 따른 평균 제곱근 편차(RMSD)를 나타내는 플롯을 보여준다.

도 9는 오르니틴 코팅에서 배양되고 라미닌 및 IKVAV PA 라이브러리 처리된 hNPC에서 ITGB1, p-FAK/FAK, ILK 및 TUJ-1에 대한 표준화된 값의 막대 그래프를 보여준다 (오차 막대는 3개의 독립적인 분화에 해당함; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IKVAV PA2 및 $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, $^{###}P < 0.001$ vs IKVAV PA5, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA).

도 10A-10C는 초분자 운동 및 시험관 내 세포 신호전달에 대한 칼슘의 영향을 보여준다. (A) 칼슘이 없거나 (No Ca^{2+}) 또는 있을 때(Ca^{2+}) IKVAV PA2 및 IKVAV PA5 용액의 이방성 (오차 막대는 3개의 독립적인 실험에 해당함; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 스튜던트 T-검정). (B) A에 언급된 조건에서 배양된 hNPC의 대표적인 형광 현미경 사진. (C) 칼슘(Ca^{2+})의 부재(-) 또는 존재(+) 하에서 IKVAV PA2 또는 IKVAV PA5로 처리한 hNPC에서 ITGB1, p-FAK/FAK, ILK 및 TUJ-1에 대한 표준화된 단백질 수준을 나타내는 WB 결과(왼쪽) 및 해당 막대 그래프(오른쪽) (칼슘 단독(+)이 대조군으로 사용되었으며 오차 막대는 조건당 3개의 독립 실험에 해당, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 스튜던트 T-검정). 스케일 막대: 10 μm .

도 11A-11C는 다양한 물비에서 FGF2 PA와 공동-조립된 IKVAV PA2의 cryo-TEM 이미지 및 저장 탄성률(Storage Modulus)을 보여준다. (A) 95:5, (B) 90:10 및 (C) 80:20의 물비로 FGF2 PA(PA1 또는 PA2)와 공동 조립된 IKVAV PA2의 cryo-TEM 현미경 사진(왼쪽) 및 저장 탄성률(오른쪽) (데이터 포인트는 조건당 3개의 복제본에 해당. ns는 유의하지 않음을 나타냄, $^*P < 0.05$, 스튜던트 양측 T-검정). 스케일 바: 200nm.

도 12A-12F는 공동 조립된 IKVAV PA2+FGF2 PA 시스템의 특성을 보여준다. IKVAV PA2(녹색), IKVAV PA2+FGF2 PA1(빨간색) 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2(파란색)의 (A) SAXS 산란 패턴, (B) WAXS 프로파일 및 (C) FT-IR. (D) IKVAV PA2(녹색), IKVAV PA2+FGF2 PA1(빨간색) 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2(파란색)의 고배율 네거티브 TEM 이미지. (E) D에 언급된 조건의 섬유 폭 (오차 막대는 조건당 측정된 50개의 섬유에 해당함; ** $P < 0.01$ vs IKVAV PA2 및 $^{\#}P < 0.05$ vs IKVAV PA2+FGF2 PA1, Bonferroni 단방향 ANOVA). (F) 다양한 비율의 IKVAV PA2, FGF2 PA1, FGF2 PA2 및 그 공동 조립체의 600nm에서의 광학 밀도(O.D.) 플롯(왼쪽)과 FGF2 PA(주황색) 및 IKVAV PA2(빨간색)와 공동 조립된 FGF2 PA의 사진(오른쪽) (오차 막대는 조건당 3개의 복제본에 해당; *** $P < 0.0001$ vs Bonferroni를 사용한 공동 조립된 샘플 단방향 ANOVA). 스케일 바: 100nm.

도 13A-13E는 이중 신호 공동 어셈블리가 주입된 투명 척수를 보여준다. Alexa Fluor® 647-표지 IKVAV PA2의 (A) 화학 구조 및 (B) 질량 스펙트럼. 및 (C) Alexa Fluor® 647-표지 IKVAV PA2의 Cryo-TEM 이미지. (D) 조직 제거 전(non-cleared) 및 후(Cleared) PA를 주입한 마우스 척수의 사진. (E) IKVAV PA2+FGF2 PA1 또는 IKVAV PA2+FGF2 PA2(둘 다 빨간색)가 주입된 마우스 척수(녹색)의 전체 현미경 사진 재구성 (IKVAV PA2에는 Alexa Fluor® 647-표지가 1% 포함). 스케일 바: (C) 100 nm 및 (E) 1000 μm .

도 14A-14D는 CST 축삭 재생에 대한 IKVAV PA의 효과를 보여준다. (A) 백본 PA, IKVAV PA1, IKVAV PA2 및 IKVAV PA4 그룹의 세로 척수 단면의 형광 현미경 사진; GFAP-성상교세포(녹색), BDA-표지 축삭(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색); 수직 흰색 점선은 근위 경계(PB), 원위 경계(DB) 및 병변의 중앙 부분(LC)을 나타낸다. (B) A의 대표적인 확대 이미지. (C) 표시된 각 위치에서 교차하는 축삭의 수를 세는 데 사용되는 개략적인 병변 부위 및 수직선(상단); 교차 축삭 수의 플롯(하단) (오차 막대는 그룹당 6마리의 동물에 해당함; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs 대조군, $^+P < 0.05$, $^{++}P < 0.01$ vs IKVAV PA1 및 $^{\#}P < 0.05$ vs IKVAV PA4 그룹, Bonferroni를 사용한 양방향 ANOVA의 반복 측정). (D) 대조군, 백본 PA, IKVAV PA1, IKVAV PA2 및 IKVAV PA4의 WB 결과(하단) 및 이에 대한 GFAP의 정규화된 단백질 수준을 나타내는 막대 그래프 (상단) (데이터 포인트는 조건당 4마리의 동물에 해당함; *** $P < 0.001$ vs 대조군, $^{\#}P < 0.05$ vs 백본 PA, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). 스케일 바: (A) 1500

μm 및 (B) 100 μm.

도 15A-15F는 축삭 재성장 및 신경교 흉터 형성에 대한 FGF2 PA와 공동-조립된 IKVAV PA2의 효과를 보여준다. (A) 식염수 용액(대조군), IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 IKVAV PA2 단독을 주입한 동물의 세로 척수 단면의 형광 이미지; BDA-표지 하강 축삭(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색); 수직 흰색 점선은 근위 경계(PB) 및 원위 경계(DB)를 나타낸다. (B) A에서 언급한 조건에서 병변 중앙에 있는 BDA-표지 축삭(빨간색)의 상세 이미지; 흰색 수직 점선은 병변(LC)의 중앙 부분을 나타낸다. (C) A에서 언급한 조건에서 병변 경계 내 GFAP-성상교세포(녹색) 및 DAPI-핵(파란색)에 대해 염색된 세로 척수 단면의 대표 이미지. (D) A(상단)의 조건을 사용한 WB 결과(하단) 및 GFAP에 대한 정규화된 단백질 수준을 나타내는 해당 막대 그래프 (데이터 포인트는 조건당 4마리의 동물에 해당함; ***P<0.001 vs 대조군, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA). (E) BDA-표지 축삭(빨간색), GFAP-성상교세포(녹색) 및 DAPI-핵(파란색)의 병변 중앙에서 촬영한 대표적인 3D 형광 현미경 사진. (F) IKVAV PA2 그룹에서 미엘린 기저 단백질(MBP, 녹색)(상단) 및 라미닌(흰색)(하단)으로 덮인 BDA-표지 축삭 재생장의 3D 현미경 사진 재구성. 스케일 바: (A, C) 100 μm, (B) 50 μm 및 (E, F) 2 μm.

도 16A-16E는 세로토닌성 뉴런 재생장에 대한 FGF2 PA와 공동-조립된 IKVAV PA2의 효과를 보여준다. (A) 대조군, IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 IKVAV PA2 그룹의 세로 척수 단면의 형광 현미경 사진; 라미닌-ECM(녹색), 5HT-세로토닌성 뉴런(빨간색) 및 DAPI-핵(파란색). (B, C) A에 대한 (B) 근위 경계(PB) 및 (C) 원위 경계(DB)의 대표적인 확대 이미지; 흰색 수직 점선은 PB와 DB를 나타낸다. (D) 표시된 각 위치에서 교차하는 5HT 축삭의 수를 세는 데 사용되는 개략적인 병변 부위 및 수직선(상단); 교차 축삭 수의 플롯(하단) (오차 막대는 그룹당 6마리의 동물에 해당함; *P<0.05, **P<0.01 vs. 대조군 및 #P<0.05 vs. IKVAV PA2 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2 그룹, Bonferroni를 사용한 양방향 ANOVA의 반복 측정). (E) IKVAV PA2+ FGF2 PA1의 병변 중앙(LC)의 대표적인 확대 이미지. 스케일 바: (A) 1500 μm 및 (B,C) 100 μm (E) 50 μm.

도 17A-17E는 이중 신호 공동-어셈블리를 주입한 동물의 발자국 분석을 보여준다. (A) 대조군, IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2 그룹에서 손상 3개월 후 걸을 때 마우스 뒷다리의 위치를 나타내는 대표 사진. (B) 식염수 용액(대조군), IKVAV PA2+FGF2 PA1, IKVAV PA2+FGF2 PA2, IKVAV PA2로 처리된 동물의 척수에 병변을 생성하는 데 사용된 충격력을 나타내는 막대 그래프 (데이터 포인트는 분석된 38마리의 동물을 나타냄; ns는 유의하지 않음을 나타냄). (C) B에 플롯된 다양한 조건으로 주입된 동물의 대표적인 발자국. (D, E) B에 언급된 다양한 조건으로 주입된 동물의 (D) 보폭(stride length, mm) 및 (E) 보간(stride width, mm)을 나타내는 막대 그래프 (데이터 포인트는 조건당 38마리의 동물에 해당함; ***P<0.0001 vs 대조군 및 ###P<0.0001 vs IKVAV PA2+FGF2 PA1 그룹, Bonferroni를 사용한 단방향 ANOVA).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

정의

본원에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본원에 기재된 구현예의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 일부 바람직한 방법, 조성물, 장치 및 재료가 본원에 기재되어 있다. 그러나, 본 물질 및 방법을 설명하기 전에, 본 발명은 일상적인 실험 및 최적화에 따라 달라질 수 있으므로, 본원에 기술된 특정 분자, 조성물, 방법론 또는 프로토콜에 한정되지 않는다는 것을 이해해야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용된 용어는 특정 버전 또는 구현예를 설명하기 위한 것이며, 본원에 기술된 구현예의 범위를 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.

달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 그러나 상충되는 경우, 정의를 포함한 본 명세서가 우선한다. 따라서, 본원에 기술된 구현예의 맥락에서, 다음과 같은 정의가 적용된다.

본원 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 문맥에서 달리 명시하지 않는 한, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 복수형을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "펩티드 양친매 분자"에 대한 언급은 당업자에게 알려진 하나 이상의 펩티드 양친매 분자 및 이의 증가물 등을 지칭하는 것이다.

본원에 사용된 바와 같이, 용어 "포함하다" 및 그의 언어적 변형은 추가적인 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등의 존재를 배제하지 않고 인용된 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등의 존재를 의미한다. 반대로, "구성된"이라는 용어 및 그의 언어적 변형은 통상적으로 연관된 불순물을 제외하고 인용된 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등의 존재를 나타내며, 인용되지 않은 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등은 제외

된다. "본질적으로 구성된"이라는 문구는 인용된 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등과 조성물, 시스템 또는 방법의 기본 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 모든 추가 특징(들), 요소(들), 방법 단계(들) 등을 나타낸다. 본원의 많은 구현에는 개방형인 "포함하는" 언어를 사용하여 설명된다. 이러한 구현에는 다수의 폐쇄적인 "구성된" 및/또는 "본질적으로 구성된" 구현예를 포함하며, 이러한 언어를 사용하여 대안적으로 청구되거나 설명될 수 있다.

- [0022] 용어 "아미노산"은 달리 명시되지 않는 한, 구조가 이러한 입체 이성질체 형태를 허용하는 경우 천연 아미노산, 비천연 아미노산 및 아미노산 유사체를 모두 D 및 L 입체 이성질체로 지칭한다.
- [0023] 천연 아미노산에는 알라닌(Ala 또는 A), 아르기닌(Arg 또는 R), 아스파라긴(Asn 또는 N), 아스파르트산(Asp 또는 D), 시스테인(Cys 또는 C), 글루타민(Gln 또는 Q), 글루탐산(Glu 또는 E), 글리신(Gly 또는 G), 히스티딘(His 또는 H), 이소류신(Ile 또는 I), 류신(Leu 또는 L), 라이신(Lys 또는 K), 메티오닌(Met 또는 M), 페닐알라닌(Phe 또는 F), 프롤린(Pro 또는 P), 세린(Ser 또는 S), 트레오닌(Thr 또는 T), 트립토판(Trp 또는 W), 티로신(Tyr 또는 Y) 및 발린(Val 또는 V)을 포함한다.
- [0024] 비천연 아미노산에는 아제티딘카복실산, 2-아미노아디프산, 3-아미노아디프산, 베타-알라닌, 나프틸알라닌("naph"), 아미노프로피온산, 2-아미노부티르산, 4-아미노부티르산, 6-아미노카프로산, 2-아미노헵탄산, 2-아미노이소부티르산, 3-아미노이소부티르산, 2-아미노피멜산, 3차-부틸글리신("tBuG"), 2,4-디아미노부티르산, 데스모신, 2, 2'-디아미노피멜산, 2,3-디아미노프로피온산, N-에틸글리신, N-에틸아스파라긴, 호모프롤린("hPro" 또는 "homoP"), 히드록시리신, 알로-히드록시리신, 3-히드록시프롤린("3Hyp"), 4-히드록시프롤린("4Hyp"), 이소테스모신, 알로-이소류신, N-메틸알라닌("MeAla" 또는 "Nime"), N-메틸글리신을 포함하는 N-알킬글리신("NAG"), N-메틸이소류신, N-메틸펜틸글리신을 포함하는 N-알킬펜틸글리신("NAPG"), N-메틸발린, 나프틸알라닌, 노르발린("Norval"), 노르류신("Norleu"), 옥틸글리신("OctG"), 오르니틴("Orn"), 펜틸글리신("pG" 또는 "PGly"), 피페콜산, 티오프롤린("ThioP" 또는 "tPro"), 호모라이신("hLys") 및 호모아르기닌("hArg")을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 용어 "아미노산 유사체"는 C-말단 카복시 그룹, N-말단 아미노 그룹 및 측쇄 생활성 그룹 중 하나 이상이 화학적으로 가역적 또는 비가역적으로 차단되거나, 다른 생활성 그룹으로 변형된 천연 또는 비천연 아미노산을 의미한다. 예를 들어, 아스파르트산-(베타-메틸 에스테르)는 아스파르트산의 아미노산 유사체이다. N-에틸글리신은 글리신의 아미노산 유사체이다; 또는 알라닌 카르복사미드는 알라닌의 아미노산 유사체이다. 다른 아미노산 유사체에는 메티오닌 술폭시드, 메티오닌 술폰, S-(카르복시메틸)-시스테인, S-(카르복시메틸)-시스테인 술폭시드 및 S-(카르복시메틸)-시스테인 술폰이 포함된다.
- [0026] 본원에 사용된 용어 "펩티드"는 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산의 짧은 중합체에 대한 올리고머를 의미한다. 다른 아미노산 중합체(예: 단백질, 폴리펩티드 등)와 달리, 펩티드의 길이는 약 50개 이하의 아미노산이다. 펩티드는 천연 아미노산, 비천연 아미노산, 아미노산 유사체 및/또는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 펩티드는 자연적으로 발생하는 단백질 또는 비천연(인공) 서열의 하위 서열일 수 있다.
- [0027] 본원에 사용된 용어 "인공"은 인간에 의해 설계되거나 제조되고 자연적으로 발생하지 않는 조성물 및 시스템을 의미한다. 예를 들어, 인공 펩티드, 펩토이드 또는 핵산은 비천연 서열(예: 자연 발생 단백질 또는 이의 단편과 100% 동일성이 없는 펩티드)을 포함하는 것이다.
- [0028] 본원에 사용된 "보존적" 아미노산 치환은 펩티드 또는 폴리펩티드 내의 아미노산을 크기 또는 전하와 같은 유사한 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것을 의미한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 다음 8개 그룹 각각은 서로 보존적 치환인 아미노산을 포함한다:
- [0029] 1) 알라닌(A) 및 글리신(G);
- [0030] 2) 아스파르트산(D) 및 글루탐산(E);
- [0031] 3) 아스파라긴(N) 및 글루타민(Q);
- [0032] 4) 아르기닌(R) 및 라이신(K);
- [0033] 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 및 발린(V);
- [0034] 6) 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 및 트립토판(W);
- [0035] 7) 세린(S) 및 트레오닌(T); 및

- [0036] 8) 시스테인(C) 및 메티오닌(M).
- [0037] 자연적으로 발생하는 잔기는 다음과 같이 공통적인 측쇄 특성에 따라 클래스들로 분류될 수 있다: 극성 양성(또는 염기성)(히스티딘(H), 라이신(K), 아르기닌(R)); 극성 음성(또는 산성)(아스파르트산(D), 글루탐산(E)); 극성 중성(세린(S), 트레오닌(T), 아스파라긴(N), 글루타민(Q)); 비극성 지방족(알라닌(A), 발린(V), 류신(L), 이소류신(I), 메티오닌(M)); 비극성 방향족(페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W)); 프롤린 및 글리신; 및 시스테인. 본원에서 사용되는 "반-보존" 아미노산 치환은 펩티드 또는 폴리펩티드의 아미노산을 같은 클래스 내의 다른 아미노산으로 치환하는 것을 의미한다.
- [0038] 일부 구현예에서, 달리 명시하지 않는 한, 보존적 또는 반-보존적 아미노산 치환은 또한 천연 잔기와 유사한 화학적 특성을 갖는 비-천연 발생 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 이러한 비천연 잔기는 일반적으로 생물학적 시스템에서 합성되기보다는 화학적 펩티드 합성에 의해 통합된다. 여기에는 펩티도모방체 및 기타 반전(reversed)되거나 역전(inverted)된 형태의 아미노산 모이어티가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 명세서의 구현예에는 일부 구현예에서 천연 아미노산, 비천연 아미노산 및/또는 아미노산 유사체로 제한될 수 있다.
- [0039] 비-보존적 치환은 한 클래스의 구성원을 다른 클래스의 구성원으로 교환하는 것을 포함할 수 있다.
- [0040] 본원에서 사용되는 용어 "서열 동일성"은 두 폴리머 서열(예: 펩티드, 폴리펩티드, 핵산 등)이 단량체 서브유닛의 순차적 조성이 동일한 정도를 의미한다. 용어 "서열 유사성"이란 두 폴리머 서열(예: 펩티드, 폴리펩티드, 핵산 등)이 보존적 및/또는 반보존적 아미노산 치환에 의해서만 차이가 나는 정도를 의미한다. "서열 동일성 백분율"(또는 "서열 유사성 백분율")은 다음과 같이 계산된다: (1) 비교 창(예: 더 긴 서열의 길이, 더 짧은 서열의 길이, 지정된 창 등)에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 서열을 비교, (2) 동일한(또는 유사한) 단량체를 포함하는 위치의 수를 결정하여(예: 동일한 아미노산이 두 서열에서 모두 발생, 유사한 아미노산이 두 서열에서 모두 발생) 매칭되는 위치의 수를 산출, (3) 매칭되는 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수(예: 더 긴 서열의 길이, 더 짧은 서열의 길이, 지정된 창)로 나누고, (4) 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율 또는 서열 유사성 백분율을 산출한다. 예를 들어, 펩티드 A와 B의 아미노산 길이가 모두 20개이고 한 위치를 제외한 모든 아미노산이 동일한 경우, 펩티드 A와 펩티드 B는 95%의 서열 동일성을 갖는다. 동일하지 않은 위치의 아미노산이 동일한 생물물리학적 특성을 공유하는 경우(예: 둘 다 산성), 펩티드 A와 펩티드 B는 100% 서열 유사성을 갖는다. 다른 예로, 펩티드 C의 아미노산 길이가 20개이고 펩티드 D의 아미노산 길이가 15개이며 펩티드 D의 아미노산 15개 중 14개가 펩티드 C의 일부와 동일한 경우, 펩티드 C와 D는 70%의 서열 동일성을 가지지만 펩티드 D는 펩티드 C의 최적 비교 창(optimal comparison window)에 대해 93.3%의 서열 동일성을 갖는다. 여기서 "서열 동일성 백분율"(또는 "서열 유사성 백분율") 계산의 목적으로 정렬된 서열의 모든 차이는 해당 위치에서 미스매치로 처리한다.
- [0041] 본원에서 참조 서열번호와 특정 퍼센트의 서열 동일성 또는 유사성(예: 70% 이상)을 갖는 것으로 기술된 임의의 폴리펩티드는 또한 해당 참조 서열에 대해 최대 치환(또는 말단 결실) 수를 갖는 것으로 표현될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 Z(예: 100개의 아미노산)와 서열 동일성이 Y% 이상(예: 90%)인 서열은 서열번호 Z에 대해 최대 X개의 치환(예: 10개)을 가질 수 있으며, 따라서 "서열번호 Z에 대해 치환이 X개(예: 10개) 이하"라고 표현할 수도 있다.
- [0042] 본원에서 사용되는 용어 "나노섬유"는 일반적으로 직경이 100 나노미터 미만인 길쭉한 또는 실 모양의 필라멘트(예: 폭 또는 직경보다 훨씬 더 큰 길이 치수를 갖는)를 의미한다.
- [0043] 본원에서 사용되는 용어 "초분자" (예: "초분자 복합체", "초분자 상호작용", "초분자 섬유", "초분자 폴리머" 등)는 분자(예: 폴리머, 거대 분자 등)와 그 결과로 형성되는 다성분 어셈블리, 복합체, 시스템 및/또는 섬유 사이의 비공유 상호작용을 의미한다.
- [0044] 본원에서 사용되는 용어 "자가-조립" 및 "자가-어셈블리"는 구성요소 부분으로부터 불연속적이고 무작위가 아닌 집합 구조를 형성하는 것을 의미하며; 상기 어셈블리는 고유한 화학적 또는 구조적 특성과 해당 구성요소의 인력으로 인해 구성요소(예: 분자)의 무작위 이동을 통해 자발적으로 발생한다.
- [0045] 본원에 사용된 용어 "펩티드 양친매성 분자"는 최소한 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트 및/또는 하전된 펩티드 세그먼트(중중 둘 다)를 포함하는 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 생활성 펩티드(예: IKVAV 펩티드, 성장 인자 모방 펩티드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 링커(예: G)를 포함한다. 상기 펩티드 양친매성 분자는 생리학적 pH에서 알짜 전하(양전하 또는 음전하)를 나타내거나, 양쪽성이온(zwitterionic, 즉, 양전하 및 음전하를 모두 운반)일 수 있다. 특정 펩티드 양친매성 분자

는 (1) 소수성 비-펩티드 세그먼트(예: 6개 이상의 탄소로 이루어진 아실기를 포함), (2) 구조성 펩티드 세그먼트, (3) 하전된 펩티드 세그먼트, (4) 생활성 펩티드 세그먼트(예: IKVAV 펩티드, 성장 인자 모방 펩티드)로 구성되거나 이를 포함한다.

[0046] 본원 및 첨부된 청구항에서 사용되는 용어 "친유성 모이어티" 또는 "소수성 모이어티"는 펩티드 양친매성 분자의 한쪽 말단(예: C-말단, N-말단)에 배치된 모이어티(예: 아실, 에테르, 실폰아마이드 또는 포스포디에스테르 모이어티)를 지칭하며, 본원 및 다른 곳에서 친유성 또는 소수성 세그먼트 또는 성분으로 지칭될 수도 있다. 상기 소수성 세그먼트는 물 또는 다른 극성 용매 시스템에서 양친매성 거동 및 응집체(또는 나노구체 또는 나노섬유) 형성을 제공하기에 충분한 길이여야 한다. 따라서, 본원에 기술된 구현예의 맥락에서, 소수성 성분은 바람직하게는 화학식: $C_n-H_{2n-1}C(O)-$ (여기서, $n=2-25$)의 단일 선형 아실 사슬을 포함하는 것이 바람직하다. 일부 구현예에서, 선형 아실 사슬은 친유성 그룹(포화 또는 불포화 탄소), 팔미트산이다. 그러나, 스테로이드, 인지질 및 탄화불소와 같은 다른 친유성 그룹이 아실 사슬 대신에 사용될 수 있다.

[0047] 본원에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "구조성 펩티드" 또는 "구조성 펩티드 세그먼트"는 일반적으로 소수성 세그먼트와 하전된 펩티드 세그먼트 사이에 배치된 펩티드 양친매성 분자의 일부를 지칭한다. 구조성 펩티드는 일반적으로 인접한 구조성 펩티드 세그먼트의 구조성 펩티드 세그먼트와 수소 결합 또는 기타 안정화 상호 작용(예: 소수성 상호 작용, 반데르발스 상호 작용 등)을 형성하는 경향(propensity)에 따라 선택된 비극성, 비하전 측쇄(예: His(H), Val(V), Ile(I), Leu(L), Ala(A), Phe(F))를 갖는 3~10개의 아미노산 잔기로 구성된다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 α -나선 및/또는 β -시트 이차 구조를 형성하는 경향을 갖는다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트를 갖는 펩티드 양친매성 분자의 어셈블리는 현미경으로 관찰할 때 선형 또는 2D 구조를 나타내고/내거나, 원형 이색성(circular dichroism, CD)으로 관찰할 때 α -나선 및/또는 β -시트 특성을 나타낸다.

[0048] 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 α -나선 및/또는 β -시트 이차 구조에 대한 낮은 경향을 갖는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 4 이하의 β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향을 갖는다. 일부 구현예에서, 4 이하의 β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향을 갖는 구조성 펩티드 세그먼트를 갖는 펩티드 양친매성 분자의 어셈블리는 덜 정렬된 특성(예: 덜 견고한 β -시트 입체형태와 같이 덜 정렬된 이차 구조)을 나타낸다. 이러한 PA는 상대적으로 높은 수준의 내부 운동성을 가지고 동적 초분자 어셈블리를 형성할 수 있으므로 유리할 수 있다. 일부 구현예에서, 4 이하의 β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향을 갖는 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , GGGG)를 갖는 펩티드 양친매성 분자의 나노섬유는 임의의 코일 구조를 형성하는 경향을 나타낸다.

[0049] 본원에서 사용되는 용어 "베타(β)-시트 형성 펩티드 세그먼트"는 β -시트 유사 특성을 나타내는(예: CD로 분석할 때) 경향을 갖는 구조성 펩티드 세그먼트를 지칭한다. 일부 구현예에서, 베타(β)-시트 형성 펩티드 세그먼트의 아미노산은 베타-시트 이차 구조를 형성하는 경향에 따라 선택된다. 20개의 자연 발생 아미노산 중에서 선택된 적합한 아미노산 잔기의 예로는 Met(M), Val(V), Ile(I), Cys(C), Tyr(Y), Phe(F), Gln(Q), Leu(L), Thr(T), Ala(A), 및 Gly(G)(베타 시트 형성 경향 순서대로 나열됨)가 포함된다. 그러나 유사한 베타-시트 형성 경향을 가진 비-자연 발생 아미노산도 사용될 수 있다. 베타 시트를 형성하기 위해 상호 작용할 수 있고/있거나 베타 시트를 형성하는 경향을 가진 펩티드 세그먼트는 잘 알려져있다(예: Mayo et al. Protein Science (1996), 5:1301-1315 참조, 본원에 전체 참조로 통합됨).

[0050] 본원에서 사용되는 용어 "하전된 펩티드 세그먼트"는 하전된 아미노산 잔기 또는 생리학적 조건 하에서 알짜 양전하 또는 음전하를 갖는 아미노산 잔기가 풍부한(예: >50%, >75% 등) 펩티드 양친매성 분자의 일부를 지칭한다. 하전된 펩티드 세그먼트는 산성(예: 음으로 하전), 염기성(예: 양으로 하전) 또는 양쪽이온성(예: 산성 및 염기성 잔기를 모두 갖는)일 수 있다.

[0051] 본원에서 사용되는 용어 "카르복시-풍부 펩티드 세그먼트", "산성 펩티드 세그먼트" 및 "음으로 하전된 펩티드 세그먼트"는 카르복실산 측쇄를 나타내는 측쇄를 갖는 하나 이상의 아미노산 잔기(예: Glu (E), Asp (D), 또는 비천연 아미노산)로 구성된 펩티드 양친매성 분자의 펩티드 서열을 지칭한다. 카르복시-풍부 펩티드 세그먼트는 선택적으로 하나 이상의 추가(예: 비산성) 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 비천연 아미노산 잔기 또는 산성 측쇄를 갖는 펩티드모방체가 사용될 수 있으며, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 이 세그먼트에는 약 2개 내지 약 7개의 아미노산, 또는 약 3개 또는 4개의 아미노산이 존재할 수 있다.

[0052] 본원에서 사용되는 용어 "아미노-풍부 펩티드 세그먼트", "염기성 펩티드 세그먼트" 및 "양으로 하전된 펩티드

세그먼트"는 양으로 하전된 산 측쇄(예: Arg(R), Lys(K), His(H), 또는 비천연 아미노산, 또는 펩티드모방체)를 갖는 하나 이상의 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드 양친매성 분자의 펩티드 서열을 지칭한다. 염기성 펩티드 세그먼트는 선택적으로 하나 이상의 추가(예: 비염기성) 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 염기성 측쇄를 갖는 비천연 아미노산 잔기가 사용될 수 있으며, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 이 세그먼트에는 약 2개 내지 약 7개의 아미노산, 또는 약 3개 또는 4개의 아미노산이 존재할 수 있다.

[0053] 본원에서 사용되는 용어 "생활성 펩티드"는 이와 관련된 서열, 분자 또는 초분자 복합체의 작용을 매개하는 아미노산 서열을 지칭한다. 생활성 펩티드(예: IKVAV 펩티드)를 함유하는 펩티드 양친매성 분자 및 구조(예: 나노섬유)는 생활성 펩티드의 기능성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 생활성 아미노산 서열 IKVAV(서열번호: 1)를 포함하는 "생활성 펩티드"는 본원에서 "IKVAV 펩티드 양친매성 분자" 또는 "IKVAV PA"로 지칭된다. 일부 구현예에서, "생활성 펩티드"는 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함하는 펩티드다. 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함하는 생활성 펩티드는 본원에서 "성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자" 또는 "성장 인자 모방 PA"로 지칭된다.

[0054] 본원에서 사용되는 용어 "생체 적합성"은 세포 또는 유기체에 독성이 없는 물질 및 체제를 지칭한다. 일부 구현예에서, 물질은 시험관 내에서 세포에 첨가될 때 세포 사멸이 약 10% 이하, 일반적으로 5% 이하, 더욱 일반적으로 1% 이하인 경우 "생체 적합성"이 있는 것으로 간주된다.

[0055] 본원에서 폴리머, 하이드로겔 및/또는 상처 드레싱을 설명하기 위해 사용되는 "생분해성"은 생리적 조건에 노출될 때 분해되거나 달리 "부서지는" 조성물을 지칭한다. 일부 구현예에서, 생분해성 물질은 세포 기계(cell machinery), 효소 분해, 화학 공정, 가수분해 등에 의해 분해되는 물질이다. 일부 구현예에서, 상처 드레싱 또는 코팅은 생분해성을 제공하는 가수분해 가능한 에스테르 결합을 포함한다.

[0056] 본원에서 사용되는 문구 "생리적 조건"은 조직의 세포내 및 세포외액에서 발생할 수 있는 화학적(예: pH, 이온 강도) 및 생화학적(예: 효소 농도) 조건의 범위와 관련된다. 대부분의 조직에서 생리학적 pH 범위는 약 7.0내지 7.4이다.

[0057] 본원에서 사용되는 용어 "치료(treat)", "치료(treatment)" 및 "치료하다(treating)"라는 용어는 현재 해당 질환 또는 질병 상태를 경험하거나 앓고 있는 대상체의 특정 질환, 질병 상태(예: 중추신경계 손상) 또는 그 증상의 양이나 심각성을 감소시키는 것을 의미한다. 이 용어가 반드시 완전한 치료(예: 해당 질환, 질병 또는 증상의 완전한 제거)를 의미하는 것은 아니다. "치료"는 질병에 대한 치료법 또는 기술의 모든 투여 또는 적용을 포함하며(예: 인간을 포함한 포유류에서), 질병 억제, 진행 중단, 질병 완화, 퇴행 유발, 또는 상실, 결손 또는 결함이 있는 기능의 회복 또는 복구를 포함하며; 또는 비효율적인 과정의 자극을 포함한다.

[0058] 본원에서 사용되는 용어 "예방(prevent, prevention 및 preventing)"은 현재 해당 질환 또는 질병 상태를 경험하거나 앓고 있지 않은 대상체에게 특정 질환이나 질병 상태(예: 중추신경계 손상)가 발생할 가능성을 감소시키는 것을 의미한다. 이 용어가 반드시 완전하거나 절대적인 예방을 의미하는 것은 아니다. 예를 들어, "중추신경계 손상 예방"은 현재 중추신경계 손상을 경험하거나 진단받지 않은 대상체에게서 중추신경계 손상이 발생할 가능성을 줄이는 것을 의미한다. "중추신경계 손상 예방"을 위해 조성물 또는 방법이 중추신경계 손상의 가능성을 감소시키기만 하면 되고, 그 가능성을 완전히 차단할 필요는 없다. "예방"은 질병이 발생할 가능성을 줄이기 위한 치료법 또는 기술의 투여 또는 적용을 포함한다(예: 인간을 포함한 포유류에서). 이러한 가능성은 집단 또는 개인에 대해 평가될 수 있다.

