



공개특허 10-2022-0161384



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0161384  
(43) 공개일자 2022년12월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A61L 2/00* (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*A61L 2/007* (2013.01)  
*A61K 38/00* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-7037089  
(22) 출원일자(국제) 2021년03월30일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2022년10월25일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/024954  
(87) 국제공개번호 WO 2021/202577  
국제공개일자 2021년10월07일  
(30) 우선권주장  
63/002,882 2020년03월31일 미국(US)

- (71) 출원인  
가부시끼가이샤 쓰리디 매트릭스  
일본 1020083 도쿄도 치요다구 코지마찌 3-2-4  
(72) 발명자  
리오울트 마리카 지.  
미국 매사추세츠주 02140 케임브리지 워싱턴 애비뉴 33 아파트 5  
길 은석  
미국 매사추세츠주 01718 액턴 그레이트 엘름 웨이 432  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
하영옥

전체 청구항 수 : 총 20 항

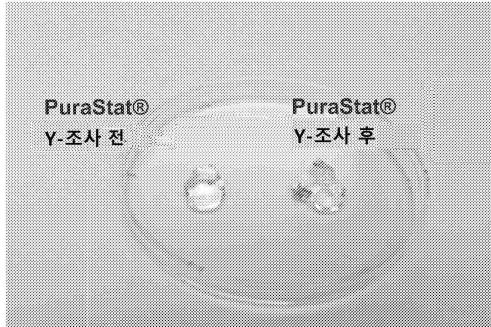
(54) 발명의 명칭 조사에 의한 자기 조립 펩티드의 멸균

### (57) 요약

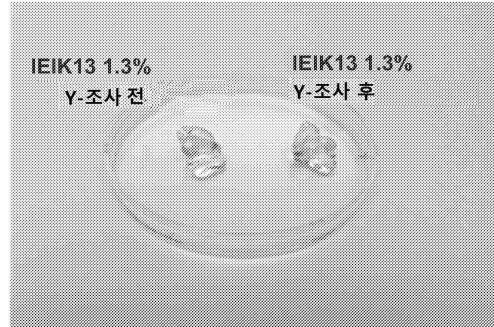
감마선 및 전자빔 조사는 주요 펩티드의 실질적인 분해없이 소정의 자기 조립 펩티드(용액 중 RADA16 포함)의 효율적인 멸균을 제공한 반면, 예를 들면 다른 자기 조립 펩티드인 QLEL12는 조사 후 현저히 분해되었다. 조사 멸균은 생리학적 pH에서 조직에 적용되면, 예를 들면 RADA16 하이드로겔의 레올로지 특성을 향상시킨다. 레올로지 특성의 증가는 다양한 생의학 용도에 있어서의 효능을 더욱 높게 할 수 있다.

### 대 표 도

1A



1B



(72) 발명자

알렉시 엘튼

미국 매사추세츠주 02132 웨스트 록스베리 프랜클  
레이드라이브 5

야마모토 나오키

일본 야마나시켄 409-1501 호쿠토 오이즈미쵸 니시  
아데 8240-8101

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

a) 자기 조립 웨티드의 용액이 담긴 하나 이상의 용기를 조사 기계 내에 두는 단계로서, 상기 자기 조립 웨티드는 대략 중성의 pH에서 생물학적 조직에 적용시 하이드로겔을 형성할 수 있는 단계; 및

(b) 상기 웨티드 용액이 웨티드의 실질적 분해 없이 미리 결정된 멸균 보증 수준(SAL)으로 멸균되면서, 그 소망하는 생물학적 또는 물리적 특성(들)이 실질적으로 동일한 수준으로 유지 또는 개선되도록, 상기 용기를 미리 결정된 선량으로 감마선, X-선 및/또는 전자빔 조사에 노출시키는 단계를 포함하는 자기 조립 웨티드(SAP) 용액을 멸균하는 방법.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 웨티드는 RADA16, KLD12, 및 IEIK13으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

#### 청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 선량은 15~50 kGy인 방법.

#### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 용액은 X선 또는 전자빔에 의해 조사되는 방법.

#### 청구항 5

제 2 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 웨티드 용액은 약 2.5%의 RADA16을 함유하고, 상기 선량은 15~24kGy인 방법.

#### 청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

조사 후에 분해되는 전체("총합") 웨티드의 양은 조사 전 웨티드의 양의 20%를 초과하지 않는 방법.

#### 청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 소망하는 생물학적 및 물리적 특성(들)은 지혈, 항유착, 재출혈 예방, 항협착, 조직 폐색, 점막 응기, 상처 치유, 저장 탄성률, 점도 및 조직 공극 충전 특성으로 이루어진 군에서 선택되는 방법.

#### 청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 자기 조립 웨티드 용액의 조사 전 바이오버든은 제품 단위당 9CFU 이하인 방법.

#### 청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

조사 선량은 적어도  $10^{-6}$ 의 무균 보증 수준(SAL)을 달성하는 방법.

### 청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,  
조사 후 용액 중의 전장 펩티드("주요 펩티드")의 분해 생성물의 농도가 0.1%~5%의 범위인 방법.

### 청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중 어느 한 항에 있어서,  
조사 전후 용액의 pH가 약 1.8~3.5의 범위인 방법.

### 청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,  
용액 용기가 플라스틱 시린지인 방법.

### 청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,  
겔화된 용액의 저장 탄성률이 조사 후 적어도 10% 증가되는 방법.

### 청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,  
저장 탄성률을 감소 또는 회복시키기 위해 상기 용액을 전단가공하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

### 청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 제조된 자기 조립 펩티드의 멸균 용액.

### 청구항 16

제 15 항에 기재된 멸균 용액의 사용 방법으로서,  
상기 용액을 생물학적 조직에 적용하는 단계를 포함하는 멸균 용액의 사용 방법.

### 청구항 17

제 16 항에 있어서,  
상기 멸균 용액은 수술 동안 또는 출혈을 수반하는 외상 후에 적용되는 방법.

### 청구항 18

제 17 항에 있어서,  
상기 멸균 용액은 인간 피험체의 내부 부위에 적용되는 방법.

### 청구항 19

제 1 항에 있어서,  
상기 자기 조립 펩티드 용액은 도 2~도 6의 대응하는 조사 후 프로파일에 도시된 바와 같이 및/또는 실시예에 기재된 바와 같이 실질적으로 조사후 질량 분석(MS) 프로파일을 나타내는(예: PuraStat<sup>®</sup>의 경우, 추가 주요 M<sub>z</sub> 피크는 836/1670, 1100 및 1513m/z에서 관찰됨) 방법.

### 청구항 20

질병 또는 상태의 치료 또는 예방을 위한 자기 조립 펩티드의 멸균 용액의 용도로서, 상기 멸균 용액은 제 1 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 방법에 의해 얻어지는 자기 조립 펩티드의 멸균 용액의 용도.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] (우선권)

[0002] 본 출원은 2020년 3월 31일에 출원된 미국 가출원 번호 63/002,882에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 본 발명은 소정의 의료용 젤, 보다 구체적으로는 소위 자기 조립 펩티드를 함유하는 젤의 멸균에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0004] 자기 조립 펩티드(때로는 "SAP"로 약칭함)는 수성 환경에 배치되고, 주변 조건의 화학적 또는 물리적 변화가 발생하는 경우, 고도로 조직화된 나노구조로 자발적으로 조립되는 펩티드의 유형이다. 또 다른 잘 알려진 구조는 천연 콜라겐에 의해 형성된 나노섬유질 바이오폴리머 구조이다. 본 발명과 관련된 SAP의 부류는 베타 시트를 형성할 수 있는 교대로 있는 친수성 및 소수성 아미노산 잔기로 이루어진다. 그들은 중성수에서 잘 정렬된 나노구조로 자율적으로 조립되는 반면, 높은 전단력이 가해지면 개별 분자로 일시적으로 분해될 수 있다. SAP는 pH 및 /또는 오스몰농도와 같은 환경에 따라 하이드로겔(SAP 젤이라고 알려짐)을 형성할 수 있고; 예를 들면 중성 부근의 pH의 체내에 두었을 때, 하이드로겔을 형성할 수 있다. SAP 젤은 다양한 의료 용도, 예를 들면 개선된 상처 치유, 항상성 유도; 특히 수술과 관련하여 내부 조직에서의 유착 감소; 일시적인 조직-공극 매트릭스 충전제로서 이러한 공극 내로의 자연 조직의 내부 성장을 촉진시키는 데 사용되는 것으로 이전에 기재되어 있다. 특정 SAP는 미국 특허 제5,670,483호; 5,955,343; 9,724,448; 10,596,225 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/136081; 및 이에 상응하는 외국 등가물에 기재되어 있다.

[0005] 멸균은 자기 조립 펩티드 용액을 포함한 대부분의 생체재료의 제조 공정에서 매우 중요한 단계이다. PuraStat<sup>®</sup>; (RADA16 = Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub> = 서열번호 1; 약 2.5%)은 멸균을 위해 통상적으로 여과되지만(예를 들면, 국제 특허 출원 공개 WO2014/008400 참조); 더욱 고농도에서의 PuraStat<sup>®</sup>의 접도는 튜빙시 손실 이외에도 상당한 펩티드의 손실을 초래하는 여과의 주요 장애물이다. 이 멸균 방법에 있어서, SAP의 용액은 다공성 필터를 얹지로 통과되며, 여기서 멸균 필터의 평균 기공 크기는 0.22μm이다(미국 특허 출원 번호 2015/019735). 다른 방법으로는 일부 열적으로 안정한 자기 조립 펩티드 용액은 약 121°C에서 약 25분 동안 고압멸균 처리에 의해 멸균될 수 있다(미국 특허 출원 번호 10/369,237).

[0006] 또한, PuraStat<sup>®</sup> 제품의 바깥쪽 부분에 대해서는 추가 에틸렌 옥사이드 멸균 단계가 필요로 된다. 또한, 용액 중에 RADA16과 같은 일부 SAP에 대해서는 완전한 열 분해 때문에 고압멸균을 사용할 수 없는 것이 발견되었다(미국 특허 출원 공개 번호 2017/0202986호). 따라서, 특히 RADA16 및 기타 SAP의 경우 손실을 줄이기 위해 또 다른 새로운 멸균 방법이 필요로 되어 왔다.

[0007] RADA16을 포함한 자기 조립 펩티드의 감마선 조사 멸균에 대해서는 선행 공개(미국 특허 출원 공개 번호 2016/0317607; 단락 [0052])에 지나가는 말로만 기재되어 있었지만; 지금까지 RADA16을 포함한 자기 조립 펩티드의 구조 및 특성에 미치는 조사의 실제 효과 또는 특정 조건에 대해서는 기재되어 있지 않다. 실제로, 펩티드 구조는 감마선, X선, 전자빔과 같은 조사에 의해 생성되는 반응성 라디칼 종에 의해 변화될 수 있다. 이러한 구조적 변화는 아미노산 조성, 반응성 잔기 위치 및 가능하게는 각 거대분자에 의해 획득된 형태를 포함하는 다중 인자에 의해 좌우될 수 있다(Vieira R et al, Biol. Pharm. Bull. 2013, 36(4) 664-675). 예를 들면, 그 논문에 있어서 펩티드의 상이한 서열에 관계없이, 시험된 9개의 펩티드 모두 최대 15kGy의 감마선 조사에 의해 점진적인 분해를 나타냈다. 멸균 공정을 위해서는 15kGy보다 높은 조사선량이 요구될 수 있다는 점을 감안하면, 다수의 펩티드가 상당한 분해 없이는 감마선 조사로 멸균될 수 없다. 방향족 아미노산(즉, 페닐알라닌(F), 티로신(Y), 트립토판(W), 히스티딘(H) 및 프롤린(P)) 및 황 함유 아미노산(즉, 시스테인(C))의 측쇄는 반응성 라디칼 종에 의한 공격에 특히 취약하다(Annu. Rev. Biochem., 62, 797-821(1993) 및 Vieira R et al, Biol. Pharm. Bull. 2013, 36(4) 664- 675). 배경으로서, 이하의 SAP: RADA16(Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)), KLD12(Ac-KLDLKLDLKLDL-NH<sub>2</sub>(서열번호 2)), 및 IEIK13(Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH<sub>2</sub>(서열번호 3))은 방향족 아미노산 또는 황 함유 아미노산을 포함하지 않는다.

[0008] 한편, 조사 멸균은 또한 자기 조립 펩티드의 2차 구조와 그 섬유질 구조에도 영향을 미칠 수 있다. 언급한 바와 같이, RADA16, KLD12 및 IEIK13은 베타 시트 형태를 가지며, 이들 분자는 정렬된 나노섬유질 구조를 형성하도록 자기 조립한다. 조사 멸균 공정은 잠재적으로 펩티드의 2차 구조와 나노섬유질 구조를 변화시킬 수 있으며, 이는 레올로지 특성의 바람직하지 않은 변화를 초래할 수 있다.

[0009] 따라서, 자기 조립 펩티드와 함께 유리하게 기능하는 새로운 멸균 방법에 대한 필요성이 존재한다. 상기 언급된 이유로, 지금까지 조사에 의한 멸균은 회피되어 왔다.

### 발명의 내용

[0010] 본 개시에 있어서, 자기 조립 펩티드 용액에 대한 조사에 의한 멸균 효과는 구체적으로 하기 펩티드를 사용하여 평가했다: PuraStat<sup>®</sup> (Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>, RADA16(서열번호 1)), IEIK13(Ac-IEIKIEIKIEIKI-NH<sub>2</sub>(서열번호 3)), 및 QLEL12(Ac-QLELQLELQLEL-NH<sub>2</sub>(서열번호 4)). 예상치 않게, 감마선 조사 멸균은 소정의 자기 조립 펩티드 용액과 하이드로겔의 레올로지 특성이 예상했던 주목할 만한 분해 없이 향상시킨 반면, 소정의 다른 펩티드는 감마선 조사 후 예상했던 현저한 분해 및 점도 저하가 나타났고(즉, RADA16 및 IEIK13과는 다름), 한편 예를 들면 또 다른 자기 조립 펩티드 QLEL12(Ac-QLELQLELQLEL-NH<sub>2</sub>(서열번호 4))는 조사 후 현저하게 분해된 것을 발견했다. 더욱이, 본 발명은 적어도 각각의 펩티드에 대해, 구체적으로 X선 및 전자빔을 포함한 다른 유사한 조사 멸균 방법에 의해 동일한 결과가 기대될 수 있다고 하는 예언적 발견에 기반한다. 따라서, 일부 실시형태에 있어서, 자기 조립 펩티드 용액을 멸균하는 방법은:

[0011] a) 자기 조립 펩티드의 용액이 담긴 하나 이상의 용기를 조사 장치 내에 넣는 단계로서, 상기 자기 조립 펩티드는 대략 중성의 pH에서 생물학적 조직에 적용시 하이드로겔을 형성할 수 있는 단계; 및

[0012] b) 펩티드 용액이 펩티드의 실질적 분해 없이 멸균되면서 소망하는 생물학적 및/또는 레올로지 특성(들)이 동일 수준으로 유지 또는 개선되도록, 상기 용기를 미리 결정된 선량으로 감마선, X선 및/또는 전자빔 조사에 노출시키는 단계를 포함한다.

[0013] 일부 실시형태에 있어서, 펩티드는 RADA16, KLD12 및 IEIK13으로 이루어진 군에서 선택된다. 관련 실시형태에 있어서, 이러한 펩티드는 15~50kGy, 바람직하게는 15~40kGy, 보다 바람직하게는 이들 펩티드의 생물학적 특성에 있어서 실질적인 분해 및/또는 실질적인 부정적 변화 없이 소망하는 멸균 보증 수준(SAL)이 되게 하는 최소 선량에 노출된다. 일부 실시형태에 있어서, 펩티드 용액은 감마선, X선, 또는 전자빔에 의해 조사된다. 일부 실시형태에 있어서, 조사 후 용액 중의 전체 펩티드의 총합 분해는 조사 전 펩티드의 양의 20%, 보다 바람직하게는 10%, 가장 바람직하게는 5%를 초과하지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 소망하는 생물학적 또는 물리적 특성(들)은 치혈, 항유착, 재출혈 방지, 항협착, 조직 폐색, 저장 탄성률(예를 들면, 일부 실시형태에서 결화된 용액의 저장 탄성률은 조사 후 적어도 10%, 적어도 15%, 또는 적어도 20% 증가함) 및 점도로 이루어진 군에서 선택되고, 또한 조직 공극 충전 특성은 조사 후 허용 가능한 또는 개선된 파라미터 내로 유지된다. 실시형태에 있어서, 조사 선량은 적어도 10<sup>-5</sup>, 바람직하게는 10<sup>-6</sup> 이하의 멸균 보증 수준(SAL)을 달성한다. 다른 실시형태에 있어서, 실시예에서 후술되는 바이오버든(bioburden) 시험을 이용하여, 조사 전 펩티드 용액의 허용 가능한 오염의 수준은 1000, 500, 100, 15, 10, 9, 5, 2, 1.5, 1CFU 또는 그 이하이다. 일부 실시형태에 있어서, 조사 후 용액 중의 온전한("주요한" 또는 "전장") 펩티드의 분해산물의 농도는 0.1%~5%의 범위이다. 일부 실시형태에 있어서, 조사 후 펩티드 용액의 pH는 약 1.8~3.5의 범위이다. 일부 실시형태에 있어서, 용액 용기는 어댑터 노즐을 구비 또는 구비하지 않은 플라스틱 시린지이다. 이러한 실시형태에 있어서, 폐기정의 플라스틱 부분 및 고무 부분은 또한 그 소망하는 물리적 특성을 반드시 유지하도록 주의가 필요로 된다. 플라스틱 시린지의 일부 황변은 예상될 수 있는 것이며, 이는 정상적인 것이지만, 임의의 고무화 재료는 반드시 플라스틱 특성을 허용 가능한 수준으로 보존시켜야 한다.

