(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0059404
(43) 공개일자 2023년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/49 (2006.01) *A61K 38/18* (2006.01)
A61L 27/22 (2006.01) *A61L 27/38* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/077* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/49 (2013.01)
A61K 38/1858 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0143554
(22) 출원일자 2021년10월26일
심사청구일자 2021년10월26일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
박용두
서울특별시 강북구 삼양로19길 113(미아동, 삼각산아이원아파트) 115-804호
이강곤
경기도 하남시 대청로116번길 59 (창우동 꿈동산신안아파트) 410동 1706호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 24 항

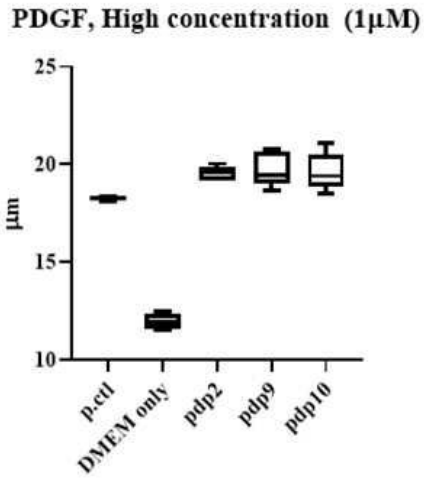
(54) 발명의 명칭 **PDGF 유래 신규 펩타이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, PDGF 유래 서열번호 1, 2 또는 3으로 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 나타내는바, 세포 이동성이 중요한 질환의 치료제 개발 또는 조직이나 장기의 재생 용도로 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61L 27/227 (2013.01)
A61L 27/3834 (2013.01)
A61L 27/3847 (2013.01)
A61L 27/56 (2013.01)
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 5/0655 (2013.01)
C12N 5/069 (2013.01)
A61L 2430/02 (2013.01)
C12N 2501/135 (2013.01)

(72) 발명자
손인우
서울특별시 성북구 고려대로17길 25 로즈빌 304호
아나 산토스
서울특별시 동작구 사당동 동작대로35 아길 14, 101동 605호 삼성아파트
최상돈
경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 103동 3001호(우만동,월드메르디앙아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711129531
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	2021.01.01 ~ 2021.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1, 2 또는 3으로 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 전구세포 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 조성물.

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 단

계를 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

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로, PDGF 유래 서열번호 1, 2 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드, 그리고 상기 펩타이드의 줄기세포 분화 또는 이동 촉진 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 혈소판 유래 성장 인자 (Platelet derived growth factor, PDGF)는 세포의 증식이나 발생·분화, 창상치유, 나아가 암 악성화나 동맥 경화 등에 있어서 중요한 역할을 하고 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-BB이다. 또한, 리 및 첸 등에 의해 새로운 타입의 PDGF C 및 D에 대한 보고가 있다(Xuri Li and Ulf Eriksson, Cytokine & Growth Factor reviews (2003) Vol. 14, pp91-93; Jingzhou Chen, Yu Han, Yu Ha, Chunxia Lin, Yisong Zhen, Xiaodong Song, Siyong Teng, Chen Chen, Yu Chen, Yinhui Zhang and Rutai Hui, Biochemical and Biophysical Research Communications (2005), Vol. 329, pp 976-983)

[0004] 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.

[0005] 또한, PDGF는 초기 발달 단계에서 유사분열촉진 물질로 미분화 중간엽 줄기세포와 몇몇 전구세포의 증식 및 이동에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다 (Hannink et al., Biochim Biophys Acta 989:1-10,1989; Heldin et

