



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0072367
(43) 공개일자 2024년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/49 (2024.01) A61L 27/22 (2006.01)
A61L 27/38 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/49 (2013.01)
A61L 27/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0152821
(22) 출원일자 2022년11월15일
심사청구일자 2022년11월15일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
박용두
서울시 성북구 삼양로 19길 113 삼각산 아이원 아파트 115-804호
이재연
서울특별시 중랑구 봉우재로65길 49 201호
최상돈
경기도 수원시 팔달구 권광로 373 월드메르디앙아파트 103-3001
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 24 항

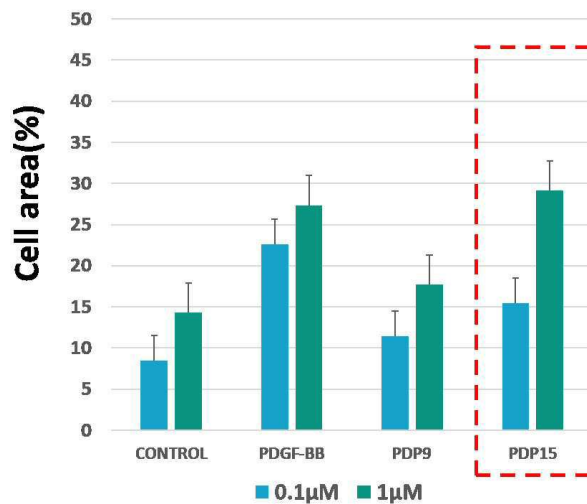
(54) 발명의 명칭 PDGF 유래 신규 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, PDGF 유래 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드, 그리고 상기 펩타이드의 줄기세포 분화 또는 이동 촉진 용도에 관한 것이다.

본 발명은 MOE 단백질 빌더 기술을 기반으로 개발된 PDGF 유래 신규 펩타이드에 관한 것으로, 상기 펩타이드는 기존의 PDGF 보다 우수한 세포 이동성 증진 및 분화 유도 효과를 나타내며, 세포 이동성이 중요한 질환의 치료제 개발 또는 조직이나 장기의 재생 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61L 27/3834 (2013.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

C12N 2501/135 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711098789
과제번호	2019M3D1A1078940
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래소재디스커버리지원(R&D)
연구과제명	머신러닝 가상실험 기반 청각전구세포 주화성 활성 펩타이드 발굴
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.07.01 ~ 2025.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 줄기세포의 분화 유도 활성, 또는 줄기세포 또는 전구세포의 이동 촉진 활성을 갖는, 펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 줄기세포의 분화는 혈관내피세포, 골아세포 또는 연골세포 분화인 것인, 펩타이드.

청구항 4

제1항에 따른 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 5

제4항에 따른 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 분화용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 또는 전구세포의 이동 촉진용 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조직은 뼈, 연골, 각막, 상피, 성장판, 인대, 근육 또는 피부인, 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성

물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 장기는 신장, 간, 폐, 췌장, 장 또는 심장인, 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 신생혈관형성용 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 골 형성 촉진용 또는 골조직 수복용 또는 조직 재건용 조성물.

청구항 13

제12항의 조성물을 포함하는, 골 이식재.

청구항 14

제12항의 조성물을 포함하는, 조직공학용 지지체.

청구항 15

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 줄기세포는 중간엽줄기세포인, 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드와 줄기세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 분화 방법.

청구항 18

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드와 줄기세포 또는 전구세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포 또는 전구세포의 이동을 촉진하는 방법.

청구항 19

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 배지에 줄기세포를 배양하여 분화를 유도하는 단계를 포함하는, 줄기세포의 분화를 촉진하는 방법.

청구항 20

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 배지에 줄기세포 또는 전구세포를 배양하는 단계를 포함하는, 줄기세포 또는 전구세포의 이동을 촉진하는 방법.

청구항 21

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 세포치료 보조제.

청구항 22

제21항에 있어서,

상기 세포는 중간엽줄기세포 또는 전구세포인, 세포치료 보조제.