[0014] 일부 실시형태에 있어서, 결화 용액은 그 저장 탄성률을 감소 또는 회복시키기 위해 추가로 전단가공된다.

[0015] 따라서, 본 발명은 자기 조립 펩티드의 멸균 방법을 제공한다. 본 발명의 방법에 따르면, 일부 실시형태에 있어서, 용액은 추가로, 예를 들면 수술 중 또는 출혈을 수반하는 외상 후에 생물학적 조직에 용액이 적용된다.

### 도면의 간단한 설명

[0016] 도 1. 28kGy로의 감마선 조사 전(1A)과 후(1B)의 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%) 및 IEIK13 1.3%의 외관.

도 2. (A) 감마선 조사 전, (B) 40kGy로의 감마선 조사 후, 및 (C) 121°C에서 20분간 고압멸균 후의 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 질량 스펙트럼.

도 3. (A) 25kGy로의 X선 조사 후 및 (B) 40kGy로의 X선 조사 후의 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 질량 스펙트럼.

도 4. (A) 25kGy로의 전자빔 조사 후 및 (B) 40kGy로의 전자빔 조사 후의 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 질량 스펙트럼.

도 5. (A) 조사 전; (B) 40kGy로의 감마선 조사 후; (C) 25kGy로의 X선 조사 후; (D) 40kGy로의 X선 조사 후; (E) 25kGy로의 전자빔 조사 후; 및 (F) 40kGy로의 전자빔 조사 후의 IEIK13 1.3%의 질량 스펙트럼.

도 6. (A) 조사 전; (B) 23kGy로의 감마선 조사 후; (C) 25kGy로의 X선 조사 후; (D) 40kGy로의 X선 조사 후; (E) 25kGy로의 전자빔 조사 후; 및 (F) 40kGy로의 전자빔 조사 후의 QLEL12 0.15%의 질량 스펙트럼.

도 7. 40mm 콘 플레이트를 사용하여 변형률 0.1%로 감마선 조사한 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 주파수 시험(N = 3, 막대는 SD를 나타냄).

도 8. 40mm 콘 플레이트를 사용하여 변형률 0.1%로 겔화 후 감마선 조사한 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 주파수 시험. 샘플을 DMEM으로 20분 동안 처리했다(N = 3, 막대는 SD를 나타냄).

도 9. 40mm 콘 플레이트를 사용하여 주파수 1Hz 및 변형률 0.1%로 감마선 조사한 PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)의 요변성 시험. 초기 저장 탄성률(G')은 1000s<sup>-1</sup>에서 1차 전단 전에 1분 동안 측정되었다. 1분 동안의 1차 전단 후, PuraStat<sup>®</sup>의 요변성 거동을 표시하기 위해 G' 회복을 1 시간 동안 기록했다. 이 시험을 중복했다.

도 10. 고해상도 MS(현재 PuraStat<sup>®</sup> 제품(미조사), 제안된 PuraStat<sup>®</sup> 제품(조사)).

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

상술한 바와 같이, 본 개시에서는 자기 조립 웨티드 용액에 대한 조사에 의한 멸균 효과를 구체적으로 이하의 웨티드를 이용하여 평가했다: PuraStat<sup>®</sup>(Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 1); RADA16), IEIK13(Ac-IEIKIEKIEIKI-NH<sub>2</sub>(서열번호 3)), 및 QLEL12(Ac-QLELQLELQLEL-NH<sub>2</sub>(서열번호 4)). 일부 실시형태에 있어서, 자기 조립 웨티드 용액을 멸균하는 방법은:

[0018]

a) 자기 조립 웨티드의 용액이 담긴 하나 이상의 용기를 조사 장치 내에 넣는 단계로서, 상기 자기 조립 웨티드는 대략 중성의 pH에서 생물학적 조직에 적용시(예를 들면 원위치) 하이드로겔을 형성할 수 있는 단계; 및

[0019]

b) 웨티드 용액이 웨티드의 실질적 분해 없이 미리 결정된 멸균 보증 수준(SAL)으로 멸균되면서 소망하는 생물학적 및/또는 레올로지 특성(들)이 실질적으로 동일 수준으로 유지 또는 개선되도록, 상기 용기를 미리 결정된 선량으로 감마선, X선 및/또는 전자빔 조사에 노출시키는 단계를 포함한다.

[0020]

예기치 않게, 감마선 조사 멸균은 주목할 만한 분해를 일으키지 않고 소정의 자기 조립 웨티드 용액 및 하이드로겔의 레올로지 특성을 향상시킨 반면, 소정의 다른 웨티드는, 즉 RADA16 및 IEIK13과는 달리, 감마선 조사 후 현저한 분해 및 점도 저하를 나타냈고, 또 다른 자기 조립 웨티드인 QLEL12(Ac-QLELQLELQLEL-NH<sub>2</sub>(서열번호 4))는 조사 후 현저히 분해된 것을 발견했다. 본 발명은 추가로 적어도 각각의 웨티드에 대해, 구체적으로 X선 및 전자빔을 포함한 다른 유사한 조사 멸균 방법에 의해 동일한 결과가 예상될 수 있다는 예언적 발견에 기반한다. 바람직한 실시형태에 있어서, 본 발명의 조성물 및 방법은 지혈, 항유착, 재출혈 예방, 항협착, 조직 폐색, 저장 탄성률, 점도 및 조직 공극과 충전 특성 등과 같은 소망하는 생물학적 특성(들)을 유지 또는 개선한다. 예를 들면, 일부 실시형태에 있어서, 저장 탄성률은 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 또는 그 이상 증가한다. 이러한 증가가 소정의 용도에 바람직하지 않을 경우, 젤은 당업계에 공지된 방법에 의한 희석 또는 전단가공(shearing)에 의해 더욱 둣게 만들어서 용액으로 하거나 또는 그렇지 않으면 저장 탄성률을 감소시킬 수 있다. 소정 실시형태에 있어서, 조사된 SAP 용액은 투명하고 점성이 있게 유지된다.

[0021]

일부 실시형태에 있어서, SAP는 식 I-IV 중 하나 이상에 부합하는 아미노산 잔기의 서열을 포함한다:

[0022]  $((Xaa^{neu}-Xaa^+)_x(Xaa^{neu}-Xaa^-)_y)_n$  (I)

[0023]  $((Xaa^{neu}-Xaa^-)_x(Xaa^{neu}-Xaa^+)_y)_n$  (II)

[0024]  $((Xaa^+-Xaa^{neu})_x(Xaa^-Xaa^{neu})_y)_n$  (III)

[0025]  $((Xaa^-Xaa^{neu})_x(Xaa^+Xaa^{neu})_y)_n$  (IV)

[0026]  $Xaa^{neu}$ 는 중성 전하를 갖는 아미노산 잔기를 나타내고;  $Xaa^+$ 는 양전하를 갖는 아미노산 잔기를 나타내고;  $Xaa^-$ 는 음전하를 갖는 아미노산 잔기를 나타내고; x 및 y는 각각 독립적으로 1, 2, 3 또는 4의 값을 갖는 정수이고; n은 1-5의 값을 갖는 정수이다.

[0027] 일부 실시형태에 있어서, SAP는 세포외 기질과 상호작용하는 아미노산 서열을 추가로 포함하고, 여기서 아미노산 서열은 SAP를 세포외 기질에 고정시킨다.

[0028] 일부 실시형태에 있어서, SAP의 아미노산 잔기는 자연 발생 또는 비자연 발생 아미노산 잔기일 수 있다. 자연 발생 아미노산은 표준 유전자 코드에 의해 인코딩되는 아미노산 잔기 및 비표준 아미노산(예: L-배열 대신 D-배열을 갖는 아미노산) 뿐만 아니라, 표준 아미노산(예: 피로리신 또는 셀레노시스테인)의 변형에 의해 형성될 수 있는 아미노산을 포함할 수 있다. 적합한 비자연 발생 아미노산은 D-알로이소류신(2R,3S)-2-아미노-3-메틸펜탄산, L-시클로펜틸 글리신(S)-2-아미노-2-시클로펜틸 아세트산을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0029] 다른 실시형태에 있어서, 자기 조립할 수 있는 또 다른 부류의 재료는 펩티도미메틱(peptidomimetic)이다. 본원에 사용된 펩티도미메틱은 펩티드 구조를 모방하는 분자를 지칭한다. 펩티도미메틱은 양친매성(amphiphilicity)과 같은 폴리펩티드의 모 구조와 유사한 일반적인 특징을 가지고 있다. 이러한 펩티도미메틱 재료의 예는 Moore et al., Chem. Rev. 101(12), 3893-4012(2001)에 기재되어 있다. 펩티도미메틱 재료는  $\alpha$ -펩티드,  $\beta$ -펩티드,  $\gamma$ -펩티드 및  $\delta$ -펩티드의 4가지 카테고리로 분류될 수 있다. 또한, 이들 펩티드의 코폴리머도 사용될 수 있다.  $\alpha$ -펩티드 펩티도미메틱의 예는 N,N'-연결된 올리고우레이, 올리고파롤리논, 옥사졸리딘-2-온, 아자티드 및 아자펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.  $\beta$ -펩티드의 예는  $\beta$ -펩티드 폴다머,  $\alpha$ -아미노옥시산, 황 함유  $\beta$ -펩티드 유사체, 및 히드라지노 펩티드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.  $\gamma$ -펩티드의 예는  $\gamma$ -펩티드 폴다머, 올리고우레이, 올리고카르바메이트 및 포스포디에스테르를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.  $\delta$ -펩티드의 예는 알켄계  $\delta$ -아미노산 및 카르보펩토이드, 예를 들면 피라노스계 카르보펩토이드 및 푸라노스계 카르보펩토이드를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 소정 실시형태에 있어서, SAP는 Arch Therapeutics, Inc.에 의해 제조된 AC5®, AC5-V®, AC5-G™ 또는 TK45(AC1이라고도 알려짐)이다([www.archtherapeutics.com](http://www.archtherapeutics.com) 참조).

[0031] 일부 실시형태에 있어서, SAP 용액은, 예를 들면 본원에 기재된 펩티드 조성물에 적합한 저장 및/또는 전달 시스템, 예를 들면 바이알, 병, 비이커, 백, 시린지, 앰플, 카트리지, 저장기 또는 LYO-JECTS®과 같은 "저장 및/또는 약물 전달 시스템"에 담겨진다. 저장 및/또는 전달 시스템은 동일하게 하나일 필요는 없고, 분리될 수 있다. 특정 실시형태에 있어서, SAP는 플라스틱 시린지에 제공되고, 약 10ml, 약 7.5ml, 약 5, 약 2.5, 약 1, 또는 약 0.5ml의 SAP 용액이 담겨진다. 소정 실시형태에 있어서, 플라스틱(예를 들면, 플라스틱 시린지)은 조사 후 황색을 띤 색조를 얻을 수 있으며, 이는 정상이며, 그 안에 담겨진 SAP 용액의 생의학적 특성에 영향을 미치지 않는다.

[0032] 일부 실시형태에 있어서, 이러한 저장 및 전달 시스템은 본원에 기재된 전달 장치 상에 고정하도록 적합화된 종종 좁은 단부 및 넓은 단부를 갖는 일반적으로 얇은 원통형 물체를 지칭하는 "노즐"을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, "노즐" 및 "캐뉼러"라는 용어는 상호교환적으로 사용된다. 노즐은 전달 시스템(예: 시린지)에 연결하기 위한 제 1 연결 지점 또는 단부, 및 약제학적 조성물의 전달이 투여되는 지점 또는 제 2 장치(예: 카테터)에 연결하기 위한 지점으로서 작용할 수 있는 제 2 연결 지점의 2개의 연결 지점 또는 단부로 구성된다.

[0033] 따라서, 본 발명은 자기 조립 펩티드의 멀균 용액을 제조하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 수술 동안 또는 출혈을 수반하는 외상 후에 생물학적 조직, 예를 들면 원위치에 적용될 수 있는 이러한 멀균 용액의 용도, 또는 예를 들면 국제 특허 출원 WO2014/133027에 기재된 바와 같은, 또는 미국 특허 출원 공개 번호

2011/02101541호 및 조직 손상의 폐색 부위에 기재된 바와 같은; 또는 혈관 색전술에 대한 미국 특허 출원 공개 번호2016/0287744에 기재된 바와 같은; 또는 뇌척수액 누출의 폐색에 대한 미국 특허 출원 번호 16/085,803에 기재된 바와 같은, 또는 점막 용기체로서 국제 특허 출원 공개 번호 WO2013/133414에 기재된 바와 같은; 또는 담즙 누출 폐색에 대한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2014/141160에 기재된 바와 같은; 또는 조직의 항유착에 대한 미국 특허 출원 번호 16/885,753에 기재된 바와 같은; 또는 췌장 누공 폐색에 대한 미국 특허 출원 번호 16/085,804에 기재된 바와 같은; 또는 기관지 폐색에 대한 미국 특허 출원 번호 15/124,639에 기재된 바와 같은; 또는 폐의 대수포 파열을 치료하기 위한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/138,478에 기재된 바와 같은; 또는 폐의 공기 누출의 치료에 대한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/019,738에 기재된 바와 같은; 또는 치아 골충전에 대한 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015/196020에 기재된 바와 같은; 또는 골 공극 충전에 대한 미국 특허 출원 번호 16/312,878호, 및 상기 언급된 임의의 문헌의 외국 등가물과 당업계에 공지된 다른 방법에 기재된 바와 같은 다른 질환 또는 상태의 치료 또는 예방에서의 소위 멸균 용액의 용도를 제공한다. 따라서, 일부 실시형태에 있어서, 본 발명은 상술한 질병 또는 상태를 치료 또는 예방하기 위한 자기 조립 펩티드의 멸균 용액의 용도를 제공하며, 여기서 멸균 용액은 본 발명의 방법에 의해 얻어진다. 이러한 소정 실시형태에 있어서, 자기 조립 펩티드 용액은 실질적으로 도 2-도 6의 대응하는 조사 후 프로파일에 나타낸 바와 같은 및/또는 실시 예에 기재된 바와 같은 조사후 질량 분석(MS) 프로파일을 나타낸다. 예를 들면, PuraStat®의 경우, 추가 주요 M<sub>z</sub> 피크는 836/1670, 1100 및 1513m/z에서 관찰된다.

[0034] 평균 바이오버든 <1,000 CFU는 멸균 전 PuraStat®의 일반적인 멸균율이다. 이 경우, 10<sup>-6</sup>의 무균 보증 수준 (SAL)을 달성하기 위해서는 조사 선량 범위가 25kGy~40kGy이여야 한다. 감마선과 X선 방법의 경우, 멸균 공정 동안에 총합 펩티드의 약 20% 이하가 분해될 수 있다. 전자빔 방법의 경우, 멸균 공정 동안에 총합 펩티드의 약 10% 이하가 분해될 수 있다. PuraStat® 레올로지는 감마선, X선에 의한 멸균 후 증가하여, 지혈 효능을 긍정적으로 또는 부정적으로 변경시킬 수 있다. 그러나, PuraStat® 레올로지는 전자빔 멸균 후에도 변경되지 않는다.

[0035] 소정 실시형태에 있어서, 실시예에서 후술하는 바이오버든 시험을 사용하여, 조사 전 펩티드 용액의 허용 가능한 오염 수준은 제품 단위 당 <1000, <500, <100, <15, <10, <9, <5, <2, <1.5, <1CFU, 또는 그 이하일 수 있다. 바람직한 바이오버든 사전 멸균은 <9CFU이다. 따라서, 9CFU 이하에서 조사 선량의 범위는 15kGy~24kGy에서 선택될 수 있다. 조사 선량 범위의 하한은 사전 조사된 제품의 바이오버든에 의해 결정될 수 있음과 아울러, 범위의 상한은 조사 기계의 구성 및 선택에 기반하여 선택되고, 소망하는 무균 보증 수준(SAL)을 달성하는 데 필요한 최소값으로 설정된다.