[0059] 본원에서 사용되는 용어 "병용-투여(co-administration 및 co-administering)"는 대상체에 적어도 두 가지 제제 또는 치료법(예: 본원에 기술된 초분자 어셈블리 및 하나 이상의 치료제)을 투여하는 것을 지칭한다. 일부 구현예에서, 둘 이상의 제제 또는 요법의 병용 투여는 동시에 이루어진다. 다른 구현예에서, 제 1 제제/요법은 제 2 제제/요법에 앞서 투여된다. 당업자는 사용되는 다양한 제제 또는 요법의 제형 및/또는 투여 경로가 다를 수 있음을 이해할 것이다. 병용 투여를 위한 적절한 용량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제 또는 요법이 병용 투여될 때, 각각의 제제 또는 요법은 단독 투여에 적합한 용량보다 낮은 용량으로 투여된다. 따라서, 제제 또는 요법의 병용 투여가 잠재적으로 유해한(예: 독성) 약제의 필요 용량을 낮추는 경우 및/또는 둘 이상의 제제의 병용 투여가 다른 제제의 병용 투여를 통해 제제 중 하나의 유익한 효과에 대한 대상체의 민감화를 초래하는 구현예에서 병용 투여가 특히 바람직하다.

[0060] **발명의 상세한 설명**

[0061] 본원에서는 펩티드 양친매성 분자(PA), PA를 포함하는 조성물, PA를 포함하는 초분자 어셈블리 및 이들의 사용 방법이 제공된다.

- [0062] 일부 측면에서, 본원에 펩티드 양친매성 분자가 제공된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 구현예의 펩티드 양친매성 분자 및 조성물은 당업자에게 잘 알려진 제조 기술을 사용하여, 바람직하게는 표준 고체상 펩티드 합성에 의해 합성되며, 펩티드의 N-말단(또는 C-말단)에서 표준 아미노산 대신에 지방산을 첨가하여 친유성 세그먼트를 만든다(일부 구현예에서는 나노섬유의 정렬이 이전에 개시되지 않았거나 당업계에 사용되지 않은 기술을 통해 수행됨(예: 메쉬 스크린을 통한 압출)). 합성은 일반적으로 링크(Rink) 아마이드 수지(수지로부터 절단된 후 펩티드의 C-말단에 --NH₂기가 생성됨) 또는 왕(Wang) 수지(C-말단에 --OH기가 생성됨)를 사용하여 아미노산이 순차적으로 첨가되는 C-말단에서 시작된다. 따라서, 본원에 기술된 일부 구현예는 --H, --OH, --COOH, --CONH₂ 및 --NH₂로 구성된 그룹으로부터 선택될 수 있는 C-말단 모이어티를 갖는 펩티드 양친매성 분자를 포함한다.
- [0063] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 펩티드에 연결된 소수성 세그먼트(즉, 소수성 꼬리)를 포함한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 구조성 펩티드 세그먼트를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 수소 결합 형성 세그먼트, 또는 베타 시트 형성 세그먼트이다. 일부 구현예에서, 상기 구조성 펩티드 세그먼트는 랜덤 코일 구조를 형성하는 경향(예: 4 이하의 β-시트 입체형태를 형성하는 총 경향)을 갖는다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 정렬된 2차 구조를 형성하는 경향이 낮기 때문에 비교적 높은 수준의 내부 운동성을 갖는다.
- [0064] 일부 구현예에서, 펩티드는 하전된 세그먼트(예: 산성 세그먼트, 염기성 세그먼트, 양쪽이온성 세그먼트 등)를 포함한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 용해도, 유연성, 세그먼트 사이의 거리 등을 추가하기 위한 링커 또는 스페이서 세그먼트를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 소수성 세그먼트의 반대편 말단에 스페이서 세그먼트(예: 펩티드 및/또는 비펩티드 스페이서)를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 세그먼트는 펩티드 및/또는 비펩티드 요소들을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 세그먼트는 하나 이상의 생활성 그룹(예: 알켄, 알킨, 아지드, 티올 등)을 포함한다. 일부 구현예에서, 다양한 세그먼트는 링커 세그먼트(예: 펩티드(예: GG) 또는 비-펩티드(예: 알킬, OEG, PEG 등) 링커)에 의해 연결될 수 있다.
- [0065] 친유성 또는 소수성 세그먼트는 일반적으로 마지막 아미노산 커플링 후 펩티드의 N- 또는 C-말단에 통합되며 아실 결합을 통해 N- 또는 C-말단 아미노산에 연결된 지방산 또는 기타 산으로 구성된다. 수용액에서 PA 분자는 자가-조립(예: 원통형 미셀(일명 나노섬유)로) 친유성 세그먼트를 코어에 묻고 생활성 펩티드를 표면에 표시한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드는 분자간 수소 결합을 거쳐 미셀의 장축에 평행하게 배향된 베타 시트를 형성한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드는 약한 분자간 수소 결합을 나타내며, 그 결과 나노섬유 내에서 덜 견고한 베타-시트 입체형태가 생성된다.
- [0066] 일부 구현예에서, 충분한 길이(예: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30개의 탄소 또는 그 이상, 또는 이들 사이의 임의의 범위)의 소수성(예: 탄화수소 및/또는 알킬/알케닐/알키닐 꼬리, 또는 콜레스테롤과 같은 스테로이드) 세그먼트는 펩티드 세그먼트(예: 펩티드 구조성 펩티드 세그먼트 및 하전된 펩티드 세그먼트)에 공유적으로 커플링되어 펩티드 양친매성 분자를 생성한다. 일부 구현예에서, 이러한 복수의 PA는 물(또는 수용액)에서 나노구조(예: 나노섬유)로 자가-조립될 것이다. 다양한 구현예에서, 펩티드 세그먼트와 소수성 세그먼트의 상대적인 길이는 PA 분자 모양과 나노구조성 구조의 차이를 가져온다. 예를 들어, 더 넓은 펩티드 세그먼트와 더 좁은 소수성 세그먼트는 PA 어셈블리에 영향을 미치는 일반적으로 원뿔형 분자 모양을 초래한다(예: J. N. Israelachvili Intermolecular and surface forces; 2nd ed.; Academic: London San Diego, 1992; 참조, 전체 내용이 본원에 참고로 통합됨). 다른 분자 모양도 조립 및 나노구조적 구조에 비슷한 영향을 미친다.
- [0067] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자 수용액의 자가-조립을 유도하기 위해, 용액의 pH는 변화(상승 또는 하강)되거나 칼슘과 같은 다가 이온, 또는 하전된 폴리머 또는 다른 거대분자를 용액에 첨가할 수 있다.
- [0068] 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트는 비-펩티드 세그먼트(예: 알킬/알케닐/알키닐기)이다. 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트는 4-25개의 탄소(예: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25) 알킬 사슬(예: 포화), 플루오르화 세그먼트, 플루오르화 알킬 꼬리, 헥테로사이클릭 고리, 방향족 세그먼트, 파이-공액 세그먼트, 사이클로알킬, 올리고티오펜 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트는 2-30개의 탄소(예: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30) 아실/에테르 사슬(예: 포화)을 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C₈₋₂₄)을 포함한다. 일부 구현예에서, 소수성 세그먼트는 16개의 탄소 알킬 사슬(C₁₆)을 포함한다.

- [0069] 일부 구현예에서, PA는 하나 이상의 펩티드 세그먼트를 포함한다. 펩티드 세그먼트는 천연 아미노산, 변형된 아미노산, 비천연 아미노산, 아미노산 유사체, 펩티드 모방체, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 세그먼트는 본원에 기술된 하나 이상의 펩티드 서열에 대한 적어도 50%의 서열 동일성 또는 유사성(예: 보존적 또는 반보존적)을 포함한다.
- [0070] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 하전된 펩티드 세그먼트를 포함한다. 하전된 세그먼트는 산성, 염기성, 또는 양쪽이온성일 수 있다.
- [0071] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 산성 펩티드 세그먼트를 포함한다. 예컨대, 일부 구현예에서, 산성 펩티드는 서열에 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상)의 산성 잔기(D 및/또는 E)를 포함한다. 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 길이 최대 7개의 잔기를 포함하고 적어도 50%의 산성 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 $(Xa)_{1-7}$ 을 포함하고, 여기서 각각의 Xa는 독립적으로 D 또는 E이다. 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 E_{2-4} 를 포함한다. 예컨대, 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 E_2 를 포함한다. 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 E_3 를 포함한다. 다른 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 E_4 를 포함한다.
- [0072] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 염기성 펩티드 세그먼트를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 산성 펩티드는 서열에 하나 이상(예: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상)의 염기성 잔기(R, H 및/또는 K)를 포함한다. 일부 구현예에서, 염기성 펩티드 세그먼트는 길이 최대 7개의 잔기를 포함하고 적어도 50%의 염기성 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 산성 펩티드 세그먼트는 $(Xb)_{1-7}$ 을 포함하며, 여기서 각각의 Xb는 독립적으로 R, H 및/또는 K이다.
- [0073] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 구조성 펩티드 세그먼트를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 베타-시트 형성 세그먼트이다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 약한 수소 결합을 나타내고 2차 구조가 결여되어 있다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 약한 수소 결합을 나타내고 견고한 베타-시트 입체형태가 아닌 무작위 코일 구조를 형성하는 경향을 갖는다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 H, I, L, F, V, G, 및 A 잔기 중 하나 이상이 풍부하다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 알라닌- 및 발린-풍부 펩티드 세그먼트(예: V_2A_2 , V_3A_3 , A_2V_2 , A_3V_3 , 또는 V와 A 잔기의 다른 조합 등)를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 4개 이상의 연속적인 A 및/또는 V 잔기, 또는 이들의 보존적 또는 반보존적 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 V_2A_2 를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 알라닌 및 글리신-풍부 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , A_3G_3 , 또는 A와 G 잔기의 다른 조합 등)를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 A_2G_2 를 포함한다. 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 글리신-풍부 펩티드 세그먼트를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 G_3 또는 G_4 를 포함한다.
- [0074] 일부 구현예에서, 구조성 펩티드 세그먼트는 4 또는 4 미만(예: 4 미만, 3.9 미만, 3.8 미만, 3.7 미만, 3.6 미만, 3.5 미만, 3.5 미만, 3.4 미만, 3.3 미만, 3.2 미만, 3.1 미만, 3.0 미만, 2.9 미만, 2.8 미만, 2.7 미만, 2.6 미만, 2.5 미만, 2.4 미만, 2.3 미만, 2.2 미만, 2.1 미만, 2.0 미만, 1.9 미만, 1.8 미만, 1.7 미만, 1.6 미만, 1.5 미만, 1.4 미만, 1.3 미만, 1.2 미만, 1.1 미만 또는 1 미만)의 β -시트 입체형태를 형성하는 총 성향을 갖는다.
- [0075] β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향은 구조성 펩티드 세그먼트 내의 각 아미노산의 β -시트 입체형태를 형성하는 경향의 합으로 계산될 수 있다. β -시트 입체형태를 형성하는 각 아미노산의 경향 및 이를 계산하는 방법은 예를 들어 Fujiwara, K., Toda, H. & Ikeguchi, M. Dependence of α -helical and β -sheet amino acid propensities on the overall protein fold type. *BMC Struct Biol* **12**, 18 (2012)에 기재되어 있으며, 그 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다. 예시적인 값은 하기 표 1에 나타내었다. 구조성 펩티드 세그먼트의 β -시트 입체형태 형성하는 총 경향을 계산하기 위해, 각 아미노산에 대한 표 1의 "총 잔기" 열에 나타난 값을 함께 추가하였다. 예를 들어, A_2G_2 구조성 펩티드 세그먼트의 경우, β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향은 $0.75 + 0.75 + 0.67 + 0.67 = 2.84$ 이다. 구조성 펩티드 세그먼트는 4 이하의 β -시트 입체형태를 형성하는 총 경향을 달성하도록 임의의 적절한 개수 및 조합의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0076] [표 1] β-시트 입체형태에 대한 아미노산 경향

아미노산	노출된 잔기 (Exposed Residues)	파묻힌 잔기 (Buried Residues)	총 잔기 (Total Residues)
V	2.31	1.57	2.00
I	2.02	1.39	1.79
L	1.18	0.93	1.15
M	1.01	0.84	1.01
P	0.49	0.42	0.40
A	0.48	0.72	0.75
C	1.24	1.07	1.36
F	1.50	1.10	1.4
Y	1.71	1.12	1.37
W	1.90	0.91	1.23
Q	0.96	0.82	0.72
S	0.86	0.85	0.81
T	1.58	1.08	1.21
N	0.71	0.76	0.63
H	1.15	0.98	0.99
D	0.61	0.76	0.55
K	1.14	0.98	0.76
E	0.89	0.86	0.65
R	1.27	0.82	0.85
G	0/41	0.81	0.67

[0077]

[0078] 일부 구현예에서, β-시트 입체형태를 형성하는 총 경향이 4 이하인 구조성 펩티드 세그먼트는 구조성 펩티드 세그먼트 내의 아미노산이 이웃 분자와의 상호 작용이 더 약하다는 것을 나타낸다. 예컨대, 구조성 펩티드 세그먼트는 약한 수소 결합 능력을 나타낼 수 있다. 따라서, 이러한 구조성 펩티드 세그먼트 및 이를 포함하는 펩티드 양친매성 분자는 보다 동적인 초분자 어셈블리를 생성할 수 있다. 예컨대, A₂G₂ 구조성 펩티드 세그먼트는 견고한 베타-시트 입체형태가 아닌 무작위의 코일 구조를 나타낼 수 있다.

[0079] 일부 구현예에서, 생활성 펩티드 양친매성 분자(예: IKVAV 펩티드 양친매성 분자)는 상대적으로 낮은 형광 이방성 값을 포함한다. 이방성은 다음의 방정식을 사용하여 계산된다:

$$A = \frac{F_{\parallel} - gF_{\perp}}{F_{\parallel} + 2gF_{\perp}}$$

[0080]

[0081] 여기서 $F_{\parallel}$ 는 여기 평면에 대한 평행 강도를 나타내고, $F_{\perp}$ 는 여기 평면에 대한 수직 강도를 나타내며, g는 수직 및 수평 편광에 대한 검출 시스템의 감도의 강도 비율을 나타내는 격자 인자(G-factor)이다.

[0082] 일부 구현예에서, 생활성 펩티드 양친매성 분자(예: IKVAV 펩티드 양친매성 분자)는 0.3 미만(예: 0.3 미만, 0.29 미만, 0.25 미만, 0.24 미만, 0.23 미만, 0.22 미만, 0.21 미만, 0.2 미만)의 형광 이방성 값을 포함한다.

[0083] 일부 구현예에서, 생활성 펩티드 양친매성 분자(예: IKVAV 펩티드 양친매성 분자)는 비교적 낮은 양성자 이완 속도($^1\text{H-R}_2$)를 포함한다. 더 낮은 양성자 이완 속도는 더 높은 운동성을 나타내므로, 높은 정도의 내부 운동성을 갖는 동적 초분자 어셈블리의 형성을 용이하게 한다. 예컨대, IKVAV 서열에서 K 잔기의 e탄소에 부착된 메틸렌 양성자에 대한 이완 속도는 횡방향-이완 핵자기공명(T2-NMR) 분광법으로 측정할 수 있다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 4s^{-1} 미만의 양성자 이완 속도($^1\text{H-R}_2$)를 포함한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 3s^{-1} 미만의 양성자 이완 속도($^1\text{H-R}_2$)를 포함한다.

- [0084] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 비펩티드 스페이서 또는 링커 세그먼트를 포함한다. 일부 구현예에서, 비펩티드 스페이서 또는 링커 세그먼트는 소수성 세그먼트로부터 펩티드의 반대쪽 말단에 위치한다. 일부 구현예에서, 스페이서 또는 링커 세그먼트는 생활성기에 대한 부착 부위를 제공한다. 일부 구현예에서, 스페이서 또는 링커 세그먼트는 PA의 기능화를 위한 반응기(예: 알켄, 알킨, 아지드, 티올, 말레이미드 등)를 제공한다. 일부 구현예에서, 스페이서 또는 링커는 CH_2 , O, $(\text{CH}_2)_2\text{O}$, $\text{O}(\text{CH}_2)_2$, NH, 및 $\text{C}=\text{O}$ 기(예: $\text{CH}_2(\text{O}(\text{CH}_2)_2)_2\text{NH}$, $\text{CH}_2(\text{O}(\text{CH}_2)_2)_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CCH}$, 등)의 실질적으로 선형 사슬이다. 일부 구현예에서, 스페이서 또는 링커는 추가의 생활성기, 치환기, 가지 등을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 링커 세그먼트는 단일 글리신(G) 잔기이다.
- [0085] 본원의 물질에 사용하기에 적합한 펩티드 양친매성 분자, PA 및 관련 재료의 제조 방법, PA에 사용하기 위한 아미노산 서열, 및 PA와 함께 사용되는 물질은 다음의 특허에 기재되어 있다: 미국 특허 제9,044,514호; 미국 특허 제9,040,626호; 미국 특허 제9,011,914호; 미국 특허 제8,772,228호; 미국 특허 제8,748,569호; 미국 특허 제8,580,923호; 미국 특허 제8,546,338호; 미국 특허 제8,512,693호; 미국 특허 제8,450,271호; 미국 특허 제8,236,800호; 미국 특허 제8,138,140호; 미국 특허 제8,124,583호; 미국 특허 제8,114,835호; 미국 특허 제8,114,834호; 미국 특허 제8,080,262호; 미국 특허 제8,076,295호; 미국 특허 제8,063,014호; 미국 특허 제7,851,445호; 미국 특허 제7,838,491호; 미국 특허 제7,745,708호; 미국 특허 제7,683,025호; 미국 특허 제7,554,021호; 미국 특허 제7,544,661호; 미국 특허 제7,534,761호; 미국 특허 제7,491,690호; 미국 특허 제7,452,679호; 미국 특허 제7,371,719호; 미국 특허 제7,030,167호; 이들 모두는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.
- [0086] PA 초분자 구조체의 특성(예: 형상, 강성, 친수성 등)은 펩티드 양친매성 분자 구성성분의 동일성(예: 친유성 세그먼트, 산성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 생활성 세그먼트 등)에 따라 달라진다. 예를 들어, 나노섬유, 나노구체, 중간 형상 및 다른 초분자 구조체는 PA 구성성분 부분의 동일성을 조정함으로써 달성된다. 일부 구현예에서, PA의 초분자 나노 구조체의 특성은 조립 후 조작(예: 가열/냉각, 연신(stretching) 등)에 의해 변경된다.
- [0087] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 (a) 8-24개 탄소의 알킬 사슬을 포함하는 소수성 꼬리; (b) 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 또는 G_4 포함) 및 (c) 하전된 세그먼트(예: $\text{E}_2\text{-E}_4$ 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 성분을 포함하는 본원에 기술된 범위 내의 임의의 PA는 본원에 사용될 수 있다.
- [0088] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는 생활성 모이어티(예: IKVAV 펩티드)를 포함한다. 특정 구현예에서, 생활성 모이어티는 PA의 가장 C-말단 또는 N-말단 세그먼트이다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 하전된 세그먼트의 말단에 부착된다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 조립된 PA 구조체(예: 나노섬유)의 표면에 노출된다. 생활성 모이어티는 일반적으로 펩티드이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 세포외 기질(ECM)에서 확인된 펩티드이다. 예를 들어, 생활성 모이어티는 콜라겐, 엘라스틴, 피브로넥틴 또는 라미닌에서 발견되는 펩티드 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 라미닌에서 발견되는 펩티드 서열이다. 예를 들어, 생활성 모이어티는 라미닌-1, 라미닌-2, 라미닌-3, 라미닌-4, 라미닌-5, 라미닌-6, 라미닌-7, 라미닌-8, 라미닌-9, 라미닌-10, 라미닌-11, 라미닌-12, 라미닌-13, 라미닌-14 또는 라미닌-15에서 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 라미닌-1에서 발견되는 펩티드 서열이다. 특정 구현예에서, 생활성 모이어티는 펩티드 서열 IKVAV(서열번호 1)이다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 제조용 펩티드이다. 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 관심 펩티드 또는 폴리펩티드(예컨대, ECM 단백질)에 결합하는 펩티드 서열이다.
- [0090] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는(예: C-말단에서 N-말단으로 또는 N-말단에서 C-말단으로) 생활성 펩티드(예: IKVAV 펩티드) - 하전된 세그먼트(예: E_{2-4} 등을 포함) - 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , G_4 포함) - 소수성 꼬리(예: 8-24개의 탄소 알킬 사슬 포함)를 포함한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 펩티드 양친매성 분자는(예: C-말단에서 N-말단으로 또는 N-말단에서 C-말단으로) 생활성 펩티드(예: IKVAV 펩티드) - 유연한 링커(예: G 등을 포함) - 하전된 세그먼트(예: E_{2-4} 등을 포함) - 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , G_4 포함) - 소수성 꼬리(예: 8-24개의 탄소 알킬 사슬 포함)를 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 본 명세서는 "IKVAV 펩티드 양친매성 분자"라고도 불리는 생활성 펩티드로서 IKVAV를 포함하는 생활성 PA를 제공한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는(예: C-말단에서 N-말단으로 또는 N-

말단에서 C-말단으로): IKVAV - 하전된 세그먼트(예: E_{2-4} 등을 포함) - 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , G_4 포함) - 소수성 꼬리(예: 8-24개의 탄소 알킬 사슬 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 양친매성 분자는 링커를 더 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 펩티드 양친매성 분자는 상기 생활성 펩티드(예: IKVAV)를 하전된 펩티드 세그먼트에 연결하는 단일 글리신 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}A_2G_2E_4GIKVAV$ 를 포함한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}G_4E_4GIKVAV$ 를 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 생활성 모이어티는 성장 인자 모방 펩티드다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 펩티드는 성장인자 모방 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 모방 서열, 섬유아세포 성장 인자 2(FGF-2) 모방 서열, 신경교세포 유래 신경 영양 인자(GDNF) 모방 서열, 뇌 유래 신경 영양 인자(BDNF) 모방 서열, 또는 네트린-1 모방 서열이다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 서열은 FGF-2 모방 서열이다. 일부 구현예에서, 상기 FGF-2 모방 서열은 YRSRKYSSWYVALKR(서열번호 2)을 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 본 명세서는 상기 생활성 펩티드로서 성장 인자 모방 서열을 포함하는 생활성 PA를 제공한다. 이러한 펩티드 양친매성 분자는 본 명세서에서 "성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자"로 지칭된다.

[0095] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는(예: C-말단에서 N-말단으로 또는 N-말단에서 C-말단으로): 성장 인자 모방 펩티드 서열 - 하전된 세그먼트(예: E_{2-4} 등을 포함) - 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , G_4 포함) - 소수성 꼬리(예: 8-24개의 탄소 알킬 사슬 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 양친매성 분자는 링커를 더 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 펩티드 양친매성 분자는 상기 성장 인자 모방 펩티드 서열을 하전된 펩티드 세그먼트에 연결하는 단일 글리신 잔기를 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, 본 명세서에서 제공되는 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는(예: C-말단에서 N-말단으로 또는 N-말단에서 C-말단으로): 성장 인자 모방 펩티드 서열 - 유연한 링커 (예: G 등을 포함) - 하전된 세그먼트(예: E_{2-4} 등을 포함) - 구조성 펩티드 세그먼트(예: A_2G_2 , G_4 포함) - 소수성 꼬리(예: 8-24개의 탄소 알킬 사슬 포함)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 $C_{16}V_2A_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 또는 $C_{16}A_2G_2E_4GYRSRKYSSWYVALKR$ 을 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, PA는 PA의 펩티드 포션에 소수성 꼬리의 부착을 위한 부착 세그먼트 또는 잔기(예: G)를 더 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, 본 명세서는 본원에 기술된 바와 같은 적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 명세서는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 본 명세서는 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 하전된 펩티드 세그먼트, 및 아미노산 서열 IKVAV를 포함하는 생활성 펩티드를 포함하는 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, AAGG를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 링커(예: G) 및 IKVAV 펩티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, V_2A_2 또는 A_2G_2 를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_2 , E_3 또는 E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 상기 적어도 하나의 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 상호작용하여 조성물 내에 초분자 어셈블리를 형성한다.

[0099] 일부 구현예에서, 본 명세서는 본원에 기술된 적어도 2개의 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 초분자 어셈블리를 제공한다. 일부 구현예에서, 초분자 어셈블리는 나노섬유이다. 일부 구현예에서, 본 명세서는 본원에 기술된 바와 같은 적어도 2개의 생활성 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 초분자 어셈블리를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 명세서는 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 초분자 어셈블리를 제공한다. 일부 구현예에서, 본 명세서는 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트, 하전된 펩티드 세그먼트, 및 아미노산 서열 IKVAV를 포함하는 생활성 펩티드를 포함하는 IKVAV 펩티드 양친매성 분자 및 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자를 포함하는 초분자 어셈블리를 제공한다. 일부 구현예에서, IKVAV 펩티드 양친매

성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, AAGG를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 링커(예: G) 및 IKVAV 펩티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 성장 인자 모방 펩티드 양친매성 분자는 8-24개의 탄소 알킬 사슬(C_{8-24})을 포함하는 소수성 세그먼트, V_2A_2 또는 A_2G_2 를 포함하는 구조성 펩티드 세그먼트, E_2 , E_3 또는 E_4 를 포함하는 하전된 펩티드 세그먼트, 및 성장 인자 모방 펩티드 서열을 포함한다.

[0100] 일부 구현예에서, 초분자 어셈블리(예: 나노섬유와 같은 나노구조체)는 생활성 모이어티(예: IKVAV 펩티드 양친매성 분자) 및 성장 인자 모방 PA를 갖는 제1 유형의 PA로부터 조립된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 조성물 또는 초분자 어셈블리(예: 나노섬유와 같은 나노구조체)는 약 90:10의 성장 인자 모방 PA에 대한 IKVAV PA의 물비를 포함한다. 일부 구현예에서, IKVAV PA: 성장 인자 모방 PA의 물비는 약 99:1, 약 98:2, 약 97:3, 약 96:4, 약 95:5, 약 94:6, 약 93:7, 약 92:8, 약 91:9, 약 90:10, 약 89:11, 약 88:12, 약 87:13, 약 86:14, 또는 약 85:15이다. 일부 구현예에서, 성장 인자 모방 PA에 대한 IKVAV PA의 비는 나노섬유 물질의 기계적 특성(예: 액체 또는 겔) 및 어떤 조건 하에서 물질이 다양한 특성(예: 생리적 조건 노출 시 겔화, 생리적 조건 노출 시 액체화 등)을 채택할 것인지를 결정한다.

[0101] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조성물 및 초분자 어셈블리는 하나 이상의 충전제 PA를 추가로 기술한다. 용어 "충전제 PA" 또는 "회석제 PA"는 본원에 기술된 바와 같이 소수성 세그먼트, 구조성 펩티드 세그먼트 및 하전된 펩티드 세그먼트를 포함하지만 생활성 모이어티가 결여된 PA(예: IKVAV 펩티드 서열 결여, 성장 인자 모방 펩티드 서열 결여 등)를 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 일부 구현예에서, 충전제 PA는 분자의 말단(예: 표면-표시 말단) 상에 고도로 하전된 글루탐산 잔기를 갖는 비-생활성 PA 분자이다. 이러한 음으로 하전된 PA는 이온성 가교를 통해 나노섬유 사이에서 겔화가 일어날 수 있도록 한다. 일부 구현예에서, 충전제 PA는 분자의 말단(예: 표면-표시 말단) 상에 고도로 하전된 라이신 잔기를 갖는 비-생활성 PA 분자이다. 이러한 양으로 하전된 PA는 염기성 조건 하에서 겔화가 일어날 수 있도록 한다. 충전제 PA는 나노섬유 용액의 겔화 능력을 여전히 보장하면서 다른 생활성 PA 분자를 나노섬유 매트릭스에 혼입시키는 능력을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 용액은 점도를 높이고 겔 역학을 강화하기 위해 어닐링된다. 이러한 충전제 PA는 예를 들어 미국 특허 제8,772,228 호(예: C_{16} -VVAAEEEE)에 기술된 서열을 가지며, 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0102] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기재된 PA 나노섬유는 작은 단면 직경(예: <25 nm, <20 nm, <15 nm, 약 10 nm 등)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 나노섬유의 작은 단면(~10 nm 직경)은 섬유가 뇌 실질에 침투할 수 있게 한다.

[0103] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 대상체의 신경계 손상을 치료 또는 예방하는데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리(예: 나노섬유)는 대상체의 신경계 손상의 치료 방법에 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기술된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 뇌 및 척수를 포함하는 중추신경계(CNS) 또는 뇌 및 척수 외부의 신경 및 신경절을 포함하는 말초신경계(PNS) 손상 예방 치료 방법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 대상체의 CNS 또는 PNS 손상의 치료 또는 예방에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 손상은 척수 손상이다. 상기 척수 손상은 경부, 요추, 흉추, 천골, 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0104] 상기 부상은 외상성 손상일 수 있다. 외상성 손상은 외상에 의해 유발된 손상, 예를 들어, 자동차 사고, 추락, 폭력, 스포츠 상해, 수술 상해 등과 같은 외상으로 인한 손상을 의미한다. 예컨대, 본 명세서에 기재된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 외상성 척수 손상의 치료에 사용될 수 있다. 다른 예로, 본 명세서에 기재된 PA, 조성물 및 초분자 어셈블리는 외상성 뇌 손상(TBI)의 치료에 사용될 수 있다. 또는, 상기 손상은 비-외상성 손상일 수 있다. 예를 들어, 상기 손상은 예를 들어 암, 다발성 경화증, 염증, 관절염, 척추 협착증, 종양, 출혈 등에 의해 야기된 CNS(예: 뇌 및/또는 척수) 또는 PNS에 대한 비-외상성 손상일 수 있다.

[0105] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 PA 및/또는 초분자 어셈블리(예: 나노섬유)를 포함하는 조성물은 외상성 척수 손상이 의심되는 대상체에 제공된다. 예컨대, 상기 조성물은 신체의 하나 이상의 영역(예: 손, 팔, 다리, 발 등)에서의 감각 상실 및/또는 운동 조절 상실, 저혈압, 혈압 조절 불능, 체온 조절 불능, 손상 부위에서의 땀 배출 불능, 만성 통증 및/또는 척수 부종을 포함하는 하나 이상의 증상을 나타내는 대상체에 제공될 수 있다. 상기 조성물은 상기 대상체에 제공되어 상기 손상을 치료할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 손상의 치료는 상기 손상과 관련된 하나 이상의 증상의 중증도를 감소시키고/시키거나 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 혈관화, 신경 재생, 기능 회복 및/또는 척수 손상 후의 피해 제한에 사용된다.

- [0106] 상기 조성물은 손상(예: 외상성 척수 손상) 후의 임의의 적절한 시점에서 대상체에게 제공되어 손상을 치료할 수 있다. 예컨대, 상기 조성물은 손상 후 24시간 이내(예: 손상으로부터 24시간 이내, 12시간 이내, 10시간 이내, 9시간 이내, 8시간 이내, 7시간 이내, 6시간 이내, 5시간 이내, 4시간 이내, 3시간 이내, 2시간 이내, 또는 1시간 이내)에 대상체에게 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 손상 또는 손상 진단 후 24시간 이상의 기간이 경과한 후에 대상체에게 제공될 수 있다.
- [0107] 상기 조성물은 대상자의 연령, 대상체의 체중, 손상의 중증도 등을 포함하는 요소에 따라 임의의 적절한 양으로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 손상의 중증도가 악화되는 것을 방지하기 위한 손상에 대한 다른 적절한 치료 또는 예방 조치와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0108] 일부 구현예에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 대상체로의 전달을 위해 제형화된다. 본 명세서에 기술된 조성물을 투여하는 적절한 경로는, 국소, 피하, 경피, 피내, 병변내, 관절내, 복강내, 방광내, 점막내, 치은, 치내, 달팽이관내, 고막내, 기관내, 경막외, 척수강내, 근육내, 정맥내, 혈관내, 골내, 안구 주위, 종양내, 뇌내 및 뇌실내 투여를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, PA 조성물은 비경구적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 비경구 투여는 척수강내 투여, 뇌실내 투여, 또는 실질내 투여에 의해 이루어진다. 본원의 PA 조성물은 단독 활성제로서 또는 다른 제제(예: 대상체의 신경계 손상 치료에 사용되는 다른 제제)와 병용하여 투여될 수 있다.
- [0109] **실시예1**
- [0110] **생활성 지지체의 초분자 운동은 척수 손상으로부터의 회복을 촉진한다**
- [0111] **개요:** 본원에서는 두 개의 구별된 신호를 포함하는 펩티드 양친매성 초분자 폴리머에 대해 기술한다. 이 초분자 폴리머는 심각한 척수 손상의 마우스 모델에서 테스트되었다. 한 신호는 막간 수용체 b1-인테그린을 활성화시키고, 두 번째 신호는 기저 섬유아세포 성장인자 2 수용체를 활성화시킨다. 비생활성 도메인에서 양친매성 단량체의 펩티드 서열을 돌연변이시키으로써 지지체 원섬유 내 분자의 움직임을 강화시켰고, 이는 혈관 성장, 축삭 재생, 골수화, 운동 뉴런의 생존, 신경교증 감소 및 기능 회복에 현저한 차이를 초래하였다. 따라서 분자 앙상블(ensemble)에 의한 세포의 신호전달은 이들의 내부 움직임을 조정함으로써 최적화될 수 있다.
- [0112] **서론:**
- [0113] 세포의 약리학적 신호 전달은 일반적으로 특정 반응을 활성화 또는 억제하는 단백질에 대한 작은 유기 분자의 강력한 결합을 통해 진행된다. 새로운 신호 전달 전략은 치료용 화물을 전달하기 위해 특정 세포를 표적으로 하는 나노 구조체 또는 세포 외 공간에서 생활성 지지체로 기능하는 물질을 사용하는 것이다. 이 분야에서 덜 개발된 측면은 수용체에 대한 신호를 수용하는 물질의 분자 설계와 그러한 신호와 인공 지지체 내 분자의 움직임 사이의 연결이다. 본원에서는 두 가지 직교 생물학적 신호인 신경줄기세포의 뉴런으로의 분화를 촉진하고 축삭을 확장하는 라미닌 신호 IKVAV 및 수용체 FGFR1을 활성화시켜 세포 증식 및 생존을 촉진하는 섬유아세포 성장인자-2(FGF-2) 모방 펩티드 YRSRKYSSWYVALKR(서열번호 2)를 통합하는 나노규모의 초분자 지지체를 설명한다. 두 신호는 수성 매질에서 비공유적으로 공중합하여 초분자 원섬유를 형성하는, 펩티드 양친매성 분자(PA)로 알려진 알킬 꼬리를 가진 두 개의 상이한 펩티드의 말단에 배치되었다. 본원에서는 심각한 척수 손상(SCI)의 쥐 모델에서 뒷다리 마비 후 생체 내 기능 회복을 위한 잠재적인 지지체 치료의 물리적 특성을 변경시키는 다른 도메인을 조사했다. 손상된 축삭이 성인 중추신경계(CNS)에서 재생될 수 없는 점을 감안할 때 외상성 손상 후 인간의 영구적인 마비를 피하는 SCI 치료법의 개발은 여전히 주요 과제로 남아 있다. 여기서, 두 생물학적 신호를 동일한 밀도로 유지하되 이 도메인의 테트라펩티드 서열을 약간 돌연변이시키는 것은 생체 내에서 쥐의 SCI로부터의 기능 회복뿐만 아니라 시험관 내 세포의 생물학적 반응을 극적으로 변화시킬 수 있다는 사실이 밝혀졌다.
- [0114] **결과:**
- [0115] 동일한 두 신호를 나타내는 상이한 물리적 특성을 갖는 나노섬유-형상 초분자 폴리머를 조사하기 위해, 물리적 행동을 제어하는 테트라펩티드 도메인에 상이한 아미노산 V, A 및 G의 서열을 갖는 상이한 IKVAV PA 라이브러리를 합성하였다(IKVAV PA1-PA8)(사용된 PA 및 이의 펩티드 서열 목록은 도 1A, 도 7 및 표 1 참조). 이러한 아미노산은 원섬유 내 분자가 수소-결합 밀도로 인해 높은 분자 간 응집력을 갖는 β -시트를 형성하는 경향에 영향을 미치기 때문에 선택되었다. 이러한 상호 작용은 차례로 원섬유 내에서 PA 분자의 이동성이 억제되는 결과를 초래한다. 예를 들어, V_2A_2 (PA1)는 발린 함량으로 인해 β -시트 구조를 형성하는 경향이 높은 반면, A_2G_2 (PA2)는 잠재적으로 2차 구조가 없는 덜 정렬된 세그먼트이다(도 1A 참조). 나머지 서열은 중간 수준의 운동에 대한 잠재적인 후보로 선택되었다. 모든 IKVAV PA는 이 세그먼트를 생활성 신호와 분리하고 물에 대한 높은 용해도를

제공하는 E₄G 서열을 이용하였다.