청구항 23

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 펩타이드를 포함하는 조직 재건 보조제.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 조직 재건은 골 결손부의 골 수복인, 조직 재건 보조제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, PDGF 유래 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드, 그리고 상기 펩타이드의 줄기세포 분화 또는 이동 촉진 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 혈소판 유래 성장 인자 (Platelet derived growth factor, PDGF)는 세포의 증식이나 발생·분화, 창상 치유, 나아가 종양 악성화나 동맥 경화 등에 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. PDGF의 3가지 공지된 이량체 이소형태(isoform)는 각각 A, B, 2 가지의 펩티드 쇄의 동종 또는 이종이량체의 조합물이다. PDGF의 3 가지 이량체 이소형태는 PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB이 있으며, 그 외에도 PDGF C 및 D에 대한 새로운 타입이 보고된 바 있다. 이러한 PDGF는 발생 과정에서 간엽 줄기세포 분열에 중요한 영향을 미치는 성장 인자로 알려져 있다. 발생 과정뿐 아니라 성체에서도 간엽 유래 세포의 성장, 분열 및 이동을 촉진하고, 특히 피부에서는 섬유아세포의 분열을 촉진한다고 알려져 있다. 또한, PDGF는 유사분열촉진 물질로서, 초기 발달 단계에서는 미분화 중간엽 줄기세포와 몇몇 전구세포의 증식 및 이동에 영향을 미치며, 후기 형태 발생 단계에서 PDGF 신호는 조직 리모델링 및 세포분화에 관여하며, 특히 혈관형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] PDGF 신호전달 네트워크는 PDGF-A, -B, -C 및 D의 4개의 리간드와 PDGFR- α 및 PDGFR- β 의 2개의 타이로신 카

이네이즈 수용체로 구성되어 있다. 모든 PDGF는 이황화 결합으로 동종이량체(homodimer)를 형성하거나, PDGF-A, -B는 이종이량체(heterodimer)를 형성할 수 있는데, 이량체를 형성한 PDGFR이 활성화되면 세포질 부위가 인산화되어, PI3K 경로 또는 ROS 생성을 통해 신호 전달을 활성화한다. 새롭게 확인된 PDGF-C, -D는 각각 PDGFR- α , PDGFR- β 와 결합하고, PDGF-D는 세포의 종양화를 유도하고 종양 성장을 촉진한다고 알려져 있다.

[0005] 본 발명의 발명자들은 MOE 단백질 빌더 기술을 통해 효과가 있을 것으로 예상되는 PDGF 유래 신규 펩타이드를 선별하였고, 그 중 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 우수한 세포 이동성 증진 및 분화 유도 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 유럽 특허공개공보 0724599 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드를 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 분화 또는 줄기세포 또는 전구세포의 이동 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 신생혈관형성 및 골 형성 촉진용, 골 조직 수복용, 골조직 재건용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 골 이식재 또는 조직공학용 지지체를 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드와 줄기세포 또는 전구세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 줄기세포 분화방법, 전구세포 또는 줄기세포의 이동을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 배지에 줄기세포 또는 전구세포를 배양하여 분화를 유도하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화를 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 세포치료 보조제 또는 조직 재건 보조제를 제공하는 것이다.
- [0020] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.
- [0024] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부로 이루어진 펩타이드를 제공한다.
- [0025] 서열번호 1: RKIEIVRKKPIFKK
- [0026] 본 발명의 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에서 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성 기술 (US 제5,516,891호)에 따라 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 공지된 펩타이드 합성 방법을 이용할 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 펩타이드는 그 활성을 증가시키기 위해 아미노산 서열의 일부 부위에서 N-말단 또는 C-말단에 변형이 유도될 수 있다. 이러한 변형을 통해 본 발명의 펩타이드는 생체내 투여시 높은 반감기 또는 개선된 안정성을 가질 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 펩타이드의 C-말단은 히드록시기(-OH), 아미노기(-NH₂), 아자이드(-NHNH₂) 등으로 변형될 수 있으며, 펩타이드의 N-말단은 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 및 폴리에틸렌글리콜(PEG)로 구성된 군으로부터 선택되는 보호기가 결합될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 더욱 구체적으로, 본 발명에 따른 펩타이드의 N-말단이 아세틸화되거나, C-말단은 아마이드화(amidation)될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명에 따른 펩타이드는 상기 서열번호 1의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1의 전부로 구성되는 펩타이드를 포함하며, 상기 서열번호 1의 서열과 최소 서열상동성 80 내지 99% 이상인 서열을 포함한다.
- [0029] 또한, PDGF는 PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC, PDGF-DD 서브타입으로 분류되는데 특히 PDGF-BB는 골 기질에서 발견되는 주요성장인자로, 골형성을 증가시키는 것으로 알려져 있는데, 특히, 중간엽기질세포를 자극하여 혈관신생 및 골형성을 증가시키는 것으로 알려져 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 펩타이드는 줄기세포의 분화 유도 활성 및/또는 전구세포 또는 줄기세포의 주화성 이동 유도 활성을 가질 수 있고, 상기 줄기세포의 분화는 중간엽줄기세포의 혈관 내피세포, 골아세포, 연골세포로의 분화일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [0033] 상기 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체를 의미하는 것으로, RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. 이는 당업계에 공지된 엄격한 조건(stringent conditions) 하에서, 상기 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있는 것으로, 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다. 상기 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 정렬(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 정렬된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 99%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0034] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포

에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미하는 것으로, 예를 들면 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, CMV, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다. 상기 재조합 벡터에서 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0035] 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다. 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다. 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예를 들어, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, CMV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0037] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 분화용 조성물, 또는 전구세포 또는 줄기세포의 이동 촉진용 조성물을 제공한다.