[0036] 감마선과 X선 방법의 경우, 멸균 공정 동안에 최대 10%의 펩티드가 분해될 수 있다. 전자빔 방법의 경우, 펩티드가 멸균 공정 동안에 현저히 분해되지 않을 수 있다. 이 경우에도, 감마선 및 X선 멸균 후에 PuraStat® 레올로지가 증가하여, 지혈 효능이 긍정적으로 또는 부정적으로 다소 변경될 수 있다. 따라서, PuraStat® 레올로지는 전자빔 멸균 후에도 변하지 않으므로, 레올로지 특성 및 지혈 특성에 있어서 변화가 없거나 또는 최소인 것이 소망되는 경우에는 바람직할 수 있다. 따라서, 전자빔 조사는 PuraStat®에 대해 특히 바람직할 수 있다.

[0037] 일부 실시형태에 있어서, 조사 후 용액 중의 분해된 전장 펩티드("주요 펩티드")의 농도는 0.1%~5%, 0.1%~4%, 0.1%~3%, 0.1%~2.5%, 0.1%~2%, 또는 0.1% 또는 1.5% 이하의 범위이다. 일부 실시형태에 있어서, RADA16, KLD12 또는 IEIK13 용액에 대해서는, 예를 들면 15~50kGy, 25kGy +/- 15kGy, 40kGy~10kGy, 35kGy~10kGy, 30kGy~10kGy, 15kGy~24kGy, 25kGy~10kGy, 20kGy~10kGy, 10kGy~15kGy 및 12kGy~14kGy를 포함한 조사 전 바이오버든에 따라 달라질 수 있는 총 선량이 조사되었다. 12~14kGy 정도의 선량이 감마선 조사에 최적인 것으로 보이지만, 펩티드 용액에도 X선 또는 전자빔이 유사한 선량으로 조사될 수 있다.

[0038] 일부 실시형태에 있어서, "저장 및/또는 약물 전달 시스템", 예를 들면 블리스터 팩에 함유된 플라스틱 시린지는 한 번에 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 2,000, 3,000, 4,000, 5,000, 6,000, 7,000, 8,000, 9,000, 10,000단위 이상의 배치(batch)로 조사된다. 일반적으로, 조사된 배치에서의 임의의 샘플의 총 노출은 본원에 기재된 바와 같이 100kGy, 보다 바람직하게는 60kGy, 가장 바람직하게는 50kGy 이하를 초과하지 않는 것이 바람직한다.

[0039] 일부 실시형태에 있어서, 조사 후 주요 펩티드의 분해(또한 "전장 펩티드의 분해"라고 칭해지기도 함)는 조사

전 웨티드의 양의 20%를 초과하지 않고, 바람직하게는 18%, 16%, 14%, 12%, 10%, 8%, 5%, 3% 또는 1%를 초과하지 않는다. 일부 실시형태에 있어서, 총 선량은 용액의 필요한 무균성을 달성하기에 충분한 기간에 걸쳐 달성된다. 예를 들면, 40kGy의 선량은 약 6시간 21분 동안 6.3kGy/hr의 방사선 강도로 전달될 수 있다. 다른 조합은 실시예 1에서 찾을 수 있다. 일부 실시형태에 있어서, 일정한 선량이 수 시간, 예를 들면 약 10, 약 9, 약 8, 약 7, 약 6, 약 5, 약 4, 약 3, 또는 약 2시간에 걸쳐 전달되었다.

[0040] 일부 실시형태에 있어서, 샘플은 감마선 선량, 예를 들면 약 23, 약 25, 약 28 또는 약 40kGy, 또는 예를 들면 VPTrad([www.vptrad.com](http://www.vptrad.com); MDS Nordin, 캐나다 오타와주)의 Gammacell 220<sup>®</sup> High Dose Rate Co-60 조사기와 같은 기기로 상기 나타낸 그외 선량으로 조사된다.

[0041] 다른 실시형태에 있어서, 샘플에는 Mevex 가속기(하기 설정: 10MeV, 20kW)를 사용하여 약 25kGy~약 40kGy의 선량 또는 상기 표시된 선량으로 X선이 조사된다.

[0042] 일반적으로, X선 주파수 범위는  $3 \times 10^{16}$ ~ $3 \times 10^{19}$  Hz 범위이고, 감마선 주파수의 주파수 범위는  $3 \times 10^{19}$  이상이다.

[0043] 다른 실시형태에 있어서, 샘플은 Mevex 가속기(하기 설정: 10MeV, 20kW)([mevex.com/linacs/10mev-system-e-beam-sterilization-for-medical-devices/](http://mevex.com/linacs/10mev-system-e-beam-sterilization-for-medical-devices/) 참조)를 사용하여 약 25~약 40kGy의 전자빔으로 조사된다.

[0044] 일부 실시형태에 있어서, 소망하는 생물학적 및 물리적 특성(들)은 지혈, 항유착, 재출혈 방지, 항협착, 조직폐색, 저장 탄성률, 점도, 조직 공극 충전성, 점막 용기 및 상처 치유로 이루어진 군에서 선택된다.

[0045] 바람직한 실시형태에 있어서, 조사 선량은 적어도  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  또는 그 이하의 무균 보증 수준(SAL)을 달성한다.

[0046] 또한, 본 발명은 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 자기 조립 웨티드의 멸균 용액을 제공한다. 이는 상기 용액을 생물학적 조직에, 예를 들면 수술 중에 또는 출혈을 수반하는 외상 후에 실질적으로 pH가 중성인 부위에 적용하여 결화를 초래하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에 있어서, 이러한 부위는 내부에 있는 반면, 다른 실시형태에서는 부위가 표면 봉합, 절단 또는 찰과상과 같은 외부일 수 있다.

[0047] 본 발명의 다른 양태는 실시예 및 첨부된 청구범위를 포함한 본 기재에 기반하여 당업자에게 명백해질 것이다.

#### 실시예 1: 조사 조건

[0049] 샘플에 VPTrad Gammacell 220<sup>®</sup> High Dose Rate Co-60 조사기를 사용하여 23, 25, 28 및 40kGy의 감마선을 조사했다. 일부 실시형태에 있어서, 40kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 6.30kGy/hr 및 6시간 20분 58초였다. 다른 실시형태에 있어서, 28kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 4.40kGy/hr 및 6시간 22분 31초였다. 다른 실시형태에 있어서, 25kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 6.58kGy/hr 및 3시간 47분 42초였다. 다른 실시형태에 있어서, 23kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 6.58kGy/hr 및 3시간 29분 29초였다.

[0050] 다른 실시형태에 있어서, 샘플을 Mevex 가속기(10MeV, 20kW)를 사용하여 25kGy 및 40kGy으로 X선을 조사했다.

[0051] 다른 실시형태에 있어서, 샘플을 Mevex 가속기(10MeV, 20kW)를 사용하여 25 및 40kGy으로 전자빔을 조사했다.

#### 실시예 2: HPLC 조건

[0053] 조사 시험 후 주요 웨티드 함유율을 평가하기 위해 HPLC 시험을 수행했다. 이 연구에는 Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)이 사용되었다. 컬럼 온도는 25°C로 유지했다.

[0054] RADA16 샘플의 경우, 용매 A는 0.1% TFA가 포함된 물이고, 용매 B는 0.1% TFA가 포함된 80% 아세토니트릴이었다. 용매 B의 구배는 25°C에서 20분 내에 10%에서 40%로, 또 다른 5분 동안 40%로 조절되었다. 이 시험에는 Agilent Zorbax 300SB-C18 컬럼(4.6mm×250mm, 5μm, 300Å)이 사용되었다. PuraStat<sup>®</sup> (RADA16 2.5%)(40mg)을 10 μL의 DH<sub>2</sub>O와 혼합하고, 혼합물을 와류시켰다. 이 혼합물을 500 μL의 포름산과 더 혼합하고, 와류시켰다. 그 다음, 이 혼합물을 DH<sub>2</sub>O(4,450 μL)와 혼합하고, 와류시켰다. Agilent 오토샘플러를 사용하여 20 μL 샘플을 주입했다.

[0055] IEIK13 샘플의 경우, 용매 A는 0.1% TFA가 포함된 물이고, 용매 B는 0.1% TFA가 포함된 90% 아세토니트릴이었다. 용매 B의 구배는 8분 내에 20%에서 43%로, 8분~9.5분 내에 43%에서 70%로, 9.5~30분 내에 70%에서 95%로, 또한 25°C에서 또 다른 5분 동안 95%로 조절되었다. 이 시험에는 Agilent PLRP-S 컬럼(4.6mm×

250mm, 8 $\mu$ m, 300Å)이 사용되었다. IEIK13의 1.3% 용액을 0.1% TFA가 포함된 물로 0.075%로 희석하고, 혼합물을 와류시켰다. 35 $\mu$ L 샘플을 Agilent 오토샘플러를 사용하여 주입했다.

[0056] QLEL12 샘플의 경우, 용매 A는 물이고, 용매 B는 80% 아세토니트릴이었다. 용매 B의 구배는 25°C에서 15분 내에 20%에서 80%로, 또 다른 7분 동안 80%로 조절되었다. 이 시험에는 Agilent PLRP-S 컬럼(4.6mm×250mm, 8 $\mu$ m, 300Å)이 사용되었다. 0.15% w/v의 QLEL12 용액을 DH<sub>2</sub>O로 0.01%로 희석하고, 와류시켰다. Agilent 오토샘플러를 사용하여 50 $\mu$ L 샘플을 주입했다.

#### 실시예 3: 질량 분석 조건

[0058] 조사 멸균 후 펩티드의 분해를 조사하기 위해 질량 분광분석 시험을 수행했다. 이 연구에는 Agilent LC/MSD 이온 트랩 질량 분석기가 사용되었다. 샘플 용액을 상기 기재된 바와 같이 HPLC 샘플을 위해 제조했다. 각 샘플은 시린지 펌프를 이용하여 9 $\mu$ L/min으로 주입되었다. 질량 스펙트럼을 1분 동안 기록했다.

#### 실시예 4: 조사된 자기 조립 펩티드의 레올로지 특성

[0060] 샘플의 레올로지 특성은 40mm 콘 및 플레이트를 구비한 레오미터(DHR1, TA Instruments)를 사용하여 평가했다. 레오미터 플레이트에 펩티드 용액(700 $\mu$ L)을 놓고, 과잉의 용액을 금속 주걱으로 서서히 제거했다. 측정은 37°C에서 2분의 이완 시간 후에 수행했다.

[0061] 주파수 시험은 0.1Hz에서 10Hz로 0.1%의 변형률로 수행했다. 겔화 후 주파수 시험은 콘과 플레이트 주위에 DMEM 3mL를 서서히 첨가한 후 동일한 조건 하에서 20분간 수행했다.

[0062] 요변성 시험은 다음과 같은 방법으로 수행했다. 1000s<sup>-1</sup>의 전단 속도를 1분 동안 적용하여 모든 레올로지 특성을 재설정한 다음, 0.1% 변형률로 1Hz의 주파수를 60분 동안 적용하여 요변성 거동을 기록했다. 이 순서를 반복한 다음, 요변성을 분석했다.

#### 실시예 5: 외관 및 pH

[0064] 감마선 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 외관 및 pH는 도 1 및 표 1에 나타내어져 있다(N=3).

#### 표 1

감마선 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>(RADA16 2.5%)의 외관 및 pH.

시험 조건	외관	pH
<b>PuraStat<sup>®</sup> 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>23 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat<sup>®</sup></b>	투명하고 점성이 있음	2.3
<b>25 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat<sup>®</sup></b>	투명하고 점성이 있음	2.3
<b>28 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat<sup>®</sup></b>	투명하고 점성이 있음	2.3
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat<sup>®</sup></b>	투명하고 점성이 있음	2.3

[0065]

[0066] 감마선 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 외관 및 pH는 약간만 변경되었다. PuraStat<sup>®</sup> 대조군의 pH는 2.2였다. 23, 25, 28 및 40kGy로 감마선 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 pH는 2.3이었다.

[0067]

또한, 감마선 조사 후 IEIK13 1.3%의 외관 및 pH도 도 1 및 표 2에 나타내어져 있다.

**표 2**

감마선 조사 후 IEIK13 1.3%, KLD12 1.3% 및 QLEL12 0.15%의 외관 및 pH. (N=3)

시험 조건	외관	pH
<b>IEIK13 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>28 kGy로 조사된 (감마선) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0

[0068]

<b>KLD12 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) KLD12</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>QLEL12 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	7.0
<b>23 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.7
<b>25 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.5
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	5.9

[0069]

[0070] 감마선 조사 후 IEIK13(1.3%)의 외관 및 pH는 변경되지 않았다. IEIK13 대조군의 pH는 3.0이었다. 28kGy 및 40kGy로 감마선 조사 후 IEIK13(1.3%)의 pH는 3.0이었다.

[0071] 또한, 감마선 조사 후 KLD12(1.3%)와 QLEL12(0.15%)의 외관 및 pH도 표 2에 나타내었다. 감마선 조사 후 KLD12(1.3%)의 외관 및 pH는 변화가 없었다. KLD12 대조군의 pH는 2.2였다. 40kGy로 감마선 조사 후 KLD12(1.3%)의 pH는 2.2였다.

[0072] 그러나, 감마선 조사 후 QLEL12의 외관 및 pH가 크게 변경되었다. QLEL12 대조군의 pH는 7.0이었다. 23, 25 및 40kGy로 감마선 조사 후 QLEL12의 pH는 각각 6.7, 6.5 및 5.9였으며, 샘플은 감마선 조사 후 수상으로 되었다.

[0073] 또한, X선 및 전자빔 조사 후 PuraStat®의 외관 및 pH도 표 3에 나타내어져 있다(N=3).

**표 3**

X선 및 전자빔 조사 시험 후 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 외관 및 pH. (N=3)

시험 조건	외관	pH
<b>PuraStat® 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>25 kGy로 조사된 (X선) PuraStat®</b>	투명하고 점성이 있음	2.3
<b>40 kGy로 조사된 (X선) PuraStat®</b>	투명하고 점성이 있음	2.3
<b>25 kGy로 조사된 (전자빔) PuraStat®</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>40 kGy로 조사된 (전자빔) PuraStat®</b>	투명하고 점성이 있음	2.2

[0074]

[0075] X선 또는 전자빔 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 외관 및 pH는 약간만 변경되었거나 또는 변경되지 않은 상태로 유지되었다. PuraStat<sup>®</sup> 대조군의 pH는 2.2였다. 25kGy 및 40kGy로 X선 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 pH는 2.3이었다. 25kGy 및 40kGy로 전자빔 조사 후 PuraStat<sup>®</sup>의 pH는 2.2였다.

[0076] 또한, X선 또는 전자빔 조사 후 IEIK13 1.3%의 외관 및 pH도 표 4에 나타내어져 있다.

#### 표 4

X선 또는 전자빔 조사 후 IEIK13 1.3%의 외관 및 pH.(N=3)

시험 조건	외관	pH
<b>IEIK13 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>25 kGy 로 조사된 (X선) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>40 kGy 로 조사된 (X선) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>25 kGy 로 조사된 (전자빔) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0
<b>40 kGy 로 조사된 (전자빔) IEIK13</b>	투명하고 점성이 있음	3.0

[0077]

[0078] IEIK13 1.3%의 외관 및 pH는 X선 또는 전자빔 조사 후 변화가 없었다. IEIK13 1.3% 대조군의 pH는 3.0이었다. 28kGy 및 40kGy로 X선 또는 전자빔 조사 후 IEIK13 1.3%의 pH는 3.0이었다.

[0079] 또한, X선 또는 전자빔 조사 후 KLD12 1.3%의 외관 및 pH도 표 5에 나타내어져 있다.

#### 표 5

X선 또는 전자빔 조사 후 KLD12 1.3%의 외관 및 pH.(N=3)

시험 조건	외관	pH
<b>KLD12 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>25 kGy 로 조사된 (X선) KLD12</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>40 kGy 로 조사된 (X선) KLD12</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>25 kGy 로 조사된 (전자빔) KLD12</b>	투명하고 점성이 있음	2.2
<b>40 kGy 로 조사된 (전자빔) KLD12</b>	투명하고 점성이 있음	2.2

[0080]

[0081] KLD12 1.3%의 외관 및 pH는 X선 또는 전자빔 조사 후 변화가 없었다. KLD12 1.3% 대조군의 pH는 2.2였다. 25kGy 및 40kGy로 X선 또는 전자빔 조사 후 KLD12 1.3%의 pH는 2.2였다.

[0082] 또한, X선 또는 전자빔 조사 후 QLEL12 0.15%의 외관 및 pH도 표 6에 나타내어져 있다.