al., EMBO J 11:4251-4259, 1992). 후기 형태발생 단계에서 PDGF 신호는 조직 리모델링 및 세포분화에 관여하며, 특히 혈관형성에 중요한 역할을 한다. PDGF 신호전달 네트워크는 PDGF-A, -B, -C 및 D의 4개의 리간드와 PDGFR-α 및 PDGFR-β의 2개의 타이로신 카이네이즈 수용체로 구성되어 있다 (Demoulin JB et al., Cytokine Growth Factor Rev 25:273-283, 2014; Levitzki A et al., Cytokine Growth Factor Rev15:229-235, 2004). 모든 PDGF는 이황화 결합으로 호모다이머를 형성하거나, PDGF-A, -B는 헤테로다이머를 형성할 수 있는데, 다이머를 형성한 PDGFR이 활성화되면 세포질 부위가 인산화되어, PI3K 경로 또는 ROS 생성을 통해 신호 전달을 활성화한다 (Blazevic T et al., J Biol Chem 288:35592-35603, 2013; Shimizu H et al., Am J Physiol Cell Physiol 297:C389-396, 2009; Lange S et al. Cardiovasc Res 81:159-168, 2009). 새롭게 확인된 PDGF-C, -D는 각각 PDGFR-a, PDGFR-β와 결합한다 (Bergsten E et al. Nat Cell Biol 3:512-516, 2001;LaRochelle WJ et al., Nat Cell Biol 3:517-521, 2001). PDGF-D는 세포의 암화를 유도하고 종양 성장을 촉진한다고 알려져 있다 (Li H et al., Oncogene 22:1501-1510, 2003).

[0006] 본 발명의 발명자들은 MOE 단백질 빌더 기술을 통해 효과가 있을 것으로 예상되는 PDGF 유래 신규 펩타이드를 선별하였고, 그 중 서열번호 1, 2 또는 3로 표시되는 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드가 우수한 세포 이동성 증진 및 분화 유도 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 유럽 특허공개공보 0724599 A1

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 서열번호 1, 2 또는 3으로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부를 포함하는 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 이를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 분화 또는 줄기세포 또는 전구세포의 이동 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 신생혈관형성 및 골 형성 촉진용, 골조직 수복용, 골조직 재건용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 골 이식재 또는 조직공학용 지지체를 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드와 줄기세포 또는 전구세포를 접촉시키는 단계를 포함하는 줄기세포 분화방법, 전구세포 또는 줄기세포의 이동을 촉진하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 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.

[0019] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 세포치료 보조제, 조직 재건 보조제를 제공하는 것

이다.

[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 실시형태는 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 1, 2 또는 3로 표시되는 아미노산 서열의 전부 또는 일부로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0025] 서열번호 1: CSGCCNTSSVQGRPTQVQLRPVQVRKVEGFRKRATLK

[0026] 서열번호 2: ANFLVWPPCVEVQRCSGCCNNRNVQCRPTQ

[0027] 서열번호 3: TDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVPSK

[0028] 본 발명의 용어 "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 펩타이드는 당업계에 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 제 5,516,891호)에 따라 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니하며, 공지된 펩타이드 합성 방법을 이용할 수 있다.

[0029] 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($-NH_2$), 아자이드($-NHNH_2$) 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 아미드화(amidation)될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명에 따른 펩타이드는 상기 서열번호 1, 2 또는 3의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 상기 서열번호 1, 2 또는 3의 전부로 구성되는 펩타이드를 포함하며, 상기 서열번호 1, 2 또는 3의 서열과 최소 서열상동성 80 내지 99% 이상인 서열을 포함한다.

[0031] 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.

[0032] 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.

[0033] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0034] 상기 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. 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 포함

한다. 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함한다. 이는 당업계에 공지된 가혹 조건 (stringent conditions) 하에서, 상기 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다. 또한 상기 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있다. 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 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 99%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.

[0035] 또한 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 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), 파아지 (예를 들면, λgt4λB, 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. 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, pLλ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보좀 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, 사이토메갈로바 이러스 (CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[0036] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 분화용 조성물 또는 전구세포 또는 줄기세포의 이동 촉진용 조성물을 제공한다.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조직 또는 장기 형성용 또는 재생용 조성물을 제공한다.

[0041] 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.

[0042] 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, 비경구 투여 제형으로 제제화하기 위하여 상기 펩타이드를 당업계에 알려져있는 생체 친화물질 등

과 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 ~ 1,000㎎/일이며, 바람직하게는 0.01 ~ 500 ㎎/일이며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 1회 내지 수회로 분할 투여할 수도 있다.

[0043] 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.

[0044] 여기서의 골조직 수복 또는 재건은, 예컨대, 임계치의 골 결손부의 골 수복을 의미한다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 골 이식재 또는 조직공학용 지지체를 제공한다.

[0046] 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 블럭, 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.

