



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0134204
(43) 공개일자 2019년12월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61L 27/22 (2006.01) A61L 27/36 (2006.01)

A61L 27/58 (2006.01) C07K 14/75 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61L 27/225 (2013.01)

A61L 27/3604 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0059554

(22) 출원일자 2018년05월25일

심사청구일자 2018년05월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

박용두

서울특별시 강북구 미아동 삼각산 아이원 아파트 115-804호

송명진

서울특별시 도봉구 방학동 705-17 퍼스티안 1304호

장용준

서울특별시 중랑구 면목로40길 35 - 11 (면목동 점보주택) 지층2호

(74) 대리인

윤대웅, 공병욱

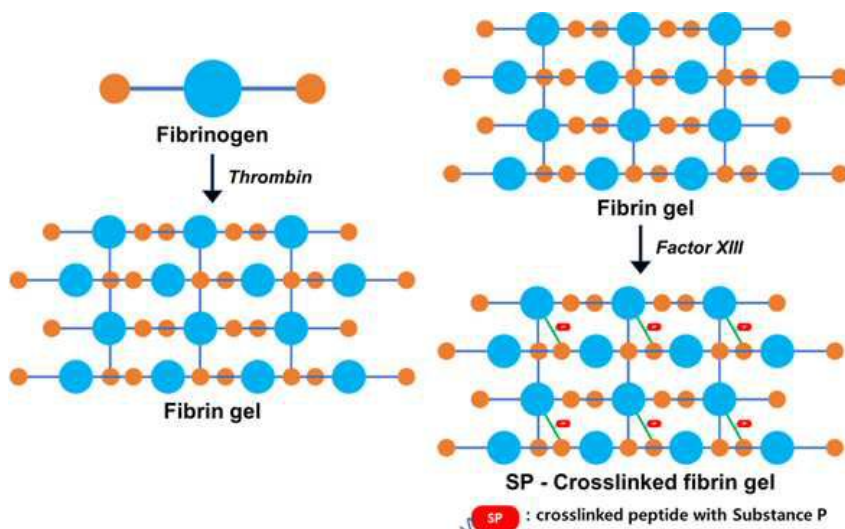
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 조직 재생을 위한 Substance P 펩타이드가 고정된 피브린 젤 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 피브린 젤, 상기 피브린 젤의 제조방법, 및 상기 피브린 젤을 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 피브린 젤은 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고, 효소 결합으로 인해 보다 안정적인 결합을 형성하므로, 조직 재생 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61L 27/54 (2013.01)

A61L 27/58 (2013.01)

C07K 14/75 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

A61L 2300/412 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9B6947892

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 차세대응용오믹스사업

연구과제명 다중스케일 조립기술 기반 기능성 심장 조직 제작 및 독성 유효성 평가

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2016.11.29 ~ 2021.08.28

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드(polypeptide) 및 피브리노겐(Fibrinogen)을 포함하는 피브린 젤(Fibrin gel).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 피브린 젤.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 효소 결합(Enzyme-Linked)을 통해 피브리노겐의 α 사슬(alpha-chain)에 고정된 것인, 피브린 젤.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 피브린 젤은 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 피브리노겐, Ca^{2+} 및 트롬빈(Thrombin)을 포함하는 것인, 피브린 젤.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드의 농도는 1 내지 50 μM 인 것인, 피브린 젤.

청구항 6

제 4 항에 있어서, 상기 피브리노겐의 농도는 1 내지 20 mg/mL인 것인, 피브린 젤.

청구항 7

제 4 항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 의 농도는 2.5 mM인 것인, 피브린 젤.

청구항 8

제 4 항에 있어서, 상기 트롬빈의 농도는 1 내지 5 U/mL인 것인, 피브린 젤.

청구항 9

제 4 항에 있어서, 상기 피브린 젤은 피브린 젤 100 중량%에 대하여, 폴리펩타이드를 30 내지 80 중량%, 피브리노겐을 0.01 내지 1 중량%, Ca^{2+} 을 0.1 내 10 중량% 및 트롬빈을 0.1 내지 10 중량%로 포함하는 것인, 피브린 젤.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항의 피브린 젤을 포함하는 조직 재생용 조성물.