**표 6**

X선 및 전자빔 조사 후 QLEL12 0.15%의 외관 및 pH.(N=3)

시험 조건	외관	pH
<b>QLEL12 대조군</b>	투명하고 점성이 있음	7.0
<b>25 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.5

[0083]

<b>40 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	5.9
<b>25 kGy로 조사된 (X선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.3
<b>40 kGy로 조사된 (X선) QLEL12</b>	투명하고 수상임	5.9
<b>25 kGy로 조사된 (전자빔) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.6
<b>40 kGy로 조사된 (전자빔) QLEL12</b>	투명하고 수상임	6.5

[0084]

[0085] 감마선, X선 또는 전자빔 조사 후 QLEL12의 외관이 크게 변경되었다. QLEL12 대조군의 pH는 7.0이었다. 25 및 40kGy로 감마선 조사 후 QLEL12의 pH는 각각 6.5 및 5.9였으며, 25 및 40kGy로 X선 조사 후 pH는 각각 6.3 및 6.5였고, 25 및 40kGy로 전자빔 조사 후 pH는 각각 6.6 및 6.5였다. QLEL12 용액은 감마선, X선 또는 전자빔 조사 후에 수상이 되었다.

[0086]

요약하면, RADA16, IEIK13 및 KLD12는 약 25~40kGy로 감마선, X선 및 전자빔 조사 후에도 변화가 없었지만, QLEL12는 그렇지 않았다. 따라서, QLEL12와 달리 RADA16, IEIK13 및 KLD12는 감마선, X선 및 전자빔 조사 기술을 사용하여 멀균될 수 있다.

[0087]

#### 실시예 7: HPLC 및 질량 분석에 의한 특성화

[0088]

RADA16, IEIK13, 및 QLEL12에 대한 HPLC 시험은 감마선, X선 및 전자빔 조사 전후에 수행했으며, 이들의 주요 펩티드 함유율에 대한 결과를 표 7-10에 나타내었다.

**표 7**

감마선 조사 전후의 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주요 펩티드 함유율에 대한 HPLC 시험 (N=3, 평균±SD).

시험 조건	주요 펩티드 함유율 (%)
<b>PuraStat® 대조군</b>	78.3 ± 1.7
<b>23 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat®</b>	75.5 ± 1.4*
<b>25 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat®</b>	74.6 ± 0.7*
<b>28 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat®</b>	68.5 ± 0.5*
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) PuraStat®</b>	69.7 ± 0.5*

\*: PuraStat® 대조군의 데이터보다 유의하게 낮은 경우를 나타낸다  
(p < 0.05, 양측 스튜던트 t-검정).

[0089]

**표 8**

X선 및 전자빔 조사 전후의 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주요 펩티드 함유율에 대한 HPLC 시험. (N=3, 평균±SD)

시험 조건	주요 펩티드 함유율 (%)
<b>PuraStat® 대조군</b>	78.3 ± 1.7
<b>25 kGy로 조사된 (X선) PuraStat®</b>	73.8 ± 1.7*
<b>40 kGy로 조사된 (X선) PuraStat®</b>	71.9 ± 0.8*
<b>25 kGy로 조사된 (전자빔) PuraStat®</b>	76.0 ± 0.9*
<b>40 kGy로 조사된 (전자빔) PuraStat®</b>	70.0 ± 2.4*

\*: PuraStat® 대조군의 데이터보다 유의하게 낮은 경우를 나타낸다  
(p < 0.05, 양측 스튜던트 t-검정).

[0090]

표 9

감마선, X선 및 전자빔 조사 전후의 IEIK13 1.3%의 주요 펩티드 함유율에 대한 HPLC 시험(N=3, t 평균±SD).

시험 조건	주요 펩티드 함유율 (%)
<b>IEIK13 대조군</b>	99.6 ± 0.0
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) IEIK13</b>	99.8 ± 0.2
<b>25 kGy로 조사된 (X선) IEIK13</b>	99.8 ± 0.1
<b>40 kGy로 조사된 (X선) IEIK13</b>	99.9 ± 0.1
<b>25 kGy로 조사된 (전자빔) IEIK13</b>	99.6 ± 0.2
<b>40 kGy로 조사된 (전자빔) IEIK13</b>	99.8 ± 0.1

[0091]

표 10

감마선, X선 및 전자빔 조사 전후의 QLEL12 0.15%의 주요 펩티드 함유율에 대한 HPLC 시험 (N=3, 평균±SD).

시험 조건	주요 펩티드 함유율 (%)
<b>QLEL12 대조군</b>	90.5 ± 1.3
<b>40 kGy로 조사된 (감마선) QLEL12</b>	40.7 ± 3.1*
<b>25 kGy로 조사된 (X선) QLEL12</b>	57.0 ± 4.9*
<b>40 kGy로 조사된 (X선) QLEL12</b>	47.3 ± 1.3*
<b>25 kGy로 조사된 (전자빔) QLEL12</b>	51.9 ± 7.3*
<b>40 kGy로 조사된 (전자빔) QLEL12</b>	55.6 ± 3.0*

\*: QLEL12 대조군의 데이터보다 유의하게 낮은 경우를 나타낸다(p < 0.05, 양측 스튜던트 t-검정).

[0092]

[0093] RADA16 대조군의 주요 펩티드 함유율은 78.3%였다. 23, 25, 28 및 40kGy로 감마선 조사 후 RADA16의 주요 펩티드 함유율은 각각 75.5, 74.6, 68.5 및 69.7%였다. 25kGy와 40kGy로 X선 조사 후 RADA16의 주요 펩티드 함유율은 각각 73.8%와 71.9%였다. 25 및 40kGy로 전자빔 조사 후 RADA16의 주요 펩티드 함유율은 각각 76.0 및 70.0%였다.

[0094]

IEIK13 대조군의 주요 펩티드 함유율은 99.6%였다. 40kGy로 감마선 조사 후 IEIK13의 주요 펩티드 함유율은 99.8%였다. 25 및 40kGy로 X선 조사 후 IEIK13의 주요 펩티드 함유율은 각각 99.8% 및 99.9%였다. 25 및 40kGy로 전자빔 조사 후 IEIK13의 주요 펩티드 함유율은 각각 99.6 및 99.8%였다.

[0095]

QLEL12 대조군의 주요 펩티드 함유율은 90.5%였다. 그러나, QLEL12는 조사 멸균 후 주요 펩티드 함유율의 유의

한 감소를 나타냈다. 40kGy로 감마선 조사 후 QLEL12의 주요 펩티드 함유율은 40.7%였다. 25 및 40kGy로 X선 조사 후 QLEL12의 주요 펩티드 함유율은 각각 57.0 및 47.3%였다. 25 및 40kGy로 전자빔 조사 후 QLEL12의 주요 펩티드 함유율은 각각 51.9 및 55.6%였다. 이를 결과는 RADA16 및 IEIK13이 QLEL12와 비교하여 감마선, X선 및 전자빔 조사 후에도 상대적으로 변하지 않는다는 것을 입증한다.

[0096] RADA16의 측정된 분자량은 계산된 분자량과 일치하는 1712이 있다(도 2). 질량 분석은 RADA16이 감마선, X선 및 전자빔 조사 후 분해되지 않는다는 것을 입증했다(도 2-4). 그러나, RADA16은 고압멸균 처리 중에 완전히 분해되었다.

[0097] 조사는 고압멸균과 달리 저온 멸균 기술이다. 두 멸균 기술 모두 멸균 중에 RADA16과 같은 자기 조립 펩티드에 높은 에너지(즉, 방사선 및 열)를 제공하지만 조사 멸균은 RADA16 분자의 실질적인 분해를 유도하지 않았다.

[0098] 그러나, 모든 감마선, X-선 및 전자빔 조사된 PuraStat® 질량 스펙트럼은 조사 전에 관찰되지 않았던 일부 피크를 나타내었지만, 그들 사이에는 눈에 띄는 차이가 관찰되지 않았다. 질량 스펙트럼의 요약은 표 11에 나타내어져 있다.

### 표 11

조사 멸균 공정 후 PuraStat®의 질량 분석 데이터.

Mz	n=1 에서의 Mw	n=2 에서의 Mw	n=3 에서의 Mw	추정된 성분	대조군 PuraStat®*	조사된 PuraStat®#
502	501			ARADA-NH <sub>2</sub> (SEQ ID NO:5)	예	예
572			1712	Ac-(RADA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (서열번호 1)	예	예
665		1328		ARADARADARADA-NH <sub>2</sub> (서열번호 6)	예	예
836		1670		(RADA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (서열번호 7)	아니오	예
857			1712	Ac-(RADA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (서열번호 1)	예	예
916	915			ARADARADA-NH <sub>2</sub> (서열번호 8)	예	예
1100	1100			ADARADARADA-NH <sub>2</sub> (서열번호 9)	아니오	예

[0099]

1143	1142			ARADARADARA (서열목록 10)	예	예
1229	1228			Ac-RADARADARAD (서열목록 11)	예	예
1329	1328			ARADARADARADA-NH <sub>2</sub> (서열목록 6)	예	예
1513	1513			ADARADARADARADA-NH <sub>2</sub> (서열목록 12)	아니오	예
1643	1642			Ac-RADARADARADARAD (서열목록 13)	예	예
1670	1670			(RADA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (서열목록 7)	아니오	예
1713	1712			Ac-(RADA) <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> (서열목록 1)	예	예

\*: 약 4년 동안 2-8°C에서 저장됨

#: 모든 PuraStat® 샘플은 40kGy로 조사됨(감마선, X선 및 전자빔을 이용함)

#### [0100]

[0101] 대조군 PuraStat®은 572, 857 및 1713에서 M<sub>z</sub> 피크가 나타났고, 이는 주요 펩티드인 Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)에 할당되었다. 또한, 대조군 PuraStat®은 502, 665/1329, 916, 1143 및 1229에서 다른 M<sub>z</sub> 피크를 나타내었으며, 이는 ARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 5), ARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 6), ARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 8), ARADARADARA(서열번호 10), Ac-RADARADARAD(서열번호 11)로 각각 추정되었다.

#### [0102]

표 12는 PuraStat®이 약 4년 동안 2-8°C에서 저장시 Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)의 분해 패턴을 도시한다. 패턴으로부터, 우리는 분해가 주로 ~RAD와 A~ 사이의 지점에서 발생한다는 것을 발견했다.

#### [0103]

한편, 조사된 PuraStat®는 836/1670, 1100 및 1513에서 추가 M<sub>z</sub> 피크를 나타내었으며, 이는 (RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(서열번호 7), ADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 9), 및 ADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호: 12)로 각각 추정된다.

#### [0104]

표 13은 PuraStat®이 조사에 의해 멸균될 때, Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)의 추가 분해 패턴을 도시한다. 특히, 836과 1670의 피크는 RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 7)를 나타내는 주요 추가 피크 중 하나이다. 이는 조사가 아세틸군(Ac)과 RAD~ 사이의 지점에서 PuraStat®의 추가 분해를 야기할 수 있다는 것을 의미한다. 또한, 1100 및 1513의 피크는 ADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 9) 및 ADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 12)를 나타내는 주요 추가 피크 중 하나이다. 이는 조사가 ~R과 AD~ 사이의 지점에서 PuraStat®의 추가 분해를 야기할 수 있다는 것을 의미한다.

**표 12**

Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (서열번호 1)의 분해 패턴

(PuraStat®는 약 4년 동안 2-8°C에서 저장되었음)

---

Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 1) (분해 전)

Ac-RAD / ARADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 6)

Ac-RADARAD (서열번호 14) / ARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 8)

Ac-RADARADARAD (서열번호 11) / ARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 5)

Ac-RAD / ARADARADARA (서열번호 10) / DA-NH<sub>2</sub>

Ac-RADARADARADARAD (서열번호 13) / A-NH<sub>2</sub>

---

[0105]

**표 13**

PuraStat®을 조사를 이용하여 멸균시, Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>의 추가 분해 패턴

---

Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 1) (분해 전)

Ac / RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 7)

Ac-R / ADARADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 12)

Ac-RADAR (서열번호 14) / ADARADARADA-NH<sub>2</sub> (서열번호 9)

---

[0106]

[0107] 또한, IEIK13의 분자량은 계산된 분자량과 일치하는 1622에서 측정되었다(도 5). 질량 분석은 IEIK13이 감마선, X선 및 전자빔 조사 후에 비설체적으로만 분해되었음을 증명했다.

[0108] 또한, QLEL12의 물 질량은 계산된 물 질량과 일치하는 1506에서 측정되었다(도 6). 그러나, 질량 분석은 QLEL12가 감마선, X선 및 전자빔 조사 후 현저히 분해되었음을 증명했다.

[0109] 실시예 7: 레올로지 특성

[0110] ISO 11137(건강 관리 제품의 멸균 - 방사선)에 기반하여, 방사선 멸균 방법은  $10^{-6}$ 의 멸균 보증 수준(SAL)을 달성하는 멸균 선량으로서 25kGy 또는 15kGy 조사가 사용될 수 있다.

[0111] 겔화 전후에 감마선 조사 멸균한 PuraStat®에 대한 레올로지 결과는 도 7 및 8에 각각 나타내어져 있다. 결정된

레올로지 결과는 표 14-15에 나타내어져 있다.

#### 표 14

40mm 콘 플레이트를 이용하여 0.1% 변형률로 감마선을 조사한 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'			
	PuraStat® 대조군	23 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®	25 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®	40 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®
1	343.7	514.1	546.0	551.0
2	323.3	449.7	490.2	607.7
3	301.7	449.5	467.0	618.4
평균	322.9	471.1*	501.0*	592.4*\$
SD	21.0	37.2	40.6	36.2

\*: 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

\$: 다른 것과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

[0112]

[0113] 23kGy, 25kGy 및 40kGy로 감마선 조사된 PuraStat®는 PuraStat® 대조군보다 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다 (도 7 및 표 14). 40kGy로 감마선 조사된 PuraStat®는 23 및 25kGy로 감마선 조사된 PuraStat®보다 훨씬 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다. 또한, 25kGy로 감마선 조사된 PuraStat®는 23kGy로 감마선 조사된 PuraStat®보다 약간 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다. 이는 감마선 조사가 PuraStat®의 레올로지 특성에 긍정적인 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 23kGy( $471.1 \pm 37.2$ Pa), 25kGy( $501.0 \pm 40.6$ Pa) 및 40kGy( $592.4 \pm 36.2$ Pa)로 감마선 조사된 PuraStat®은 PuraStat® 대조군( $322.9 \pm 21.0$ Pa)과 비교하여 저장 탄성률이 각각 46%, 55% 및 83% 증가를 나타냈다.

## 표 15

겔화 후 감마선 조사된 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과.

샘플을 40mm 콘 플레이트를 이용하여 0.1% 변형률로 20분 동안 DMEM으로 처리했다.

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'			
	PuraStat® 대조군	23 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®	25 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®	40 kGy로 감마선 조사된 PuraStat®
1	4454	8866	6885	14568
2	5280	8845	10395	10286
3	5183	8622	10148	12134
평균	4972	8711*	9143*	12330*
SD	451	135	1959	2148

\*: 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

\$: 다른 것과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

[0114]

[0115] 또한, 모의 체액(즉, DMEM 버퍼)에 의해 20분 동안 겔화를 촉발한 후, 23kGy( $8711 \pm 135$ Pa), 25kGy( $9143 \pm 1959$ Pa) 및 40kGy( $12330 \pm 2148$ )로 감마선 조사된 PuraStat®은 PuraStat® 대조군( $4972 \pm 451$ Pa)과 비교하여 저장 탄성률이 각각 75%, 84% 및 148% 증가를 나타냈다(도 8 및 표 11).

[0116]

겔화 전과 후에 X선 조사 멀균된 PuraStat®에 대한 레올로지 결과는 각각 표 16 및 17에 나타내어져 있다.

**표 16**

40mm 콘 플레이트를 이용하여 0.1% 변형률로 X선 조사한 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'		
	PuraStat® 대조군	25 kGy로 X선 조사된 PuraStat®	40 kGy로 X선 조사된 PuraStat®
1	343.7	448.3	610.2
2	323.3	429.3	632.5
3	301.7	471.7	578.9
평균	322.9	449.8*	607.2*,\$
SD	21.0	21.2	27.0

\*: 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

\$: 다른 것과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

[0117]

[0118] 또한, 25kGy 및 40kGy로 X선 조사된 PuraStat®도 PuraStat® 대조군보다 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다. 40kGy로 X선 조사된 PuraStat®은 25kGy로 X선 조사된 PuraStat®보다 훨씬 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다. 이는 X선 조사가 PuraStat®의 레올로지 특성에 긍정적인 영향을 미쳤다는 것을 나타낸다. 25kGy( $449.8 \pm 21.2$ ) 및 40kGy( $607.2 \pm 27.0$ Pa)로 조사된 PuraStat®은 PuraStat® 대조군( $322.9 \pm 21.0$ Pa)과 비교하여 저장 탄성률이 각각 39% 및 88% 증가를 나타냈다(표 17).

## 표 17

겔화 후 X선 조사된 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과.  
샘플을 40mm 콘 플레이트를 사용하여 0.1%의 변형률로 20분 동안 DMEM으로 처리했다.