[0038] 본 발명에 있어서, 상기 이동 촉진은, 줄기세포 "동원"과 같은 개념을 포함한다. 예를 들어, 이러한 이동은 줄기세포 또는 전구세포가 골수, 장기 및/또는 조직으로부터 순환하는 혈액으로 유통되고, 순환하는 혈액으로부터 손상된 장기 및/또는 조직에 축적되거나, 장기 및/또는 조직의 내부로 움직이는 것을 의미한다. 이러한 줄기세포 이동 촉진은 동원 활성을 가짐으로써, 증식 또는 분화를 촉진시킬 수도 있다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 조성물은 당업계에 줄기세포 동원 활성을 가진 것으로 알려진 물질 등과 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 전구세포 또는 줄기세포와 혼합하여 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조직이나 장기 형성용 또는 재생용 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 조직은 뼈, 연골, 각막, 상피, 성장판, 인대, 근육 및 피부 등일 수 있고, 상기 장기는 신장, 간, 폐, 췌장, 장 및 심장 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0044] 이러한 본 발명의 조성물은 손상된 장기 또는 조직의 재생, 치료용 약학적 조성물의 형태로 사용될 수 있다. 이러한 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 예컨대, 비경구투여(복강내투여, 정맥내투여, 근육내투여, 피하투여, 피내투여 등 이에 제한되지 않음)일 수 있고, 비경구투여 제형으로 제제화하기 위하여 상기 펩타이드를 당업계에 알려져있는 생체 친화물질 등과 적절한 혼합을 통해 제형화될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 인체에 대한 투여량은 환자의 나이, 몸무게, 성별, 투여형태, 건강상태 및 질환 정도에 따라 달라질 수 있으며, 몸무게가 60 kg인 성인 환자를 기준으로 할 때, 일반적으로 0.001 ~ 1,000mg/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 mg/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

- [0046] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 신생혈관형성 또는 골형성 촉진용 또는 골조직 수복용 또는 골조직 재건용 조성물을 제공한다.
- [0047] 여기서의 골조직 수복 또는 재건은, 예컨대, 임계치의 골 결손부의 골 수복을 의미한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 골 이식재 또는 조직공학용 지지체를 제공한다.
- [0049] 본 발명에서 사용가능한 골이식재 및 지지체에는 당해분야에서 사용하는 모든 종류 및 형태의 골이식재 및 고분자 지지체를 사용할 수 있으며, 일 예로, 자가골, 소뼈 및 돼지뼈에서 기인한 생물유래 골미네랄 분말 및 다공성 블록, 합성 수산화아파타이트 분말 및 다공성 블록, 트리칼슘인산 분말 및 다공성 블록, 모노칼슘인산 분말 및 다공성 블록, 이산화규소(실리카)로 이루어진 골이식재, 실리카와 고분자의 혼합체로 이루어진 골충진이식재, 키토산, 폴리락트산을 포함하는 생체적합성 고분자로 이루어진 미립자 및 다공성 지지체, 티타늄 및 3차원적 다공성 지지체 등이 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 상기 조성물은 표면에 코팅되는 형태로 사용되거나 기타 당업계에 알려진 방식으로 담지되어 사용될 수 있으며, 골이식재 및 지지체의 표면에 코팅되어 사용되는 경우에는, 펩타이드의 부착이 용이하도록 표면을 개질할 수 있다.
- [0051] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배지 조성물은 세포의 분화 및/또는 주화성 이동을 유도할 수 있다.
- [0054] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 줄기세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 분화방법을 제공한다.
- [0055] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드와 줄기세포 또는 전구세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포 또는 전구세포의 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0056] 이러한 접촉은 인 비트로(in vitro), 인 비보(in vivo)를 포함한다.
- [0057] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 배지에 상기 줄기세포를 배양하여 분화를 유도하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화방법을 제공한다.
- [0058] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 배지에 줄기세포 또는 전구세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포 또는 전구세포의 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.
- [0060] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 세포치료 보조제 또는 조직 재건 보조제를 제공한다.
- [0061] 본 발명에 있어서 용어 "세포 치료 보조제"는, 줄기세포 또는 전구세포를 이용하는 세포치료에 있어서, 이러한 당업계에서 일반적으로 사용되고 있는 줄기세포와 같은 세포치료제의 효과를 증진시키기 위해 보조적으로 사용되어 증상을 호전, 개선시킬 수 있음을 의미한다.
- [0062] 이러한 세포치료 보조제는 이러한 세포치료제가 in vivo 이식될 때, 줄기세포 또는 전구세포와 함께 투여되어 기능 향상을 시킬 수 있으며, 줄기세포 또는 전구세포가 세포치료제로써 이식 전에 전처리 단계에서 투여될 수 있다. 또는, 세포치료제의 투여전에, 적절한 펩타이드의 처리를 통해 생체의 배양을 통해 활성을 증대시킬 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함한다.
- [0063] 또한, 본 발명의 펩타이드는 손상된 또는 결손된 조직 재건을 위해 보조제로써 사용될 수 있으며, 당업계에 알려져있는 조직 재건에 사용될 수 있는 물질, 예컨대, 생체친화성 물질과 함께 사용될 수 있다. 일 예로, 본 발명에 따른 펩타이드는 임계치의 골결손부의 골수복에 사용될 수 있음을 포함한다.