표 1

사용된 PA 목록 및 펩티드 서열

샘플명	펩티드 서열
IKVAV PA1	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA2	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA3	C ₁₆ AVG ₂ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA4	C ₁₆ VAG ₂ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA5	C ₁₆ G ₄ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA6	C ₁₆ VA ₃ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA7	C ₁₆ AVA ₂ E ₄ GIKVAV
IKVAV PA8	C ₁₆ A ₄ E ₄ GIKVAV
Backbone PA	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₂
FGF2 PA1	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₄ GYRSRKYSWYVALKR
FGF2 PA2	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GYRSRKYSWYVALKR
VVIAK PA1	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₄ GVVIAK
VVIAK PA2	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GVVIAK
scrFGF2 PA1	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₄ GWRSKKYSLYYVASRR
scrFGF2 PA2	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GWRSKKYSLYYVASRR
Alexa647 IKVAV PA2	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GIKVAValpha647
FGF2 PA1Cy3	C ₁₆ V ₂ A ₂ E ₄ GYRSRKYSWYVALKRCy3
FGF2 PA2Cy3	C ₁₆ A ₂ G ₂ E ₄ GYRSRKYSWYVALKRCy3

극저온 투과 전자 현미경(Cryogenic transmission electron microscopy, Cryo-TEM)은 모든 IKVAV PA가 물에서 초분자 중합 후 나노섬유를 형성하는 것을 확인했다(도 1B). 또한, 싱크로트론(synchrotron) 용액 소각 x-선 산란(small-angle x-ray scattering, SAXS)은 필라멘트와 구형 미셀의 혼합을 시사하는 PA5(기울기 = -0.2)를 제외하고 기니에 영역(Guinier region)에서 -1 내지 -1.7 범위의 기울기를 나타내는 필라멘트의 형성을 확인했다(도 1D). 라이브러리의 다양한 어셈블리의 물리적 거동은 마티니 역장(MARTINI force field)(I3)(도 8)을 사용한 거친 입자 분자동역학(CG-MD) 시뮬레이션을 사용하여 비교되었다. 이러한 시뮬레이션은 다양한 IKVAV PA 섬유 내의 분자가 상이한 정도의 내부 역학을 가지고 있음을 예측했다(도 1B). 시뮬레이션을 통해 분자가 상당한 거리(나노미터 단위)에 걸쳐 내부적으로 위치를 변경하는 능력에 차이가 있음을 알 수 있었으며, 이는 시뮬레이션의 마지막 5ms 동안 PA 분자의 평균 변위를 측정하는 루트-평균제곱 변동(root-mean-square fluctuation, RMSF)으로 정의된 매개변수 값을 산출했다(도 1C). 이러한 시뮬레이션은 G 잔기만을 포함하는 PA5뿐만 아니라 PA2 섬유 내의 분자가 실제로 높은 정도의 내부 운동성을 가지고 있음을 나타낸다. 광각 X-선 분석(Wide-angle X-ray analysis, WAXS)은 또한 낮은 RMSF 값(PA2 및 PA5)을 가진 것을 제외한 모든 IKVAV PA에서 내부 순서(4.65Å의 d-간격을 갖는 β-시트 브래그 피크(Bragg peak))의 존재를 밝혔다(도 1E).

IKVAV PA 간의 역학 차이를 조사하기 위해, PA 나노섬유 내에 1,6-디페닐-1,3,5-헥사트리엔(DPH)을 캡슐화하여 형광 탈분극(fluorescence depolarization, FD) 측정을 수행하고 내부 소수성 코어의 미세 점도를 측정하였다. PA2 및 PA5는 이방성 값이 가장 낮아(각각 0.21 및 0.18) 가장 역동적인 초분자 어셈블리를 형성하고 있음을 나타내며, PA4는 중간 정도의 동역학(0.30)을, 나머지 PA는 덜 강렬한 초분자 운동(0.40 내지 0.37)을 보였다(도 2A). 횡이완 핵자기공명(transverse-relaxation nuclear magnetic resonance, T2-NMR) 분광법을 사용하여 IKVAV 에피토프의 분자 역학도 측정하였다. 이 실험을 통해 IKVAV 서열의 K 잔기의 e 탄소(H_e)에 부착된 메틸렌 양성자에 대한 이완 속도를 얻었다(2.69 내지 2.99ppm에서 관찰됨). IKVAV PA1은 가장 높은 이완 속도(낮은 운동 정도)를 보인 반면, IKVAV PA2와 PA5는 IKVAV PA 라이브러리에서 가장 낮은 이완 속도를 보여(¹H-R₂= 각각 2.7±0.1 및 2.6±0.003 s⁻¹) 더 큰 운동성과 일관된다(도 2B 및 표 2). FD 결과와 일관되게, IKVAV PA4는 PA1

과 PA2(또는 PA5) 사이의 중간 수준의 초분자 운동을 보여준다. 종합적으로, 시뮬레이션과 FD, WAXS 및 T2-NMR 측정은 조사된 분자 라이브러리에서 세 가지 수준의 초분자 운동과 일치한다.

표 2

IKVAV PA 라이브러리 및 T2 이완 시간.

샘플명	테트라펩티드 서열	δ_H (ppm)	R2 (/s)
IKVAV PA1	VVAA (SEQ ID NO: 3)	2.72	11.2 $\pm$ 2.9
IKVAV PA2	AAGG (SEQ ID NO: 4)	2.87	2.7 $\pm$ 0.1
IKVAV PA3	AVGG (SEQ ID NO: 5)	2.69	4.5 $\pm$ 0.7
IKVAV PA4	VAGG (SEQ ID NO: 6)	2.77	5.6 $\pm$ 0.4
IKVAV PA5	GGGG (SEQ ID NO: 7)	2.79	2.6 $\pm$ 0.03
IKVAV PA6	VAAA (SEQ ID NO: 8)	2.78	6.1 $\pm$ 0.8
IKVAV PA7	AVAA (SEQ ID NO: 9)	2.81	6.0 $\pm$ 0.03
IKVAV PA8	AAAA (SEQ ID NO: 10)	2.99	4.5 $\pm$ 0.2
IKVAV PA2(+Ca ²⁺)	AAGG (+Ca ²⁺)	2.87	8.6 $\pm$ 0.5

초분자 운동 및 시험관내 생활성

IKVAV 신호가 IKVAV PA의 라이브러리에서 동일하게 생활성을 갖는지를 결정하기 위해 시험관 내 실험을 수행하였다. IKVAV PA의 생활성을 확립하기 위해, 인간 배아 줄기 세포(hNPC)로부터 유래된 신경 전구 세포를 용액 내의 상이한 IKVAV PA 섬유 또는 재조합 단백질 라미닌으로 처리하였다(도 2C). PA 필라멘트는 세포와 밀접하게 연관되고 그 표면을 신호를 표시할 때 수용체를 활성화시킬 수 있다.

활성 형태 특이적 항체 HUTS4를 사용하여 IKVAV PA 및 라미닌의 존재하에서 발현되는 막 횡단 수용체 β 1-INTEGRIN(ITGB1)의 활성화를 평가하였다. 수용체의 세포 내 신호 경로의 활성화도 또한 검증되었다. 형광 공초점 현미경 및 웨스턴 블롯(WB) 분석은 IKVAV PA2 및 PA5가 IKVAV PA, IKVAV 펩티드 및 대조군으로서 라미닌 또는 오르니틴 코팅에 비해 실질적으로 더 높은 농도의 활성 ITGB1 및 다운스트림 이펙터 인테그린-결합 키나제(integrin-linked kinase, ILK) 및 포스포-국소 부착 키나제(phospho-focal adhesion kinase, p-FAK)를 유도하였음을 보여주었다(도 2, D 및 E, 도 9). 라이브러리의 나머지 PA에 비해 중간 초분자 운동과 상관관계가 있는 PA4와의 중간 수준의 활성화가 관찰되었다. VVIAK 스크램블 시퀀스를 표시하는 PA는 ITGB1의 최소한의 세포 활성화를 초래하였다. 또한, ITGB1 항체를 사용한 전처리하면 모든 IKVAV PA에서 hNPC의 부착이 차단되었으며, 이는 IKVAV-ITGB1 상호 작용이 이러한 과정을 매개한다는 것을 시사한다.

hNPC는 IKVAV PA로 처리했을 때 신경 형태의 β -튜불린(β -TUBULIN, TUJ-1⁺)을 상향 조절했지만, 이 유도(신경 분화 규칙을 반영)는 가장 역동적인 두 초분자 원섬유인 IKVAV PA2 및 PA5(각각 20.5 $\pm$ 1% 및 20.7 $\pm$ 1.2%)에서 더 높았다(도 2F-H). 중간 정도의 신경세포 분화 규칙(PA4: 14 $\pm$ 1.2%)을 보인 IKVAV PA4를 제외한 다른 IKVAV PA는 TUJ-1⁺ 신경세포 유도 비율이 더 낮았다(PA1: 8.2 $\pm$ 0.7%, PA3: 7.5 $\pm$ 0.6%, PA6: 7.9 $\pm$ 1.3%, PA7: 7.4 $\pm$ 0.6%, 및 PA8: 7.5 $\pm$ 0.5%). 푸로마이신-기반 단백질 합성 분석(SUnSET 기법)을 이용하여, 모든 조건에서 유사한 단백질 번역 수준을 보여 관찰된 차이가 대사 효과와 관련이 없음을 확인하였다.

음으로 하전된 PA 섬유와 정전기적으로 가교-결합하는 5mM CaCl₂와 혼합된 가장 생활성이 높은 IKVAV PA(PA2 및 PA5)로 hNPC를 처리하여 시험관 내 실험을 수행하였다. Ca²⁺의 첨가는 초분자 운동을 억제하였으며, 이는 FD 및 T2-NMR 실험을 통해 확인되었다(도 2I). 배지에 Ca²⁺ 이온을 첨가하여 초분자 운동을 감소시켰을 때, ITGB1과 그 다운스트림 세포 내 경로(ILK, p-FAK/FAK)의 활성화도 감소하였다(도 2J 및 도 10a-10c). 이러한 결과는 IKVAV PA의 비생활성 도메인에 있는 테트라펩티드 아미노산 서열에 돌연변이가 도입됨에 따라 역학과 시험관 내 생활성 사이에 강한 양의 상관관계가 있음을 보여주었다.

SCI 모델: 축삭 재생 및 신경교 흉터 형성

다음으로, 생체 내 SCI 후 기능 회복을 향상시키는 이중 신호 원섬유의 능력을 테스트하였다. IKVAV PA1, PA3, PA4, PA6, PA7 및 PA8에 대해 관찰된 낮은 수준의 시험관 내 생활성을 고려할 때, 이들 PA는 FGF2 PA와 조합하

여 사용되지 않았다. 두 신호를 동시에 표시하는 나노섬유도 테스트되었으므로, 바이너리 시스템은 혼합 가능해야 하며 일단 손상 부위에 주입된 생리학적 유체와 접촉 시 유사한 기계적 특성을 갖는 하이드로겔을 형성해야 했다. 오직 IKVAV PA2만이 혼합 가능하고, 특히 90:10의 물비로 FGF2 PA1 또는 FGF2 PA2와 혼합되었을 때 유사한 기계적 특성을 갖는 하이드로겔을 형성할 수 있었다(도 3, A 내지 C, 도 11A-11C, 표 3). 또한, 두 FGF2 PA 모두 단독으로 고도로 응집된 짧은 섬유를 형성하여 PA1, PA4 또는 PA5와 같은 다른 IKVAV PA와의 비혼화성에 더욱 기여하였다.

표 3

사용된 PA 공동-어셈블리 목록.

샘플명 (A + B + ...)	사용된 공동-어셈블리 비율 (몰%)			
	A	B	C	D
IKVAV PA1 + FGF2 PA1	90% or 95%	10% or 5%	–	–
IKVAV PA1 + FGF2 PA2	90% or 95%	10% or 5%	–	–
IKVAV PA2 + FGF2 PA1	90% or 95%	10% or 5%	–	–
IKVAV PA2 + FGF2 PA2	90% or 95%	10% or 5%	–	–
IKVAV PA4 + FGF2 PA1	90%	10%	–	–
IKVAV PA4 + FGF2 PA2	90%	10%	–	–
IKVAV PA5 + FGF2 PA1	90%	10%	–	–
IKVAV PA5 + FGF2 PA2	90%	10%	–	–
VVIAK PA2 + scrFGF2 PA1	90%	10%	–	–
VVIAK PA2 + scrFGF2 PA2	90%	10%	–	–
Alexa-647 IKVAV PA2 + IKVAV PA2 + Cy3 FGF2 PA1 + FGF2 PA1	1%	89%	1%	9%
Alexa-647 IKVAV PA2 + IKVAV PA2 + Cy3 FGF2 PA2 + FGF2 PA2	1%	89%	1%	9%

유사한 기계적 특성을 갖는 혼화성 및 겔-형성 이원 시스템, 즉 FGF2 PA1 또는 FGF2 PA2와 IKVAV PA2가 생체 내 실험에 사용되었다(도 3A 및 도 12). SCI의 확립된 쥐 모델에서 심한 타박상을 입은지 24시간이 지난 후 FGF2 PA1 또는 FGF2 PA2와 공동-조립된 IKVAV PA2 90:10 몰 비율의 식염수 용액을 마우스의 척수에 주입하였다(20). 모든 생체 내 실험에서 가장 생활성이 높은 단일 신호 시스템인 IKVAV PA2를 대조군으로 사용하였다. 모든 PA 용액은 척수에 전달되었을 때 그자리에서 겔화되어 손상된 부위에 국한되었다. 생활성 지지체의 생분해를 시간의 함수로 추적하고 정량화하기 위해 PA 분자를 Alexa 647 염료로 형광 표지하였다. 형광 물질을 손상 24시간 후의 척수에 주입하고 회전 디스크 공초점 현미경을 사용하여 척수를 완전히 재구성하여 1, 2, 4, 6, 및 12주째에 그 부피를 측정하였다(도 3D 참조). 연질 물질 이식 후 1 내지 12주 동안 서서히 생분해되었으며, 세 가지 실험 물질 간 생분해율의 차이는 관찰되지 않았다(도 3E 및 도 13 참조).

자발적 운동 기능을 매개하는 피질척수로(corticospinal tract, CST)를 추적하기 위해 손상 10주 후 비오틴화 텍스트란 아민(biotinylated dextran amine, BDA)을 양측 주사하여 감각운동 피질에 투여했다(도 3F). 전행성 표지된 CST 축삭 재생장은 손상 12주 후 모든 PA 및 대조군(sham, 식염수만 주입) 그룹에서 평가되었다. 이 과정에서는 근위 병변 경계와 그 너머로 다시 증가하는 표지된 축삭의 수를 정량화해야 했다. 표면에 생활성 신호가 없는 IKVAV PA1 및 PA 섬유("백본 PA")를 대조군으로 주입했다.

식염수 용액을 주입한 마우스에서는 병변 내에서 재생장한 축삭이 거의 관찰되지 않은 반면, 섬유가 낮은 이동성을 보이는 IKVAV PA1에서는 축삭의 일부 재생장이 관찰되었다(도 3G 및 도 14). 반면에, IKVAV PA2를 단독으로 또는 FGF2 PA2(IKVAV PA2와 동일한 A₂G₂ 비-생활성 도메인을 공유)와 공동-조립하여 주입한 마우스에서는 대조군 조건에 비해 완만하지만 증가된 축삭 재생장이 관찰되었다. 그러나 FGF2 PA1(A₂G₂ 대신 V₂A₂ 비-생활성 도메인을 포함)과 공동-조립된 IKVAV PA2를 주입한 결과, 병변 부위 전체에 걸쳐 원위 경계까지 넘어서는 강력한 피질척수 축삭 재생이 유도되었다(도 3, G 및 H, 도 15). 이 그룹에서 병변 내 총 축삭 재생은 IKVAV PA2와 FGF2 PA2의 공동-어셈블리를 사용한 그룹보다 2배 더 컸고 대조군보다 50배 더 컸다(도 3I). 운동 기능에서도 중요한 역할을 할 수 있는 세로토닌 축삭돌기(5HT)도 CST와 유사한 경향으로 병변 중심 내에서 재생되었다(도 16).

- [0131] 이론에 얽매이지 않고, 관찰된 CST 및 5HT 축삭 재생장은 부분적으로 축삭 재생을 위한 강력한 장벽인 상당한 성상 세포 흉터가 없기 때문일 수 있다. 대조군 및 백본 PA 그룹에서 이 장벽은 손상 경계에서 높은 수준의 GFAP를 발현하는 반응성 성상세포의 밀집된 집단으로 밝혀진 반면, 모든 생활성 PA 그룹에서는 신경교 흉터의 밀도가 낮았다(도 3H, 도 16). 이러한 결과와 일치하는 WB 분석 결과, 재생 축삭의 성장 원뿔에 존재하는 성장 관련 단백질-43(growth-associated protein-43, GAP-43)은 가장 생활성적인 공동-어셈블리(IKVAV PA2+FGF2 PA1)에서만 더 높은 수준으로 나타났다(도 3J).
- [0132] 다음으로, PA 지지체가 손상 3개월 후 피질척수 축삭의 재생장을 유도할 수 있는지 여부를 확인했다. 병변 내에서 높은 수준의 미엘린 기저 단백질(MBP)이 발견되었으며, 특히 재생장한 축삭을 IKVAV PA2+FGF2 PA1에서 감싸고 있는 것으로 나타났다(도 3, J 및 K). 또한, 이 상태에서는 병변 내에서 성장하는 많은 축삭이 높은 수준의 라미닌 및 낮은 수준의 피브로넥틴과 접촉하는 것으로 관찰되었으며, 이는 섬유성 코어가 감소했음을 나타낸다(도 3, K 및 L, 도 15). 이러한 조직학적 및 생화학적 관찰은 두 가지 생활성 신호를 지닌 두 조분자 공동-어셈블리 간의 물리적 차이가 손상 후 신경-재생 결과를 크게 향상시킬 수 있음을 시사한다.
- [0133] **SCI 모델: 혈관 신생, 세포 생존 및 기능 회복**
- [0134] 다음으로 완전한 해부학적 및 기능적 재생에 중요한 손상 부위의 혈관 신생에 대한 두 가지 이중 신호 공동-어셈블리의 영향을 조사했다. 손상되지 않은 조직 단면에 비해 대조군 마우스의 척수 횡단면에서는 병변의 중심에서 2.0mm 이상 전후로(rostro-caudally) 확장된 상당한 수준의 조직 변성이 나타났다. 이 경우 손상되지 않은 대조군에 비해 혈관 면적 분율, 혈관 길이 및 분지의 현저한 감소가 관찰되었다(도 4, A 및 B). 내피 세포막에 통합되는 친유성 카르보시아닌 염료인 1,1'-디옥타데실-3,3,3',3'-테트라메틸인도카보시아닌 퍼클로레이트(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate, DiI)를 함유하는 포도당 용액을 경심(transcardially) 주입하여 기능적 혈관 네트워크의 존재를 조사하였다(도 4A). PA 지지체를 처리한 그룹에서는 복부 조직 구조가 잘 보존되어 있어 기능적인 혈관 네트워크가 유지되고 있음을 알 수 있었다. 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리로 처리한 그룹은 특히 등쪽 영역에서 혈관 면적 분율, 혈관 길이 및 분지가 증가하였다(도 4, A 및 B). 이러한 매개변수는 IKVAV PA2 단독 그룹 및 생활성도가 낮은 공동-어셈블리 그룹(IKVAV PA2+FGF2 PA2) 간에 유의한 차이가 없었으며, 이는 모방 FGF2 혈관신생 신호가 IKVAV PA2+FGF2 PA2에서 최적으로 기능하지 않았음을 암시한다.
- [0135] 병변 내 혈관의 기원을 확인하기 위해, 티미딘 유사체 5'-브로모-2'-데옥시유리딘(BrdU)을 손상 후 첫 주 동안 복강 내 주입하였다. 손상 12주 후 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리 그룹의 병변 내에서 새로 형성된 혈관이 관찰되었다. 이는 WB 분석(도 4E) 뿐만 아니라 다른 모든 그룹의 샘플(도 4, C, D)에 비해 $\text{BrdU}^+/\text{CD31}^+$ 세포 수가 현저히 증가함으로써 확인되었다. IKVAV PA2+FGF2 PA2 공동-어셈블리와 IKVAV PA2 단독은 대조군 그룹에 비해 매우 완만하지만 혈관 형성을 유의하게 증가시켰다.
- [0136] 신경 생존, 척추 회로 유지 및 국소 기능에 대한 두 가지 이중 신호 공동-어셈블리의 효과도 조사하였다. 네이티브 FGF-2는 SCI 후 신경 생존의 증가와 관련이 있을 수 있다. 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리 그룹의 척수 횡단면은 손상되지 않은 대조군과 유사하게 등쪽 영역에서 새로 생성된 혈관 근처에 NeuN^+ 뉴런을 보여주었다(도 5A). 또한, ChAT^+ (운동 뉴런)이기도 한 뉴런(NeuN^+ 세포)은 PA가 활용되었을 때 배쪽 뿔에서만 발견되었으며, 다른 그룹에 비해 가장 생활성이 높은 시스템에서 유의하게 더 많은 수를 보여주었다(도 5, B 및 C). 어느 그룹에서도 병변 내에서 이중 $\text{BrdU}^+/\text{NeuN}^+$ 뉴런이 발견되지 않은 것은 국소 신경 발생이 없음을 시사한다.
- [0137] 관찰된 축삭 재생, 혈관 신생 및 국소 신경 세포 생존이 손상된 동물의 행동 개선으로 이어지는지 평가하였다. 이를 위해 손상 후 12주 동안 모든 그룹에서 발자국 분석에 의한 바소 마우스 스코어(Basso Mouse Score, BMS) 오픈 필드 운동 점수 및 운동 회복을 평가하였다(도 5D 및 도 17). 손상 1주 후와 그 이후에 모든 PA 그룹은 대조군 그룹에 비해 유의하고 지속적인 행동 개선을 보여주었다. 흥미롭게도 손상 3주 후, 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리로 처리된 마우스는 IKVAV PA2+FGF2 PA2 및 IKVAV PA2 단독 주입 마우스(각각 4.4 ± 0.5 및 4.3 ± 0.5)에 비해 유의한 기능 회복(5.9 ± 0.5)을 보였다(도 5D). 발자국을 정량화한 결과, 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리를 처리한 마우스의 보폭과 보간이 다른 그룹에 비해 상당히 더 큰 것으로 나타났다(도 17). 종합하면, 이러한 데이터는 이중 신호 시스템에서 관찰된 신경세포의 생존과 기능 회복은 놀랍게도 각각의 비-생활성 테트라펩티드의 화학적 조성 차이와 관련이 있음을 시사한다.
- [0138] **인간 내피 및 신경 전구세포에 대한 시험관 내 결과**

[0139] 상기에서 설명한 결과를 바탕으로 인간 제대 정맥 혈관 내피 세포(human umbilical vein vascular endothelial cell, HUVEC)를 사용하여 두 공동-어셈블리 모두에서 시험관 내 FGF2 신호의 생활성을 평가하였다. 네이티브 FGF-2는 내피 세포 증식 및 네트워크 형성을 향상시킨다. 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리 또는 FGF2 단백질에 HUVEC를 배양한 후 48시간 이내에, 광범위한 분지 및 혈관-유사 모세혈관 네트워크 형성이 관찰되었다(도 6, A 및 B). 또한 IKVAV PA2와 공동-조립된 FGF2 PA1의 관찰된 시험관 내 생활성이 FGF-2 세포 내 신호전달 경로와 연관되어 있는지 확인하기 위해 WB 분석을 수행하였다. 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리 또는 네이티브 FGF-2로 처리한 HUVEC는 내피 세포의 증식과 이동을 활성화하는 높은 수준의 p-FGFR1과 다운스트림 단백질 p-ERK1/2를 나타내었다(도 6C). 스크램블 FGF2 모방 서열을 함유하는 시스템에서는 어떠한 생물학적 활성도 나타나지 않았다.

[0140] 두 공동-어셈블리에서 IKVAV 및 FGF2 신호의 동시 생활성을 확립하기 위해, 이중 양성 $\text{EdU}^+/\text{SOX}-2^+$ 와 ITGB1 및 pFGFR-1의 유도를 정량화하여 시험관 내에서 이러한 분자가 hNPC 증식에 미치는 영향을 평가하였다(도 6, D-F). 이러한 실험은 생활성이 낮은 공동-어셈블리에서 FGF2 신호는 대부분 비-기능적인 반면, IKVAV 신호는 두 가지 모두에서 계속 작동한다는 것을 시사한다. 이러한 결과는 SCI 실험에서 관찰된 결과와 일치한다.

[0141] 초분자 운동에 대한 물리적 실험 및 컴퓨터 시뮬레이션

[0142] FGF2 PA에서 알킬 꼬리를 따르는 테트라펩티드가 V_2A_2 에서 A_2G_2 로 돌연변이되었을 때 시험관 내 및 생체 내 생활성이 손실되는 잠재적인 물리적 이유를 조사하였다. 두 공동-어셈블리에서 FGF2 PA 분자 간의 역학 차이를 T2-NMR 분광법 및 FD로 연구하였다(도 6, G-I). FGF2 모방 신호에만 존재하는 Y 및 W 아미노산에서 방향족 양성자의 이완 속도를 측정하였다. 이 속도는 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리에서 더 느렸는데, 이는 신호 펩티드의 초분자 운동이 더 크다는 것을 나타낸다($^1\text{H-R}_2 = 49.3 \pm 11 \text{ s}^{-1}$ vs $80.9 \pm 18.9 \text{ s}^{-1}$, 생활성이 낮은 공동-어셈블리의 경우)(도 6, G 및 H). 두 공동-어셈블리에 대한 FD 실험은 Cy3 염료로 공유 표지된 FGF2 PA 분자를 사용하여 수행되었다(cryo-TEM 이미지에 따르면 염료가 초분자 어셈블리를 방해하지 않았음). 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리에서 낮은 이방성이 발견되었으며, 이는 나노섬유 내에서 FGF2 신호 분자의 이동성이 더 높다는 것을 나타낸다(도 6I).

[0143] CG-MD 시뮬레이션은 가장 생활성이 높은 공동-어셈블리에서 FGF2 PA 분자에 대해 더 높은 RMSF 값을 산출함으로써 위의 T2-NMR 및 FD 결과를 뒷받침하였다. 시뮬레이션은 또한 FGF2 PA 분자가 두 공동-어셈블리 모두에서 클러스터를 형성하며(가장 생활성이 높은 시스템에서 약간 더 큼) 이동성 분포(RMSF 값)를 갖는다는 것을 보여주었다(도 6J). 시스템 중 하나에서 생활성이 감소하는 것은 신호를 전달하는 두 PA 분자 간의 공동-어셈블리 정도의 차이에 기인할 수 있다. 그러나 알킬 꼬리에서 메틸렌 단위의 1D $^1\text{H-NMR}$, 확산 질서 분광법(diffusion ordered spectroscopy, DOSY) 및 T2-NMR은 두 시스템 모두에서 공동-어셈블리가 발생했음을 나타낸다(표 4).

표 4

[0144] IKVAV PA2, IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2의 확산 계수(Diffusion coefficient) 및 회전반경(radius of gyration)

샘플	D (m^2/s)	R_g (nm)
IKVAV PA2	$1.6 \pm 0.01 \times 10^{-10}$	1.4
IKVAV PA2+FGF2 PA1	$8.7 \pm 0.12 \times 10^{-11}$	2.7
IKVAV PA2+FGF2 PA2	$8.9 \pm 0.06 \times 10^{-11}$	2.7

[0145] FGF2 PA1 분자의 더 큰 움직임 정도에서 얻은 결과는 직관적이지 않은데, 이는 테트라펩티드 V_2A_2 (FGF2 PA1에 존재)가 IKVAV PA만 포함하는 시스템에서 가장 낮은 이동성을 보였기 때문이다. IKVAV PA2와의 공동-어셈블리에서 FGF2 PA2 분자의 낮은 이동성은 두 분자에 존재하는 동일한 테트라펩티드 간의 수소 결합 및 측쇄 접촉을 통한 더 큰 상호 작용의 결과일 가능성이 높다. 대조적으로, 두 개의 서로 다른 테트라펩티드가 생활성이 높은 IKVAV PA2+FGF2 PA1 공동-어셈블리의 두 분자에 존재하며, 이는 두 유형의 분자 간의 강한 상호작용을 선호하지 않고 더 높은 수준의 초분자 운동으로 이어질 수 있다.