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'		
	PuraStat® 대조군	25 kGy로 X선 조사된 PuraStat®	40 kGy로 X선 조사된 PuraStat®
1	4454	9563	12832
2	5280	6404	10611
3	5183	9522	10294
평균	4972	8497*	11246*
SD	451	1812	1383

\*: 대조군과 비교하여  $p < 0.05$ 인 경우를 나타낸다(양측 스튜던트 t-검정).

[0119]

[0120] 또한, 20분 동안 모의 체액(즉, DMEM 버퍼)에 의해 겔화가 촉발된 후, 25kGy( $8497 \pm 1812$ Pa) 및 40kGy( $11246 \pm 1383$ Pa)로 X선 조사된 PuraStat®은 PuraStat® 대조군( $4972 \pm 451$ Pa)과 비교하여 그 저장 탄성률이 각각 71% 및 126% 증가를 나타냈다.

[0121] 겔화 전후에 전자빔 조사 멸균된 PuraStat®에 대한 레올로지 결과는 표 18 및 19에 각각 나타내어져 있다.

## 표 18

40mm 콘 플레이트를 이용하여 0.1% 변형률로 전자빔 조사된 PuraStat®(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과.

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'		
	PuraStat® 대조군	25 kGy로 전자빔 조사된 PuraStat®	40 kGy로 전자빔 조사된 PuraStat®
1	343.7	348.1	349.6
2	323.3	356.1	371.5
3	301.7	324.0	338.4
평균	322.9	342.7	353.2
SD	21.0	16.7	16.8

[0122]

[0123] 그러나, 25kGy 및 40kGy로 전자빔 조사된 PuraStat<sup>®</sup>은 PuraStat<sup>®</sup> 대조군과 비교하여 저장 탄성률에서 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 전자빔 조사 멀균이 PuraStat<sup>®</sup>의 레올로지 특성에 큰 영향을 미치지 않는다는 것을 나타낸다. 그러나, p값은 통계적 유의성을 나타내지 않았지만(즉,  $p > 0.05$ ), 25kGy( $342.7 \pm 16.7\text{Pa}$ ) 및 40kGy( $353.2 \pm 16.8\text{Pa}$ )로 X선 조사된 PuraStat<sup>®</sup>은 PuraStat<sup>®</sup> 대조군( $322.9 \pm 21.0\text{Pa}$ )과 비교하여 그 저장 탄성률이 각각 6% 및 9% 증가를 각각 나타냈다(표 18).

### 표 19

겔화 후 전자빔 조사된 PuraStat<sup>®</sup>(RADA16 2.5%)의 주파수 시험 결과.

샘플을 40mm 콘 플레이트를 사용하여 0.1% 변형률로 20분 동안 DMEM으로 처리했다.

샘플 #	1Hz (Pa)에서의 저장 탄성률 G'		
	PuraStat <sup>®</sup> 대조군	25 kGy로 전자빔 조사된 PuraStat <sup>®</sup>	40 kGy로 전자빔 조사된 PuraStat <sup>®</sup>
1	4454	3623	4918
2	5280	4830	9327
3	5183	3542	7875
평균	4972	4007	7373
SD	451	715	2247

[0124]

[0125] 20분 동안 모의 체액(즉, DMEM 벼퍼)에 의해 겔화가 촉발된 후, 25kGy 및 40kGy로 전자빔 조사된 PuraStat<sup>®</sup>은 PuraStat<sup>®</sup> 대조군과 비교하여 그 저장 탄성률의 유의한 차이를 나타내지 않았다(즉, p값이 0.05보다 높음)(표 19).

[0126] PuraStat<sup>®</sup>은 높은 전단 속도에서의 전단 박화(shear thinning) 특성 및 고전단이 중단되었을 때 느린 레올로지 특성 회복을 시사하는 요변성 거동을 증명했다(도 9). PuraStat<sup>®</sup>의 이들 특성으로부터, PuraStat<sup>®</sup>의 강성은 환자에게 적용하는 동안 더욱 용이한 취급을 위해 낮아질 수 있고, 그 후 강성은 적용 후 서서히 초기값으로 회복될 수 있다. PuraStat<sup>®</sup>의 이들 고유 요변성 특성은 23 및 25kGy로 감마선 조사 후에도 변하지 않았던 반면, 조사된 PuraStat<sup>®</sup>은 PuraStat<sup>®</sup> 대조군보다 더 높은 저장 탄성률을 나타냈다.

[0127] HPLC 및 질량 분석법의 결과를 고려하면, 웨티드의 분자 구조는 실질적으로 변하지 않았기 때문에, 웨티드의 조립된 나노섬유질 구조가 레올로지 특성을 높이는 요인일 수 있다. 자기 조립 웨티드 용액의 레올로지 특성은 자기 조립 웨티드 구조가 보다 조직화되는 경우 증가할 수 있었다. 비결합 이론에 따르면, 조사로부터의 높은 에너지는 보다 조직화된 나노섬유질 구조를 갖도록 웨티드 분자를 약간 이동시켜서, 레올로지 특성이 개선되게 할 수 있다.

[0128] 증가된 레올로지 특성은 반복되는 고 전단가공에 의해 적어도 부분적으로 역전되었고, 본래의 수준에 근접하게 되돌아왔다.  $1000\text{s}^{-1}$ 에서 1분 동안 2회 완전히 전단가공한 후, 23kGy 및 25kGy로 조사된 PuraStat<sup>®</sup> 샘플은 저장 탄성률이 각각 484.5Pa에서 410.9Pa로 및 514.3Pa에서 426.5Pa로 점진적인 감소를 각각 나타낸 반면, PuraStat

<sup>®</sup> 대조군은 저장 탄성률에서 현저한 변화를 보이지 않았다(도 9). 조사된 PuraStat<sup>®</sup>의 레올로지 특성은 더욱 전 단가공으로 PuraStat<sup>®</sup> 대조군의 레올로지 특성에 더욱 가까워질 것으로 예상할 수 있다. 따라서, 감마선 조사는 자기 조립 나노섬유의 구조를 향상시켜서, 펩티드 분자 구조의 분해 또는 가교의 감지 가능한 변화 없이 레올로지 특성이 증가한다.

#### [0129] 실시예 8: 바이오버든 시험

A. 샘플의 수집. 조사 시 다음과 같이 50개의 샘플을 수집했다: 패키지 내부에 바이오버든 시험을 위한 10개의 샘플(패키징 작업의 초반에는 4개, 중반 및 후반에는 각각 3개를 수집함); 시린지 내의 충전 액체의 바이오버든 시험을 위한 샘플 10개(패키징 작업의 초반에는 4개, 중반 및 후반에는 각각 3개를 수집함); 추가 시험이 필요로 될 수 있는 경우에 수집될 수 있는 여분의 샘플(예: 30개의 샘플)

B. 멸균 검증을 위한 생존 세균 수 시험. 샘플을 클린 벤치 내에서 무균적으로 준비하고, 사용할 모든 기구와 용매를 멸균시켰다.

블리스터 패키징된 제품의 경우, 하나의 밀봉된 패키지에 대해 하기 절차를 2회 반복하여 총 100mL의 샘플 용액을 제조했다. 멸균 시험용 린스액(USP 유체 D) 50mL를 패키지 내부에 시린지를 사용하여 주입했다. 샘플을 충분히 쉐이킹하고, 기포를 줄이기 위해 방치했다. 그 다음, 패키지의 외부 개구를 내용물을 가열하지 않고 개구에 화염을 가볍게 통과시켜 멸균시켰다. 그 다음, 시린지 또는 다른 적합한 방법을 사용하여 패키지로부터 주입된 용액을 모두 추출한 다음, 내열 병에 수집했다. 고초균(Bacillus subtilis(NBRC3134))과 같은 표준 균주로부터 정제한 포자를 약 100CFU 함유하는 밀봉된 블리스터 패키지를 이용하여, 회수율과 회수율에 기반한 보정 계수를 상기와 동일한 방법으로 준비된 샘플로부터의 생존 세균 수 및 첨가된 세균 수로부터 미리 계산했다. 보정 계수는 1/회수율(%)×100으로 계산했다. 이 보정 계수는 샘플 준비 절차가 변경되었을 경우 다시 계산했다.

내용물 유체를 시험하기 위해, 내용물 용액 1mL를 대두-카제인 소화 배지 한천배지(SCD 한천배지) 9mL와 혼합하고, 젤을 미세하게 분산시켜 샘플 용액 10mL를 제조했다.

블리스터 패키지 제품의 경우, 배양 배지당 100mL의 샘플 용액을 사용했고, 일본 약전 미생물 한도 시험의 멤브레인 필터 방법을 사용하여 시험을 수행했다.

내용물 유체의 시험은 배양배지당 1mL의 샘플 용액을 일본 약전 미생물 한도 시험의 한천 평판 희석법을 이용한 시험을 행한다. 이 시험을 10회 반복하여 샘플 용액 10mL에 해당하는 10개의 배양 배지 플레이트를 얻었다.

배양물은 SCD 한천 배지에서 3-5일(또는 그 이상) 동안 30°C-35°C에서 유지했다. 원칙적으로, 배양 기간 동안 및 최종 측정일에 매일 적어도 1회 배양을 관찰했다.

배양 완료 후, SCD 한천 배지의 콜로니의 실제 측정값을 다음 계산에 의해 변환했다.

(1) 블리스터 패키지 제품의 경우

블리스터 패키지의 생존 세균 수 = 샘플 액체 100mL 중의 생존 세균 수 × 보정 계수

(2) 내용물 유체의 경우

내용물 액체 1mL 중 생존 세균 수 = 샘플 용액과 동일한 10mL 중의 총 생존 세균 수(배양 배지 플레이트 10개)

비고 : 내용물 유체에 대한 시험 방법 중에서, 계산에 사용된 SIP(앨리퀴트)의 값은 1/5 = 0.2로 결정되었고, 내용물 액체 1mL에 상당하는 시험 방법에 의해 5mL 제품을 시험했을 때의 총량은 아니었다. \*SIP(샘플 아이템 일부)는 앤리퀴트(시험에 사용되는 의료 제품의 규정된 일부)에 상당한다.

#### [0143] 실시예 9: 감마선 조사에 의한 PuraStat<sup>®</sup> 멸균의 실험 설계

조사 조건 -- PuraStat<sup>®</sup> 샘플(Lot# 17C09A30)에 Gammacell 220<sup>®</sup> High Dose Rate Co-60 조사기(MDS Nordion, 캐나다 오타와주)를 사용하여 25, 28 및 40kGy으로 감마선을 조사했다. 40kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 6.30kGy/hr 및 6시간 20분 58초였다. 28kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 4.40kGy/hr 및 6시간 22분 31초였다. 25kGy 조사에 대한 실행 선량률 및 지속 시간은 각각 6.58kGy/hr 및 3시간 47분 42초였다.

- [0145] 방법 및 시험 결과: 각 시험 후 PuraStat<sup>®</sup>의 외관을 관찰했다. PuraStat<sup>®</sup>의 pH는 Accumet AB15 pH 측정기 (Fisher Scientific)를 사용하여 시험했다. 조사 시험 후, 주요 케პ티드 함유율을 평가하기 위해 HPLC 시험을 수행했다. 이 연구에는 Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)이 사용되었다. 컬럼 온도는 25°C로 유지되었다.
- [0146] 용매 A는 0.1% TFA가 포함된 물이고, 용매 B는 0.1% TFA가 포함된 80% 아세토니트릴이었다. 용매 B의 구배는 25 °C에서 20분 내에 10%에서 40%로, 또 다른 5분 동안 40%로 조절되었다. 이 시험에는 Agilent Zorbax 300SB-C18 컬럼(4.6mm×250mm, 5μm, 300 Å)이 사용되었다. PuraStat<sup>®</sup>(RADA16 2.5%)(40mg)을 10 μL의 DH<sub>2</sub>O 및 500 μL의 포름산과 혼합하고, 와류시켰다. 그리고, 혼합물을 DH<sub>2</sub>O(4,450 μL)와 혼합하고, 와류시켰다. 20 μL의 샘플을 Agilent 오토샘플러를 사용하여 주입했다.
- [0147] 조사 멸균 후 케პ티드의 분해를 조사하기 위해 질량 분석 시험을 수행했다. 이 연구에는 Agilent LC/MSD 이온 트랩 질량 분석기가 사용되었다. 샘플 용액은 HPLC 샘플에 대해 상기 기재된 바와 같이 제조했다. 각 샘플을 시린지 펌프로 9 μL/min으로 주입했다. 질량 스펙트럼을 1분 동안 기록했다. MS-트레이스는 도 10에 도시되어 있다. PuraStat<sup>®</sup>(Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>)(서열번호 1)의 분자량은 1712이며, 이는 대조군 및 조사된 PuraStat<sup>®</sup> 샘플의 모든 스펙트럼에 있어서 m/z=572, m/z=857, 및 m/z=1713의 주요 3개의 피크로부터 계산된 분자량과 일치한다.
- [0148] Ac-RADARADARADARADA-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)에 할당된 피크는,
- [0149] M/z = 572 = (Mw +3)/3이므로, 계산된 Mw = 1713
- [0150] M/z = 857 = (Mw +2)/2이므로, 계산된 Mw = 1712
- [0151] M/z = 1713 = Mw +1이므로, 계산된 Mw = 1712
- [0152] 감마선 멸균 전후의 PuraStat<sup>®</sup> 샘플의 레올로지 특성을 37°C에서 레오미터(Discovery HR 1, TA Instruments)를 사용하여 평가했다. 흐름 시험은 37°C에서 0.001 1/sec~3,000 1/sec의 전단 속도 범위에서 20mm 플레이트-플레이트 기하학적 구조 및 800μm 갭 거리로 수행했다. 샘플 용액(350 μL)을 레오미터 플레이트에 놓고, 과잉의 용액을 서서히 제거했고; 측정은 37°C에서 2분의 이완 시간 후에 수행했다. 점도(h)는 매우 낮은 전단 속도(0.001 1/초)에서 높은 전단 속도(3000 1/초)로 기록했다.
- [0153] 조사된 PuraStat<sup>®</sup>의 세포독성을 조사하기 위해 L929 뉴트럴 레드 흡수 시험을 행했다. 이들 시험은 미국 매사추세츠주 베드포드에 소재하는 Toxikon에 의해 수행되었다. 이 연구는 ISO 10993-5, 2009, 의료 기기의 생물학적 평가 - 파트 5: 시험관 세포독성의 시험 및 ISO 10993-12, 2012, 의료 기기의 생물학적 평가 - 파트 12: 샘플 준비 및 참조 재료를 기반으로 행했다. 시험 물품 추출물에 반응하는 포유동물 세포 단층, L929 마우스 섬유아세포의 생물학적 반응성을 측정했다. 시험 물품 추출물은 mL당 물품 0.2g의 비율로 혈청 보충 최소 필수 배지 (MEM)를 사용하여 얻었다. 추출은 37±1°C에서 24±2시간 동안 행했다. 시험 시스템의 적절한 기능을 확인하기 위해, 양성 대조군(천연 고무) 및 음성 대조군(음성 대조군 플라스틱) 물품과 미처리 대조군(블랭크)을 준비했다. 세포 배양의 보존 배지를 대체하기 위해 시험 물품 추출물 및 대조군 물품 추출물을 사용했다. 시험 물품 추출물은 100%(순수) 농도에서 시험되었다. 모든 배양물을 24시간~26시간 동안 37±1°C에서, 5±1% 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)를 포함하는 가습 분위기 하에서 적어도 6회 반복하여 인큐베이션했다. 추출물에의 노출 후 세포의 생존력은 필수 염료인 뉴트럴 레드를 흡수하는 능력을 통해 측정했다. 이 염료가 생존 세포에 활발히 통합되도록 세포에 첨가했다. 생존 세포의 수는 추출 후 540nm에서의 측광에 의해 결정된 색상 강도와 상관관계가 있다.
- [0154] 음성 대조군 물품 추출물 및 양성 대조군 물품 추출물에 노출된 세포의 생존력은 어세이의 유효성을 확인하기 위해서는 각각 미처리 대조군의 70% 이상 및 70% 미만이어야 할 필요가 있다. 생존력 %가 미처리 대조군의 70% 이상일 경우, 시험 물품은 시험의 필요조건을 충족한다.
- [0155] 우리는 가장 높은 선량(즉, 40kGy)으로 조사된 PuraStat<sup>®</sup> 샘플만을 조사된 샘플 모두를 대표하는 것으로 간주하고, 시험했으며, 그 이유는 만약 그렇다면 더 낮은 선량으로 조사된 것보다 세포 독성에 더 많은 영향을 미치기 때문이다.

## 표 20

## 조사 멸균 시험의 요약표

시험 조건	외관	pH	HPLC 및 MS	레올로지	세포독성
PuraStat® (대조군)	투명하고 점성이 있음	2.2	대조군	대조군	독성 없음
25kGy의 감마선을 사용한 PuraStat®	투명하고 점성이 있음	2.3	~5% 분해	-	-
25kGy 또는 40kGy의 감마선을 사용한 PuraStat®	투명하고 점성이 있음	2.3	~15% 분해	등가	독성 없음

[0156]

[0157] 조사 전 웨티드의 양. 최대 25kGy의 조사 후, PuraStat®의 분해는 조사 전 웨티드 양의 5%를 초과하지 않았다.