발명의 효과

[0065] 본 발명은 MOE 단백질 빌더 기술을 기반으로 개발된 PDGF 유래 신규 펩타이드에 관한 것으로, 상기 펩타이드는 기존의 PDGF보다 우수한 세포 이동성 증진 및 분화 유도 효과를 나타내는바, 세포 이동성이 중요한 질환의 치료제 개발 또는 조직이나 장기의 재생 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0067] 도 1은 PDP15 펩타이드의 효능을 검증하기 위한 생체외(in-vitro) 실험방법으로서, 세포 생존율 분석(live and dead assay), CCK-8 세포 증식률 분석, 유전자 발현 분석 및 이동성 측정을 위한 마이그레이션 분석 방법을 나타낸 순서도이다.

도 2는 인간 중간엽줄기세포(hMSC)에 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15를 처리한 후, 라이브 앤 데드 어세이에 의해 형광 표지된 세포의 이미지를 나타내었다.

도 3은 인간 중간엽줄기세포(hMSC)에 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15를 처리한 후, 살아있는 세포 면적을 정량화한 그래프이다.

도 4는 인간 중간엽줄기세포(hMSC)에 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15를 처리한 후, CCK-8 어세이를 수행한 결과값(OD₄₅₀)을 정량화한 그래프이다.

도 5는 인간 중간엽줄기세포(hMSC)에 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15를 처리한 후, 인서트-디쉬를 이용하여 48시간 뒤 세포의 이동성을 확인한 결과이다.

도 6은 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15에 의한 인간 중간엽줄기세포(hMSC)의 이동 면적을 정량화한 그래프이다.

도 7은 PDGF-BB, PDP9 및 PDP15에 의한 줄기세포에서 pI3K, AKT, ki67 유전자의 발현 수준 변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0068] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0070] 실시예 1: MOE 단백질 빌더 기술을 통한 펩타이드 선별

[0071] PDGF의 구조를 NMR 분광법 및 X-선 결정학에 의해 결정한 결과, PDGF는 N-말단 비구조화 서열, 중앙 β-시트 구조 및 C-말단 α-나선 구조를 포함한 세 가지 구조적 모티프를 포함하고 있으며, PDGF의 글라이신(Gly)은 강력한 수용체 결합 및 수용체 내재화 효과를 보인다. CXCR4 (CXC chemokine receptor 4)는 PDGF 및 기타 리간드의 N-말단을 인식하므로, PDGF와 이의 수용체인 CXCR4의 상호 작용 부분을 고려하여 MOE 단백질 빌더 도구를 통해 작용성 펩타이드를 설계하였고, PDGF의 각 잔기를 다른 아미노산으로 돌연변이시킨 후, dAffinity 및 dStability 점수를 기반으로 안정적인 변이 펩타이드를 선별하고자 한 결과, 서열번호 1의 펩타이드를 도출하였다.