- [0146] IKVAV PA2와 FGF2 PA2 사이의 강한 상호 작용과 적은 운동성에 대한 증거는 FGF2 PA2가 IKVAV PA2에 추가되었을 때 본질적으로 변하지 않는 CD 스펙트럼이다. 그러나 상호 작용이 적은 FGF2 PA1이 IKVAV PA2에 추가되면 CD 스펙트럼이 수정되어 이차 구조의 파괴를 시사한다. 따라서, FGF2 PA1 분자에 대해 NMR에 의해 감지된 더 큰 운동성은 원섬유 내에서 클러스터의 자유로운 병진 운동 또는 원섬유 안팎에서 신호 클러스터의 수직 운동을 나타낼 수 있다.
- [0147] **추가 결과:**
- [0148] 공동-어셈블리 특성화
- [0149] IKVAV PA2를 FGF2 PA(IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2)와 공동-조립했을 때 두 시스템 모두 90:10의 몰비로 긴 리본 모양의 구조를 형성했다(도 3B). 공동-조립 시 형태학적 변화는 FT-IR 스펙트럼뿐만 아니라 SAXS 및 WAXS 프로파일에 의해 입증되었다. SAXS 프로파일은 기니에 영역에서 IKVAV PA2의 경우 -1.2, IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2의 경우 -1.6의 기울기를 보여 원통형 섬유(-1.0)에서 리본(-2.0) 사이의 전이 정도가 다르다는 것을 보여주었다. 또한, PA 공동-어셈블리(IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2)는 FT-IR 스펙트럼에 의해 입증된 WAXS에서 일관된 β -시트 간격을 보여 아마이드 I 영역에서 IKVAV PA2와 유사한 β -시트 시그니처를 나타냈다. 공동-어셈블리의 음성 염색을 사용한 고배율 투과 전자 현미경(TEM)은 IKVAV PA2+FGF2 PA1 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2의 경우 각각 13.7 ± 0.3 및 15.6 ± 0.2 nm의 평균 섬유 폭을 보였다. 두 시스템의 섬유 폭은 주요 시스템 단독(IKVAV PA2 = 10.6 ± 0.1 nm)보다 훨씬 더 컸는데, 이는 시스템에 FGF2 PA가 추가되었기 때문일 수 있다. IKVAV PA2에 통합된 FGF2 PA의 양은 600nm(O.D. 600nm)에서의 광 산란 강도(광학 밀도)를 기준으로 분석하였다. 다른 몰 %의 FGF2 PA(PA1 및 PA2)는 IKVAV PA2와 함께 조립된 동일한 비율보다 더 높은 값을 보였다. 따라서, FGF2 PA는 단독으로는 용해도가 낮지만 IKVAV PA2가 용해도를 향상시켜 이들의 조립으로 이어진다. 더 낮은 비율의 FGF2 PA(5-10 몰%)가 IKVAV PA2와 공동-조립된 경우, O.D.는 IKVAV PA2 단독(0몰%의 FGF2 PA)과 유사한 값을 보였으며 용액에 유리된 FGF2 PA보다 현저히 낮았다.
- [0150] SCI 모델에서 PA 제어:
- [0151] 대조군으로 표면에 생활성 신호가 없는 IKVAV PA1, IKVAV PA4 및 PA 섬유(백본 PA)를 주입했다. 백본 PA를 주입한 마우스에서는 병변 내 축삭의 재성장이 거의 관찰되지 않은 반면, IKVAV PA1의 경우 축삭의 일부 재성장이 관찰되었다. 흥미롭게도 시험관 내에서 중간 수준의 초분자 운동과 생활성을 갖는 것으로 밝혀진 IKVAV PA4는 (IKVAV PA1과 IKVAV PA2 사이) 생체 내에서도 중간 수준의 축삭 재성장을 보였다.
- [0152] 공동-조립된 시스템의 hNPC:
- [0153] hNPC는 PA 코팅 위에 시드되었고 일주일에 걸쳐 테스트된 모든 PA 조건에 대해 유사한 방식으로 부착되고 생존하는 것으로 나타났다. 모든 조건에서 플레이트된 hNPC의 수는 유사했지만, hNPC를 IKVAV PA2+FGF2 PA1 또는 네이티브 FGF-2와 함께 배양했을 때 EdU^+ 및 SOX2^+ 세포를 증식시키는 비율은 증가한 반면, IKVAV PA2+FGF2 PA2, IKVAV PA2 단독 또는 상업용 라미닌에서 세포를 배양했을 때 그 비율은 크게 감소했다(도 6E). 일주일 후, IKVAV PA2+FGF2 PA1은 네이티브 FGF-2 단백질과 동일한 정도로 SOX2^+ 세포의 높은 풀을 유지했다. 반대로, IKVAV PA2+FGF2 PA2, IKVAV PA2 및 라미닌에서 플레이트된 세포는 더 분화된 세포를 나타내는 신경 전구 세포 PAX6^+ 의 비율이 증가했다. 다음으로, IKVAV PA2+FGF2 PA1의 관찰된 생활성이 WB에 의한 표현을 따름으로써 실제로 ITGB1 및 FGFR-1 각각과 연관되어 있는지 여부를 조사했다. P-FGFR-1은 IKVAV PA2+FGF2 PA1에 시드되거나 네이티브 FGF-2로 처리된 hNPC에서 높게 발현되는 반면, 활성 ITGB1은 IKVAV PA2를 함유하는 모든 PA 조건에서 배양된 세포에서 상당히 높은 수준을 보였다. FGF2 PA1과 공동-조립된 IKVAV PA2에서 플레이트된 세포와 FGF2 PA2와 공동-조립된 IKVAV PA2에서 플레이트된 세포 사이의 표현형 프로파일의 차이도 관찰되었다. IKVAV PA2+FGF2 PA1은 네이티브 FGF-2로 처리된 라미닌 코팅에 시드된 세포와 유사한 방식으로 신경줄기세포 마커 SOX-2, 신경 마커 β -튜불린-III(TUJ-1), 유사분열 후 마커 PH3의 더 높은 발현을 유발시켰다.
- [0154] 공동-어셈블리 시스템을 위한 ^1H -NMR, DOSY 및 이완 NMR
- [0155] ^1H -NMR 스펙트럼은 IKVAV PA2 단독에 비해 두 공동-어셈블리 모두에서 메틸렌 양성자의 더 넓고 낮은 강도 피크를 나타냈으며 DOSY로 이러한 결과를 확인하였다. 양성자 이완 속도 데이터도 T2-NMR을 사용하여 얻은 결과, 공동-어셈블리의 양성자 이완 속도가 IKVAV PA2에 비해 훨씬 더 높은 값(IKVAV PA2+FGF2 PA1: $^1\text{H}-R_2 = 59.6 \pm 1.9$

s^{-1} 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2: $^1H-R_2= 52.7 \pm 1.7 s^{-1}$, 및 IKVAV PA2: $^1H-R_2= 6.4 \pm 0.1 s^{-1}$)을 나타냈다. 이러한 결과는 두 신호의 공동-어셈블리가 두 시스템 모두에서 발생한다는 것을 나타낸다.

[0156] 논의

[0157] 본원에서는 물리적으로나 계산적으로 더 큰 초분자 운동을 보여줌으로써 쥐 모델에서 SCI로부터 더 큰 기능 회복을 이끌어내는 생활성 지지체에 대해 설명한다. 비공적으로 중합된 생활성 분자의 1차원 지지체에서 다원자 효과는 효과적인 신호 전달을 위해 수용체를 클러스터링하는 데 도움이 될 것으로 예상되었다. 또한 초분자 지지체의 내부 구조가 자유 운동을 제한하고 원섬유 축에 수직인 수용체를 향해 신호의 방향을 유리하게 할 수 있을 것으로 예상했다. 그러나 이 연구에서 놀라운 발견은 벤치에서 측정된 생활성 원섬유 내의 분자 운동 강도가 SCI로부터 향상된 축삭 재생, 신경 생존, 혈관 재생 및 기능 회복과 상관관계가 있다는 것이다. 컴퓨터 시뮬레이션과 실험 데이터에 따르면 어셈블리 내부 또는 어셈블리 외부에서 나노미터 단위로 이동하여 수용체 부위에 도달하면 생활성이 향상되는 것으로 나타나다. 이론에 얽매이지 않더라도, 매우 민감하고 물리적으로 가소성 있는 초분자 지지체는 급격한 형태 변동을 겪는 세포막의 수용체에 신호를 보내는 데 더 효과적일 수 있다. 회복의 원인에 대한 또 다른 설명은 분자적으로 역동적인 지지체와 ECM의 단백질 환경이 더 유리하게 상호작용하는 것일 수 있다. 요약하면, 본원에 설명된 지지체는 치료용 초분자 폴리머의 생활성을 최적화하기 위한 동역학 구조 설계에 큰 기회를 제공한다.

[0158] 재료 및 방법

[0159] 펩티드 양친매성 분자 나노구조의 특성:

[0160] 합성 및 정제

[0161] PA 합성 및 제조: IKVAV PA (IKVAV PA1: $C_{16}VVAEEEEEGIKVAV$ 및 IKVAV PA2: $C_{16}AAGEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA3: $C_{16}VAGEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA4: $C_{16}AVGEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA5: $C_{16}AAAAEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA6: $C_{16}GGGEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA7: $C_{16}VAAEEEEEGIKVAV$, IKVAV PA8: $C_{16}AVAAEEEEEGIKVAV$), FGF2 PA (FGF2 PA1: $C_{16}VVAEEEEEGYRSRKYSSWYVALKR$ 및 FGF2 PA2: $C_{16}AAGEEEEEGYRSRKYSSWYVALKR$), 이들의 스크램블 버전 scr-IKVAV PA (VVIK PA1: $C_{16}VVAEEEEEGVVIK$ 및 VVIK PA2: $C_{16}AAGEEEEEGVVIK$) 및 scr-FGF2 PA (scr-FGF2 PA1: $C_{16}VVAEEEEEGWRSKKYSLYYVASRR$ 및 scr-FGF2 PA2: $C_{16}AAGEEEEEGWRSKKYSLYYVASRR$), 및 백본 PA ($C_{16}VVAEE$) (물질명 및 해당 펩티드 서열 목록은 표 1 참조, C_{16} 는 팔미토일 그룹)는 링크 아마이드 MBHA 수지에서 CEM 모델 리버티 블루 마이크로웨이브 보조 펩티드 합성기(CEM model Liberty Blue Microwave Assisted Peptide Synthesizer)를 사용하여 표준 플루오레닐메톡시카보닐(fluorenylmethoxycarbonyl, Fmoc) 고체상 펩티드 합성에 의해 합성되었다. 자동화된 커플링 반응은 4당량 Fmoc-보호 아미노산, 4당량 N,N'-디이소프로필카보디이미드(N,N'-diisopropylcarbodiimide, DIC), 및 8당량 에틸(히드록시이미노)시아노아세테이트(ethyl(hydroxyimino)cianoacetate, Oxyma pure)를 사용하여 수행되었다.

[0162] DMF에서 20% 4-메틸피페리딘을 사용하여 Fmoc 그룹을 제거하였다. 펩티드는 95% TFA, 2.5% 물, 2.5% 트리이소프로필실란(TIS)의 표준 용액을 사용하여 수지에서 절단하고 차가운 에테르로 침전시켰다. IKVAV PA, 이들의 스크램블 버전 및 백본 PA의 경우, 역상 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 사용한 기본 정제는 Phenomenex Gemini NX-C18 컬럼(C18 고정상, $5 \mu m$, $110 \text{ \AA}$ 기공 크기, $150 \times 30 \text{ mm}$)를 사용하여 Shimadzu 모델 Prominence modular HPLC 시스템, LC-20AP 용매 전달 장치 2개, SPD-M20A 다이오드 어레이 검출기 및 FRC-10A 분획 수집기에서 25.0 mL/분의 유속에서 용리액으로 1% $NH_4OH(v/v)$ 를 함유하는 H_2O/CH_3CN 구배를 사용하여 수행되었다. FGF2 PA와 이들의 스크램블 버전은 산성 조건(물과 CH_3CN 에 0.1% TFA v/v)에서 Phenomenex Kinetex C8 컬럼(C8 고정상, $5 \mu m$, $100 \text{ \AA}$ 기공 크기, $150 \times 30 \text{ mm}$)을 사용하여 정제되었다. 동결 건조된 PA의 순도는 액체 크로마토그래피-질량 분석법(LC-MS)을 사용하여 Phenomenex Jupiter $4 \mu m$ Proteo $90 \text{ \AA}$ 컬럼(C12 고정상, $4 \mu m$, $90 \text{ \AA}$ 기공 크기, $1 \times 150 \text{ mm}$) 또는 Phenomenex Gemini C18, (C18 고정상, $5 \mu m$, $110 \text{ \AA}$ 기공 크기, $150 \times 1 \text{ mm}$)을 사용하여 Agilent 모델 1200 Infinity 시리즈 바이더리 LC 구매 시스템에서 50 $\mu L/min$ 의 유속으로 0.1% 포름산 또는 $NH_4OH(v/v)$ 를 각각 용리액으로 함유하는 H_2O/CH_3CN 구배를 사용하여 분석되었다. 전기분무 이온화 질량(ESI-질량) 분석은 Agilent model 6510 Quadrupole Time-of-Flight LC-MS에서 양성 스캔 모드로 수행되었다.

[0163] 공유 결합 염료가 있는 PA의 경우, Alexa Fluor®-647 표지-IKVAV PA2 및 Cy3 표지-FGF2 PA는 상기 서열의 C-

말단에 각각 시스테인 또는 아지돌리신을 첨가하여 합성하였다. 정제된 IKVAV PA를 pH 8 Tris 버퍼에서 트리스(2-카복시에틸) 포스핀(TCEP) 염산염(PA에 대하여 5당량)으로 용해시키고 말레이미드-기능화 Alexa Fluor®-647(Thermo Fisher)과 반응시켰다. 정제된 FGF2 PA를 N,N-디메틸포름아미드(DMF)에 용해시키고 디벤조사이클로옥탄-기능화 Cy3-DBCO(Click Chemistry Tools)와 반응시켰다. 최종 염료-표지 PA 제품은 HPLC로 정제되고 동결 건조되어 사용될 때까지 보관되었다.

[0164] 공동-조립된 PA 제조

[0165] 시험관내 실험의 경우: 동결건조 후, PA 분말을 150 mM NaCl 및 3 mM KCl 용액에서 재구성하고, 세포 호환성 및 물질 일관성을 보장하기 위해 1 M NaOH 1 μ L를 첨가하여 pH 7.4로 조정하였다. 다양한 생활성 PA를 다양한 몰%로 혼합하고(표 3 참조), 10% 강도로 3회, 10초 동안 혼 초음파 처리하였다. PA 용액을 80 °C에서 30분 동안 어닐링한 다음, 모든 샘플의 균일하고 제어된 가열 및 냉각을 위해 열 순환기(Eppendorf PCR Thermocycler)를 사용하여 천천히 냉각, 분당 1° C에서 최종 온도 27° C에 도달하였다. PA 코팅 기질을 제조하기 위해, 24-, 12- 또는 6-웰 폴리스티렌 세포 배양 플레이트 또는 12 mm 및 18 mm 글라스 커버 슬립(German Glass, Chemglass Life Science)을 37°C에서 3시간 동안 폴리-D-라이신(0.01 mg/mL, Sigma-Aldrich)으로 코팅하였다. 그 후 플레이트를 MilliQ 물로 3회 행구고, 4시간 동안 건조되도록 하였다. PA는 피펫(어닐링된 PA 8-30 μ L(1 wt%))을 드래그하여 커버 슬립 또는 조직 배양 플레이트에 칠해졌고, 표면에 얇고 균일한 물질 코팅을 압출하였다. PA 코팅을 실온에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 추가 사용 전에 배지로 부드럽게 행구었다. 염료-표지된 PA 실험을 위해, Cy3-표지된 FGF2 PA를 1 몰%에서 상응하는 비-표지 PA 대응물로 공동-조립하였다(표 3 참조).

[0166] 생체내 실험의 경우: 동결건조 후, PA 분말을 1 mg/100 μ L 농도의 멸균 등장성 식염수 염화나트륨, 0.9%(w/v)(Ricca Chemical)로 재구성하였다. 그런 다음 멸균 1M NaOH를 1 μ L 첨가하여 PA 용액을 pH 7.4로 조정한 다음, IKVAV PA2를 10몰 % FGF2 PA1 또는 FGF2 PA2와 공동-조립하였다(표 3 참조). 혼합 후, 용액을 초음파 처리하고 어닐링하였다. 염료-표지 PA 실험의 경우, Alexa-647 표지-IKVAV PA2를 해당 비-표지 PA 대응 물과 1몰 %로 공동-조립하였다(표 3 참조).

[0167] 투과전자현미경(TEM)

[0168] 음으로 염색된 TEM 표본을 준비하기 위해, 7 μ L의 PA 샘플 용액(150mM NaCl 및 3mM 10배 희석된 MilliQ 물에서 제조한 1wt% PA)을 글로우 방전 그리드(glow discharged grid, 탄소 필름이 있는 300 메쉬 구리, Electron Microscopy Sciences)의 빛나는 면에 적용한 다음, MilliQ 물로 세 번 행구어 과도한 염을 제거하였다. 그런 다음 그리드를 여과된 2 wt% 우라닐 아세테이트 수용액으로 염색하고 공기 중에서 건조시켰다. 100kV 가속 전압에서 LaB6 필라멘트가 장착된 JEOL 1230 현미경과 Gatan 831 CCD 카메라로 TEM 이미징을 수행하였다. 이미징 중 샘플 안정화를 위해 콜드 핑거를 도입하였다.

[0169] 극저온투과전자현미경 (Cryo-TEM)

[0170] Cryo-TEM 샘플의 급랭-동결은 FEI 모델 Vitrobot MarkIV(FEI)를 사용하여 준비하였다. 7 μ L의 샘플 용액(H₂O 중 [PA]=0.05-0.1 wt %)을 플라즈마-세척 TEM 그리드(300 메쉬 구리 및 레이시 탄소, Electron Microscopy Sciences)에 증착하고 Vitrobot에 장착된 핀셋으로 제자리에 고정시켰다. 표본을 실온에서 습도 100%의 환경에서 블롯하였고(블롯 힘: 3, 블롯 총 횟수: 1-2, 대기 시간: 0.5-1초, 블롯 시간: 3초, 배수 시간: 0-1초), 액체 질소로 냉각된 액체 에탄 저장소에 넣었다. 유리화된 샘플을 액체 질소에 보관한 다음 Gatan 626 Cryo-TEM 홀더로 옮겼다. Gatan 831 CCD 카메라가 장착된 100kV의 가속 전압에서 LaB6 필라멘트로 작동하는 JEOL1230 전자 현미경을 사용하여 Cryo-TEM 이미지를 얻었다.

[0171] 주사전자현미경 (SEM)

[0172] 세포가 있거나없는 PA 코팅을 인산염 완충 식염수(1X, Gibco)에 파라포름알데히드(2.0%, Electron Microscopy Sciences), 글루타알데히드(2.5%, Electron Microscopy Sciences)의 혼합물에 20분 동안 고정하였다. 고정액을 제거하고 200 Proof 에탄올(Decon Laboratories, Inc)의 농도를 증가시키면서(30-100%) 에탄올 용액의 농도 변화에 따라 샘플을 배양하여 물을 에탄올로 교환하였다. 과도한 수분을 제거하기 위해 임계점 건조(Tousimis Samdri-795)를 사용하였다. 충분한 교환이 이루어지도록 20분의 퍼지 사이클을 사용하였다. 탈수된 샘플은 탄소 집착 테이프(Electron Microscopy Sciences)와 경우에 따라 탄소 집착제(Electron Microscopy Sciences)를 사용하여 스테브(stub)에 장착하였다. 샘플 표면이 이미징을 위해 전도성이 되도록 약 10nm의 오스뮴(Filgen,

OPC-60A)으로 샘플을 코팅하였다. 모든 이미지는 Hitachi SU8030 SEM 장비로 2kV의 가속 전압에서 촬영되었다.

[0173] X-선 산란

[0174] 소각 X선 산란(SAXS), 중각 X선 산란(MAXS), 광각 X선 산란(WAXS) 실험은 아르곤 국립연구소(Argonne National Laboratory) 고급 광자 소스(Advanced Photon Source)의 DuPont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team (DND-CAT) Synchrotron Research Center의 빔라인 5-ID-D에서 수행되었다. 100-150 μL 의 샘플 용액([수성 NaCl 및 KCl]([NaCl]=150 mM 및 [KCl]=3 mM) 중 PA=1-3 w/v%(~6-10 mM)]을 고정된 직경을 갖고 모세관 유동-셀에 도입하고, 0.5, 2, 3 또는 10초의 노출 시간 동안 X선을 조사하였다. 빔 과다 노출로 인한 손상을 방지하기 위해 샘플 측정 중에 주사기 펌프를 사용하여 모세관에서 샘플을 10 μL /초의 속도로 진동시켰다. 삼중 영역 검출기 시스템을 사용하여 17keV($\lambda=0.83\text{\AA}$)의 X선 에너지로 데이터를 수집했다. 산란 강도는 $0.002390 < q < 4.4578\text{ \AA}^{-1}$ 간격으로 기록되었다. 파동 벡터 q 는 $q = (4\pi/\lambda) \sin(\Theta/2)$ 로 정의되며, 여기서 Θ 는 산란 각도이다. 획득한 2D 산란 데이터는 GSAS-II 소프트웨어의 빔 중심 주변의 방위각 통합을 통해 1D 강도 대 파동 벡터 플롯으로 축소되었다. 배경 산란 패턴은 150mM NaCl 및 3mM KCl을 함유하는 샘플에서 얻어졌다. 그런 다음 이 배경 데이터를 실험 데이터에서 제거했다. 모든 데이터는 IgorPro 소프트웨어에서 실행되는 Irena 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석되었다.

[0175] 원편광 이색성 (CD) 분광분석

[0176] 각 PA 샘플을 H_2O (무염 샘플) 또는 150mM NaCl 및 3mM KCl(고염)이 포함된 완충액에서 0.01-0.04 wt %의 농도로 희석하였다. CD 스펙트럼은 0.5mm 광학 경로 길이의 석영 셀을 사용하는 JASCO 모델 J-815 분광 편광계에 기록하였다. 연속 스캔 모드는 분당 100nm의 스캔 속도로 감도를 표준 모드로 설정하여 사용하였다. 측정값이 포화 상태가 되지 않았는지 확인하기 위해 각 샘플에 대해 HT(High Tension) 전압을 기록하였다. 세 번의 측정값을 누적하고 버퍼 샘플을 배경에서 제거하여 최종 스펙트럼을 얻었다. 최종 스펙트럼은 몰 평균 분자량을 사용하여 각 샘플의 최종 농도로 정규화되었다.

[0177] 푸리에변환적외선(FT-IR) 분광분석

[0178] FT-IR 스펙트럼은 Bruker Tensor 37 FT-IR 분광기로 기록되었다. 샘플은 중수(D_2O)에서 준비되었으며, 50 μm 간격으로 두 개의 CaF_2 창 사이에 배치하였다. 최종 스펙트럼은 1cm^{-1} 해상도로 25회 스캔한 결과이며 대기 중 CO_2 및 H_2O 를 배경에서 제거하였다.

[0179] 형광편광 분석(Fluorescence depolarization)

[0180] 어닐링된 PA 수용액 100 μL ([PA]=6mM, [KCl]=3mM, [NaCl]=150 mM)에 1,6-디페닐-1,3,5-헥사트리엔(DPH; 1.4 mM)의 THF 용액(2 μL)을 첨가하고, 혼합물을 25° C에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 그런 다음 혼합물을 수성 KCl 및 NaCl(1900 μL , [KCl]=3mM, [NaCl]=150mM)로 희석하고, 25° C에서 10-30분 동안 배양하여 DPH(1.4 μM)-포함 PA(300 μM)의 용액을 얻었다. CaCl_2 존재 하에서 IKVAV PA2(A_2G_2) 또는 IKVAV PA5(G_4)를 얻기 위해, 5mM CaCl_2 를 DPH-포함 PA 수용액에 첨가하여 물 비율을 6:1의 PA : CaCl_2 를 얻었다. DPH는 336nm에서 방출되었고 방출은 18A 출력의 300W 제논 아크 램프를 사용하는 ISS 모델 PC1 분광형광계의 450nm에서 기록되었다. 여기 슬릿 및 방출 슬릿 폭은 1mm(8nm 대역폭)로 설정되었다. 이방성은 다음 방정식을 사용하여 계산하였다:

[0181]
$$A = \frac{F_{\parallel} - gF_{\perp}}{F_{\parallel} + 2gF_{\perp}}$$

[0182] 여기서 $F_{\parallel}$ 는 여기 평면에 대한 평행 강도를 나타내고, $F_{\perp}$ 는 여기 평면에 대한 수직 강도를 나타내며, g는 수직 및 수평 편광에 대한 검출 시스템의 감도의 강도 비율을 나타내는 격자 인자(G-factor)이다. G-인자는 각 측정에서 개별적으로 결정되었다. 결과는 두 번의 측정에서 34번의 반복을 기준으로 평균을 냈다.

[0183] 형광 연구를 위한 Cy3 기능화 FGF2 PA 샘플

[0184] 90:10 물 비율의 IKVAV/FGF2 혼합물의 PA 수용액([PA]_{total} = 6 mM, [KCl] = 3 mM, [NaCl] = 150 mM)은 Cy3 DBCO 염료로 기능화된 FGF2 PA의 1 mol%로 제조되었다. 이 용액 100 μL 를 수성 KCl 및 NaCl(1900 μL , [KCl] = 3mM, [NaCl] = 150mM)로 희석하고 시스템을 25° C에서 10분 동안 인큐베이션하여 평형을 맞췄다. 최종 PA 및 염

료 농도는 각각 300 μ M 및 0.3 μ M이었다. Cy3는 535nm에서 방출되었고 방출은 575nm에서 기록되었다.

[0185] 유변학(Rheology)

[0186] PA 물질은 위에서 설명한 시험관 내 연구 방법을 사용하여 제조되었다. 모든 유변학적 연구에는 MCR302 레오미터(Anton Paar)가 사용되었다. 시험관 내 및 생체 내 조건을 시뮬레이션하기 위해 기기 스테이지를 37° C로 설정하였다. PA 용액(150 μ L)을 샘플 스테이지에 놓고 25mM CaCl₂ 용액 30 μ L를 물질 위에 위치한 25mm 원뿔 플레이트의 밑면에 피펫팅하였다. 플레이트를 측정 위치로 천천히 내리고 습도 칼라(collar)를 사용하여 샘플 플린저를 둘러싸고 각 45분 실험 진행 동안 샘플 증발을 방지하였다. 각 실험마다 샘플은 10[rad/s]의 일정한 각진동수와 0.1%의 변형률로 30분 동안 평형화되었다. 저장 및 손실 계수(G' 및 G'')는 정체기(plateau)가 발생한 후 기록하였다.

[0187] 광학 밀도(O.D.)

[0188] PA 물질은 실험관 내 연구를 위해 상기에서 설명한 방법을 사용하여 준비하였다. PA 용액을 1x 식염수 용액으로 총 부피가 300 μ L가 될 때까지 추가 희석하였다. 이 현탁액 100 μ L를 96 웰 플레이트의 삼중 웰에 피펫팅하고 Cytation3 세포 이미징 다중-모드 리더기(BioTek)를 사용하여 광학 밀도를 600nm에서 기록하였다.

[0189] 글라스 표면에 IKVAV 펩티드 고정화

[0190] 붕규산 글라스 커버슬립(직경 12mm; Fisher Scientific)을 합성 IKVAV 펩티드로 변형하였다. 붕규산 글라스 커버슬립을 2%(v/v) 마이크로-90 세척액(Sigma-Aldrich)로 60° C에서 30분 동안 세척하고 증류수로 6회 행군 후 에탄올로 행군 다음 건조시켰다. 커버슬립을 30초 동안 O₂로 플라즈마 에칭(Harrick Plasma PDC-001-HP)한 다음, 즉시 에탄올 중 (3-아미노프로필) 트리에톡시실란(Sigma-Aldrich) 2%(v/v) 용액에서 15분 동안 인큐베이션 하였다. 그런 다음 커버슬립을 에탄올로 두 번, 물로 두 번 행군 후 오븐에서 건조시켰다. 그런 다음 2% DMF(Sigma-Aldrich)가 포함된 1-에틸-3-(디메틸아미노프로필) 카르보디이미드(Acros Organics) 1.25 mg/mL 용액에서 50 nmol/mL로 IKVAV 펩티드를 제조하였다. 커버슬립을 이 용액과 함께 40° C에서 3.5시간 동안 인큐베이션 하였다. 인큐베이션 후 커버슬립을 100% 무수 아세트산(Fisher Chemical), 2M 염산(Fisher Chemical), 0.2M 중탄산나트륨으로 연속적으로 세척하였다. 과량의 물로 행군 후 샘플을 4 M 요소에서 10분간 초음파 처리한 다음 1 M NaCl에서 10분간 초음파 처리하였고, 그 다음 과량의 물로 행군 후 100° C에서 1시간 동안 건조시켰다.

[0191] NMR 실험

[0192] NMR 스펙트럼은 6kHz의 스위프 폭과 16k 데이터 포인트를 가진 Doty 확산 프로브를 사용하여 Tecmag NMR 분광기 600MHz에서 또는 QCI-F 크라이오 프로브가 있는 Bruker Neo 시스템 600MHz에서 획득하였다:

[0193] 25° C에서 TFA-d, 9/1 비율의 H₂O/D₂O를 (D₂O는 0.05 wt.% 3-(트리메틸실릴) 프로피온산-2,2,3,3-d₄산, 나트륨 염을 함유) 용매로 사용하여 IKVAV PA의 NMR 스펙트럼을 기록하였다. 화학적 이동은 백만 분의 1(ppm) 단위로 보고된다. 구조 할당은 ¹H, ¹H-gCOSY, ¹H, ¹³C-gHSCQAD, TOCSY 및 NOESY 를 사용하여 수행되었다. 다중도는 단일선(s), 이중선(d), 다중선(m), 이중선의 이중선(dd), 이중선의 이중선의 이중선(ddd), 삼중선(t), 사중선(q)으로 표시된다. 90° 펄스 폭은 15 μ s였고 일반적인 스펙트럼에는 32번의 스캔이 필요했다. 방향족 양성자를 함유하는 에피토프의 존재량이 10몰 %에 불과했기 때문에 방향족 신호 강도를 정확하게 추정하기 위해 추가 스캔(512회)이 필요했다.

[0194] 확산 계수는 최대 구배 강도가 53.5G/cm이고 구배 강도에 대한 16개의 값을 갖는 양극성 펄스 쌍 펄스 시퀀스를 사용하여 종 방향 와전류 지연을 사용하여 펄스장 구배 NMR로 측정하였다. 피크 강도 I를 측정하고 Stejskal-Tanner 방정식에 맞췄다:

$$I = I_0 e^{-\left(D\gamma^2 g^2 \delta^2 \left(4 - \frac{\delta}{3}\right)\right)}$$

[0195]

[0196] 여기서 I₀은 구배 펄스가 없을 때의 강도, D는 확산 계수, γ 는 양성자 회전 자기 비율, g는 구배 강도, δ 는 펄스장 구배 펄스의 길이(2ms), Δ 는 확산 지연(0.1초)이다.

[0197] 회전 반경 R_g 는 스토크스-아인슈타인(Stokes-Einstein) 방정식에서 다음과 같이 계산되었다:

$$R_g = \frac{k_B T}{6\pi\eta D}$$

[0199] 여기서 k_B 는 볼츠만 상수, T 는 온도, η 는 점도이다.

[0200] 스핀-스핀 이완 속도는 가변 루프에서 0.2ms의 지연 시간을 갖는 Carr-Purcell-Gill-Meiboom 펄스 시퀀스를 사용하여 측정하였다. 피크 강도 데이터는 다음과 같은 형식으로 지수화하였다:

$$I = I_0 e^{-(R_2\tau)} + b$$

[0202] 여기서 τ 는 지연 시간의 길이, R_2 는 스핀-스핀 이완 속도, b 는 기준선이다.

[0203] 피크 할당(peak assignment)

[0204] IKVAV PA1: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.83 (t, 3H, $J = 6.6$ Hz, Pal-CH₃), 0.88 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, Ile-C(δ)-H₃), 0.92-1.01 (m, 24H, 4x Val-C(γ)-H₃), 1.25 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.49 (m, 9H, 3x Ala-C(β)-H₃), 1.67 (m, 8H, 4x Glu-C(β)-H₂), 2.1 (m, 8H, 4x Glu-C(γ)-H₂), 2.24 (m, 3H, Pal-C(α)-H₂), 2.59 (m, 3H, 3x Val-C(β)-H), 2.81 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, Lys-C(ϵ)-H₂), 3.88 (m, Lys-C(α)-H₂, Ile-C(α)-H₂), 3.97 (m, 4H, 4x Glu-C(α)-H₂), 4.01 (m, 3H, 3x Val-C(α)-H), 4.38-4.5 (m, 6H, Gly-C(α)-H₂, 3xAla-C(α)-H, Val-C(α)-H), 4.62-4.75 (m, Ala-C(α)-H₂).

[0205] IKVAV PA2: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.80 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz, Pal-CH₃), 0.86 (t, 3H, $J = 7.4$ Hz, Ile-C(δ)-H₃), 0.92 - 0.96 (m, 12H, 2x Val-C(γ)-H₃), 1.01 (dd, $J = 10.9$ Hz, 6.7 Hz, Ile-C(γ)-H₃), 1.21 - 1.33 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.45 (d, $J = 7.1$ Hz, Ile-C(β)-H₃), 1.49 (m, 9H, 3x Ala-C(β)-H₃), 1.66 (m, 2H, Lys-C(β)-H₂), 1.72 (m, 2H, Lys-C(γ)-H₂), 1.85 (m, 8H, 4xGlu-C(β)-H₂), 2.1 (m, 8H, 4x Glu-C(γ)-H₂), 2.25 (m, 2H, Pal-C(α)-H₂), 2.52 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, Lys-C(ϵ)-H₂), 4.1-4.3 (m, 2H, Lys-C(α)-H, Ile-C(α)-H), 4.4-4.5 (m, 2H, 2x Glu-C(α)-H), 4.60-4.67 (m, 2H, 2x Glu-C(α)-H), 4.71-4.86 (m, 12H, 3x Gly-C(α)-H₂, 3xAla-C(α)-H, 3x Val-C(α)-H).

[0206] IKVAV PA3: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.93 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, Pal-CH₃), 0.99 (t, 3H, $J = 7.1$ Hz, Ile-C(δ)-H₃), 1.04 - 1.16 (m, 18H, 3x Val-C(γ)-H₃, 3H, Ile-C(β)-H₃), 1.25-1.32 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.51 (m, 6H, 2xAla-C(β)-H₃) 1.59-1.63 (m, 8H, 4x Glu-C(β)-H₂), 1.80 (dq, $J = 12.9$, 1H, Val-C(β)-H), 2.25 (m, 2H, Pal-C(α)-H₂, 4H, 2x Glu-C(β)-H₂), 2.39 (m, 4H, 2xGlu-C(β)-H₂), 2.66 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz, Lys-C(ϵ)-H₂), 3.86-4.01 (m, 5H, Ile-C(α)-H, 2x Glu-C(α)-H, Lys-C(α)-H, Val-C(α)-H), 4.55-4.62 (m, 2H, 2x Glu-C(α)-H), 4.77-4.82 (m, 6H, 3x Gly-C(α)-H₂), 4.86-4.92 (m, 3H, 2x Ala-C(α)-H, Val-C(α)-H), 4.98-5.01 (m, 1H, Val-C(α)-H).

[0207] IKVAV PA4: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.80 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz, Pal-CH₃), 0.86 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz, Ile-C(δ)-H₃), 0.91 - 1.06 (m, 18H, 3x Val-C(γ)-H₃, 3H, Ile-C(β)-H₃), 1.21-1.28 (m 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.45-1.51 (m, 8H, 4x Glu-C(β)-H₂), 1.56 (m, 6H, 2x Ala-C(β)-H₃) 1.71 (dq, $J = 12.9$, 1H, Val-C(β)-H), 1.83 (m, 2H, Pal-C(α)-H₂, 4H, 2x Glu-C(β)-H₂), 2.13 (m, 4H, 2x Glu-C(γ)-H₂), 2.7 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, Lys-C(ϵ)-H₂), 4.14-4.22 (m, 5H, Ile-C(α)-H, 2x Glu-C(α)-H, Lys-C(α)-H, Val-C(α)-H), 4.24-4.29 (m, 2H, 2x Glu-C(α)-H), 4.43-4.52 (m, 6H, 3x Gly-C(α)-H₂), 4.62-4.68 (m, 3H, 2x Ala-C(α)-H, Val-C(α)-H), 4.73-4.86 (m, 1H, Val-C(α)-H).

[0208] IKVAV PA5: $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.78 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz, Pal-CH₃), 0.84 (t, 3H, $J = 7.3$ Hz, Ile-

$C_{(\delta)}H_3$), 0.90 - 0.94 (m, 12H, 2x Val- $C_{(\gamma)}H_3$, 3H, Ile- $C_{(\beta)}H_3$), 1.19-1.29 (m 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.44-1.49 (m, 11H, 4xGlu- $C_{(\beta)}H_2$, Ala- $C_{(\beta)}H_3$), 1.88 (m, 2H, Pal- $C_{(\alpha)}H_2$), 2.11 (m, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.54 (t, 2H, J=6.9 Hz, Lys- $C_{(\epsilon)}H_2$), 4.13-4.29 (m, 5H, Ile- $C_{(\alpha)}H$, 2xGlu- $C_{(\alpha)}H$, Lys- $C_{(\alpha)}H$, Val- $C_{(\alpha)}H$), 4.41-4.47 (m, 2H, 2x Glu- $C_{(\alpha)}H$), 4.62-4.67 (m, 8H, 4x Gly- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.72-4.79 (m, 2H, Ala- $C_{(\alpha)}H$, Gly- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.73-4.86 (m, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$).