[0158]

대조군 PuraStat®의 분해 패턴으로부터, 우리는 주로 ~RAD와 A~ 사이의 지점에서 분해가 발생한다는 것을 발견했다. PuraStat®을 조사 멸균하는 경우, Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>(서열번호 1)의 추가 분해 패턴으로부터, 우리는 조사가 ~R과 AD~ 사이의 지점에서 추가 분해를 일으킬 수 있다는 것을 발견했다.

[0159]

전반적으로, 감마선을 조사한 PuraStat®의 레올로지 특성은 PuraStat® 대조군과 동일했다. 조사된 모든 PuraStat® 및 PuraStat® 대조군 샘플은 시험의 필요조건을 충족하며, 잠재적인 세포독성을 갖는다고 생각되지 않는다.

## 표 21

### 2개의 제품 형태에 대한 HPLC 및 LC-MS 분석

각 피크에서의 HPLC 및 LCMS 결과									
PuraStat® 현재의 제품 (미조사)					PuraStat® 제안된 제품 (조사)				
HPLC				LC-MS	HPLC				LC-MS
피크	t <sub>R</sub>	면적	면적 %	대표적인 m/z	피크	t <sub>R</sub>	면적	면적 %	대표적인 m/z
1	6.37	25.70	4.39	1329(666)	1	6.35	8.20	1.90	1329(666)
2	6.73	8.49	1.44	1229(615)	2	6.73	2.90	0.67	1229(615)
3	7.15	9.98	1.71	1300(651)	3	7.27	12.00	2.78	1143(572)
4	7.30	9.29	1.59	1143(572) 893	4	7.56	2.29	0.53	1671(836)
5	7.75	4.75	0.81	1671(836), 1713(857)	5	7.71	2.34	0.54	1671(836)
6	8.01	7.49	1.28	1713(857), 750	6	7.90	7.62	1.77	1671(836), 1713(857)
7	8.18	6.95	1.19	1643(823), 1713(857)	7	8.16	4.06	0.94	1643(823), 1713(557), 1513
8	8.29	2.15	0.36	1643(823), 1713(857)	8	8.27	7.95	1.84	1643(823), 1713(557), 1513
9	8.45	473.23	80.80	1713(857)	9	8.47	348.78	80.89	1713(857)
10	8.80	11.89	2.03	1557, 783, 857	10	8.77	12.95	3.00	1557, 783
11	8.93	4.54	0.77	783, 857	11				
12	9.06	4.85	0.82	839, 1713(857)	12	9.00	10.46	2.43	839, 1713(857)
13	10.00	16.26	2.77	482, 839, 891	13	9.96	11.61	2.69	839, 482

[0160]

[0161] 하기 표 21은 감마선 조사 전(대조군)과 후의 주요 펩티드 함유율을 평가하기 위해 HPLC 시험을 수행한 결과를 나타낸다.

[0162] 이 연구에는 Agilent HPLC 1100(Agilent Technologies)이 사용되었다. 컬럼 온도는 25°C로 유지되었다. Agilent Zorbax 300SB-C18 컬럼(4.6mm×250mm, 5mm, 300Å)이 이 시험에 사용되었다. 용매 A는 0.1% TFA가 포함된 물이고, 용매 B는 0.1% TFA가 포함된 80% 아세토니트릴이었다. 용매 B의 구배는 25°C에서 20분 내에 10%에서 40%로, 또 다른 5분 동안 40%로 조절되었다. PuraStat®(40mg)을 10 μL의 DH<sub>2</sub>O 및 500 μL의 포름산과 혼합하고, 와류시켰다. 그리고, 혼합물을 DH<sub>2</sub>O(4,450 μL)와 혼합하고, 와류시켰다. Agilent 오토샘플러를 사용하여 샘플 20 mL를 주입했다. 결과를 하기 표 23에 나타내었다.

## 표 22

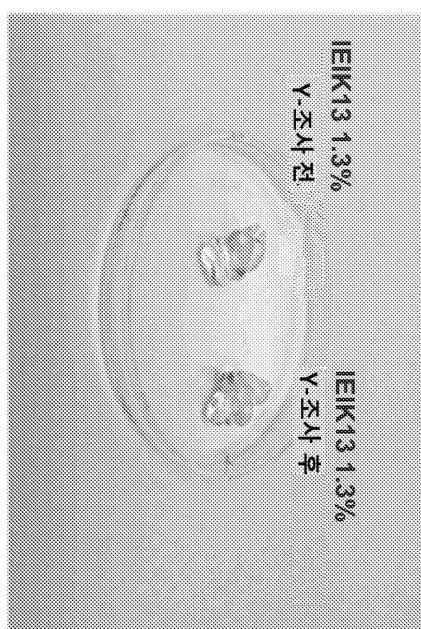
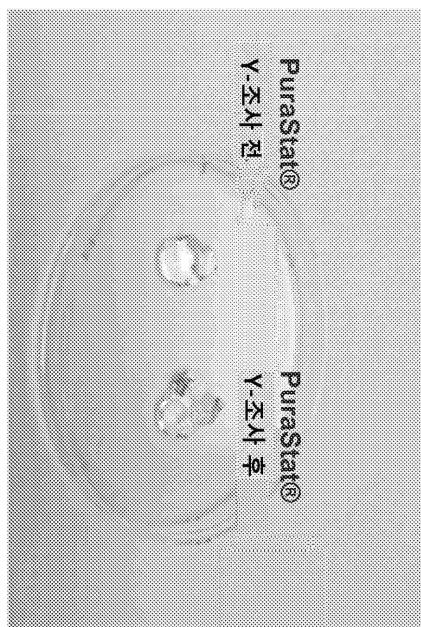
	PuraStat® 대조군	25 kGy 이상으로 조사된 PuraStat®
주요 펩티드 함유율 (n=3)	83,8 +/- 1%	81,3 +/- 0,7%
제조 사양	75% 이상	

[0163]

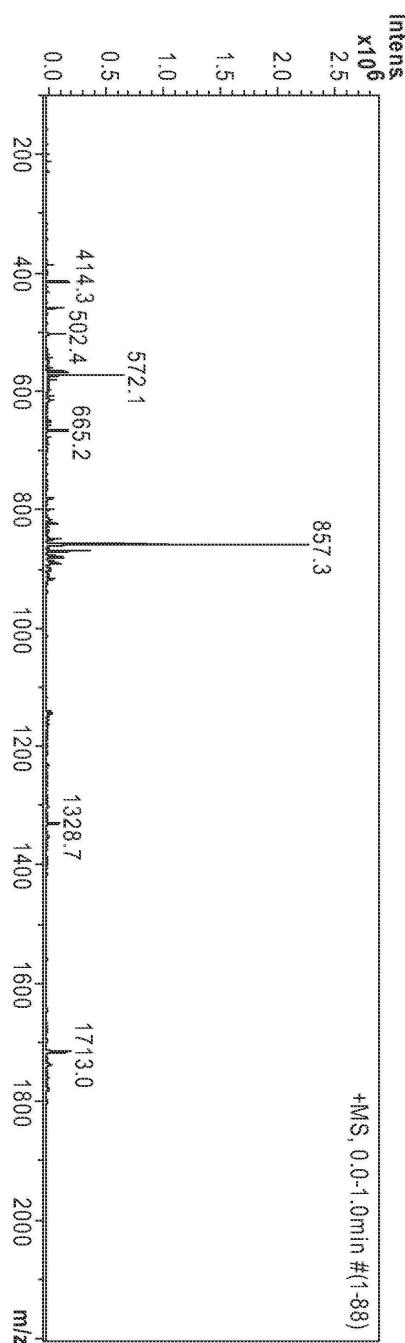
- [0164] 결과--전반적으로, PuraStat<sup>®</sup>의 주요 웨티드 함유율은 감마선 조사 방법으로 감소했으며, 감소 정도는 더 높은 선량에서 더욱 현저했다. 최대 40kGy의 조사 후, PuraStat<sup>®</sup>의 분해는 전체의 15%를 초과하지 않았다. PuraStat<sup>®</sup>의 주요 웨티드 함유율은 감마선 조사 방법으로 감소했으며, 감소 정도는 더 높은 선량에서 더욱 현저했다. 최대 40kGy의 조사 후, PuraStat<sup>®</sup>의 분해는 조사 전 웨티드 양의 15%를 초과하지 않았다. 최대 25kGy 조사 후, PuraStat<sup>®</sup>의 분해는 조사 전 웨티드 양의 5%를 초과하지 않았다.
- [0165] 대조군 PuraStat<sup>®</sup>의 분해 패턴으로부터, 우리는 주로 ~RAD와 A~ 사이의 지점에서 분해가 발생한다는 것을 발견했다. PuraStat<sup>®</sup>을 조사 멸균하는 경우의 Ac-(RADA)<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>의 추가 분해 패턴으로부터, 우리는 조사가 ~R과 AD~ 사이의 지점에서 추가 분해가 일어날 수 있다는 것을 발견했다.
- [0166] 전반적으로, 감마선을 조사한 PuraStat<sup>®</sup>의 레올로지 특성은 PuraStat<sup>®</sup> 대조군과 동일했다. 모든 조사된 PuraStat<sup>®</sup> 및 PuraStat<sup>®</sup> 대조군 샘플은 시험 필요조건을 충족했으며, 잠재적인 세포독성을 갖고 있다고 생각되지 않았다.