[0047] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 줄기세포 또는 전구세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0048] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 배지 조성물은 세포의 분화 및/또는 주화성 이동을 유도할 수 있다.

[0049] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드를 줄기세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포의 분화방법을 제공한다.

[0050] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 펩타이드와 줄기세포 또는 전구세포를 접촉시키는 단계를 포함하는, 줄기세포 또는 전구세포의 이동을 촉진하는 방법을 제공한다.

[0051] 이러한 접촉은 인 비트로(in vitro), 인 비보(in vivo)를 포함한다.

[0052] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 배지에 상기 줄기세포를 배양하여 분화를 유도하는 단계를 포함하는 줄기세포의 분화방법을 제공한다.

[0053] 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.

[0054] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 펩타이드를 포함하는 세포치료 보조제 또는 조직 재건 보조제를 제공한다.

[0055] 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.

[0056] 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 단계로써 투여될 수 있다. 또는, 세포치료제의 투여전에, 적절한 펩타이드의 처리를 통해 생체외 배양을 통해 활성을 증대시킬 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽줄기세포를 포함한다.

[0057] 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

[0059] 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

[0061] 도 1은 3D 스페로이드를 이용하여 줄기세포의 이동성을 확인하는 실험 방법을 나타낸 순서도이다.

도 2는 3D 스페로이드에서 뻗어나간 줄기세포의 가지(branch) 모양을 나타낸 사진이다.

도 3은 3D 스페로이드에서 뻗어나간 줄기세포의 가지 길이를 정량화한 그래프이다.

도 4는 3D culture를 이용하여 hAKT, pERK, PI3K, Smad2 유전자 발현 정도를 확인하는 실험 방법을 나타낸 순서도이다.

도 5a 내지 도 5d는 PDGF, PDP2, PDP9, PDP10이 포함된 배지가 처리된 줄기세포에서 hAKT, pERK, PI3K, Smad2 유전자의 발현 정도를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

도 6은 2D 견인력 현미경(traction force microscope)을 이용하여 줄기세포의 이동성을 확인하는 실험 방법을 나타낸 순서도이다.

도 7 및 도 8은 PDGF, PDP2, PDP9, PDP10이 포함된 배지가 처리된 줄기세포의 이동 속도를 보여주는 실험 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 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.

[0064] **실시예 1: MOE 단백질 빌더 기술을 통한 PDP2, PDP9, PDP10 펩타이드 선별**

[0065] 먼저, PDGF의 구조를 NMR 분광법 및 X-선 결정학에 의해 결정하였다. PDGF는 N-말단 비구조화 서열, 중앙 β-시트 구조 및 C-말단 α-나선 구조를 포함한 세 가지 구조적 모티프를 가졌으며, 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 설계하였다. PDGF의 각 잔기를 다른 아미노산으로 돌연변이시킨 후, dAffinity 및 dStablity 점수를 기반으로 안정적인 변이 펩타이드를 선택하였다. 그 결과, 아래 서열번호를 갖는 펩타이드가 선택되었다.

표 1

[0067]

아미노산 서열	서열번호	펩타이드 명칭
CSGCCNTSSVQGRPTQVQLRPVQVRKVEGFRKRATLK	1	PDP2
ANFLVWPPCVEVQRCSGCCNNRNVQCRPTQ	2	PDP9
TDTIFWPGCLLVKRCGGNCACCLHNCNECQCVPSK	3	PDP10

[0069] **실시예 2: 3D 스페로이드(spheroid)를 이용한 PDP2, PDP9, PDP10 펩타이드 효능 검증**

[0070] 실시예 1에서 선별한 펩타이드 PDP2, PDP9, PDP10의 효능을 검증하기 위해, 도 1의 방법을 따라 줄기세포의 이동성을 확인하는 실험을 실시하였다.

[0071] 구체적으로, 준비된 인간유래 중간엽줄기세포(hMSC)를 페트리접시에 시딩(seed)하고 스페로이드를 만든 후, 제조한 스페로이드는 코니칼 튜브에 수집하였다. 콜라겐 매트릭스 혼합물(collagen matrix mixture)를 준비하여

제조한 스페로이드와 혼합하였다. 스페로이드/콜라겐 혼합물을 24 well에 분배하고 30분 동안 겔화(gelation)시킨 후, PDGF, 실시예 1에서 제조한 펩타이드 PDP2, PDP9, 또는 PDP10 가 혼합된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지(저농도는 0.1uM, 고농도는 1uM), 또는 배지만 1ml를 추가하여 37℃에서 16시간 동안 두었다. 16시간 후, 현미경을 통해 스페로이드의 가지(branch)를 확인하고, 가지 길이를 정량화하였다.