[0209] IKVAV PA6: ^1H -NMR (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.82 (t, 3H, J = 6.9 Hz, Pal-CH₃), 0.88 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Ile- $C_{(\delta)}H_3$), 0.93 - 1.06 (m, 18H, 3x Val- $C_{(\gamma)}H_3$, 3H, Ile- $C_{(\beta)}H_3$), 1.23-1.21 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.46-1.51 (m, 20H, 4x Glu- $C_{(\beta)}H_2$, 4x Ala- $C_{(\beta)}H_3$), 1.79-1.93 (m, 2H, Pal- $C_{(\alpha)}H_2$, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.09-2.20 (m, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.62 (t, 2H, J=6.9 Hz, Lys- $C_{(\epsilon)}H_2$), 4.17 (d, 1H, J=17 Hz Ile- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.21 (d, 1H, J=17 Hz, Ile- $C_{(\beta)}H_2$), 4.45-4.49 (m, 5H, 4x Glu- $C_{(\alpha)}H_2$, Val- $C_{(\alpha)}H$), 4.55 (d, J= 7.33Hz, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$), 4.61-4.71 (m, 4H, Ala- $C_{(\alpha)}H$), 4.79-4.82 (m, 2H, Val- $C_{(\alpha)}H$, Lys- $C_{(\alpha)}H$), 4.87 (m, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$).

[0210] IKVAV PA7: ^1H -NMR (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.84 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Pal-CH₃), 0.89 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Ile- $C_{(\delta)}H_3$), 0.89 - 1.03 (m, 18H, 3x Val- $C_{(\gamma)}H_3$, 3H, Ile- $C_{(\beta)}H_3$), 1.17-1.24 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.38-1.54 (m, 20H, 4x Glu- $C_{(\beta)}H_2$, 4x Ala- $C_{(\beta)}H_3$), 1.84-1.91 (m, 2H, Pal- $C_{(\alpha)}H_2$, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.01-2.11 (m, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.72 (t, 2H, J=6.9 Hz, Lys- $C_{(\epsilon)}H_2$), 4.14 (d, 1H, J=16.7 Hz Ile- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.21 (d, 1H, J=16.7 Hz, Ile- $C_{(\beta)}H_2$), 4.29-4.35 (m, 5H, 4xGlu- $C_{(\alpha)}H_2$, Val- $C_{(\alpha)}H$), 4.51 (d, J= 7.12 Hz, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$), 4.67-4.73 (m, 4H, Ala- $C_{(\alpha)}H$), 4.72-4.81 (m, 2H, Val- $C_{(\alpha)}H$, Lys- $C_{(\alpha)}H$), 4.88 (m, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$).

[0211] IKVAV PA8: ^1H -NMR (600 MHz, TFA- d_1): δ 0.85 (t, 3H, J = 7.2 Hz, Pal-CH₃), 0.86 (t, 3H, J = 7.1 Hz, Ile- $C_{(\delta)}H_3$), 0.91 - 1.06 (m, 12H, 2x Val- $C_{(\gamma)}H_3$, 3H, Ile- $C_{(\beta)}H_3$), 1.11-1.20 (m, 24H, 여러 Pal-CH₂), 1.29-1.44 (m, 20H, 4x Glu- $C_{(\beta)}H_2$, 4xAla- $C_{(\beta)}H_3$), 1.81-1.92 (m, 2H, Pal- $C_{(\alpha)}H_2$, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.02-2.14 (m, 8H, 4x Glu- $C_{(\gamma)}H_2$), 2.65 (t, 2H, J=7.1 Hz, Lys- $C_{(\epsilon)}H_2$), 4.09 (d, 1H, J=17.1 Hz Ile- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.13 (d, 1H, J=17.1 Hz, Ile- $C_{(\beta)}H_2$), 4.21-4.30 (m, 4H, 4x Glu- $C_{(\alpha)}H_2$), 4.54-4.62 (m, 5H, Ala- $C_{(\alpha)}H$), 4.69-4.84 (m, 2H, Val- $C_{(\alpha)}H$, Lys- $C_{(\alpha)}H$), 4.86-4.91 (m, 1H, Val- $C_{(\alpha)}H$).

[0212] 확산 정렬 분광분석 (DOSY)

[0213] PA 물질을 혼합(90 mol %의 IKVAV PA2 + 10 mol %의 FGF2 PA)하고 위에서 설명한 대로 초음파 처리한 다음 동결 건조하였다. 그런 다음 샘플을 D₂O 물에 용해시키고 화학적 이동 레퍼런스 및 강도 표준으로 0.25 mM 트리메틸실릴프로판설포네이트 나트륨(DSS)을 사용하여 표준 5mm NMR 튜브에서 6 mM 농도의 1 당량 NaOD에 용해시켰다. 20분 동안 초음파 처리한 후, 샘플을 80° C에서 30분 동안 어닐링한 다음 실온에서 천천히 냉각시켰다. 확산 계수는 2ms의 구배 펄스와 최대 구배 강도 53G/cm를 사용하는 100ms의 확산 지연 시간을 갖는 자극 에코 펄스 시퀀스를 사용하여 펄스-장 구배 NMR을 사용하여 측정하였다.

[0214] **1. 시뮬레이션 절차**

[0215] PA는 아보가드로(Avogadro)에서 생성되었으며, 팔미토일 꼬리를 포함하고 펩티드에 코일된 코일 이차 구조를 사용하도록 수정된 버전의 martinize.py를 사용하여 마티니 역장(MARTINI force field) 거친 입자(CG) 표현으로 변환되었다. 마지막 두 개의 E 잔기(지방족 꼬리에서 가장 멀리 떨어져 있음)와 에피토프의 K 및 R 잔기는 전하를 띠고, 처음 두 개의 E 잔기는 이전 시뮬레이션에서 섬유 형성에 이상적인 것으로 밝혀졌기 때문에 중성으로 처리하였다. 최종 전하량은 IKVAV PA의 경우 -1, FGF2 PA의 경우 +3이다. CG 물에 용해되고 시스템을 중화하기에 충분한 이온이 있는 $21.5 \times 21.5 \times 21.5$ nm³ 입방체 상자에서 두 단계로 시뮬레이션을 수행하였다. 먼저, 최소 분자 간 공간이 3Å인 상자에 300개의 IKVAV PA를 무작위로 배치하여 농도를 50mM(IKVAV PA의 경우 7.3-7.8 wt %)으로 맞췄다. 이는 자가-조립 시뮬레이션을 가속화하는 데 일반적으로 사용되는 농도 범위 내에 있으

며, 사용된 실험 시스템보다 최대 10배까지 높을 수 있다. 이러한 시스템은 10 μ s 동안 평형화되었다(도 8). 형성된 섬유를 상자 중앙에 배치하고 최소 3Å의 허용치를 두고 섬유 주위에 33개의 FGF2 PA(10물 %)를 무작위로 추가하였다. 그런 다음 시스템당 5회의 독립적인 시뮬레이션을 통해 10 μ s 동안 평형을 맞췄다.

[0216] 모든 시각화는 VMD(visual molecular dynamics)를 사용하여 렌더링되었다. CG-MD(Coarse-grained molecular dynamic) 시뮬레이션은 GROMACS 5.0.4에서 수행되었으며, 이 시뮬레이션은 시뮬레이션 분석에도 사용되었다. 정전기의 경우 상대 유전 상수가 15인 반응장을 사용하여 분자 간 상호 작용을 위해 1.1 nm의 컷오프가 사용되었고, 레너드-존스(Lennard-Jones) 상호 작용의 경우 전위-시프트가 사용되었다. 모든 시스템은 5000단계로 최소화하거나 원자 사이의 힘이 2000pN 이하로 수렴할 때까지 최소화했다. 자가-조립 시뮬레이션은 온도(303K, τ_T = 1ps)에 대해 V-rescale 알고리즘을, 압력(1bar, τ_P = 3ps)에 대해 Berendsen을 사용하여 NPT 앙상블에서 25-fs 시간 단계를 사용하여 실행되었다. 시뮬레이션은 10 μ s 유효 시간에 해당하는 100,000,000단계에 대해 실행되었다.

[0217] 클러스터링은 동일한 클러스터의 PA에 대해 0.6nm의 컷오프 거리를 고려하여 측정하였다(도 6J). 역동성은 평균 제곱근 변동(RMSD)으로 표시되는 것처럼 5 μ s 후 평형화된 시스템을 사용하여 5개의 시뮬레이션 중 마지막 5 μ s 동안의 평균제곱근변동(RMSF)을 사용하여 측정되었다. 따라서 이 분석을 제외한 시스템은 결과에 마스킹 효과가 있었기 때문에 일부 FGF2 PA는 마지막 5 μ s 이전에 섬유에 부착되지 않았다. 시각화를 위해 RMSF를 β -인자로 변환하고 모든 결과를 정규화하여 비슷한 색상 코드를 얻었다.

[0218] 2. 실험관내 세포 배양

[0219] 인간 제대 정맥(Human umbilical vein cord, HUVEC) 배양

[0220] 인간 제대 정맥(HUVEC)(pooled donor, LONZA, Allendale, New Jersey)을 1% 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 완전 배지(Endo GRO-VEGF Complete Culture Media Kit, Millipore)를 사용하여 T-75 세포 배양 플라스크에서 각 실험(P2-P4)에 대해 70-80% 컨플루언스(confluence)까지 성장시켰다. 배지는 3일마다 교체되었다.

[0221] HUVEC 처리 및 코팅

[0222] 공동-조립된 PA를 혈청이 없는 배지에 용해시켜 처리를 준비하였다. 처리당 FGF2 PA의 총 농도는 0.5 μ M이었다. FGF-2 천연 단백질(Peprotech)을 재현탁하고 0.25nM에서 사용하였다. 웨스턴 블롯 실험을 위해, HUVEC를 12웰 플레이트에서 약 150,000개 세포/웰의 밀도로 실험관 내에서 2일 동안 배양한 후 처리하였다. 세포 용해물을 수확하거나 세포를 고정하기 전에 실험관 내에서 2시간-2일 동안 처리를 추가하였다. PA 코팅의 경우 공동-조립된 PA 준비 섹션에 설명된 대로 커버슬립(German Glass, Chemglass Life Science) 또는 조직 배양 플레이트에 PA를 칠하였다. 조사된 모든 조건에 대해 조건당 3번의 반복 실험과 3번의 독립적인 실험이 수행되었다.

[0223] 인간 신경 전구세포(Human neural progenitor cell, hNPC) 배양

[0224] 신경 전구 세포(NPC)는 인간 배아 줄기 세포 HUES 64(Harvard University)에서 분화되었다(도 2C 참조). 간단히 말해, Matrigel(Thermo Fisher) 코팅 플레이트에서 mTESR 배지(STEMCELL Technologies)로 배양한 70% 컨플루언스 줄기세포 배양액을 이중 SMAD 억제제(SB431542, DNSK International 및 LDN-193189, Tocris)가 포함된 N2B27 배지(50% DMEM: F12, 50% Neurobasal, NEAA 보충, Glutamax, N2 및 B27; Gibco)로 12일간 전환하여 신경 전구세포 생성을 유도하였다. 5일부터 12일까지 배지에 라미닌을 보충하여 신경화를 강화하였다. 다음으로 신경 로제트(neural rosette)를 신경 로제트 선택 시약(STEMCELL Technologies)으로 해리하여 NPC를 얻었으며, 이 NPC는 bFGF(Millipore)가 보충된 N2B27(Gibco) 배지에서 증식되었다. 다른 PA 플랫폼에서의 실험을 위해 NPC를 Accutase (Innovative Cell technology)로 해리하고, DMEM:F12+N2+B27 배지(하이클론 페니실린-스트렙토마이신(GE 헬스케어) 및 아스코르브산(0.2 μ g/mL; Sigma-Aldrich)을 첨가)을 사용하여 별개의 플랫폼에서 배양하였다.

[0225] IKVAV PA로 처리되거나 공동-조립된 PA 코팅에 시드된 인간 신경 전구세포(hNPC) 배양물

[0226] IKVAV PA 처리의 경우, 오르니틴 코팅(German Glass, Chemglass Life Science)에서 각각 500,000세포/웰 및 80,000세포/웰의 밀도로 6웰 및 24웰 플레이트에서 hNPC를 배양하였다. hNPC는 용액에서 60mM의 IKVAV PA([PA] = 6mM, [KCl] = 3M, [NaCl] = 150mM) 또는 제조함 라미닌 단백질(10 mg/mL)로 처리하였다. 또한 IKVAV PA2 및 IKVAV PA5를 5mM CaCl2와 PA:CaCl2 6:1의 비율로 혼합하여 hNPC를 처리하였다. 2D 실험의 경우, 위에 언급된 밀도로 6 웰 및 24 웰 플레이트에서 서로 다른 IKVAV PA 또는 라미닌 코팅 위에서 hNPC를 배양하였다. 공동-조립 실험의 경우, 6 웰 및 24 웰 플레이트에서 각각 400,000 세포/웰 및 50,000 세포/웰의 밀도로 6 웰 및 24 웰

플레이트에서 서로 다른 공동-조립 PA 코팅에 hNPC를 배양하였다.

[0227] hNPC에는 하이클론 페니실린-스트렙토마이신과 아스코르브산이 함유된 DMEM: F12+N2+B27 배지를 일주일에 4회 공급하였다. 시험관 내에서 24시간, 72시간 또는 1주 또는 2주 후, WB 또는 ICC를 위해 세포 용해물을 각각 수확하거나 고정하였다. 조사된 모든 조건에 대해 조건당 3개의 반복과 최소 3개의 독립적인 실험을 수행하였다.

[0228] 표면 이동 감지(SUnSET)

[0229] 다양한 IKVAV PA 처리로 배양된 hNPC를 37° C에서 10분간 퓨로마이신(20 μM, Sigma-Aldrich)으로 펄스 처리하였다. 세포는 퓨로마이신 펄스 2시간 전에 이동 억제제 대조군으로 사이클로헥시미드(100 mg/mL, Calbiochem, Millipore)로 사전 처리되었다. 30 μg 단백질 추출물을 얻어 Mini-PROTEAN TGX Stain-Free 겔(4-20% 구배, BIO-RAD)에 로드하였다. 총 단백질 신호는 ChemiDocTM XRS+(Bio-Rad)로 검출하고 새로 합성된 단백질은 항-퓨로마이신 항체(마우스 항-퓨로마이신 1:5000, Millipore)로 웨스턴 블롯하여 검출하였다.

[0230] 세포 생존력 분석

[0231] HUVEC 및 hNPC를 시험관 내에서 2일-2주 동안 서로 다른 공동-조립 PA 시스템에서 처리하거나 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 HBSS 1x(Gibco)로 한 번 행겼다. Calcein-AM/ethidium homodimer-1 생/사 분석법(Invitrogen)을 사용하여 세포 생존력을 평가하였다. Calcein-AM/ethidium homodimer-1 용액을 HBSS에 넣고 실온(RT)에서 20분 동안 각 웰에 첨가하였다. 용액을 제거하고 이미징을 위해 커버슬립을 장착하기 전에 샘플을 HBSS(Gibco)로 3번 행겼다.

[0232] EdU 분석

[0233] hNPC 증식 분석을 위해, 티미딘 유사체 5-에티닐-2'-데옥시우리딘(EdU, Thermo Fisher) 2 μM을 24시간 동안 배양액에 혼입하였다. 세포를 지정된 시점에 4% 파라포름알데히드(PFA)에서 15분 동안 RT에서 고정하였다. 고정 후 샘플을 PBS로 두 번 세척한 다음 11mM CuSO4(50mM 스톱)와 1 μg/mL의 Alexa Fluor-555 아지드(0.5mg/mL, Thermo Fisher)가 함유된 Click-iT™ EdU 세포 증식 키트로 어두운 곳에서 30분 동안 RT에서 염색하였다. 그런 다음 염색 각테일을 제거하고 세포를 PBS로 세척하였다. 그런 다음, 아래에 설명된 면역 형광 프로토콜에 따라 항-토끼 SOX-2 항체와 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI, Thermo Fisher)을 5 μg/mL의 PBS에 넣고 RT에서 20분간 염색하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 세척하고 이미징을 위해 Immu-Mount(Fisher Scientific)에 장착하였다.

[0234] **4. 생체내 연구**

[0235] 모든 동물 사육 및 절차는 실험동물의 인도적 관리 및 사용에 관한 공중보건 서비스 정책(Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals)에 따라 수행되었다. 모든 절차는 노스웨스턴 대학교 기관 동물 관리 및 사용 위원회의 승인을 받았습니다.

[0236] 수술 절차

[0237] 모든 실험은 노스웨스턴 대학교의 심슨 퀘러리 연구소(Simpson Querrey Institute)에서 수행되었다. 182마리의 CD1 마우스(Charles River)가 이 연구의 대상체이다 (N=38 대조군, N=38 IKVAV PA2 단독, N=38 IKVAV PA2+FGF2 PA1, N=38 IKVAV PA2+FGF2 PA2, N=12 IKVAV PA1, N=12 백본 PA, N=6 IKVAV PA4). 연구에 사용된 동물의 연령은 10-16주 범위였다. 8개의 독립적인 생체 내 실험(손상 + PA 주입)이 수행되었으며, 8개의 실험 각각에는 최소한 4가지 주요 처리 그룹이 주입된 정확히 동일한 연령의 동물이 사용되었다: 대조군, IKVAV PA2 단독, IKVAV PA2+FGF2 PA1, 및 IKVAV PA2+FGF2 PA2. 동물은 산소가 포함된 2.5% 이소플루란 가스를 사용하여 마취되었다. T10-T11 척추 수준에서 척수를 노출시키기 위해 척추후궁절제술(laminectomy)을 시행하였다. 85kdyn의 충격력과 60초의 체류 시간을 가진 Infinite Horizon 척추 충격기 시스템(IH-0400 Precision Systems and Instrumentation)을 사용하여 심각한 타박상을 입혔다. 병변 후 9mm 상처 클립(BD Biosciences)을 사용하여 피부를 봉합하고 체온을 유지하기 위해 가열 패드 위에 동물을 회복시켰다. 실험 전체 12주 동안 매일 방광을 수동으로 배액하였다.

[0238] 동물 포함 및 제외 기준

[0239] 모든 마우스는 병변 발생 24시간 후 오픈필드 환경에서 평가되었으며, 뒷다리의 움직임이 있는 동물(BMS 점수에서 0점 이상)은 연구에서 제외되었다. 이 포함 기준을 통과한 마우스는 PA 주입을 위한 실험 그룹으로 무작위 배정되었으며, 이후 실험 조건에 대한 맹검 평가를 받았다.

- [0240] 주입 절차
- [0241] 다른 곳(19)에서 설명한 대로 표면 장력을 줄이기 위해 Sigmacote (Sigma-Aldrich)로 코팅된 유리 모세관 마이크로피펫(Sutter Instruments, Novato, CA)을 사용하여 SCI 24시간 후 PA(평균 NaCl 0.9% 용액에 1 wt %로 용해)를 주입하였다(외경, 100 μ m). 모세관은 Micro4 마이크로 주사기 펌프 컨트롤러(World Precision Instruments)로 제어되는 암형(female) Luer adaptor (World Precision Instruments)를 사용하여 해밀턴 주사기(Hamilton syringe)에 로드되었다. 이소플루란 마취 하에, 오토클립을 제거하고 손상 부위를 노출시켰다. 손상 후 24시간이 지났을 때 척추의 후궁절제술은 여전히 온전했고 병변으로 인해 생긴멍이 보였다. 정위 코프 장치(stereotaxic Kopf apparatus)를 사용하여 마이크로피펫을 병변의 등쪽에 위치시켰다. 마이크로피펫을 척추의 등쪽 표면에서 측정된 750 μ m 깊이까지 내리고 희석된 양친매성 용액 4-6 μ L를 1 μ L/분으로 주입하였다. 마이크로피펫을 250 μ m 간격으로 빼내어 척수 내에 PA의 흔적(배쪽에서 등쪽)을 남겼다. 주입이 끝나면 피펫을 2-3분 더 방치하여 물질이 겔화되도록 한 후 빼내고 9mm 상처 클립으로 상처를 봉합하였다.
- [0242] 뒷다리 운동 평가
- [0243] 운동 기능은 바소 마우스 척도(Basso Mouse Scale, BMS)의 운동성 오픈필드 평가 척도를 사용하여 평가하였다. 숙련된 두 명의 시험관으로 구성된 팀이 각 동물을 5-10분 동안 평가하고 각 뒷다리에 정해진 점수를 부여하였다. 발자국 분석을 위해, 쥐의 뒷다리를 유색 염료에 담갔다. 좁은 활주로(길이 80cm, 너비 4cm)에 흰 종이를 깔고 동물이 걸어가도록 하였다. 보폭은 뒷발로 한 걸음의 시작부터 끝까지의 거리로 정의하였다. 보간은 왼쪽 가장 바깥쪽 발가락에서 오른쪽 가장 바깥쪽 발가락까지의 거리로 정의하였다. 모든 측정은 각 측면에서 연속 세 걸음씩 측정하여 평균을 냈다.
- [0244] 전조 BDA 피질척수 추적(Anterograde BDA corticospinal tracing)
- [0245] 관류 14일 전에 조건당 6마리의 동물을 사용하여 피질척수를 추적하였다. 동물은 산소 중 2.5% 이소플루란 가스를 사용하여 마취하였다. 각 마우스의 머리는 정위 프레임(Stoelting Co.)을 사용하여 안정화하였다. 수술용 메스 칼날을 사용하여 두개골 중앙선을 따라 피부를 8mm 절개하였다. 10% 비오틴닐화 텍스트란 아민(BDA, 분자량 = 10,000, Thermo Fisher Scientific) 0.25 μ L를 운동 피질에 걸쳐 각 반구에 주입하였다. 이하의 좌표가 사용되었다: 전정(bregma), 등-꼬리: $\pm$ 0.0, 0.5, 1.0mm; 측면: $\pm$ 1.0, 1.5mm; 깊이: 0.7mm. 단면은 스트렙타비딘-결합 이차 항체 555(Thermofisher)를 사용하여 BDA에 대해 처리되었다.
- [0246] BrdU 주입
- [0247] PA를 척수에 주입하고 24시간 후, 조건당 6마리의 동물을 사용하여 5-브로모-2'-데옥시우리딘(BrdU, Sigma-Aldrich)을 7일 동안 복강 내(체중 5mg/10g)로 주입하였다(1일 1회 펄스). PA 주입 12주 후 면역조직화학(쥐-항-BrdU, 1:1000, Abcam)을 통해 BrdU 혼입을 분석하였다.
- [0248] DiI 표지
- [0249] 깊은 마취 후 관류 직전에, 앞서 설명한 대로(21) 포도당 5 w/v%가 포함된 PBS 용액에 20 μ L/mL의 DiI(Sigma-Aldrich)를 조건당 6마리의 동물에 경심 주입하였다. 그 직후, 4% 파라포름알데히드(PFA, 0.4 M 인산염 완충액 중, pH 7.4)를 함유한 등장성 용액을 사용하여 동물을 경심 관류하였다.
- [0250] 동물 희생 및 조직 처리
- [0251] 모든 동물을 이산화탄소를 과다 투여하여 희생시키고 인산 완충 식염수(PBS)에 이어 4% 파라포름알데히드(PFA, Sigma-Aldrich)를 등장 용액(0.4 M 인산 완충액, pH 7.4)에 넣어 경심 관류시켰다. 척수를 4% PFA에서 4-6시간 동안 고정하고 30% 수크로스(Sigma-Aldrich)를 함유한 PBS에서 하룻밤 동안 고정하였다. 그런 다음 척수를 30% 수크로스(Sigma-Aldrich) 및 15% 젤라틴(Sigma-Aldrich)을 함유한 PBS에서 동결시키고, 라이카 CM1850 저온유지장치(Leica CM1850 cryostat)에서 40 μ m 두께로 절편화하였다.
- [0252] **5. 시험관 내 및 생체 내 생물학적 분석**
- [0253] 면역 형광
- [0254] 면역 형광을 위해, 고정된 1차 배양 또는 자유 부유 조직 단면(40 μ m 두께)을 0.02% Triton-X(Sigma-Aldrich), 1% NHS(Gibco) 및 PBS 1X(Gibco)를 함유하는 차단 버퍼에서 배양하였다. 샘플을 4° C에서 밤새 1차 항체와 함께 인큐베이션 하였다. Alexa-488, Alexa-555 및/또는 Alexa-647 (1:500, Thermofisher)을 2차 항체로 사용하였다. 핵 염색에는 DAPI(1:500, Thermofisher)를 사용하였다. 마지막으로, 이미징을 위해 Immu-

Mount(Fisher Scientific) 용액으로 커버슬립에 샘플을 장착하였다.

[0255] 웨스턴 블롯(WB)

[0256] 시험관 내 및 생체 내 샘플에서 단백질을 추출하기 위해 정지 프로테아제 및 포스파타제 억제제(Halt Protease and Phosphatase Inhibitors, Thermofisher) 각테일이 포함된 RIPA 버퍼(Thermofisher)를 사용하였다. 생체 내 연구의 경우, 척수 조직을 혼 소니케이터(Branson)를 사용하여 초음파 처리하여 조직을 분해하였다. 사용된 모든 샘플의 단백질 함량을 측정하기 위해 Pierce™ BCA 단백질 분석 키트(BCA Protein Assay Kit, Thermofisher)를 사용하였다. 세포 배양 또는 조직에서 얻은 단백질 추출물을 SDS-폴리아크릴아미드 젤을 사용하여 분리하였고 니트로셀룰로오스 멤브레인(Bio-Rad)으로 전기 전이시켰다. 멤브레인을 5% 밀크 용액(Bio-Rad)을 사용하여 30분-1시간 동안 차단하고 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션 하였다. 상응하는 이차 HRP-결합 항체(1:1000, ThermoFisher)를 실온에서 1시간 동안 사용하였다. 래디언스 바이오발광 ECL 기질(Radiance Bioluminescent ECL substrate, Azure Biosystems)을 사용하여 단백질 신호를 검출하였다. 멤브레인은 Azure Biosystems 이미저를 사용하여 이미징하고 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 밀도측정 분석을 수행하였다.

[0257] 면역 형광 및 웨스턴 블롯용 항체

[0258] 시험관 내 및/또는 생체 내 연구에 사용된 일차 항체는 다음과 같다: 토끼 항-GFAP (1:1000, Dako, Z0334), 토끼 항-라미닌 B1 (1:1000, Sigma-Aldrich), 토끼 항-액틴 (1:2000, Sigma-Aldrich, A2066), 마우스 항-GAPDH (1:2000, Cell Signaling, 97166), 염소 항-5HT (1:1000, Abcam, mab66047), 토끼 항-CD31 (1:100, BD Pharmingen, 550274) 마우스 항-뉴로필라멘트(Neurofilament) (NF, 1:2000, Millipore, MAB1592), 토끼 항-GAP43 (1:2000, Cell Signaling, 8945), 염소 항-Sox-2 (1:1000, Abcam, ab110145), 스트렙타비딘 Alexa Fluor™ 555 컨쥬게이트 (1:500, Thermofisher, S32355), 토끼 항-PH3 (1:1000, Cell Signaling, 9701), 쥐 항-BrdU (1:1000, Abcam, ab6326), 토끼-항-MBP (1:500, Abcam, ab40390), 마우스 항-NeuN (1:1000, Millipore, MAB377), 염소 항-ChAT (1:1000, Millipore, AB144P), 토끼 항-FGFR1 (1:500, Cell signalling,3472), p-FGFR1 (1:500, Cell signalling,3471), 마우스 항-ITGB1 (1:250, Millipore, clone HUTS-4, MAB2079Z), 토끼 항-p-ERK1/2 (1:1000, Abcam, ab196883), TUJ-1(1:2000, Biolegend, 802001 and 801213), 마우스 항-Pax-6 (1:500, Millipore, AD2.38), 토끼 항-Ki67 (1:500, Abcam, ab15580), 토끼 항-Nestin (1:1000 Millipore, ABD69) 토끼 항-ILK (1:500, Cell Signaling, 3862), 토끼 항-p-FAK (1:1000, Cell Signalling,3281S), 토끼 항-FAK (1:1000, Cell Signaling, 3285S).

[0259] 혈관 분석

[0260] 시험관 내 세뇨관 형성과 생체 내 혈관 형성을 평가하기 위해 1) 혈관의 면적 분율, 2) 혈관 길이, 및 3) 가지 수를 자동으로 계산하는 ImageJ(Fiji) 스크립트를 구축하였다. 이미지를 처리하고 이진화하여 분석하였다. 관심 영역 내에서 CD31/BrdU 이중-양성 세포의 양을 정량화하여 생체 내에서 새로 생성된 혈관을 식별하였다. 마우스 당 병변 내 8개 단면에서 DiI 염색을 사용하여 기능적 혈관을 식별하였다. 이 분석에는 그룹 처리당 6마리의 동물이 사용되었다. 정량화된 단면은 DiI 염색이 있는 병변 내의 첫 번째 연속 단면으로 선택되었다.

[0261] 신경돌기(Neurite) 추적

[0262] 이전에 설명한 대로(2I) Imaris® 소프트웨어 버전 9.3을 사용하여 BDA(Thermofisher, N7167)를 사용하여 표지하거나 5HT(Abcam)로 염색한 축삭을 정량화하였다. SCI 병변의 근위 경계(PB)에서 원위 경계(DB)까지 세로 척수 단면을 가로질러 일정한 거리에서 선을 긋고, 그 선을 가로지르는 축삭의 수를 실험 조건에 대해 맹검된 연구자가 세었다. BDA 또는 5HT 염색이 더 짙은 척수 중양을 통과하는 여러 단면을 마우스당 계산하여 위치당, 동물당 총 절편으로 표현하였다. 이 분석에는 그룹 처리당 6마리의 동물이 사용되었다.

[0263] 분해 연구 및 조직 제거

[0264] 병변 척수에 주입된 PA의 분해 연구는 Alexa-647(click) 형광 염료로 IKVAV 서열을 공유 결합하여 표지하는 방식으로 수행되었다. PA 주입 후 다양한 시점(2주, 4주, 6주, 및 12주)에 척수를 관류하고 추출하여 벤질 알코올-벤질 벤조에이트(BABB, Sigma-Aldrich)를 사용하여 척수를 제거하였다. 제거 후 척수 조직은 488nm에서 형광을 띄게 된다. 회전 디스크 공초점 현미경을 사용하여 전체 재구성을 수행한 후 Imaris 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 이 연구에는 그룹 처리 및 시점당 3개의 척수가 사용되었다.

[0265] 이미징

[0266] 형광 세포, 단면 또는 완전히 제거된 척수 샘플을 시각화하고 이미지화하기 위해 GaAsP 검출기가 장착된 Nikon

AIR 공초점 레이저 스캐닝 현미경, Nikon W1 듀얼 캠 회전 디스크 공초점 및 Nikon AIRMP+ 멀티포톤이 사용되었다. Nikon Ti2 와이드필드는 척수의 더 넓은 단면을 얻는 데 사용되었다.

[0267] 이미지 정량화 및 분석

[0268] 시험관 내 세포 정량화를 위해, 이미지 파일을 NIH Image J(1.51) 소프트웨어로 가져와 “입자 분석” 및 “세포 카운터” 기능을 사용하여 정해진 영역의 총 세포 수를 측정하였다. 자유-부유 면역 염색을 사용하여 연속적인 조직 섹션을 NeuN 및 ChAT로 염색한 후 Nikon Elements 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다. 병변의 등쪽 및 꼬리쪽 경계는 네 개의 회백질 뿔 모두에서 NeuN 염색이 있는 첫 번째 단면으로 선택되었다. 동물당 병변 내 8개의 단면을 선택하여 단면당 뉴런의 수로 표현하였다. 자동화된 다채널 이미지 획득, 이미지 스티칭, z-스택 재구성(두께 36-40mm)을 Nikon GasP R1 공초점 현미경으로 수행하여 모든 조건에서 선택한 전체 단면을 NeuN 및 Chat 마커에 대해 이미지화하였다.

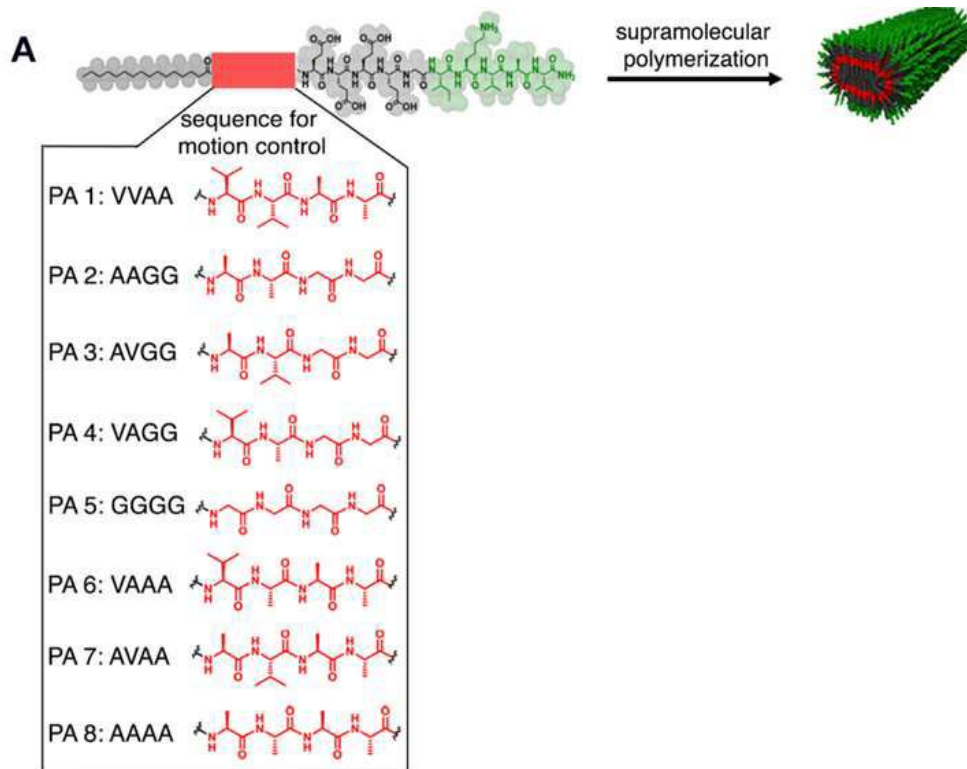
[0269] GFAP를 위해 염색된 조직 단면의 형광 강도는 NIH Fiji 소프트웨어를 사용하여 분석하였다. 이 분석에는 위에서 언급한 다양한 현미경에서 일정한 노출 설정으로 스캔한 이미지가 사용되었다. 단일 채널 면역 형광 이미지는 각 이미지에서 선택한 영역을 따라 형광 양성 픽셀 수를 분석하는 데 사용되었다. ImageJ 소프트웨어의 "플롯 프로파일" 기능을 사용하여, 그려진 선을 따라 위치를 기준으로 평균 픽셀 값을 얻었다. GFAP 대 거리를 플롯하기 위해, 마우스당 척수 중앙을 통과하는 5개의 단면을 세었다. 이미지 정량화에는 그룹 처리당 6마리의 마우스를 사용하였다.