도면

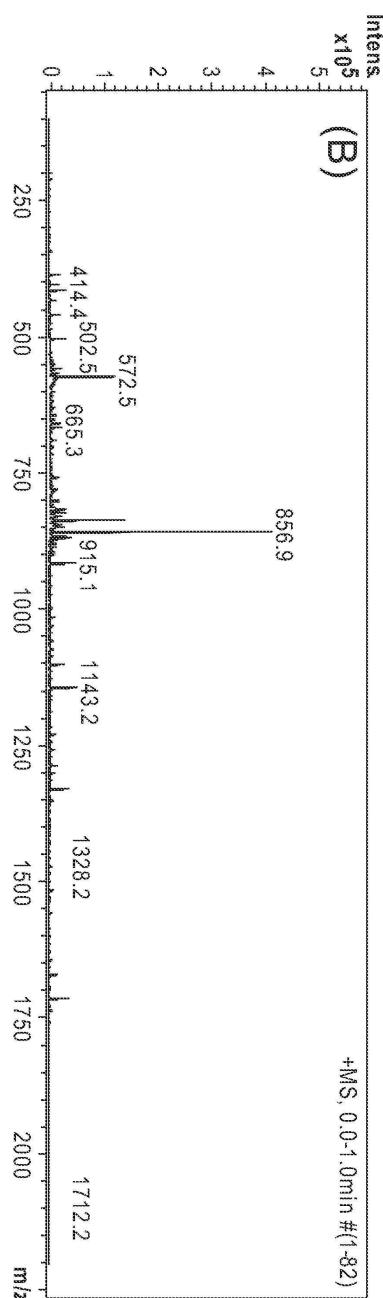
도면1



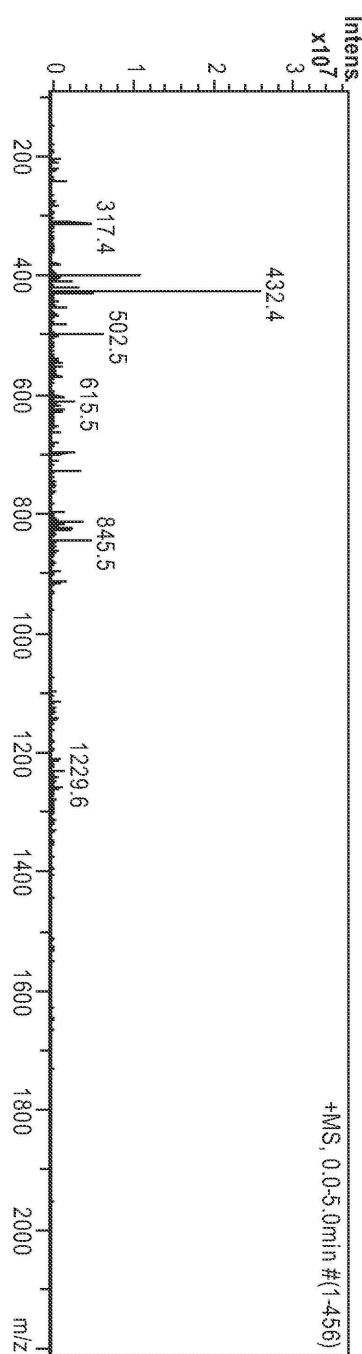
도면2a



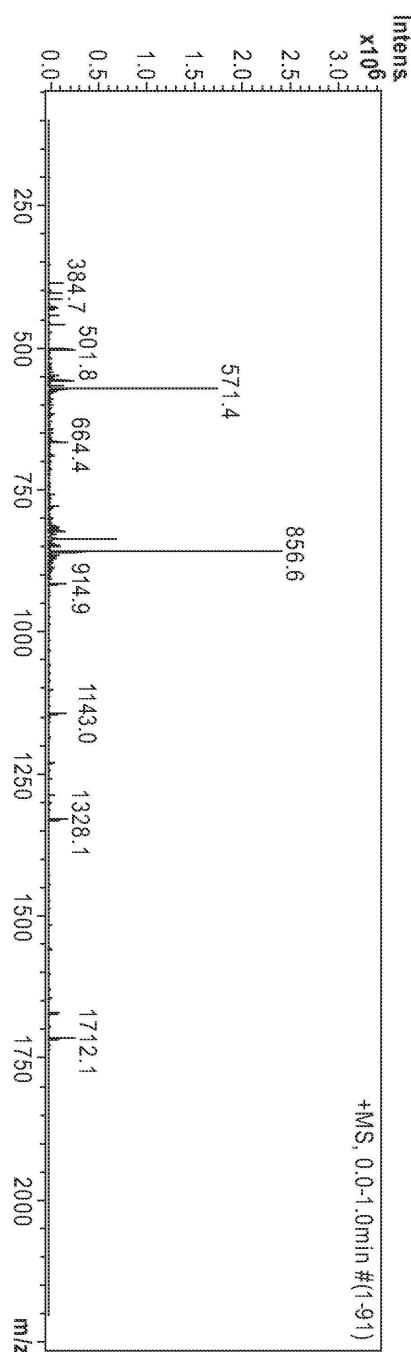
도면2b



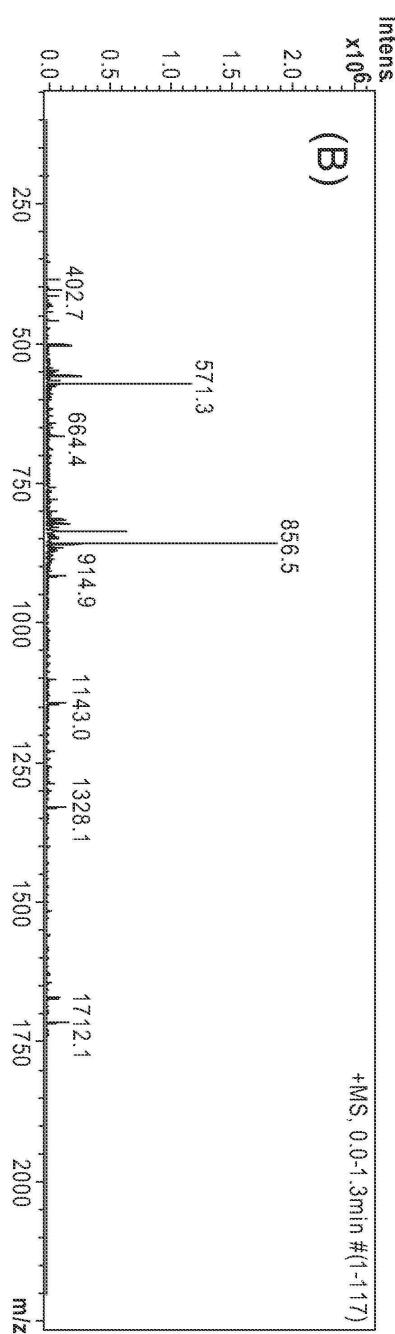
도면2c



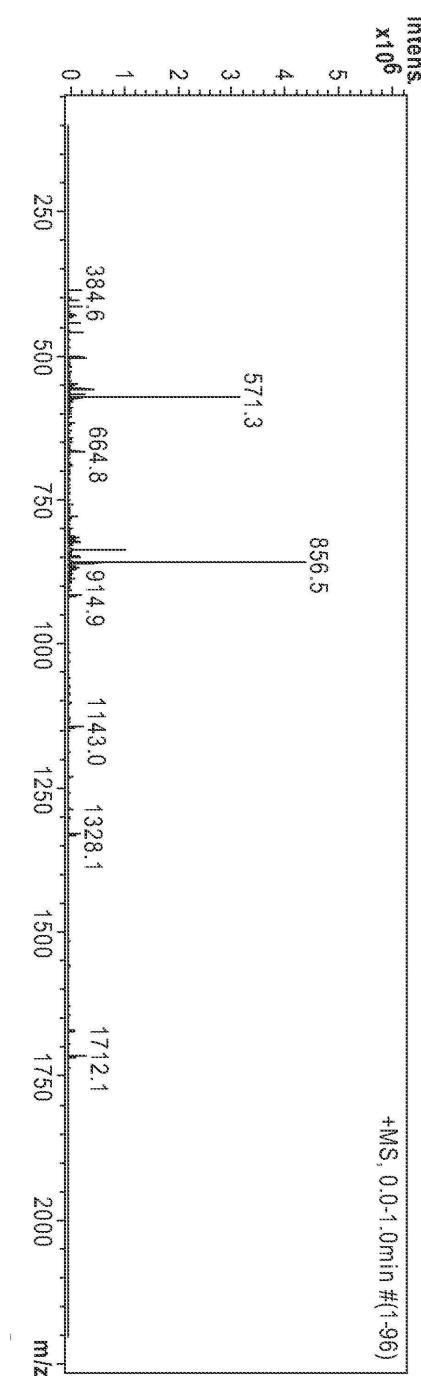
도면3a



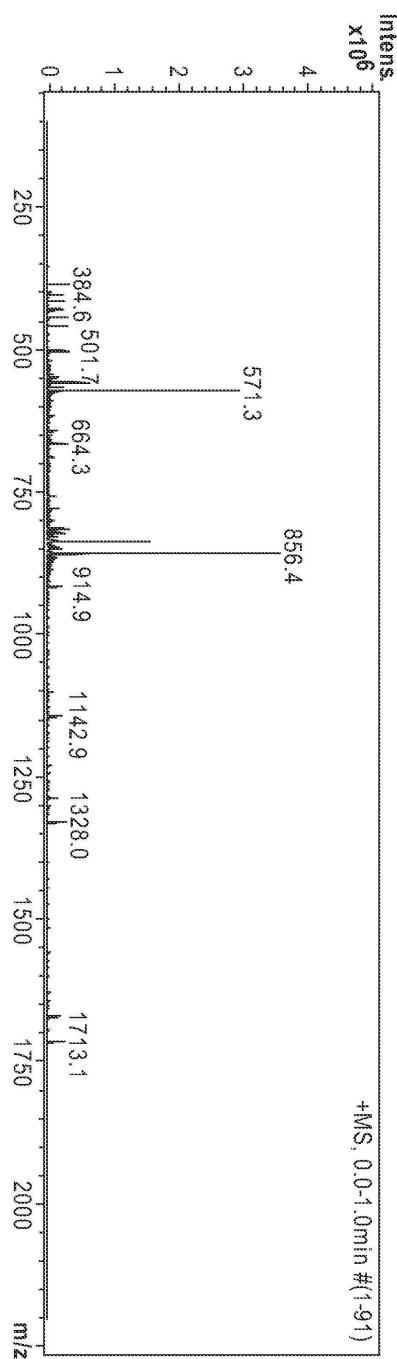
도면3b



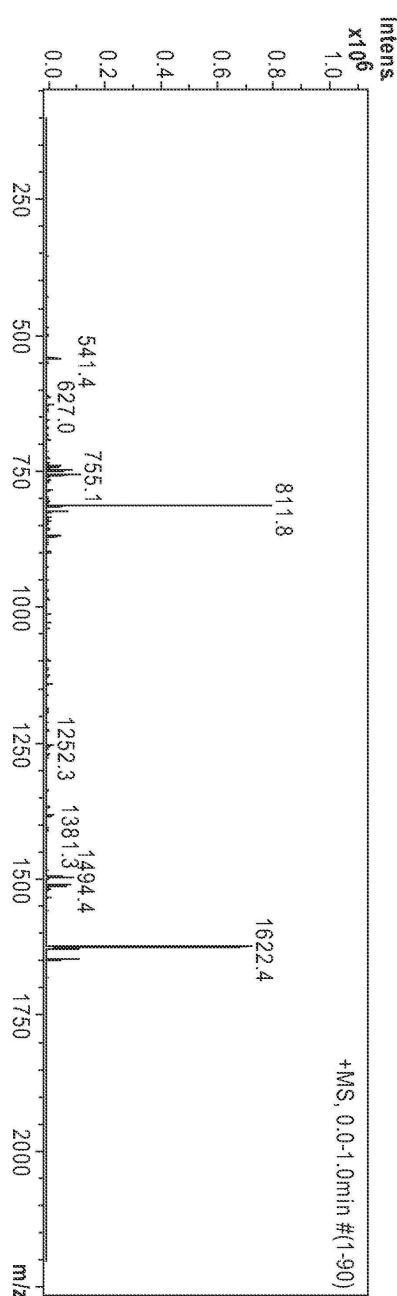
도면4a



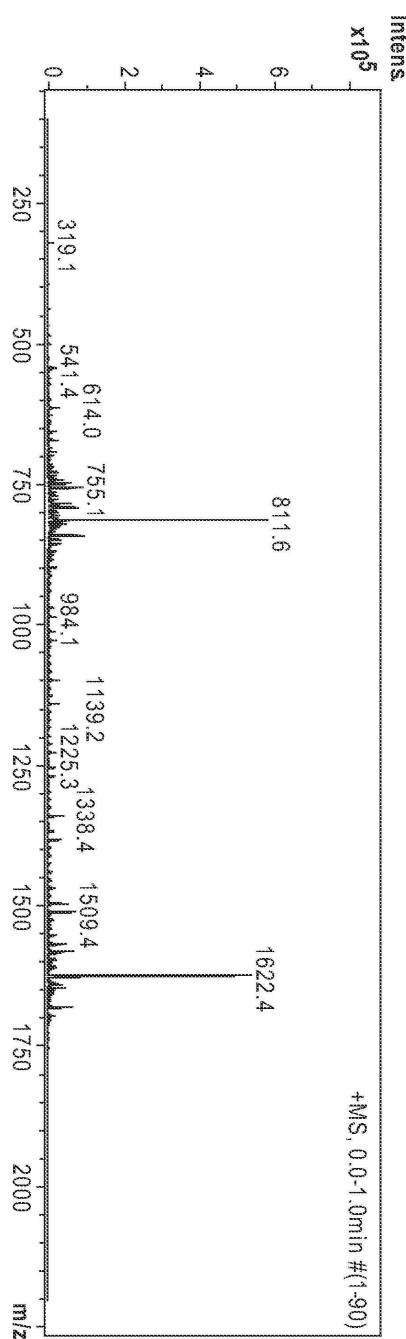
도면4b



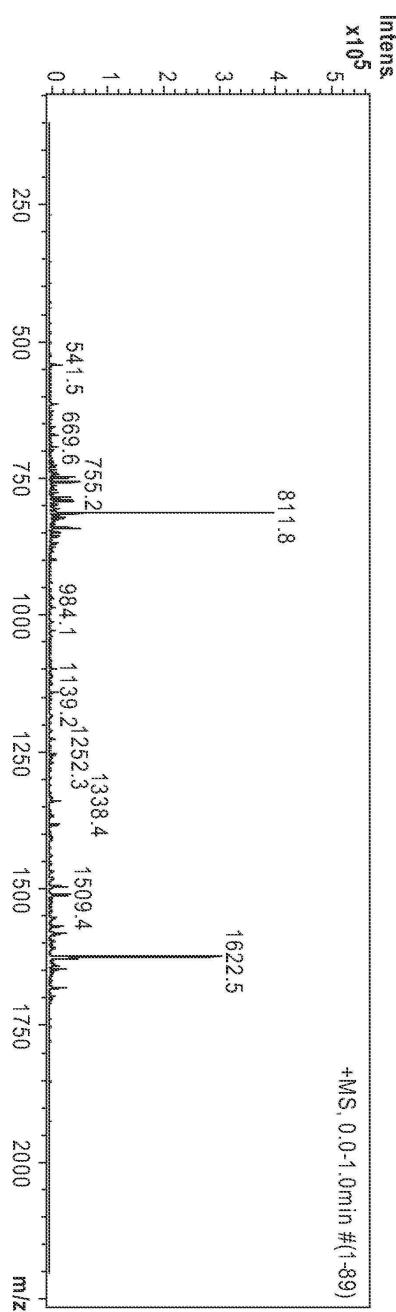
도면5a



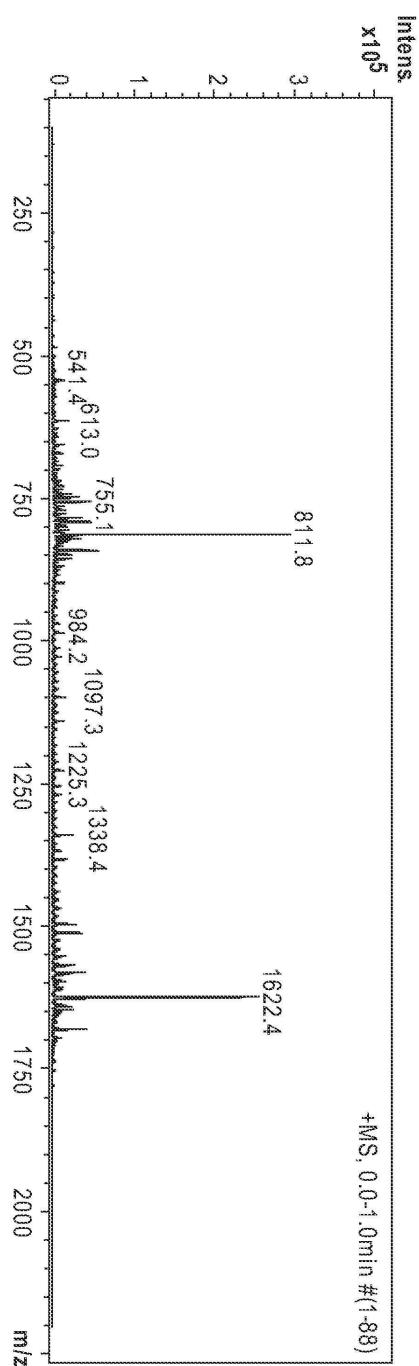
도면5b



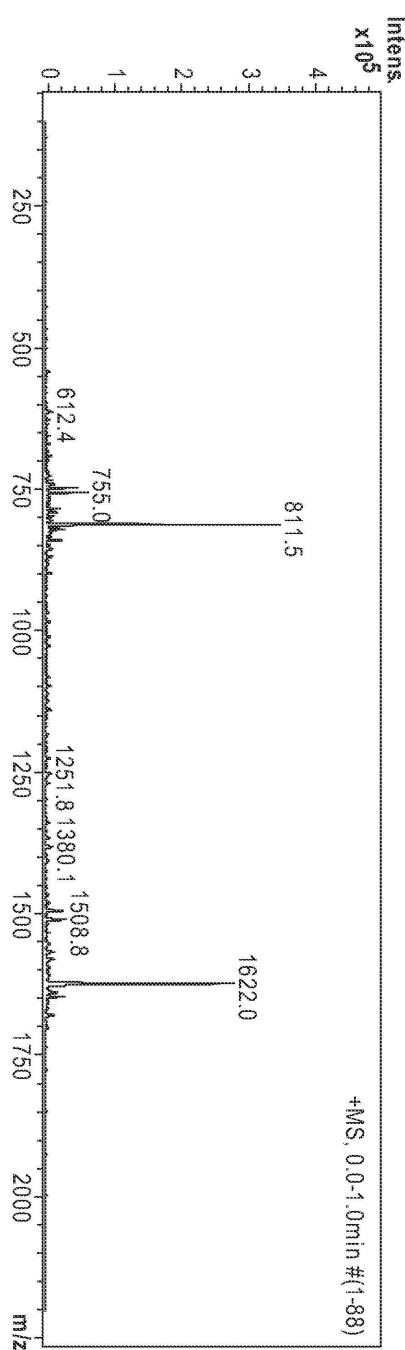
도면5c



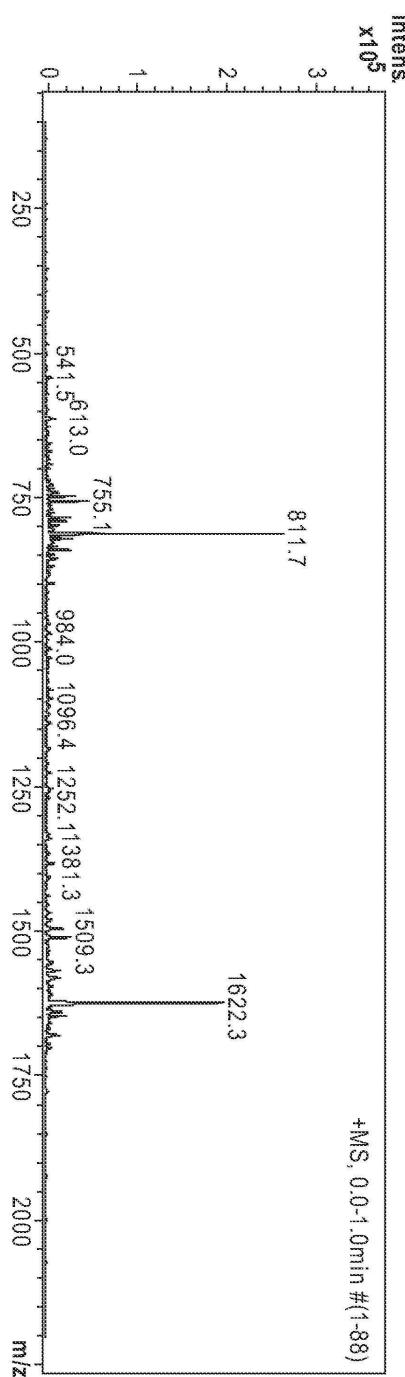
도면5d



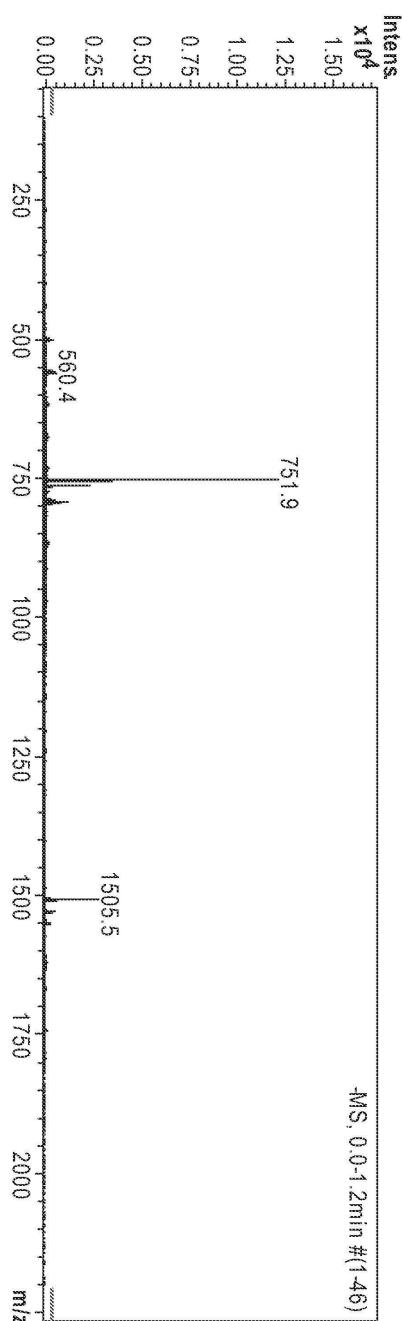
도면5e



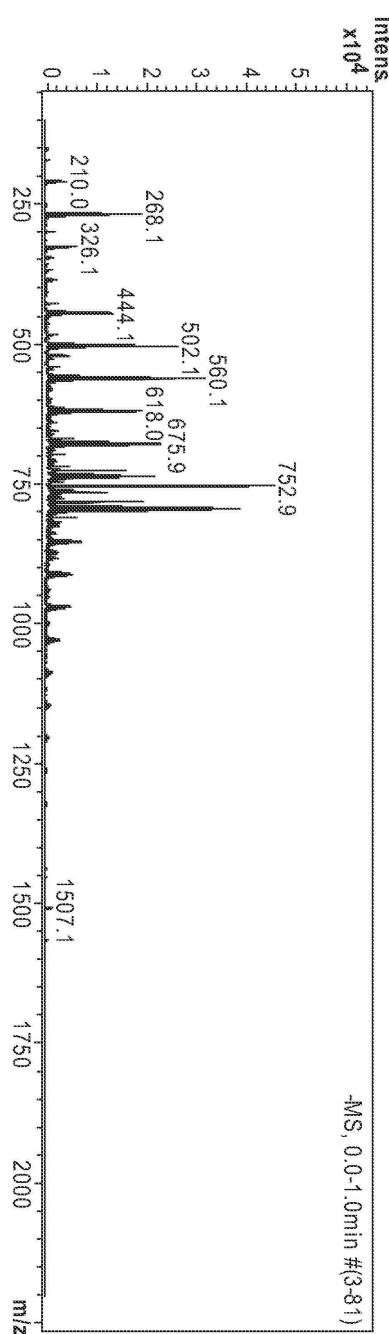
도면5f



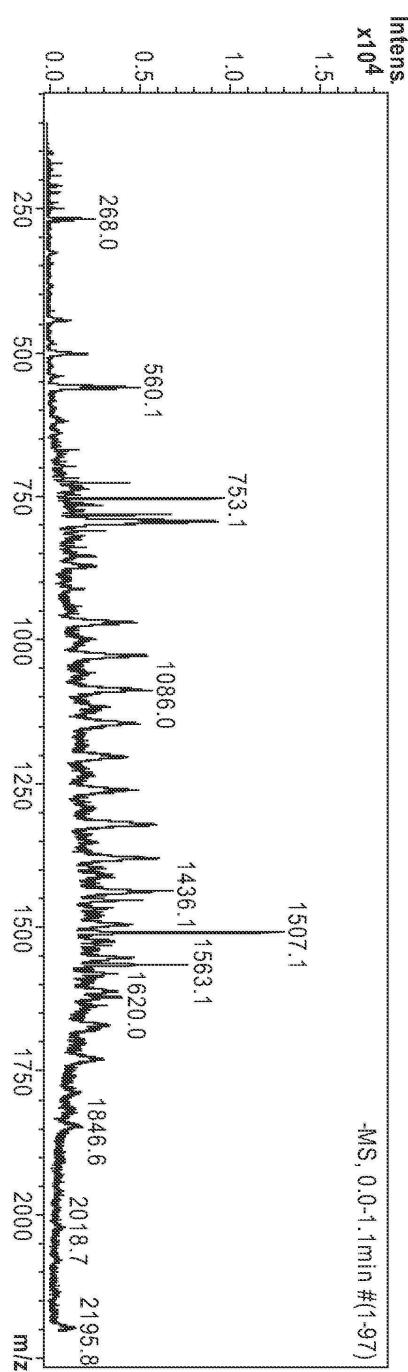
도면6a



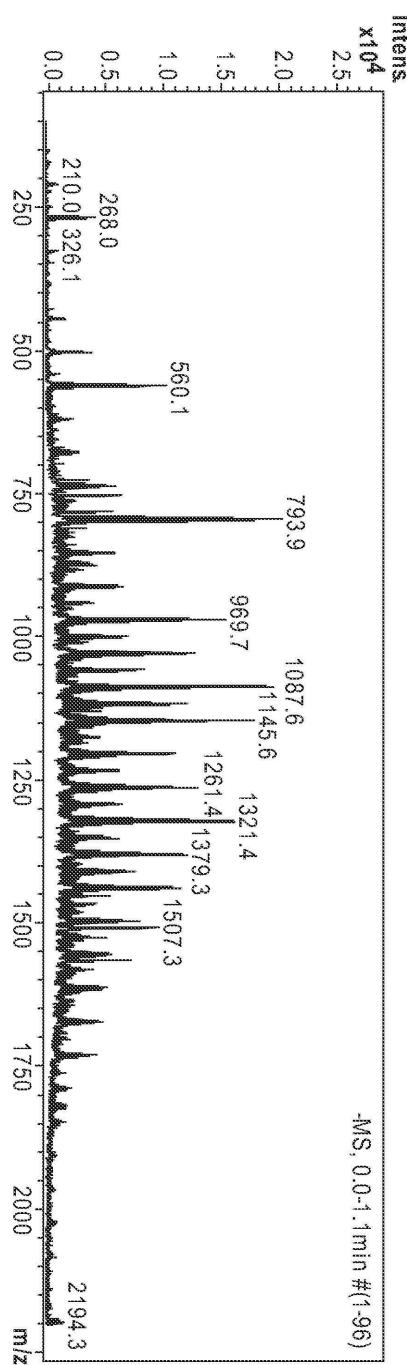
도면6b



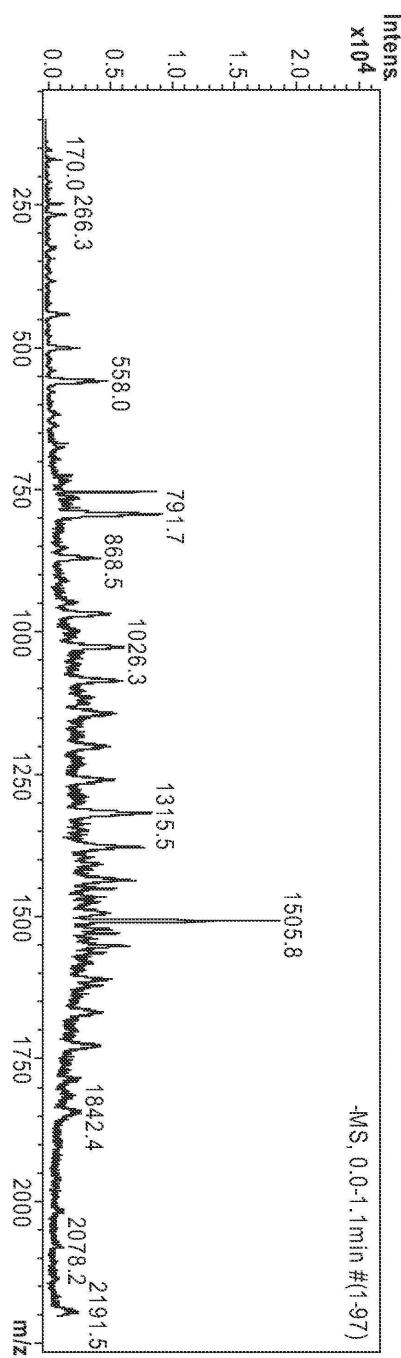
도면6c



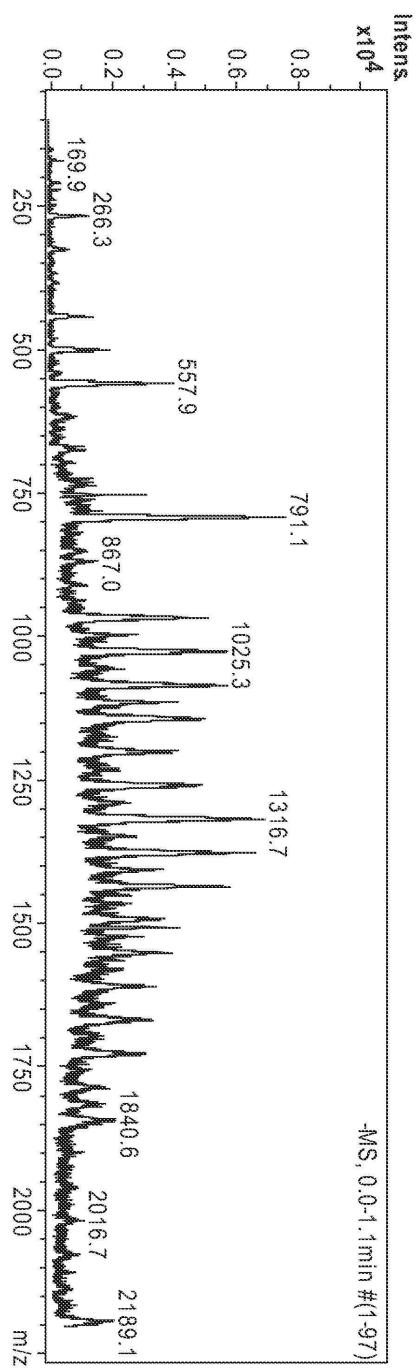
도면6d



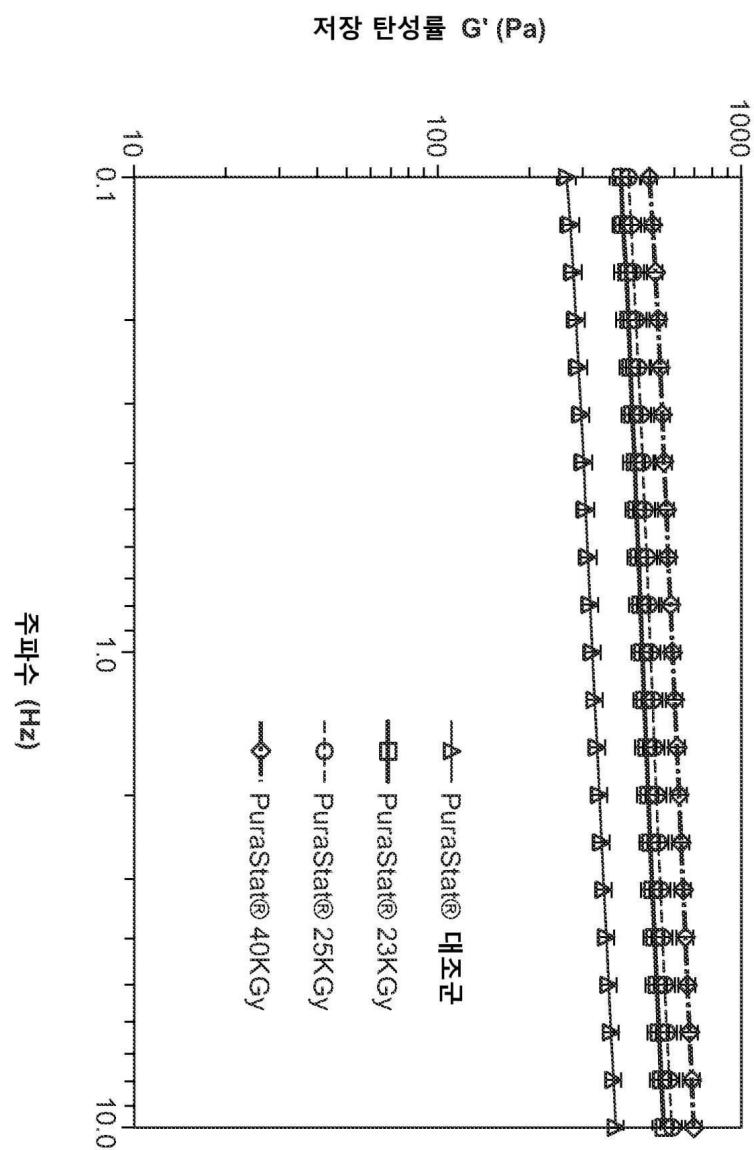
도면6e



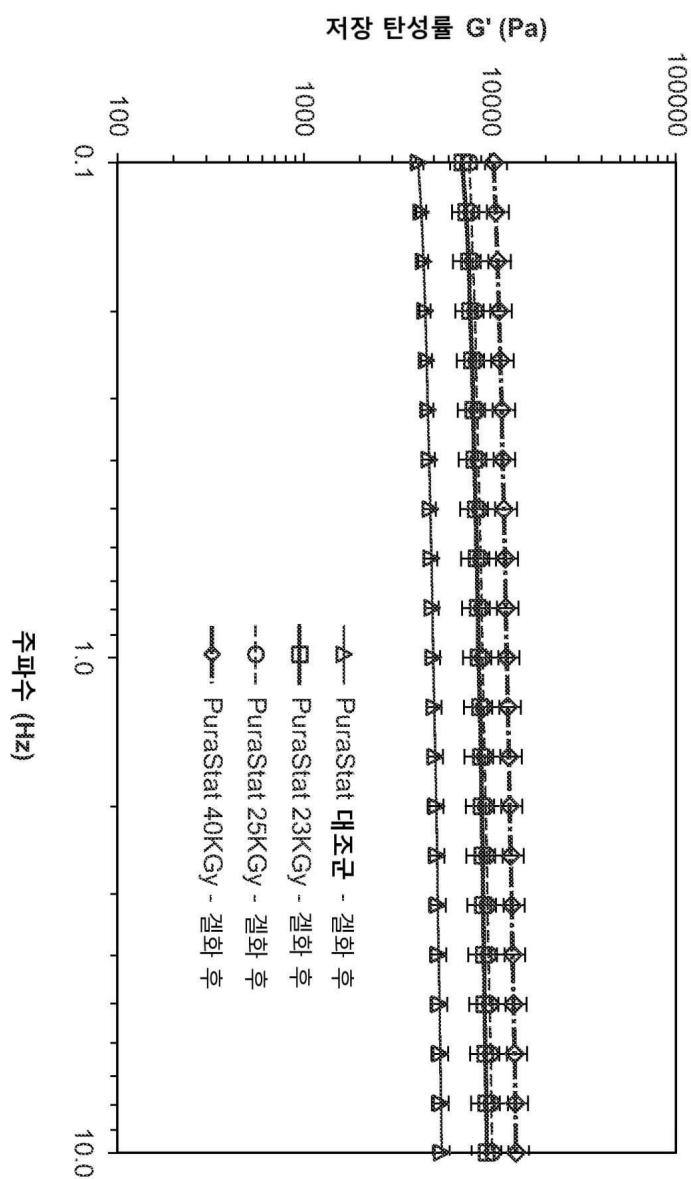
도면6f



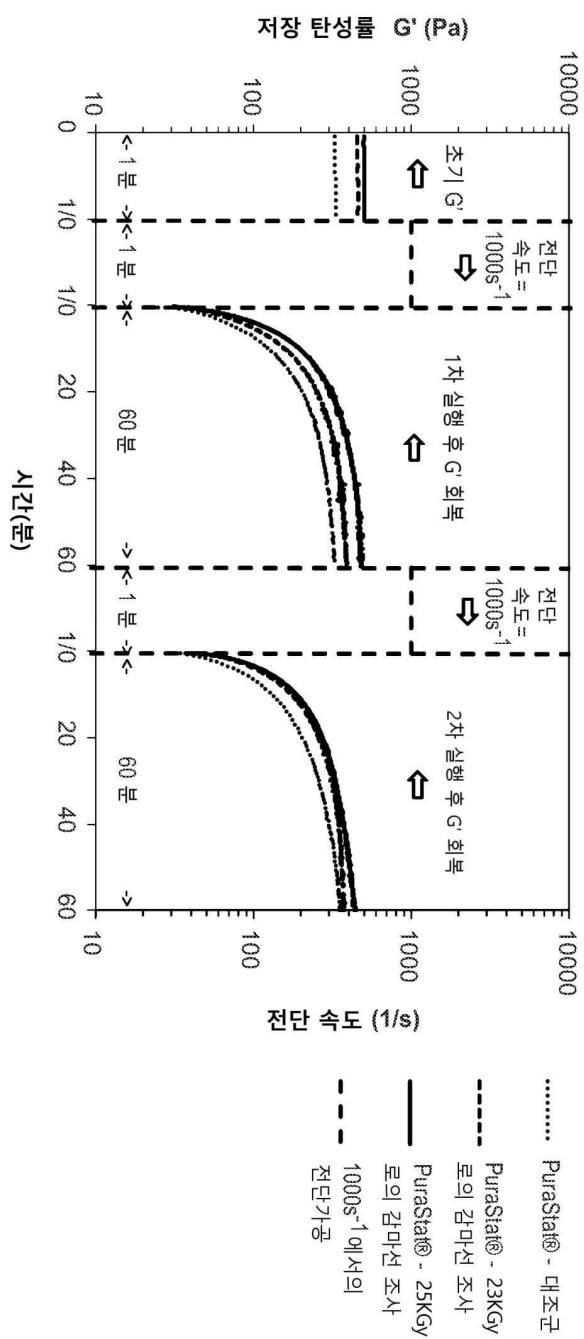
도면7



## 도면8



## 도면9



## 서 열 목 록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 3-D MATRIX, LTD.

&lt;120&gt; STERILIZATION OF SELF-ASSEMBLING PEPTIDES BY IRRADIATION

&lt;130&gt; 3DMUS-2021-02-IRR-PCT

&lt;140&gt; PCT/US21/24954

&lt;141&gt; 2021-04-09

&lt;150&gt; 63/002,882

<151> 2020-03-31

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> N-term Acetylated

<220><223> C-term Amidated

<400> 1

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1 5 10 15

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<220><223> C-term Amidated

<400> 2

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu

1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<220><223> C-term Amidated

<400> 3

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile

1                   5                   10

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<220><223> C-term Amidated

<400> 4

Gln Leu Glu Leu Gln Leu Glu Leu Gln Leu Glu Leu

1                   5                   10

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 5

Ala Arg Ala Asp Ala

1                   5

<210> 6

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 6

Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1                   5                   10

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 7

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1                   5                   10                   15

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 8

Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1                   5

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 9

Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1                   5                   10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<400> 10

Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala

1                   5                   10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<400> 11

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp

1                   5                   10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> C-term Amidated

<400> 12

Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala

1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<400> 13

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp

1 5 10 15

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<400> 14

Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<220><223> Synthetically produced

<220><223> N-term Acetylated

<400> 15

Arg Ala Asp Ala Arg

1                   5