표 1

아미노산 서열	서열번호	펩타이드 명칭
RKIEIVRKKPIFKK	1	PDP15

[0075] 실시예 2: Live and dead assay를 이용한 PDP15 펩타이드에 의한 세포 생존율 효과 검증

[0076] 실시예 1에서 선별된 PDP15의 효능을 검증하기 위해, 도 1a의 방법에 따라 줄기세포의 생존율을 확인하는 실험을 실시하였다. 구체적으로, 준비된 인간유래 중간엽줄기세포(hMSC)를 48웰 디쉬에 웰당 5X10³의 수로 분주

(seeding) 하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 웰 디쉬(well dish)에 세포가 부착된 것을 확인한 뒤 DMEM에 0.1μM 과 1μM 의 농도로 PDP15를 섞어서 세포에 처리하였다. 2일에 한번씩 배양액을 교체하고 7일 차에 Live and dead assay를 실시하여, 형광현미경으로 초록색으로 형광표지된 세포 사진을 촬영하고 imageJ 로 살아있는 세포의 면적을 계산하였다(도 2). 그 결과, 0.1μM 과 1μM 두 농도일 때 모두 PDP9에 비해 PDP15에 서 더 높은 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다(도 3).

[0078] **실시예 3: CCK-8 kit을 이용한 세포 증식률 확인**

[0079] 실시예1에서 선별된 PDP15의 효능을 검증하기 위해, 도 1b의 방법에 따라 세포 카운팅 키트-8(CCK-8)을 실시하였다.

[0080] 구체적으로, 준비된 인간유래 중간엽줄기세포(hMSC)를 48웰 디쉬에 웰당 5×10^3 의 수로 분주(seeding) 하고 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 뒤 웰 디쉬에 세포가 부착된 것을 확인한 뒤 DMEM에 0.1μM 과 1μM 의 농도로 PDP15를 섞어서 세포에 처리하였다. 2일에 한번씩 배양액을 교체하고 7일차에 CCK-8 kit을 배양액에 넣어주어 2시간 동안 반응시켰다. 세포 반응이 끝나고 배양액을 98웰로 옮긴 후 플레이트 리더기기를 이용하여 0.D 값 450nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 0.1μM 과 1μM 두 농도에서 모두 PDP15 가 대조군(control) 이나 PDP9 보다는 높은 세포 증식율을 보였다(도 4).

[0082] **실시예 4: PDP15에 의한 세포 이동성 검증**

[0083] 실시예 1에서 선별한 펩타이드 PDP15 펩타이드의 효능을 검증하기 위해, 도 1c의 방법에 따라 세포 마이그레이션 어세이(cell migration assay)를 실시하였다. 세포 마이그레이션 어세이 는 배양-인서트(Culture-Insert) 2 Well in a μ-Dish 35 mm(bidi)을 이용하여 실시하였다. 우선 인간유래 중간엽줄기세포(hMSC)를 3×10^5 /ml 로 준비하고 배양-인서트 2웰에 70μl씩 넣어준다. 그리고 37℃ 5% CO₂ 조건하 인큐베이터 안에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 배양-인서트를 제거한 후 선별된 PDP15 펩타이드를 1μM 농도로 처리하였다. 다시 20시간 배양한 후 현미경을 통해 세포 이동 거리를 측정하였다. 그 결과 대조군(control)이나 PDP9에 비해 PDP15에서 훨씬 많은 세포가 이동하는 것을 확인할 수 있었고(도 5), imageJ로 세포가 이동한 면적을 정량한 결과 48시간 후 PDP9보다 PDP15에서 더 많은 세포가 이동한 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[0085] **실시예 5: PDP15 에 의한 줄기세포 유전자 변화 평가**

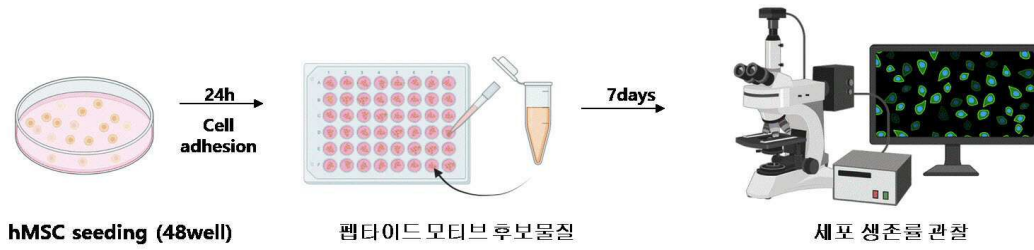
[0086] PDP15에 의한 세포 증식율 효능을 검증하기 위해, 도 1d의 방법에 따라 여러 신호전달 경로(signaling pathway)에 관여하는 hAKT, PI3K, ki67 유전자 발현 정도를 확인하는 실험을 실시하였다. 전술한 live/dead assay 및 CCK-8 assay 와 동일하게 세포를 48웰에 부착시킨 후 1μM 의 PDP15가 포함된 배양액에서 7일간 중간엽줄기세포(hMSC)를 배양하였으며, 7일차에는 Real-time PCR을 실시하였다. 유전자 발현 분석을 위해 TRIzol(InvitrogenLife Technologies, Carlsbad, CA)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 정량화한 RNA는 PrimeScript TMRT reagent Kit(TaKaRa, Dalian, China)을 이용하여 제조사의 지침서에 따라 주형(template) cDNA을 합성하였다. 각각의 real-time PCR 반응은 합성된 cDNA 2mℓ와 특정 유전자 프라이머를 포함한 SYBR premix Ex TaqTM(TaKaRa, Dalian, China)27-1420mℓ을 applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System을 이용해 증폭시켰고, 특정 유전자의 상대값은 제조사의 추천에 따라 2-△△ CT 방법을 통하여 측정하여, 베타-액틴에 대한 비율로 표준화(noramlzation)하였다. 그 결과, 1μM 농도의 PDP15를 처리한 실험군에서 hAKT, PI3K, ki67 의 발현량이 대조군(control), PDGF-BB, PDP9 그룹에 비하여 3~8배까지 높게 나타나는 것을 확인하였다(도 7).