[0270] 통계 분석

[0271] 데이터는 GraphPad Prism 소프트웨어(버전 9.12)를 사용하여 분석하였다. 각 통계 분석에서 정규 분포를 빠르게 식별하기 위해 Q-Q 플롯 또는 빈도 분포도(히스토그램)를 사용하였다. 또한 샤피로 윌크(Shapiro Wilk) 테스트와 디아고스티노-피어슨(D' Agostino-Pearson) 옴니버스 정규성 테스트를 사용하여 샘플 데이터가 가우스 분포에 맞는지 테스트하였다. 한 쌍의 실험 그룹 간의 비교는 쌍을 이루지 않은 스튜던트 t-테스트를 사용하여 수행하였다. 세 개 이상의 그룹 간의 비교는 본페로니에 따라 사후 독립 쌍 분석(post hoc independent pair-wise analysis)과 함께 단방향 분산 분석(one-way ANOVA)을 사용하여 수행하였다. 마우스 BMS 행동 점수는 본페로니를 사용한 양방향 반복 측정 ANOVA를 통해 PA 처리 그룹과 식염수 처리 그룹 간 또는 PA 그룹 간 비교하였다. 정의 및 실험 횟수를 포함한 통계적 테스트 및 매개변수는 해당 도면 범례에 보고되어 있다. 시험관 내 데이터는 막대 그래프로 표시하였다. 오차 막대는 실험당 30개의 이미지와 조건당 3개의 독립적인 실험을 나타낸다. 생체 내 데이터는 각 데이터 포인트가 하나의 생체 내 동물 또는 조직 단면에 대한 값을 나타내는 점 플롯을 사용하여 표현되었다(모든 염색 실험에서 유사한 결과를 얻은 6개의 다른 동물 조직에 대해 독립적으로 ICC를 반복함. 그룹당 동물 한 마리당 36-40mm 두께의 이미지 8장을 촬영함.) 모든 데이터는 달리 명시되지 않는 한 평균 $\pm$ 평균의 표준 오차(SEM)로 표시되었다.

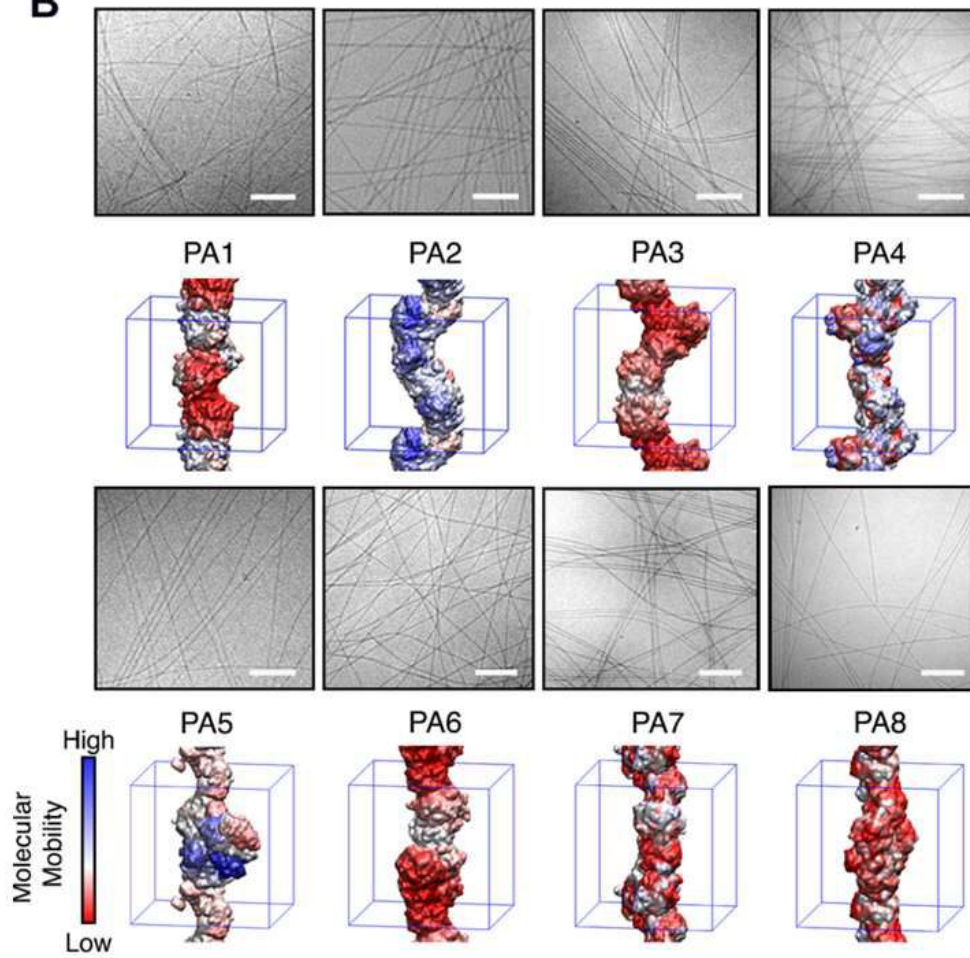
도면

도면1a



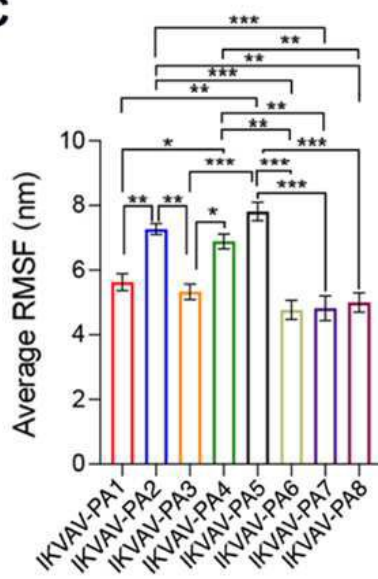
도면1b

B

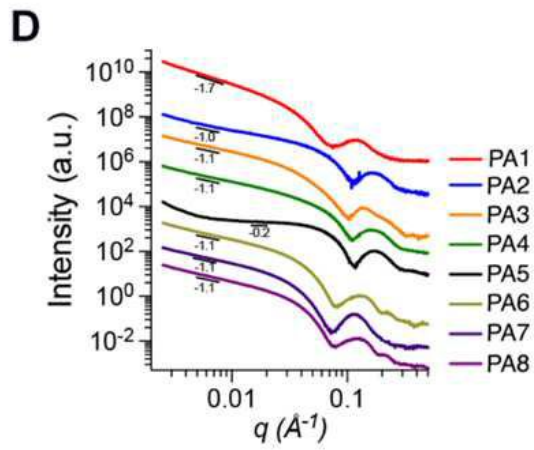


도면1c

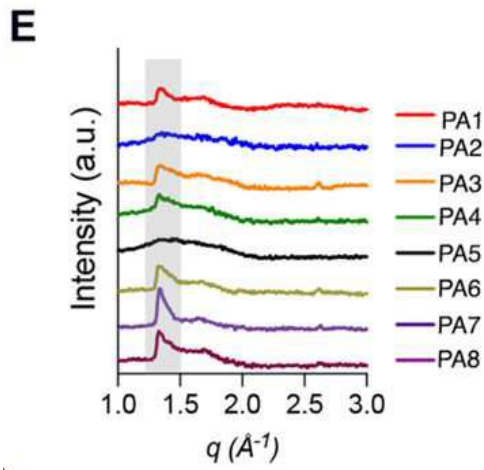
C



도면1d

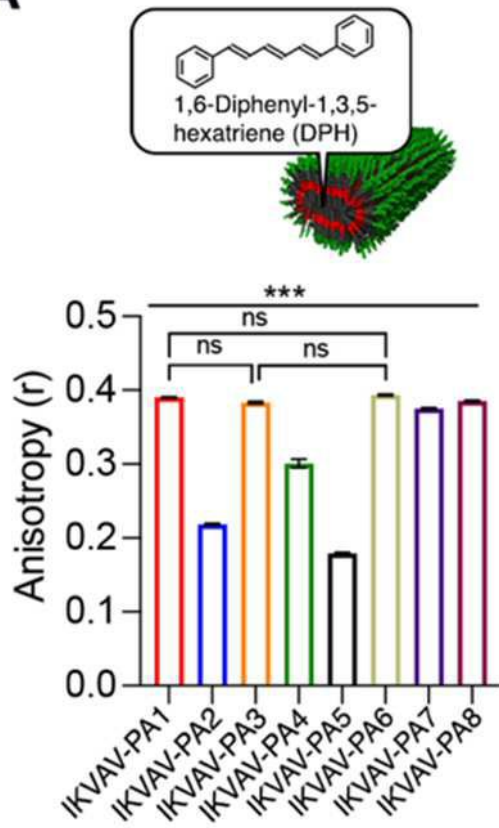


도면1e

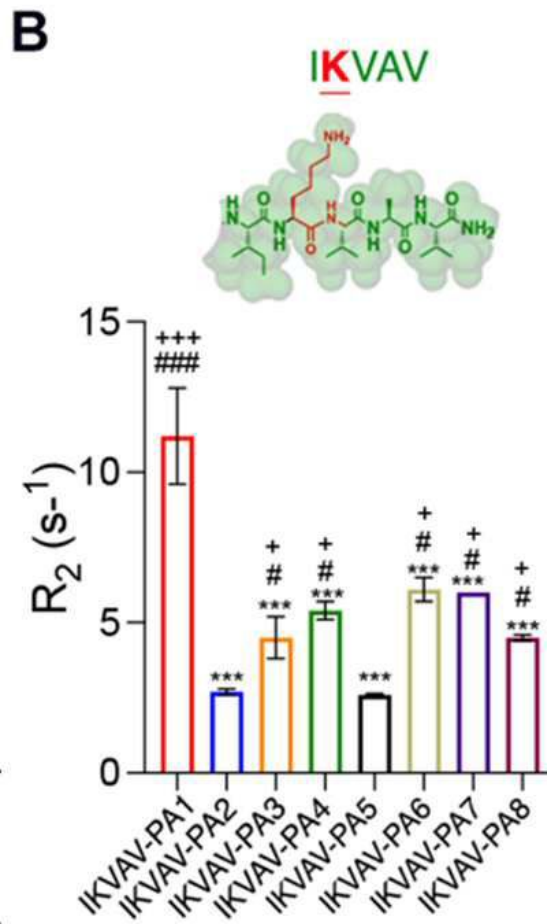


도면2a

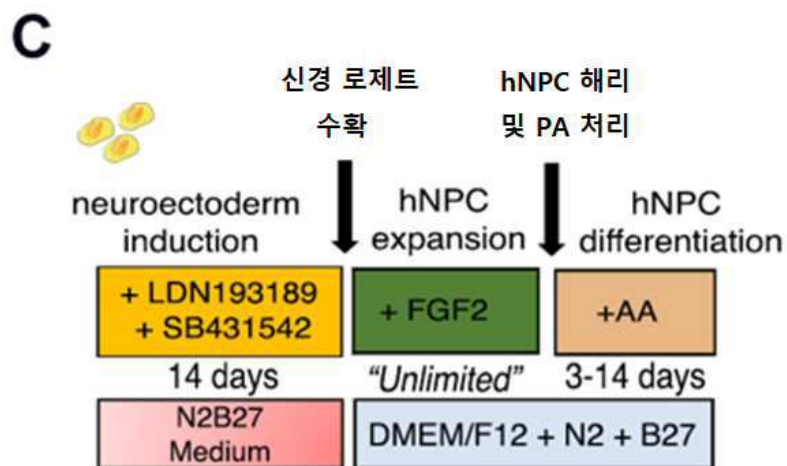
A



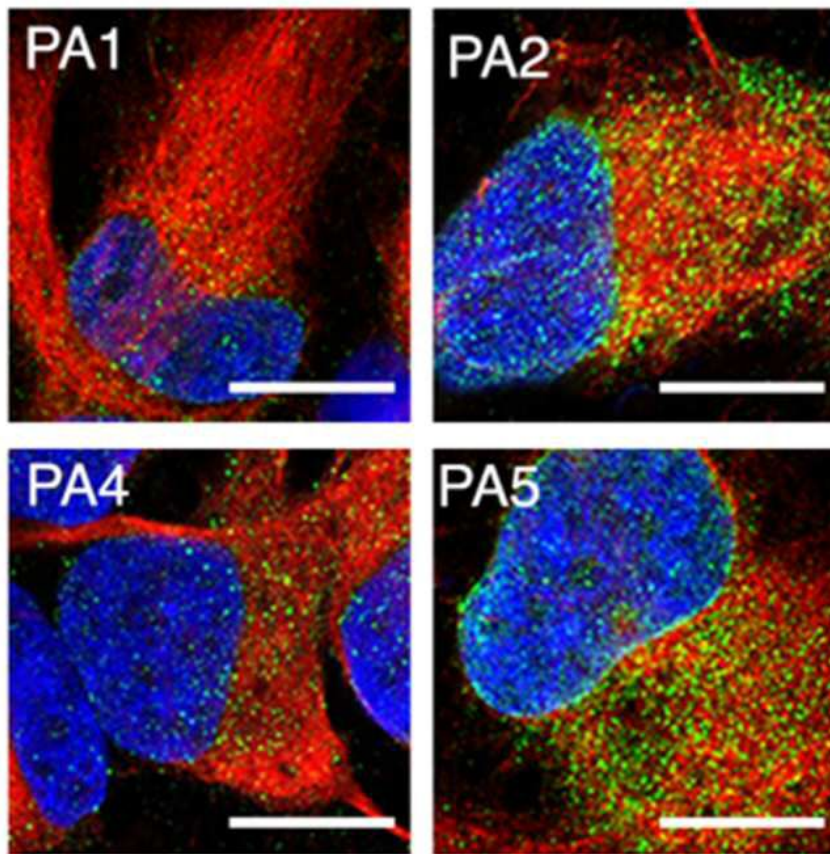
도면2b



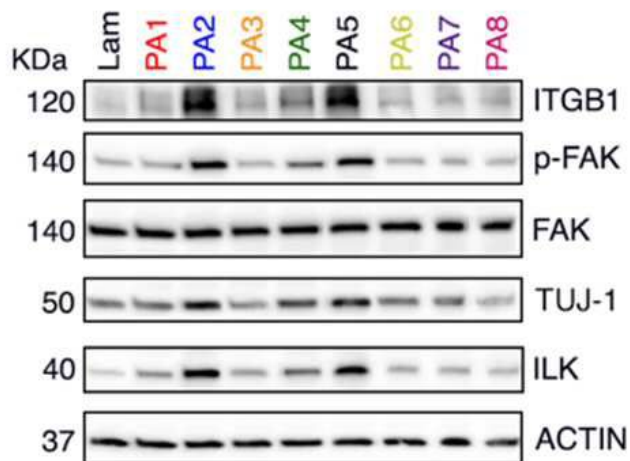
도면2c



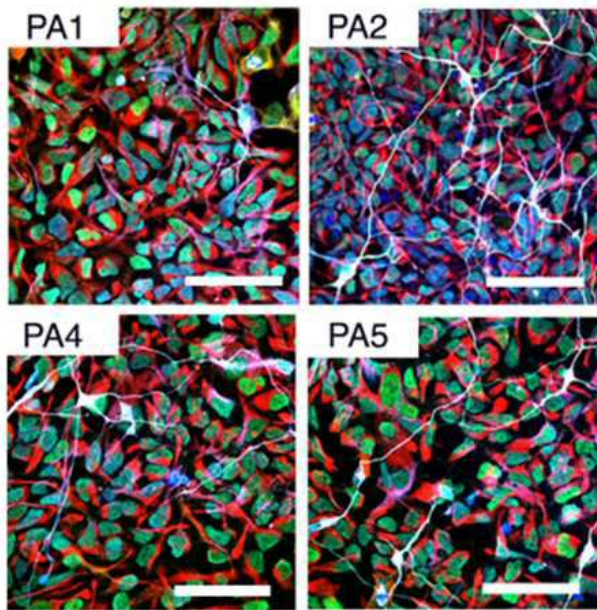
도면2d



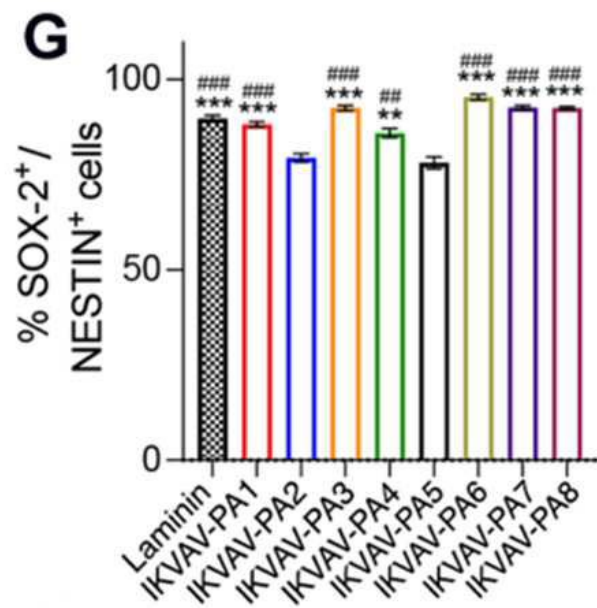
도면2e



도면2f



도면2g



도면2h

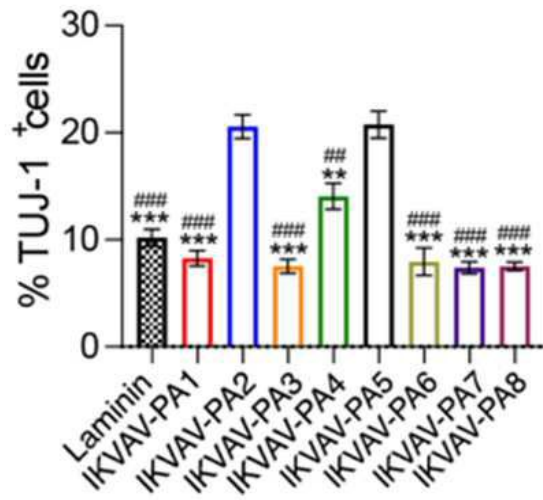
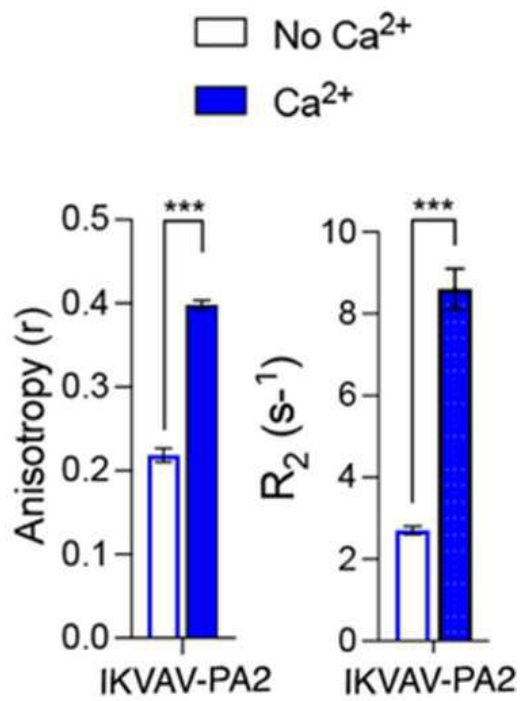
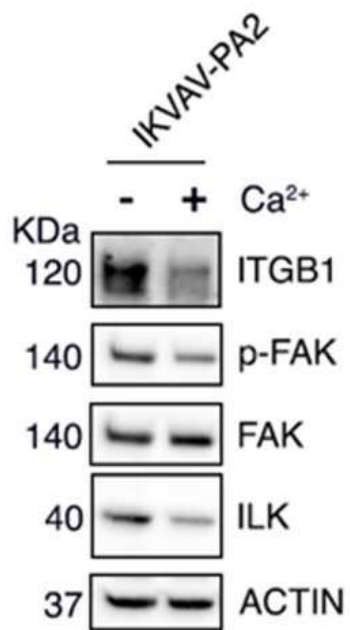