[0072] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 PDGF를 처리한 군 또는 DMEM만 처리한 군 대비, PDP2, PDP9, 또는 PDP10가 혼합된 배지를 처리한 경우 줄기세포 가지가 많이 뻗어나간 것을 확인하였다. 또한, 3D 스페로이드로부터 뻗어나간 줄기세포 가지의 길이를 정량화하여 도 3에 나타낸 바와 같이 PDP2, PDP9, 또는 PDP10가 혼합된 배지를 처리한 경우 줄기세포 가지가 상대적으로 긴 것으로 나타났다. 즉, 상기 실험을 통해 펩타이드 PDP2, PDP9, 또는 PDP10은 줄기세포의 이동성을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

[0074] **실시예 3: 3D culture를 이용한 PDP2, PDP9, PDP10 펩타이드 효능 검증**

[0075] 실시예 1에서 선별한 펩타이드 PDP2, PDP9, PDP10의 효능을 검증하기 위해, 도 4의 방법을 따라 여러 시그널링 경로들(signaling pathway)에 관여하는 hAKT, pERK, PI3K, Smad2 유전자 발현 정도를 확인하는 실험을 실시하였다.

[0076] 구체적으로, 3차원 세포 배양에 많이 사용되는 매트리겔(Matrigel®)에 중간엽줄기세포를 1×10^7/ml의 농도로 균일하게 섞어준 후 50μl씩 drop 형태로 겔화 시키고 펩타이드(PDGF, PDP2, PDP9, 또는 PDP10)가 10μM과 100μM로 희석된 포함된 배지, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을(를) 500μl씩 처리하였다. 처리한 배양액은 3일에 한 번 교체하면서 7일과 14일 간 배양하였다. 펩타이드(PDGF, PDP2, PDP9, PDP10)를 포함하는 배지에서 배양한 중간엽줄기세포(hMSC)에서 RNA를 추출하고, RT-qPCR을 실시하여 hAKT, pERK, PI3K, Smad2 유전자 발현 정도를 측정하였다.

[0077] 그 결과, 도 5a 내지 도 5d에 나타낸 바와 같이, 각각 저농도 및 고농도(0.1μM, 1μM)로 흰색 막대 및 회색 막대그래프 결과에서와 같이, PDP2, PDP9, 또는 PDP10을 처리한 실험군에서 hAKT, pERK, PI3K, Smad2 발현 수준이 더 높은 것으로 나타났다.

[0079] **실시예 4: 2D 견인력 현미경(traction force microscope)을 이용한 PDP2, PDP9, PDP10 펩타이드 효능 검증**

[0080] 실시예 1에서 선별한 펩타이드 PDP2, PDP9, PDP10 펩타이드의 효능을 검증하기 위해, 도 6의 방법을 따라 견인력(traction force)을 확인하는 실험을 실시하였다.