[0088] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모

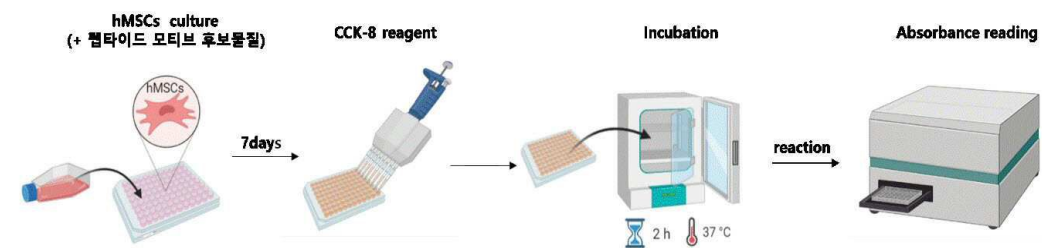
든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

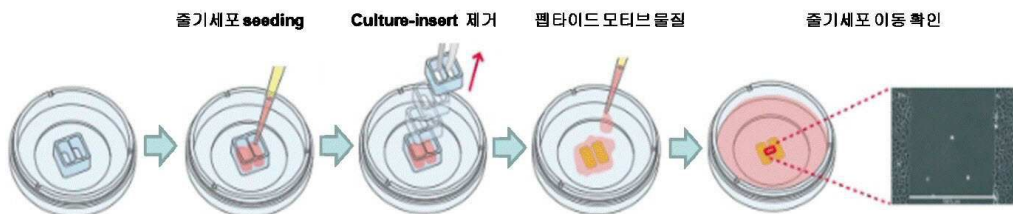
도면1a



도면1b

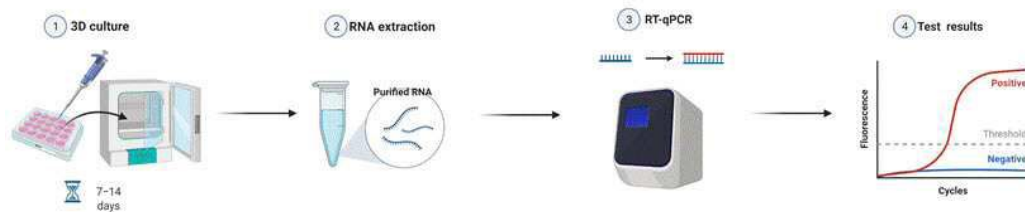


도면1c

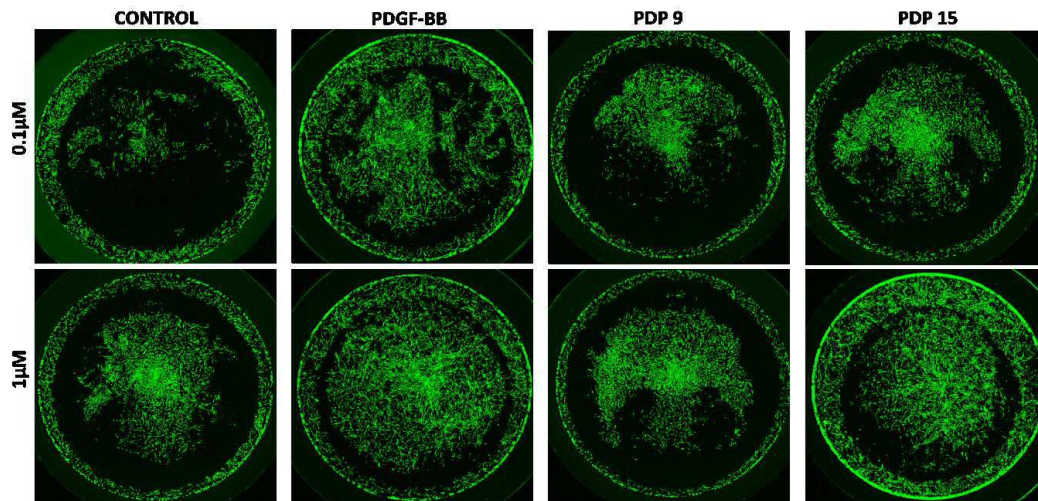


도면1d

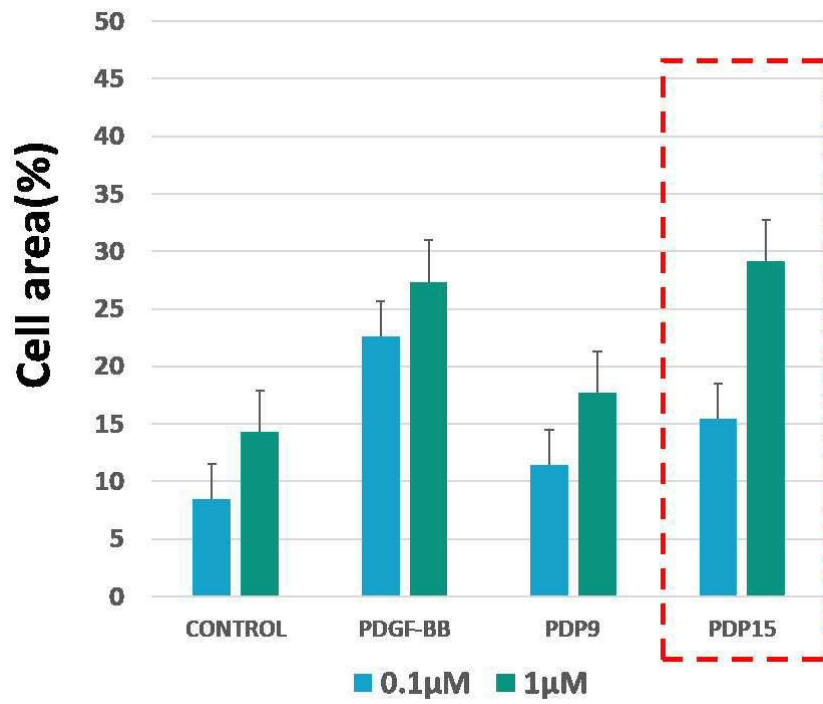
Analysis of peptide gene expression using 3D culture.