FIG. 2G-2H

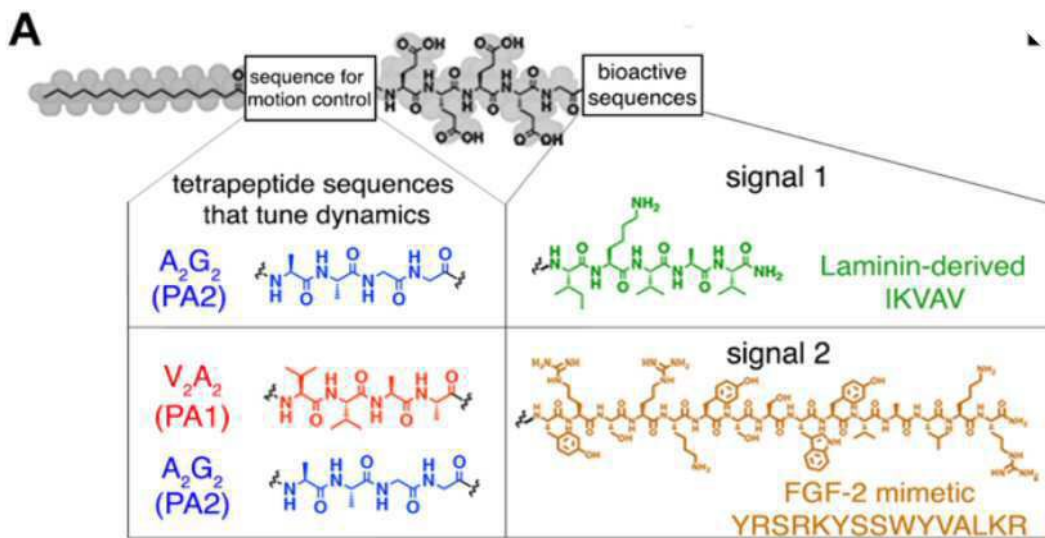
도면2i



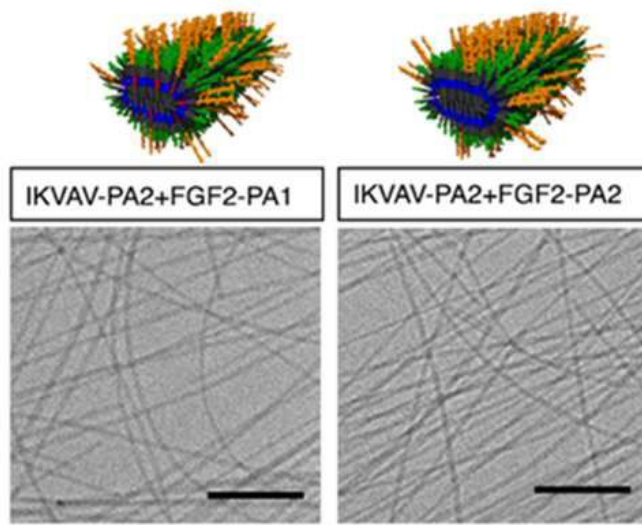
도면2j



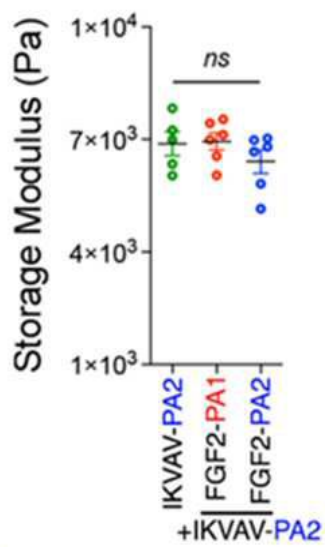
도면3a



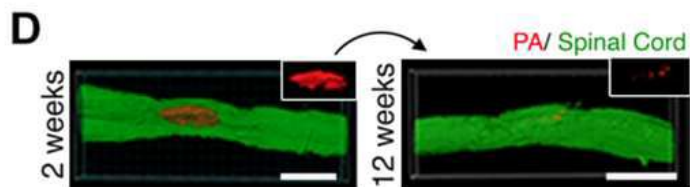
도면3b



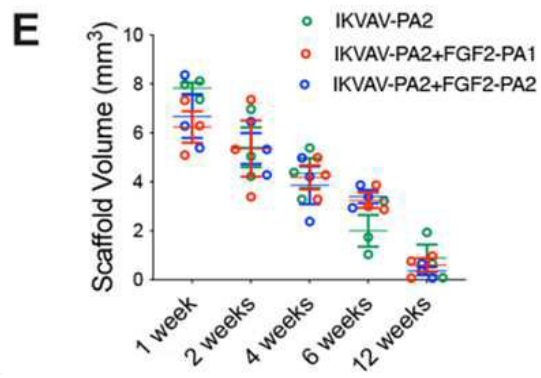
도면3c



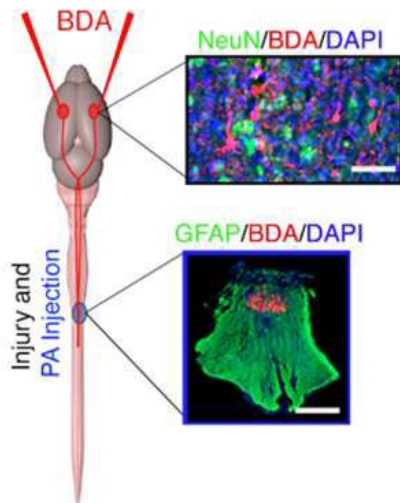
도면3d



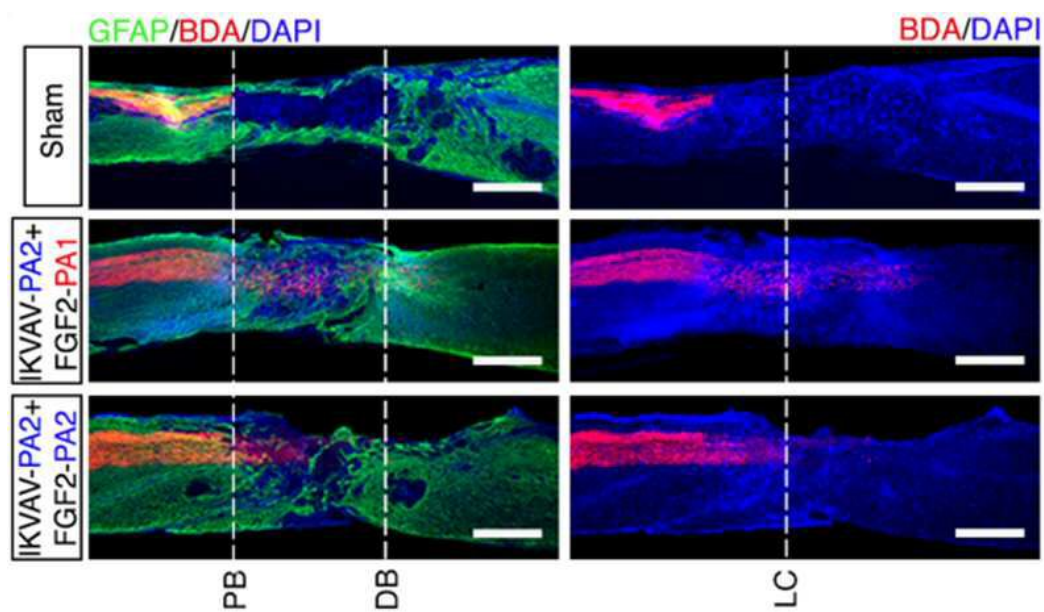
도면3e



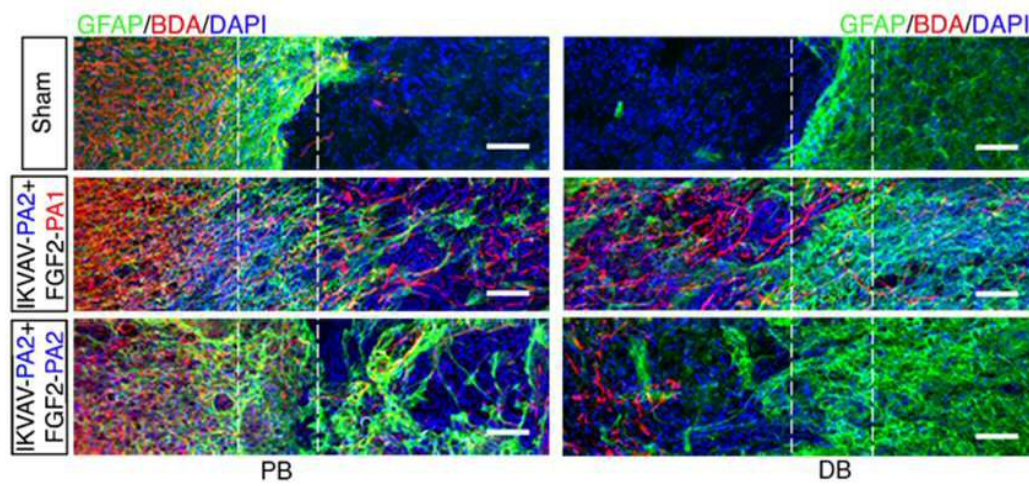
도면3f



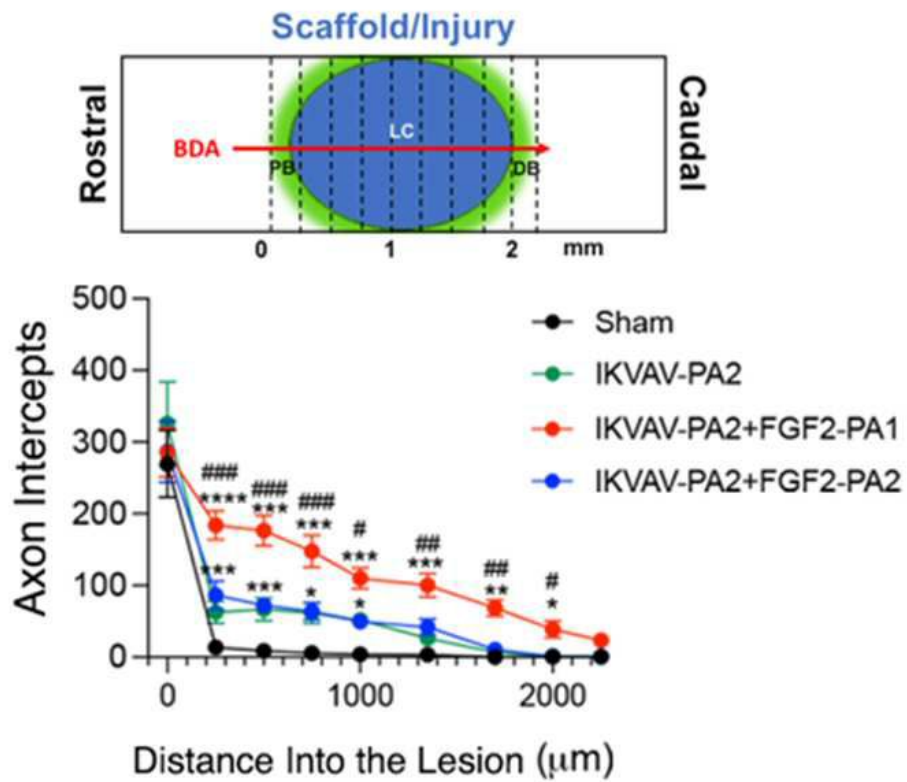
도면3g



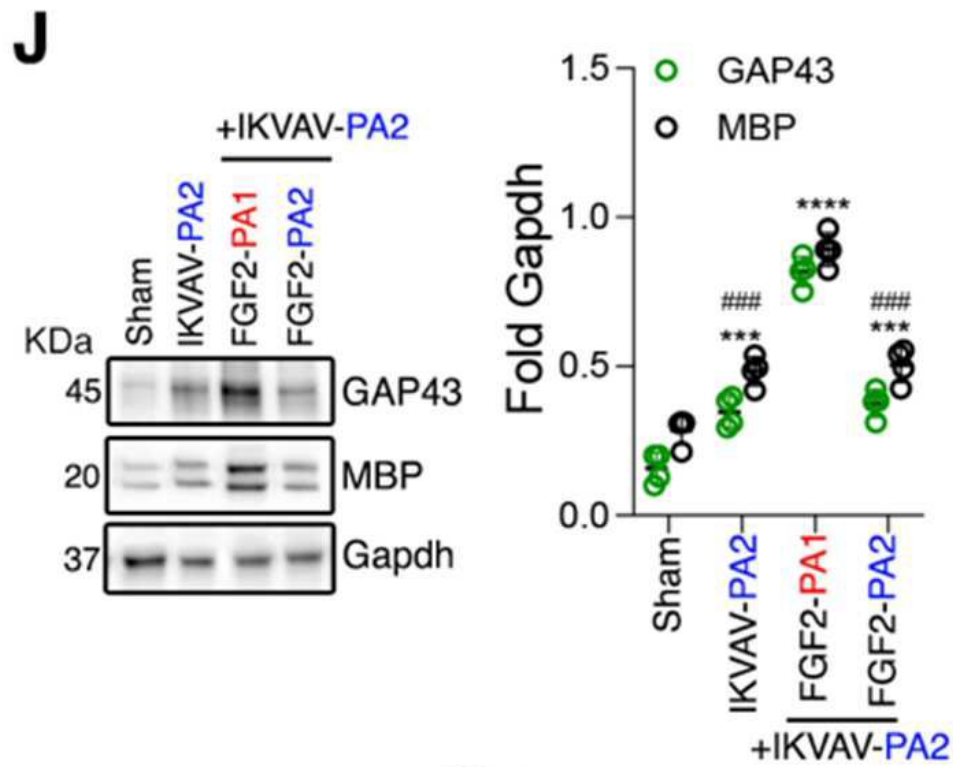
도면3h



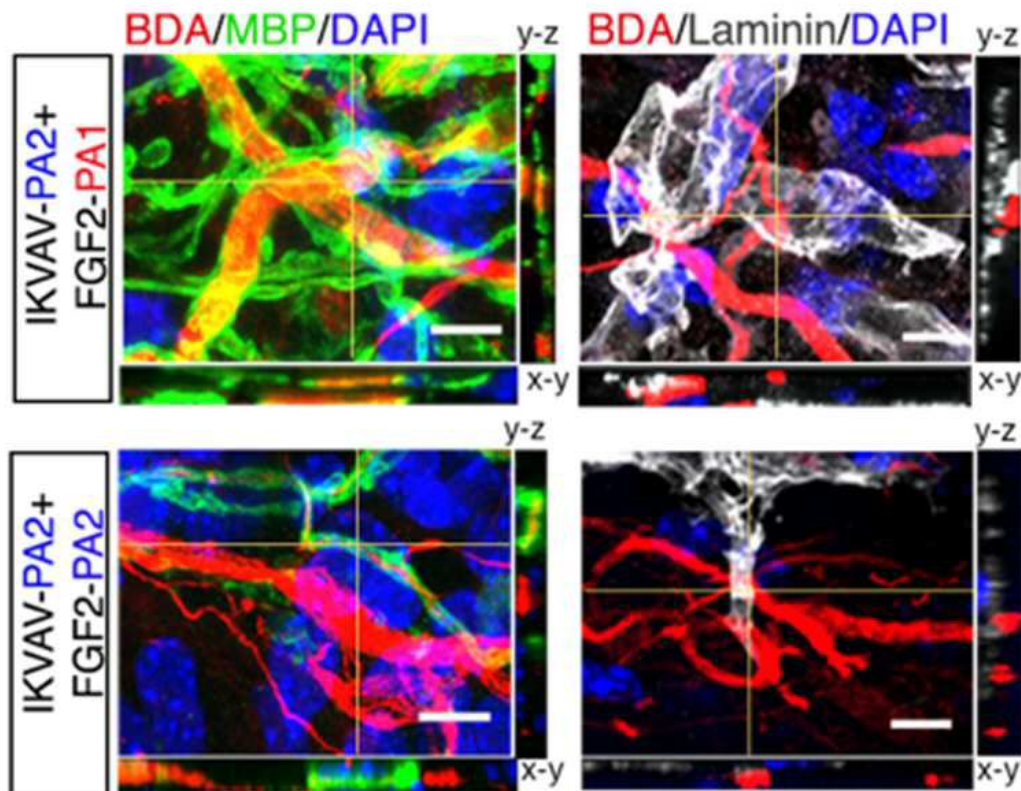
도면3i



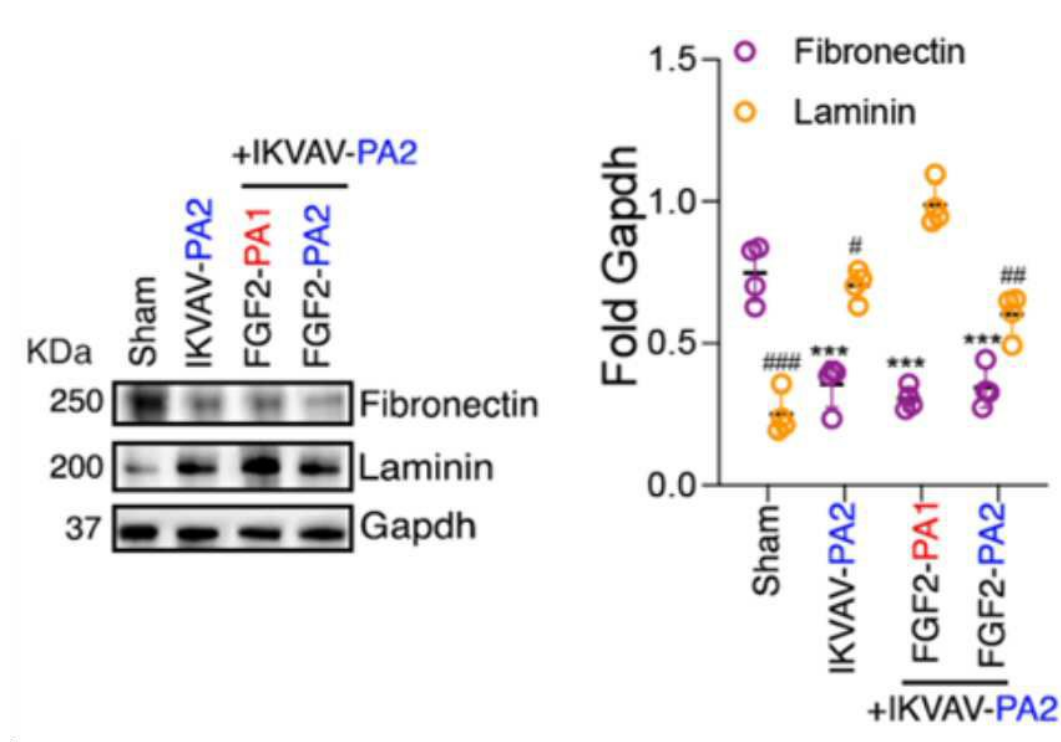
도면3j



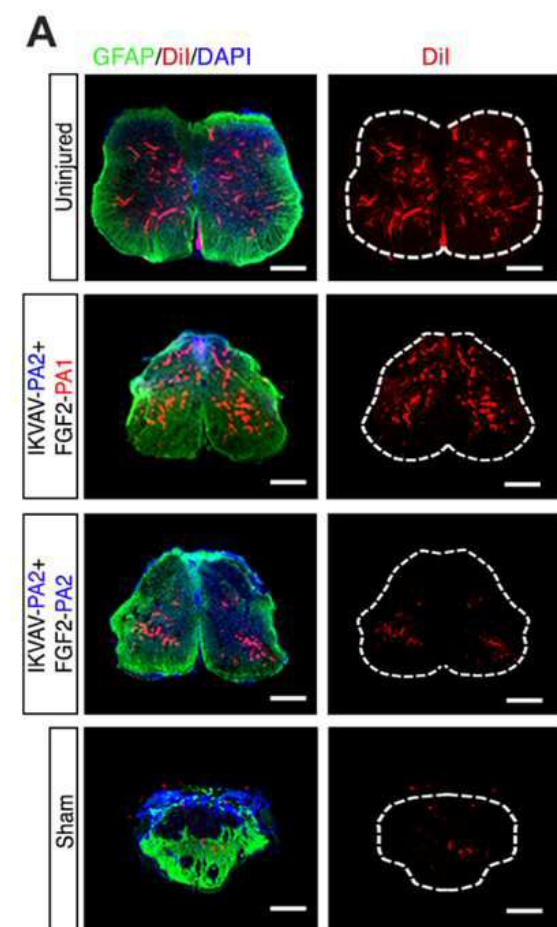
도면3k



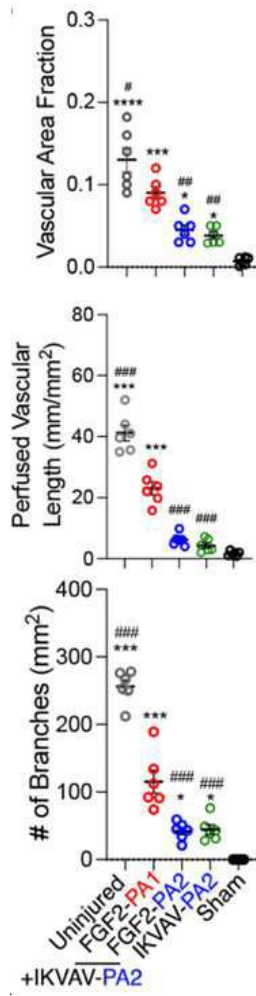
도면31



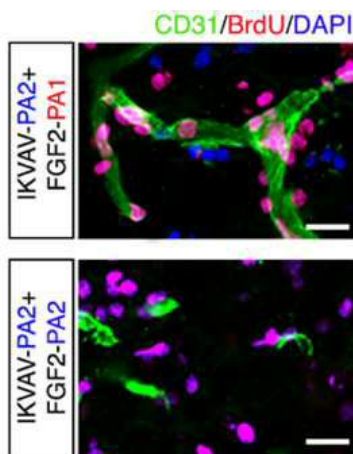
도면4a



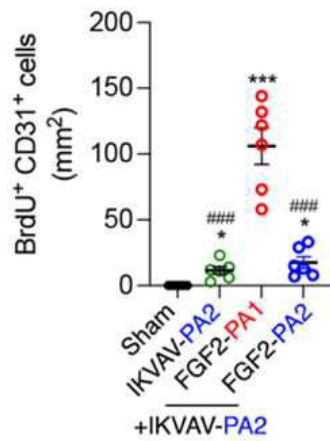
도면4b



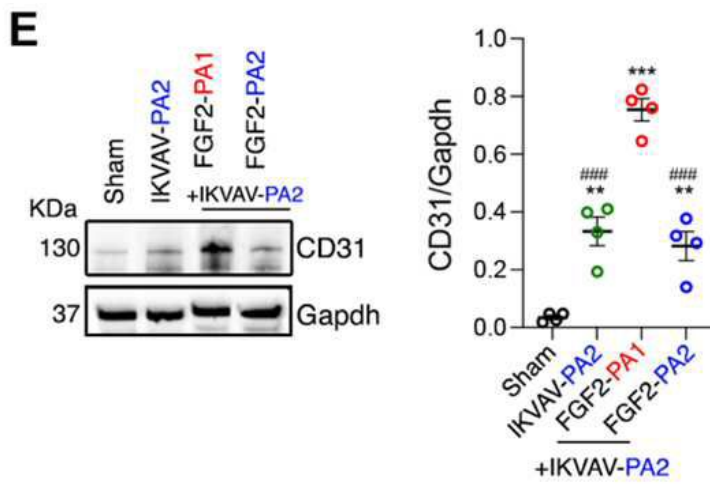
도면4c



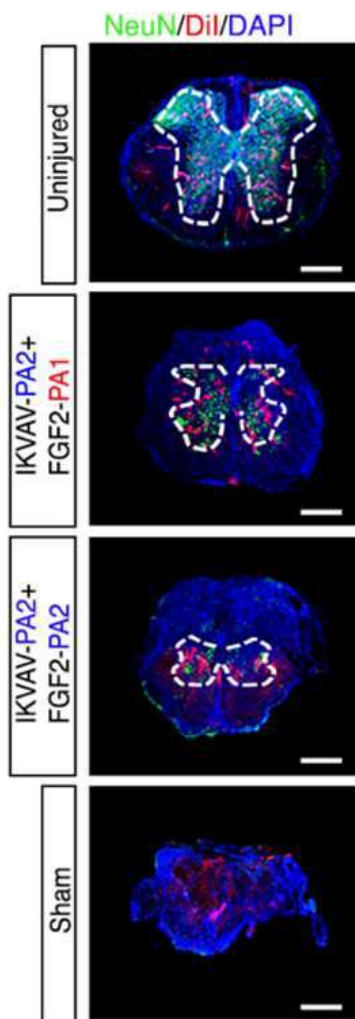
도면4d



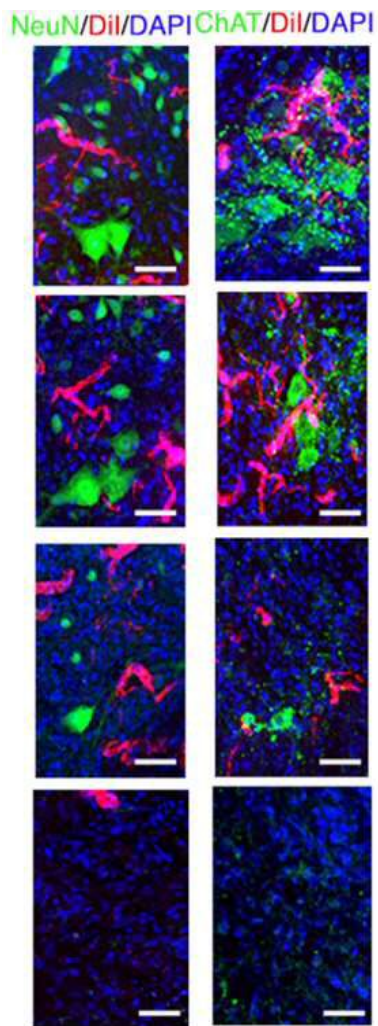
도면4e



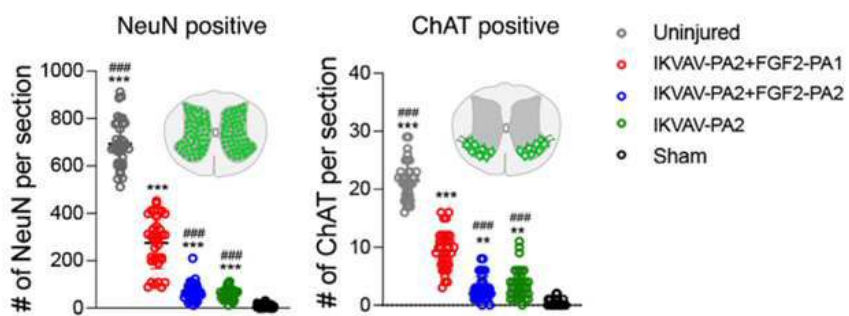
도면5a



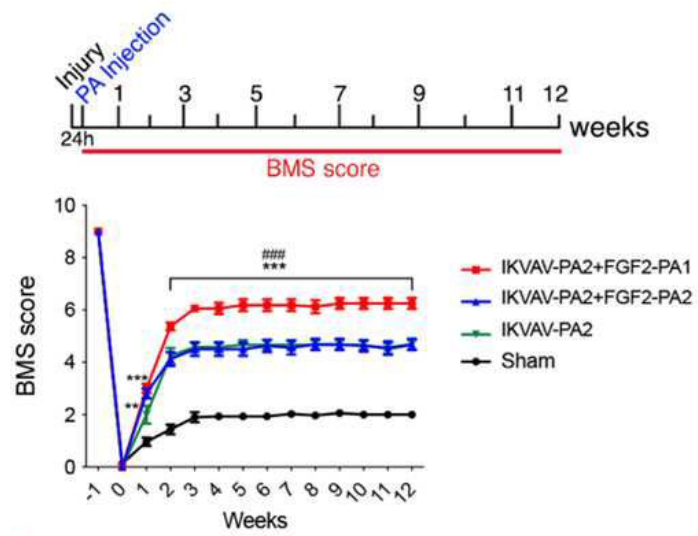
도면5b



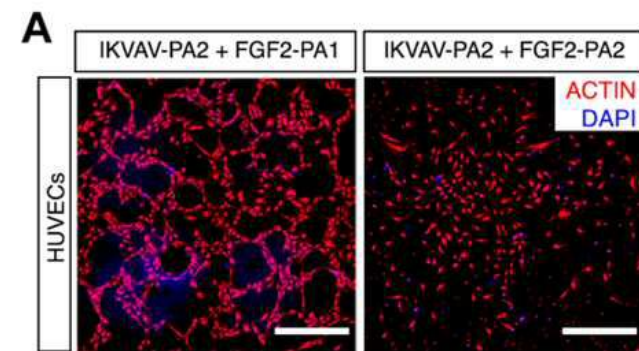
도면5c



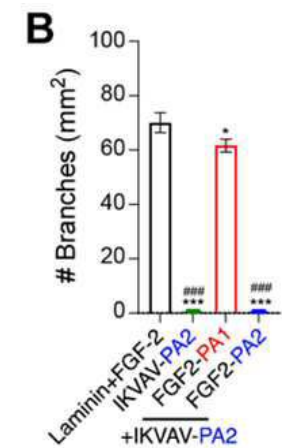
도면5d



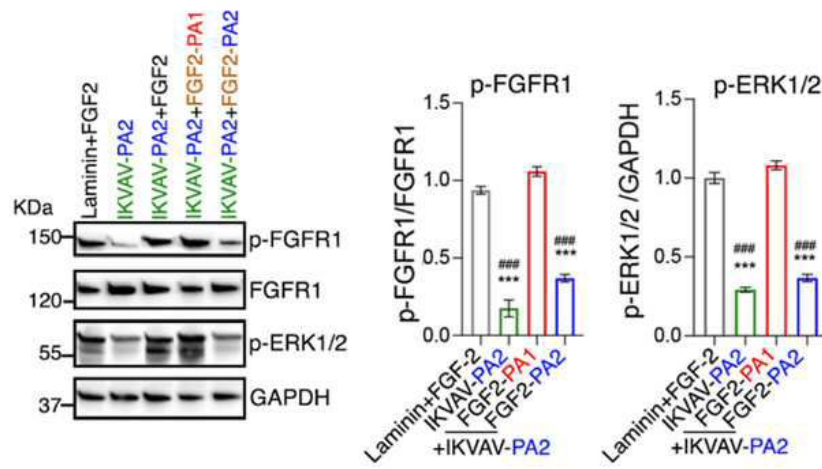
도면6a



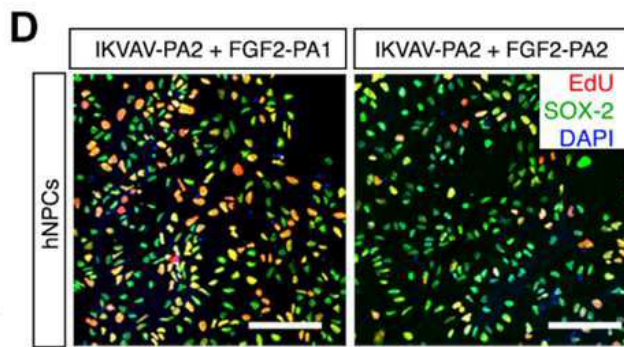
도면6b



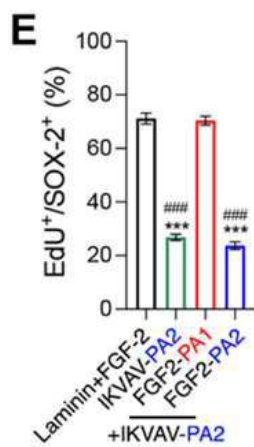
도면6c



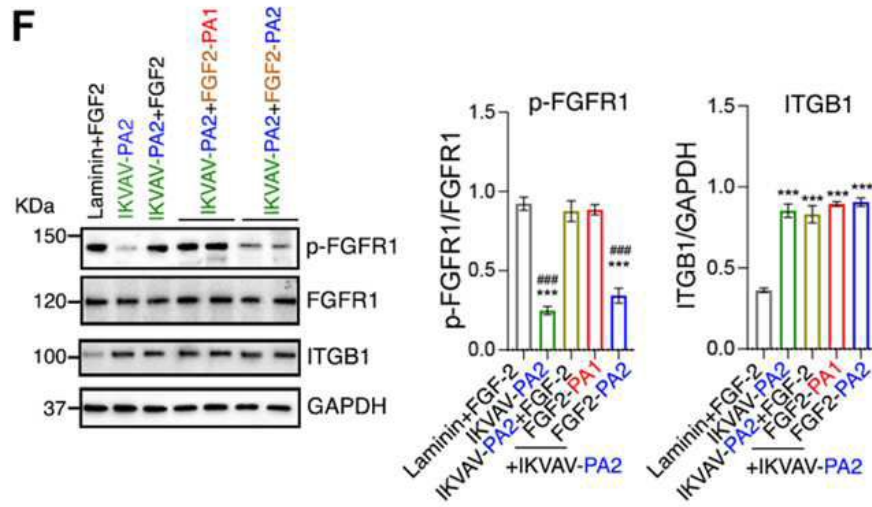
도면6d



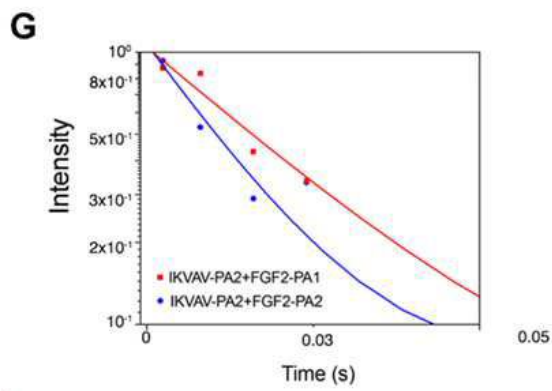
도면6e



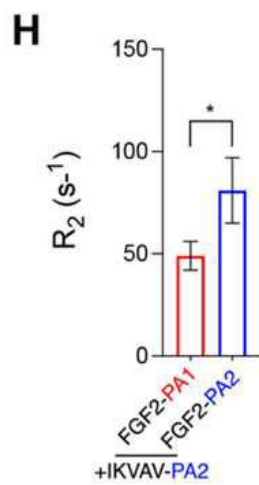
도면6f



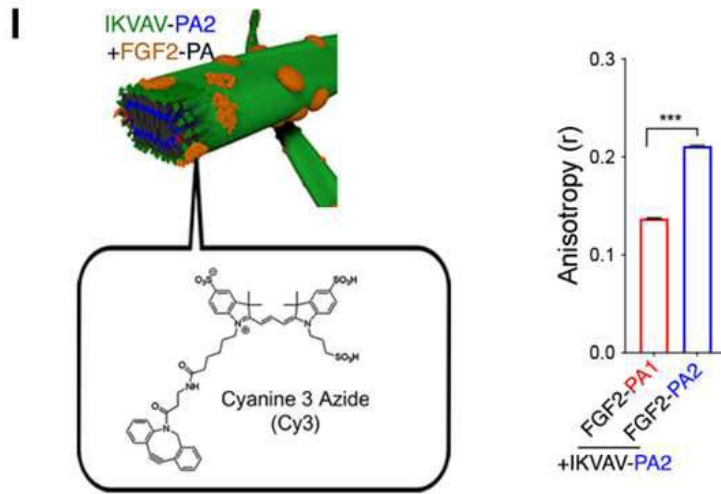
도면6g



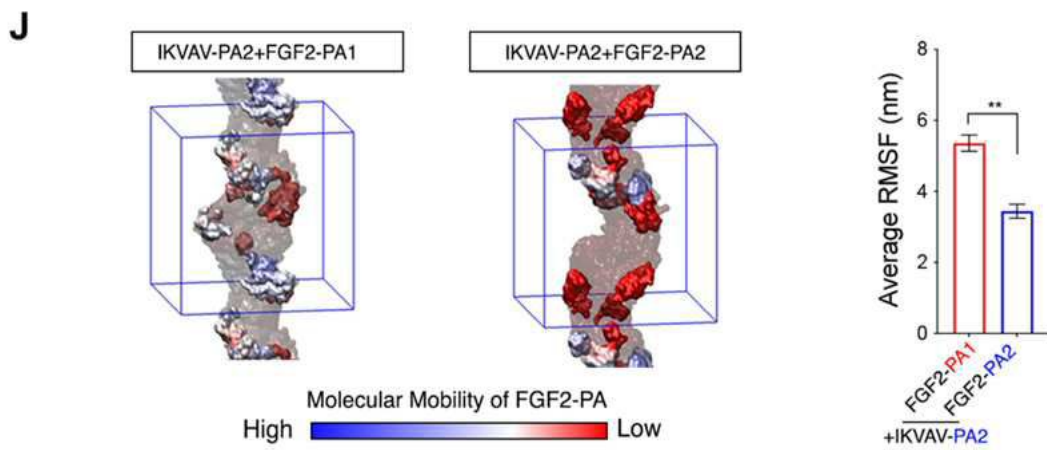
도면6h



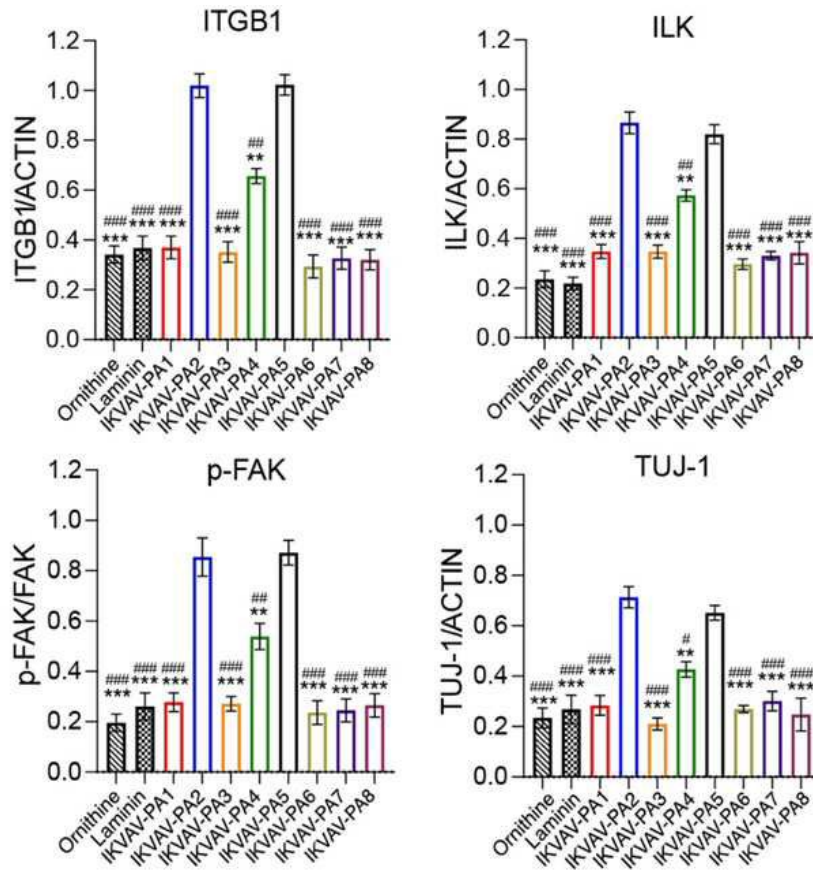
도면6i



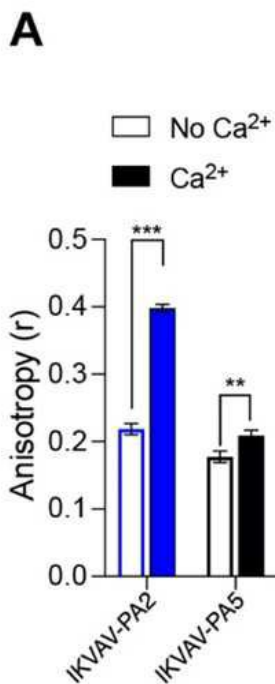
도면6j



도면9

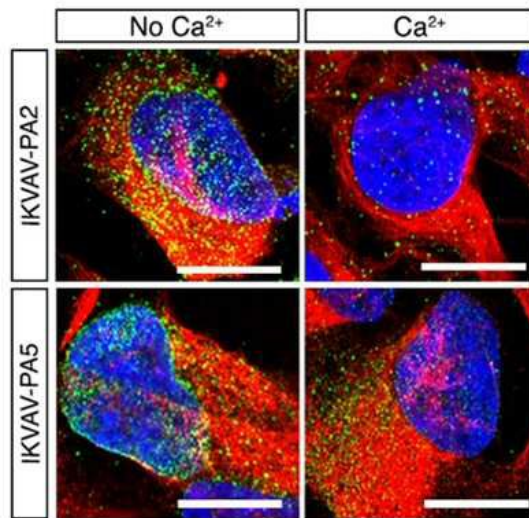


도면10a

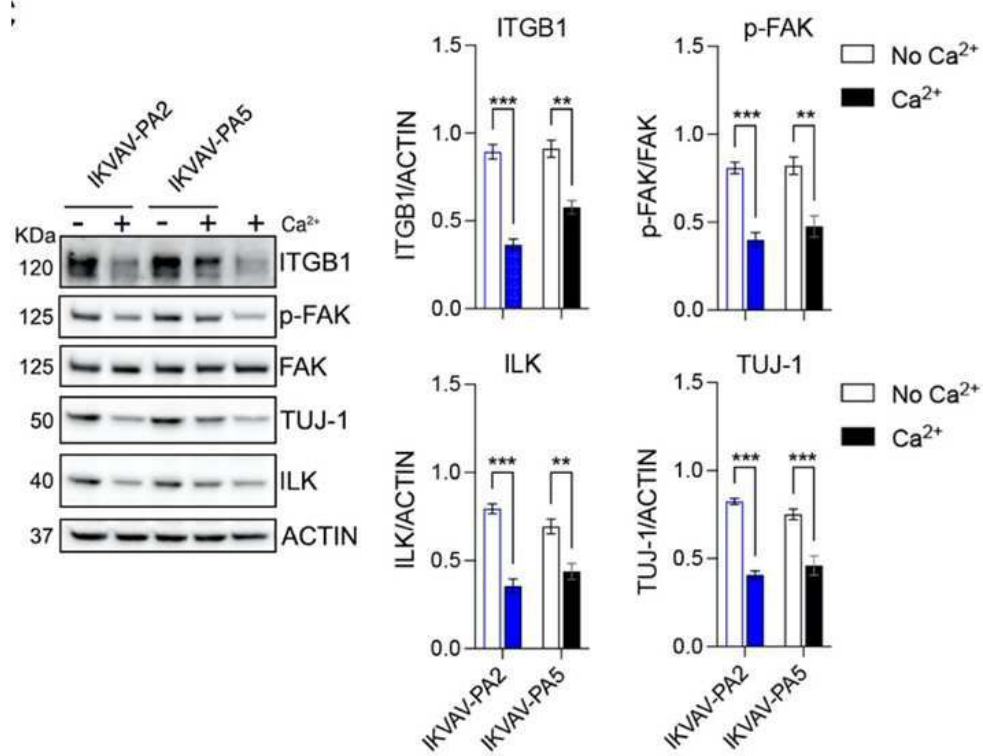


도면10b

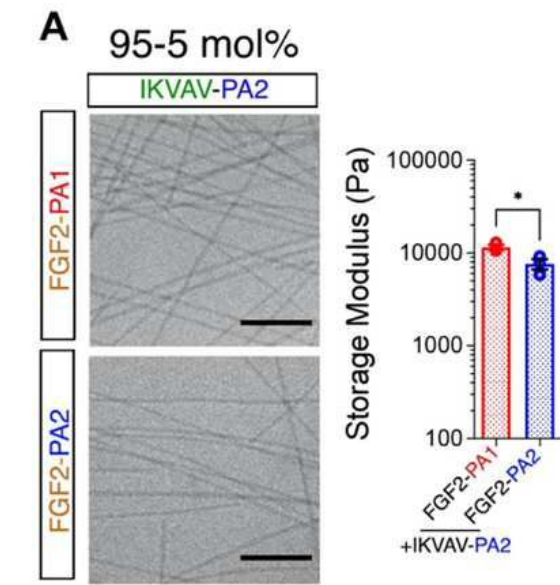
B



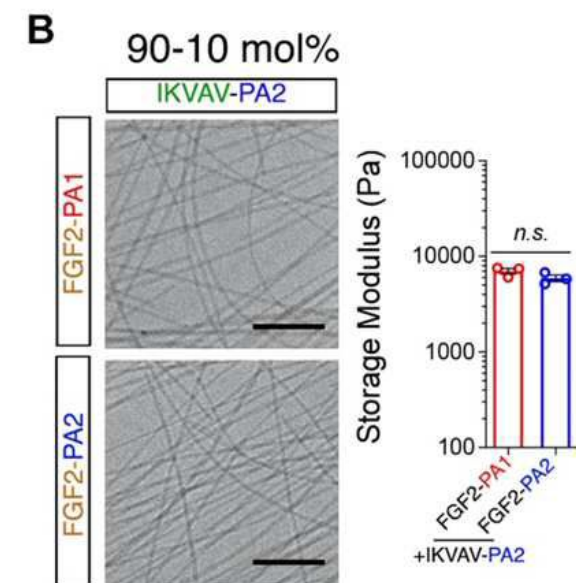
도면10c



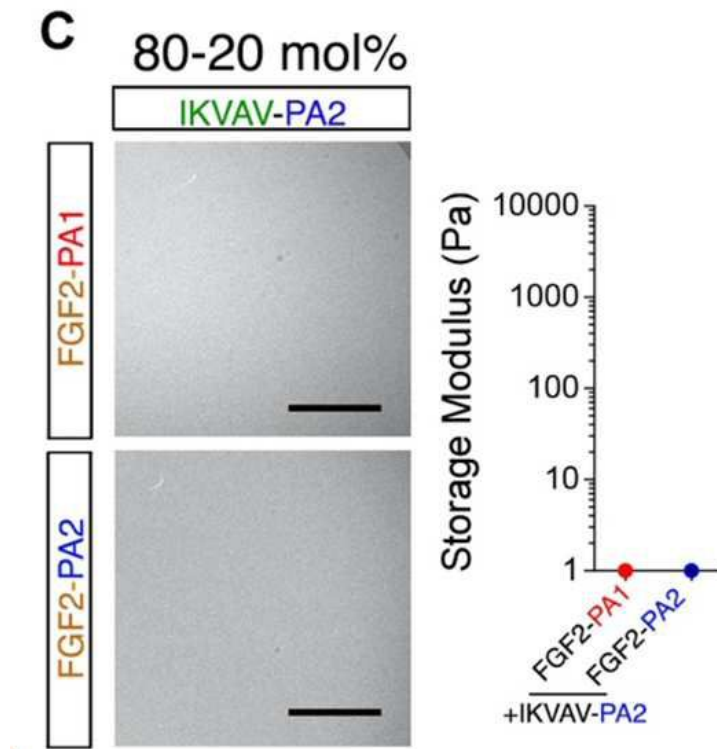
도면11a



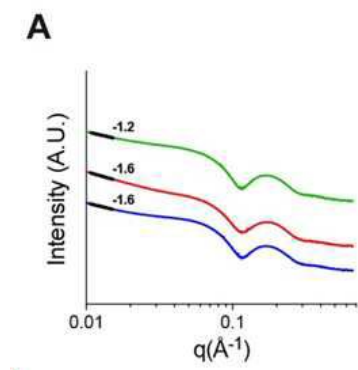
도면11b



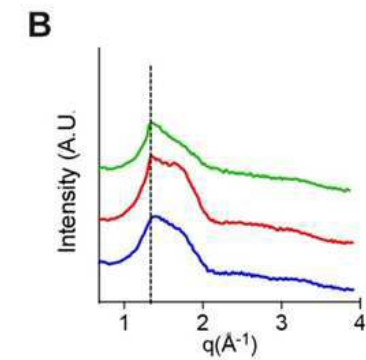
도면11c



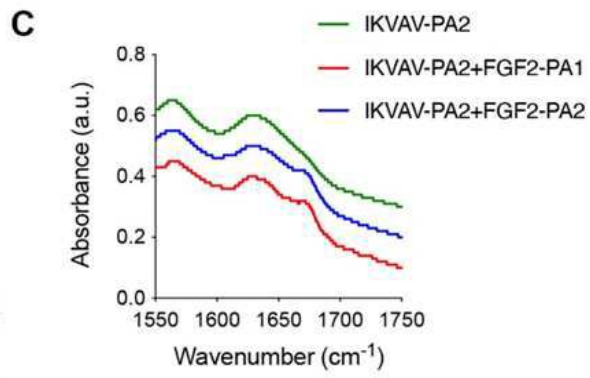
도면12a



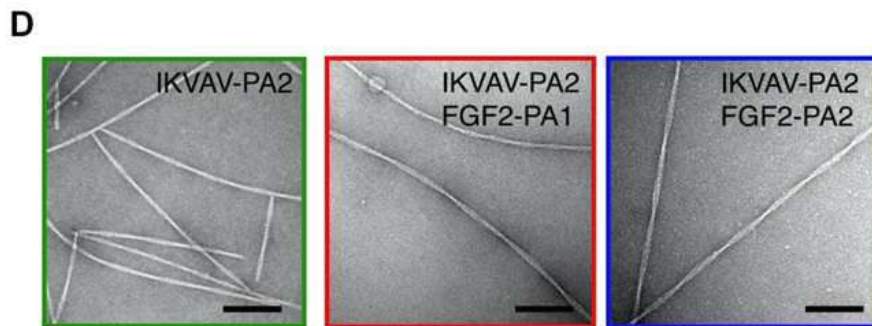
도면12b



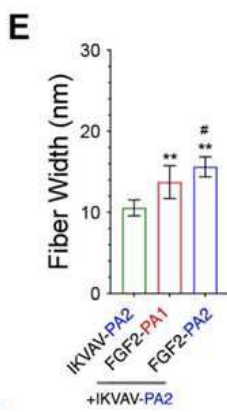
도면12c



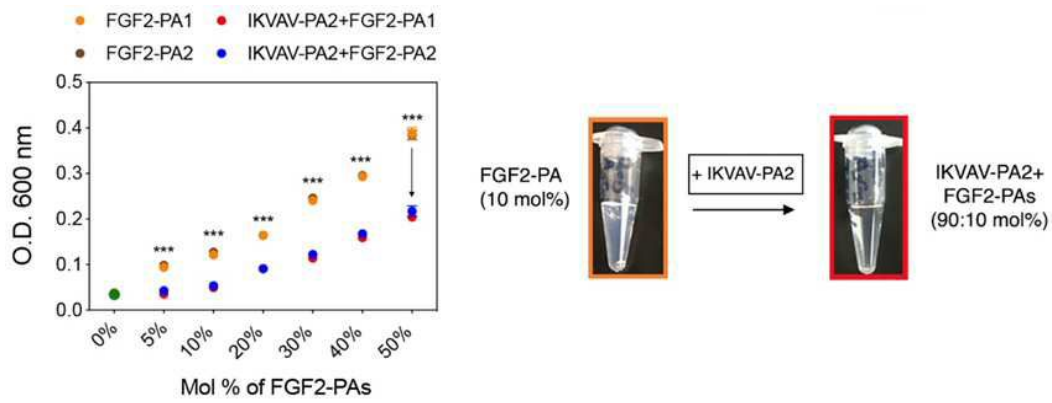
도면12d



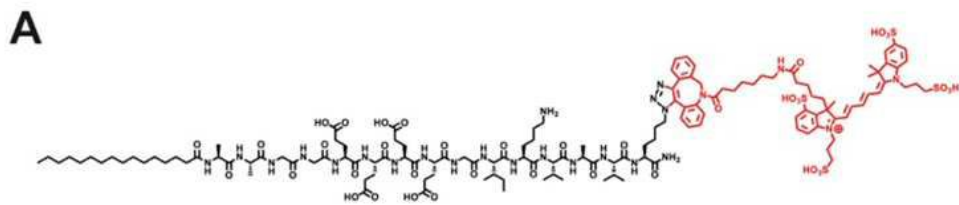
도면12e