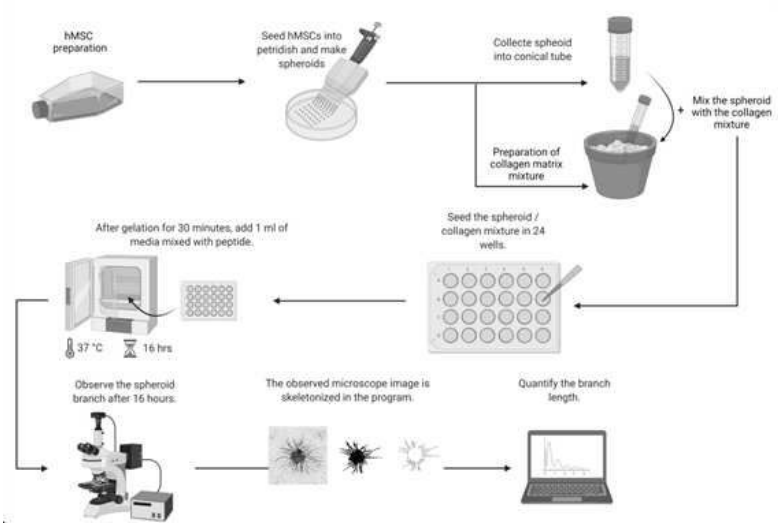
[0081] 구체적으로, 커버 글래스 디쉬에 형광을 발하는 비드가 포함된 PA 젤을 바닥에 균일하게 코팅하고, 콜라겐 젤을 순서대로 도포하여 콜라겐 젤 코팅을 시킨 후 스텐실(stencil)을 준비하였다. 각각의 well에 hMSC를 시딩하고 펩타이드(PDGF, PDP2, PDP9, 또는 PDP10)가 포함된 배지를 살아있는 세포의 명시야 이미징 및 형광 이미징이 가능한 현미경 시스템에 로딩하였다. 24시간동안 명시야 이미징을 통해 줄기세포의 움직임을 관찰하고 세포 아래 도포된 PA 젤의 형광 비드의 움직임을 통해 줄기세포가 바닥에 가하는 힘을 정량하였다.

[0082] 그 결과, 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, PDP2, PDP9, PDP10을 포함한 배지의 경우에도 대조군 대비 우수한 줄기세포 이동속도를 나타내는 것으로 확인하였다. 즉, 상기 실험을 통해 펩타이드 PDP2, PDP9, 또는 PDP10은 줄기세포의 이동성을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다.

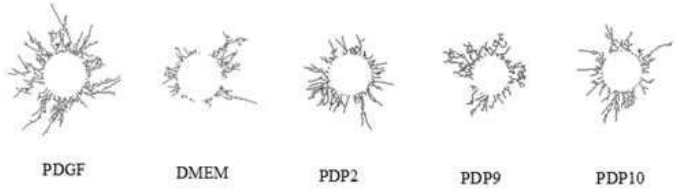
[0084] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