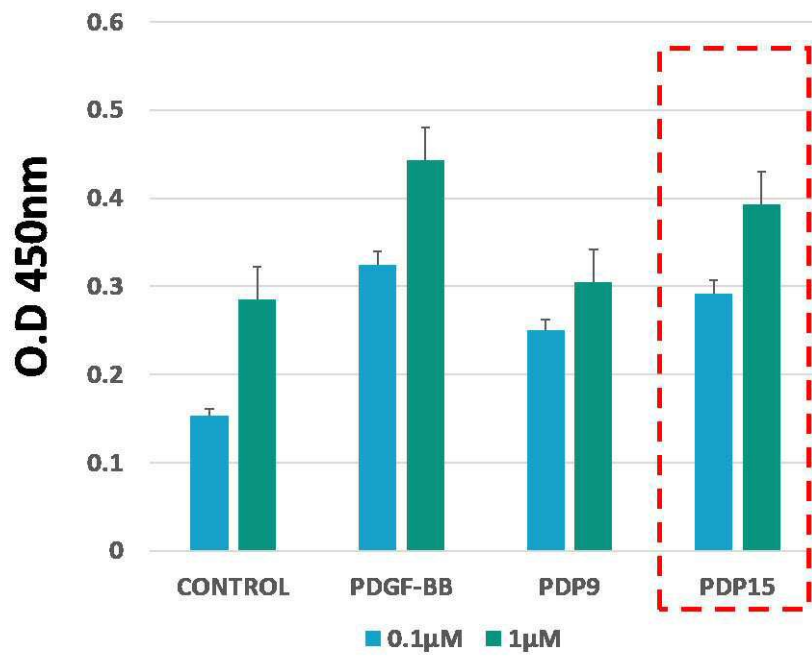
도면2



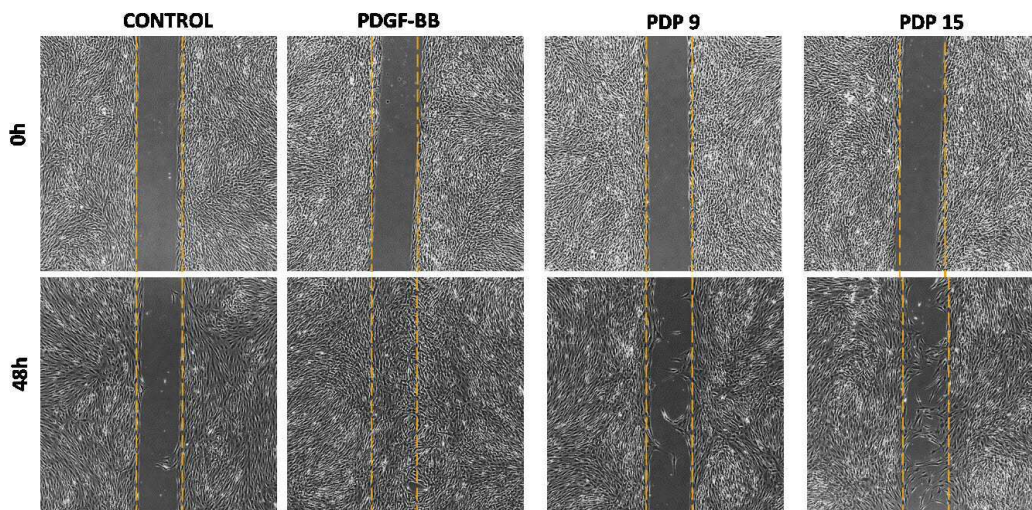
도면3



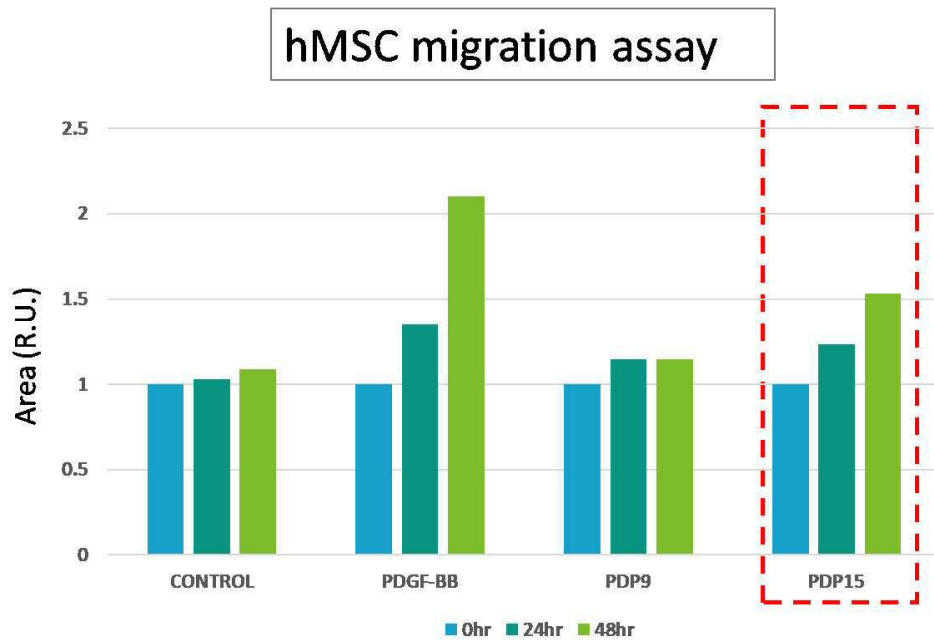
도면4



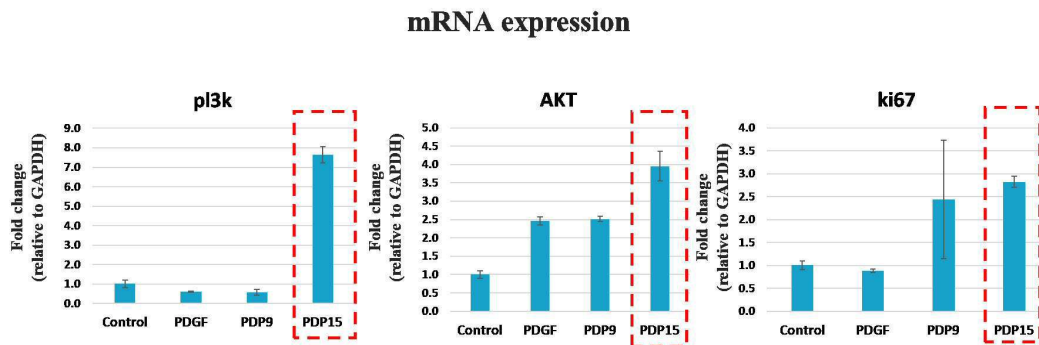
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.