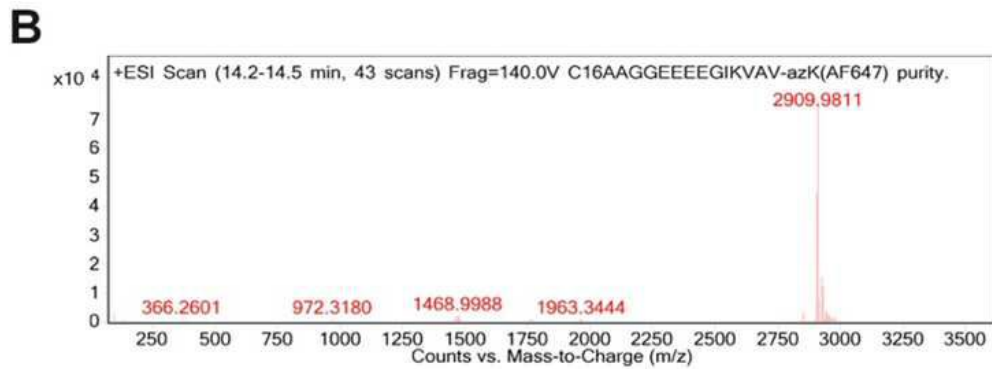
도면12f



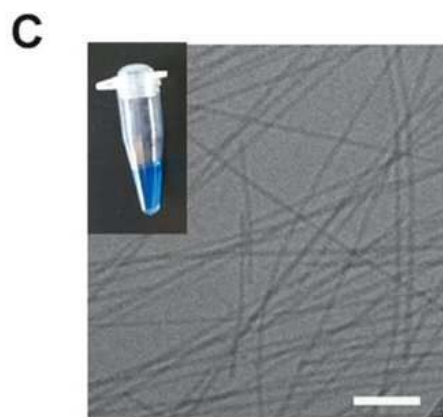
도면13a



도면13b



도면13c



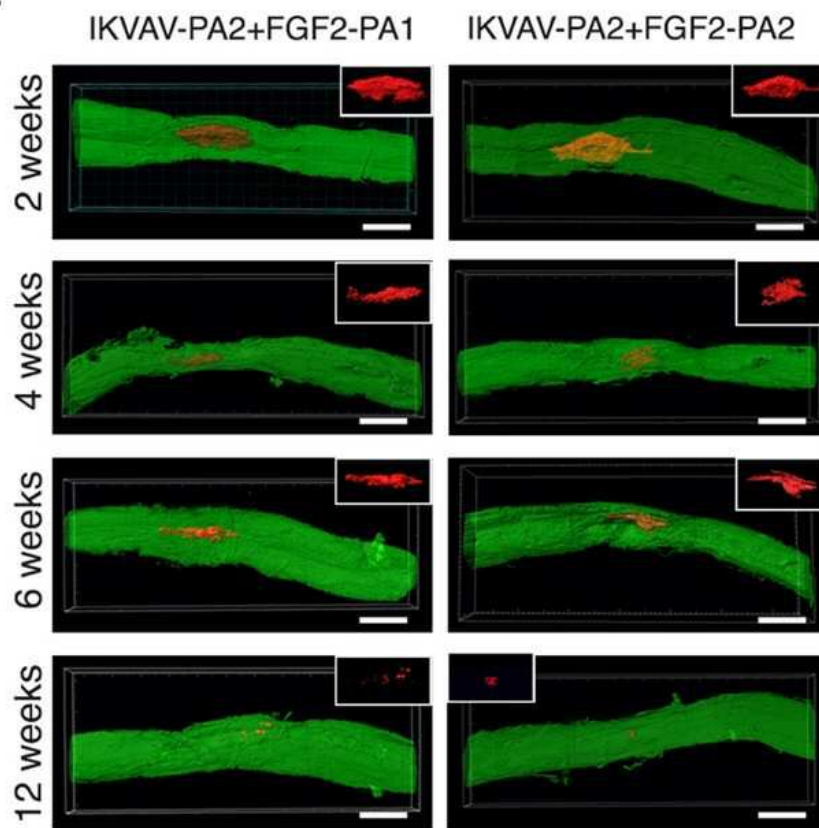
도면13d

D

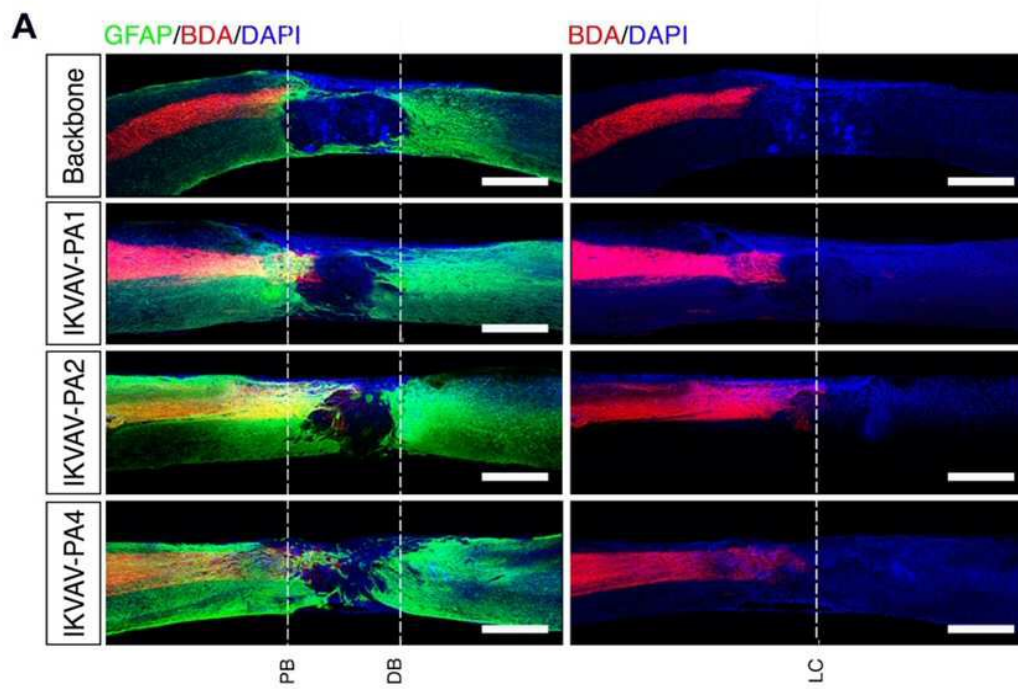


Non-Cleared Cleared

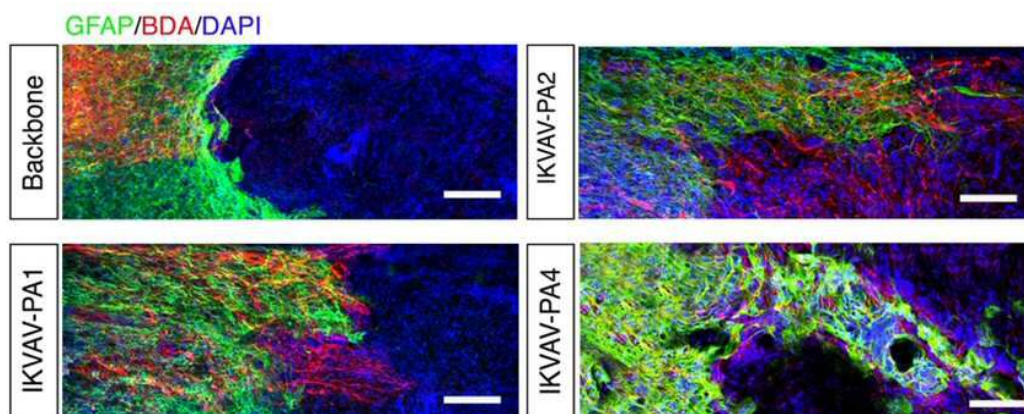
도면13e



도면14a

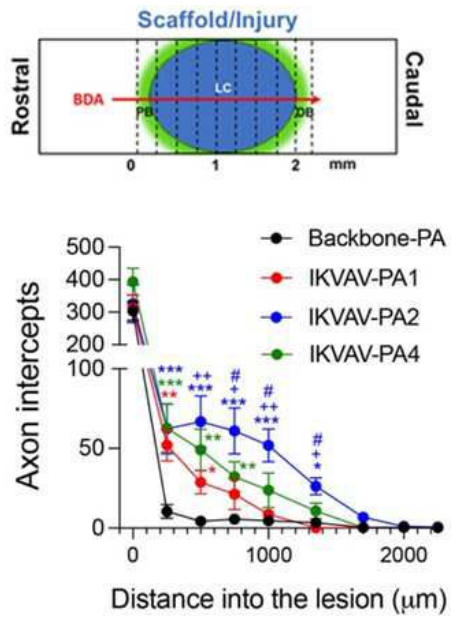


도면14b



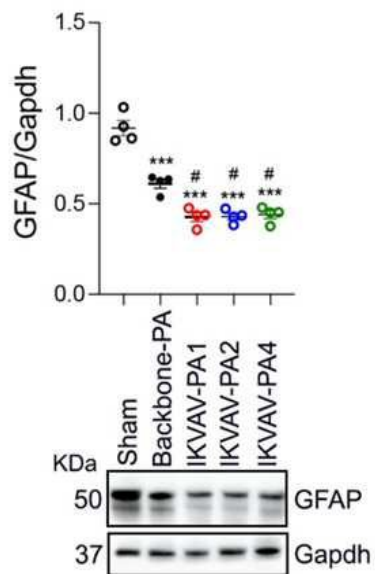
도면14c

C

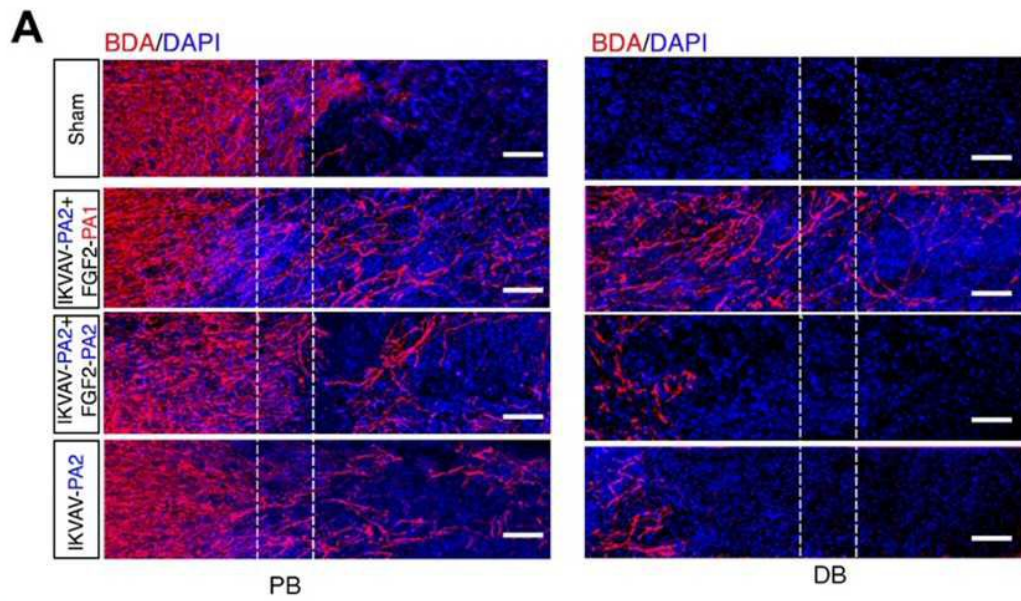


도면14d

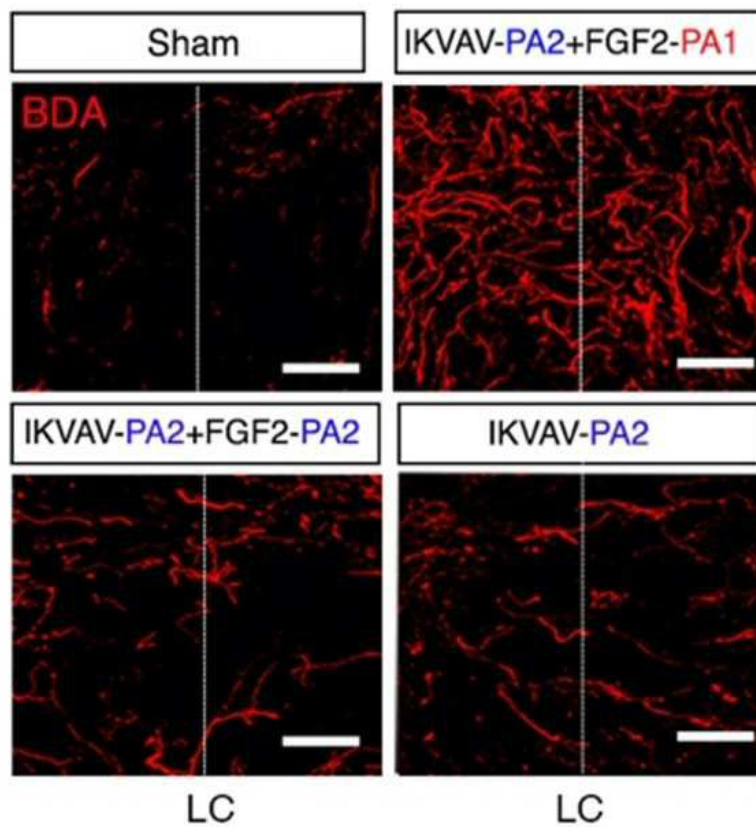
D



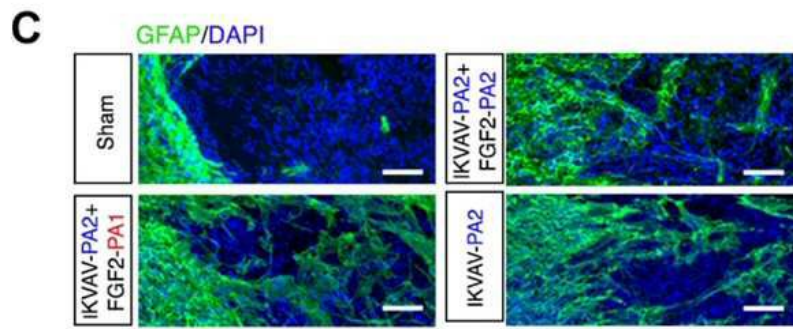
도면15a



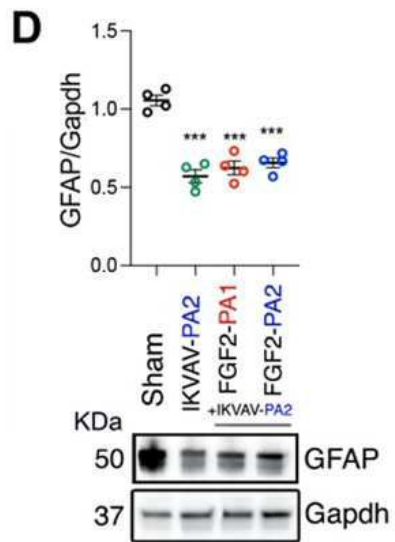
도면15b



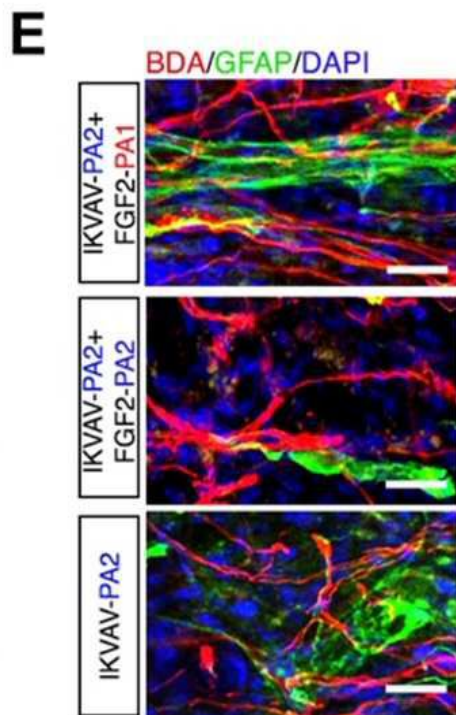
도면15c



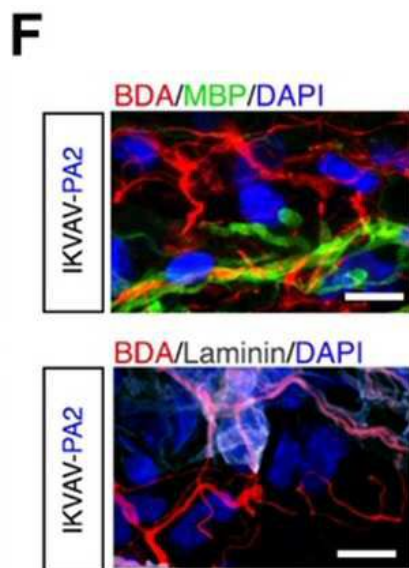
도면15d



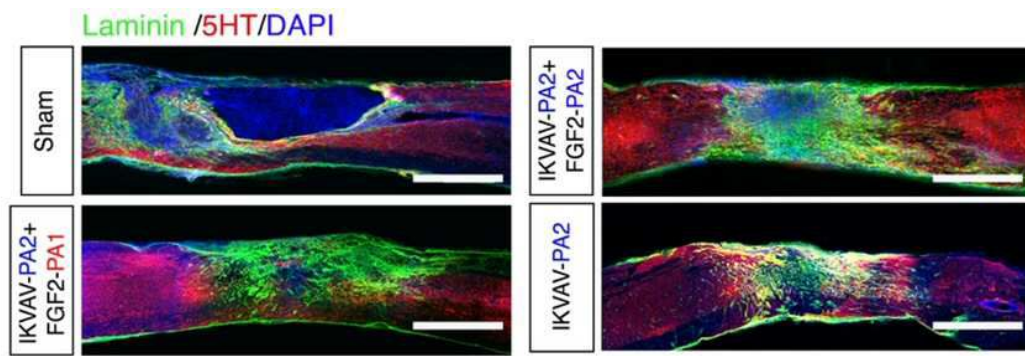
도면15e



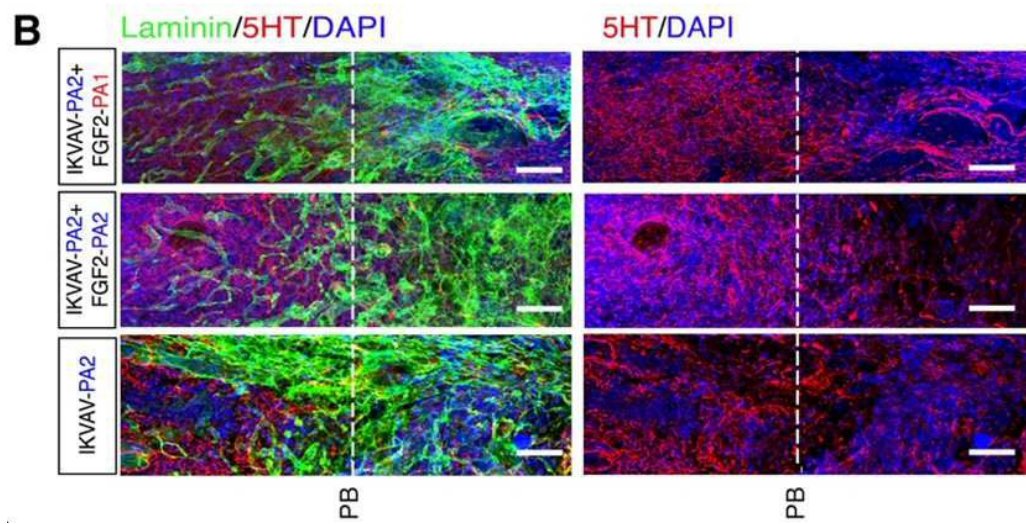
도면15f



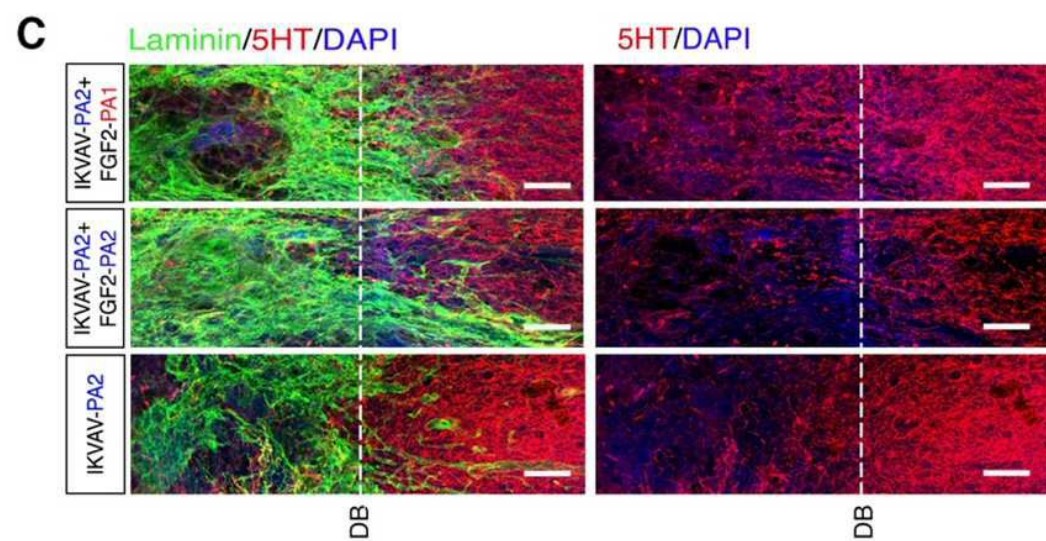
도면16a



도면16b

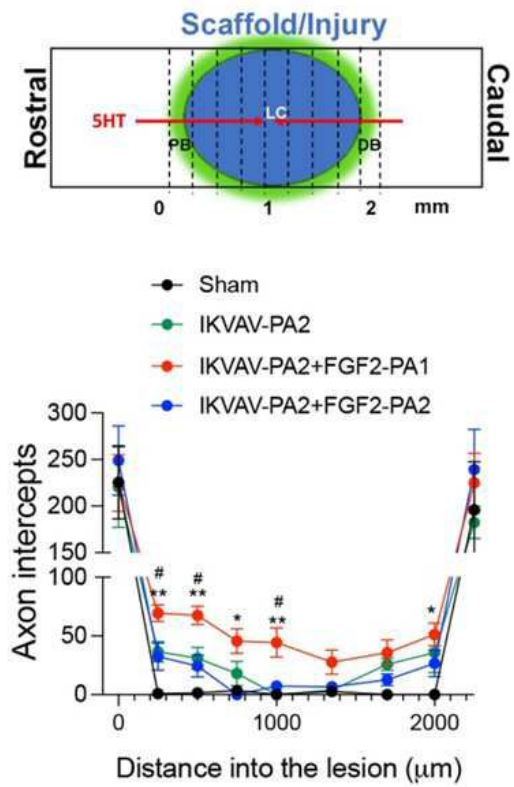


도면16c



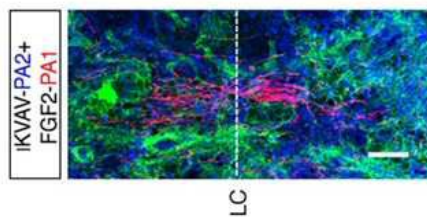
도면16d

D



도면16e

E

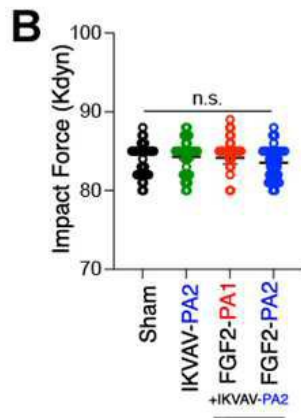


도면17a

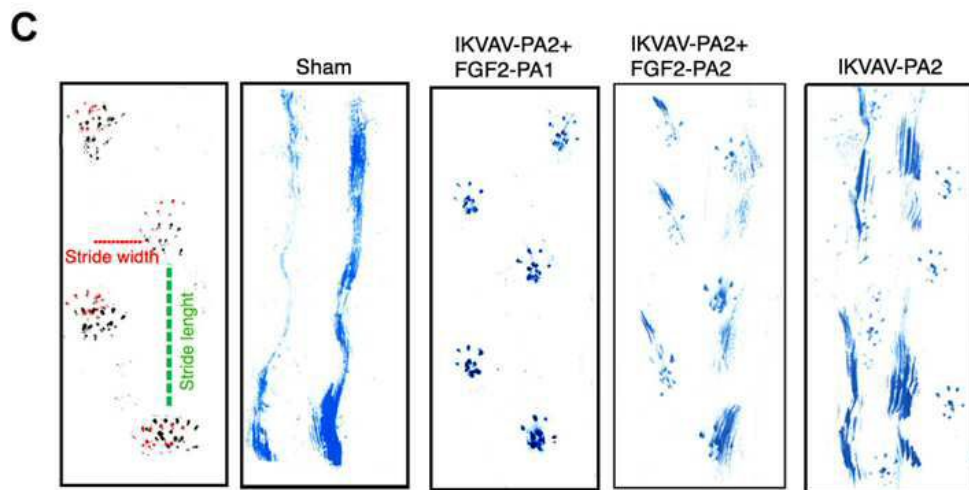
A



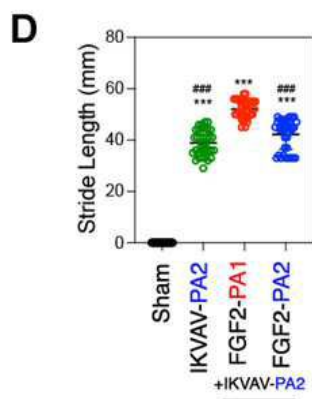
도면17b



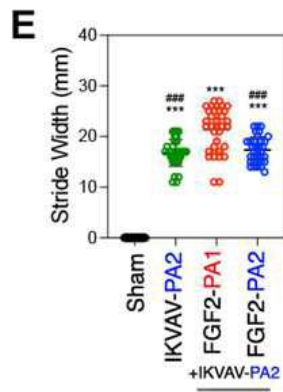
도면17c



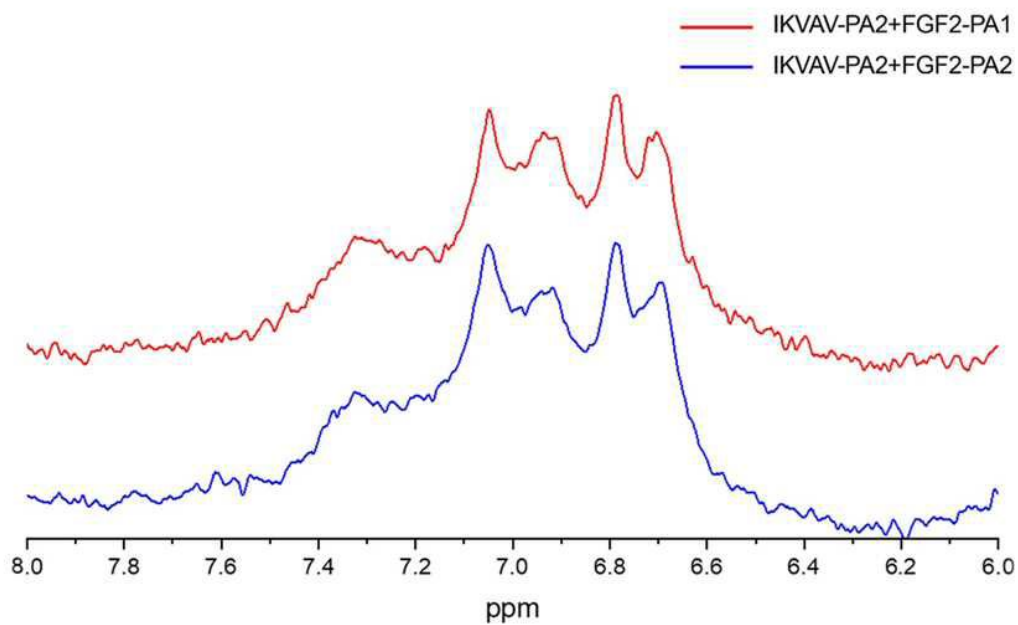
도면17d



도면17e



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NORTHWESTERN UNIVERSITY

<120> DYNAMIC BIOACTIVE SCAFFOLDS AND THERAPEUTIC USES THEREOF AFTER

CNS INJURY

<130> NWEEST-39312.601

<150> US 63/152,498

<151> 2021-02-23

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 1

Ile Lys Val Ala Val

1 5

<210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 2

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

1 5 10 15

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 3

Val Val Ala Ala

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 4

Ala Ala Gly Gly

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 5

Ala Val Gly Gly

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 6

Val Ala Gly Gly

1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 7

Gly Gly Gly Gly

1

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 8

Val Ala Ala Ala

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 9

Ala Val Ala Ala

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic

<400> 10

Ala Ala Ala Ala

1