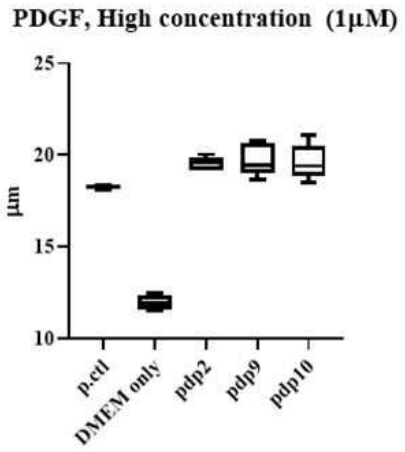
도면1



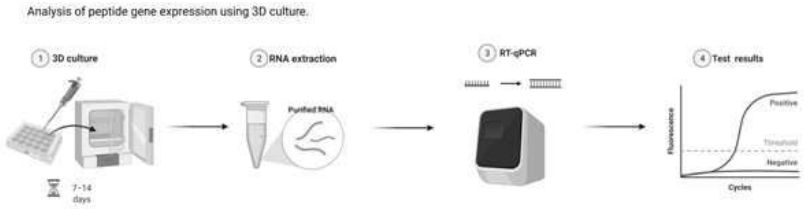
도면2



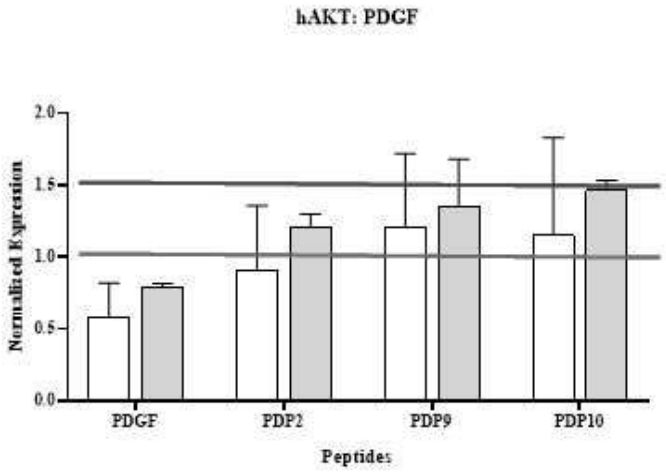
도면3



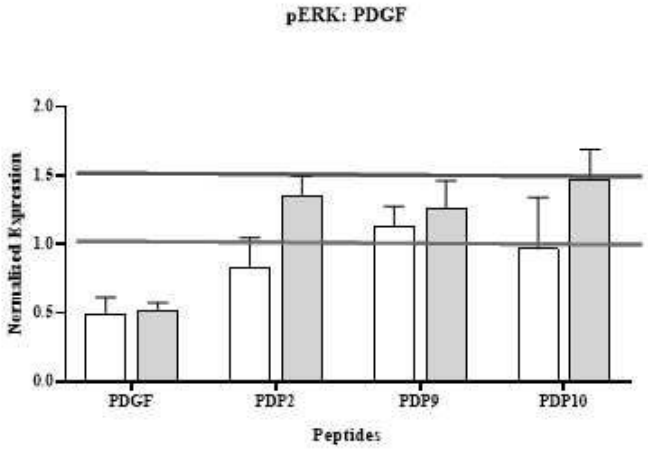
도면4



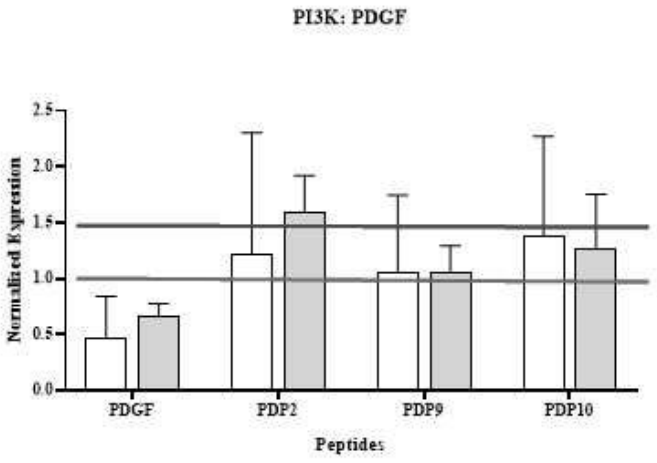
도면5a



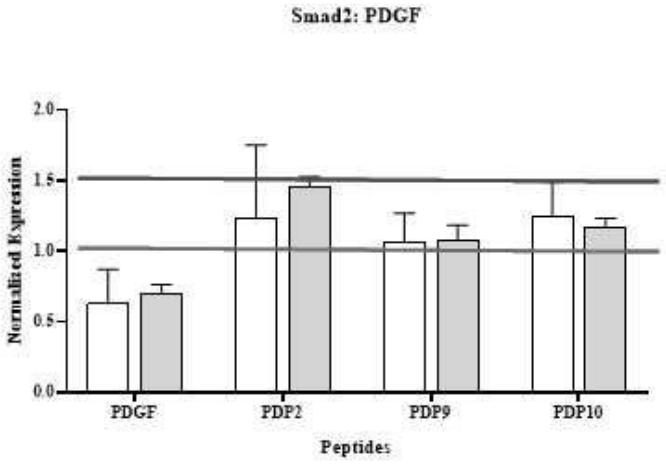
도면5b



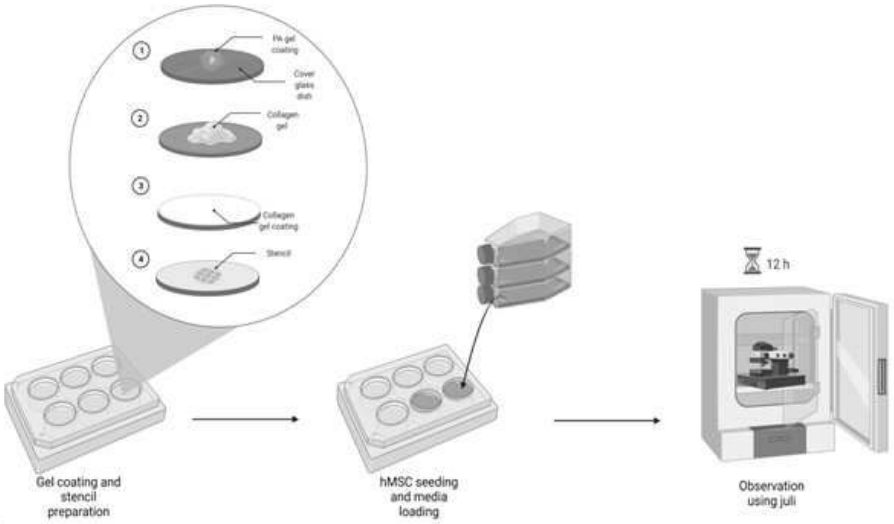
도면5c



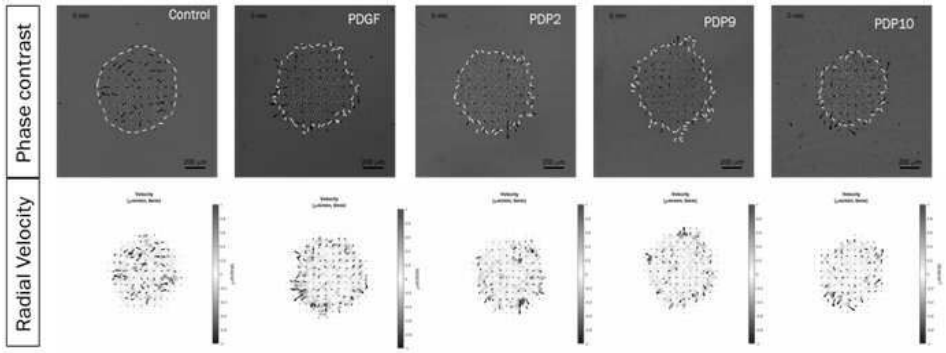
도면5d



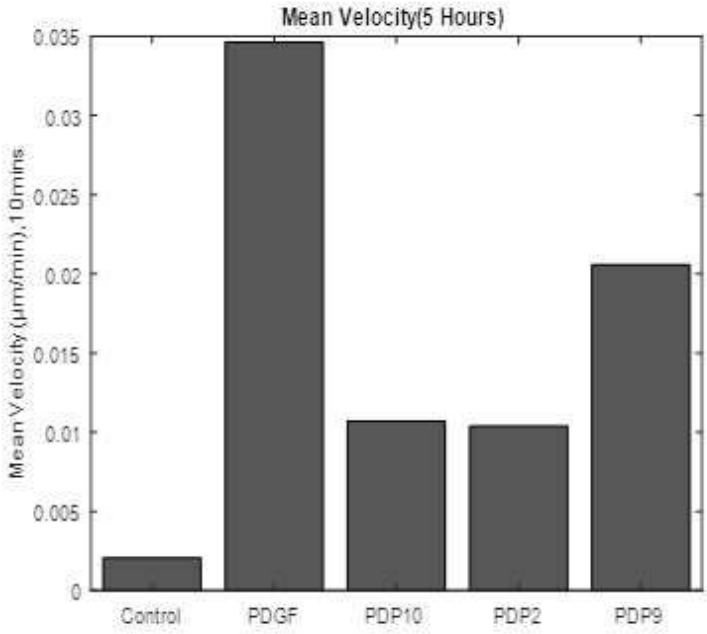
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Novel Peptides from Platelet Derived Growth Factor and uses thereof

<130> KPA2021-256

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 1

Cys Ser Gly Cys Cys Asn Thr Ser Ser Val Gln Gly Arg Pro Thr Gln

1 5 10 15

Val Gln Leu Arg Pro Val Gln Val Arg Lys Val Glu Gly Phe Arg Lys

20 25 30

Arg Ala Thr Leu Lys

35

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 2

Ala Asn Phe Leu Val Trp Pro Pro Cys Val Glu Val Gln Arg Cys Ser

1 5 10 15

Gly Cys Cys Asn Asn Arg Asn Val Gln Cys Arg Pro Thr Gln

20 25 30

<210> 3

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial sequence

<400> 3

Thr Asp Thr Ile Phe Trp Pro Gly Cys Leu Leu Val Lys Arg Cys Gly

1 5 10 15

Gly Asn Cys Ala Cys Cys Leu His Asn Cys Asn Glu Cys Gln Cys Val

20 25 30

Pro Ser Lys

35