청구항 11

하기의 단계를 포함하는 피브린 젤 제조방법:

서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 혼합하는 제1 혼합 단계;

Ca^{2+} 를 혼합하는 제2 혼합 단계; 및

트롬빈을 혼합하는 제3 혼합 단계.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 제조방법은 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는 준비 단계를 더 포함하는 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 13

제 11 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 14

제 11 항에 있어서, 상기 폴리펩타이드의 농도는 1 내지 50 μM 인 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 15

제 11 항에 있어서, 상기 피브리노겐의 농도는 1 내지 20 mg/mL인 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 16

제 11 항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 의 농도는 2.5 mM인 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 17

제 11 항에 있어서, 상기 트롬빈의 농도는 1 내지 5 U/mL인 것인, 피브린 젤 제조방법.

청구항 18

제 11 항에 있어서, 상기 제3 혼합 단계는 5 분 이내로 수행되는 것인, 피브린 젤 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피브린 젤, 이의 제조방법, 및 상기 피브린 젤을 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신체 장기의 조직 재생을 위한 연구가 활발하게 진행됨에 따라, 재생 효율이 더 좋은 인자 및 이를 재생이 필요한 조직까지 안정적으로 전달할 수 있는 생체 재료의 개발이 필수적이다.

[0003] 기존의 아크릴기가 부착된 히알루론산-기반 하이드로젤(hydrogel)은 성장 인자 및 세포를 포함(conjugation)시켜 전달할 수 있는 장점이 있으나, 제작 과정이 길고, 수화력을 가지고 있어 모든 장기에 적용할 수 없는 단점이 있다.

[0004] 또한, 이러한 하이드로젤의 단점을 보완하기 위해 개발된 헤파린-기반 피브린 젤(fibrin gel)은 생체 적합성을 가지는 장점이 있으나, 단백질 결합으로 고형화가 되어 안정적인 피브린 젤을 얻기가 쉽지 않은 단점이 있다.

[0005] 이에 따라, 생체 적합성을 가진 동시에 성장 인자 및 세포의 활성을 유지시킬 수 있고, 제작 과정이 짧으며, 모든 장기에 적용 가능하고, 안정적인 결합을 유지시킬 수 있는 생체 재료의 개발이 시급하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 국내공개특허 10-2007-0073008호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명자들은 성장 인자 및 세포의 활성 유지, 및 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고 모든 장기에 적용 가능한 생체 재료를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 플라스민 저해제의 펩타이드에 P 물질(substance P) 펩타이드를 결합시킨 합성 폴리펩타이드를 사용하여 피브린 젤을 제조하는 경우, 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고, 효소 결합으로 인해 보다 안정적인 결합을 형성함을 규명함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드(polypeptide) 및 피브리노겐(Fibrinogen)을 포함하는 피브린 젤(Fibrin gel)을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 다른 목적은 조직 재생용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 피브린 젤 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 조직 재생용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 조직 재생 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 조직 재생용 조성물의 조직 재생 용도를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명자들은 성장 인자 및 세포의 활성 유지, 및 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고 모든 장기에 적용 가능한 생체 재료를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 플라스민 저해제의 펩타이드에 P 물질(substance P) 펩타이드를 결합시킨 합성 폴리펩타이드를 사용하여 피브린 젤을 제조하는 경우, 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고, 효소 결합으로 인해 보다 안정적인 결합을 형성함을 규명하였다.
- [0014] 본 발명은 피브린 젤, 이의 제조방법, 및 상기 피브린 젤을 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.
- [0016] 본 발명의 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 포함하는 피브린 젤에 관한 것이다.
- [0017] 본 명세서에서 "피브린 젤(Fibrin gel)"은 피브린(Fibrin, 생체 적합성 천연 응고 물질) 등이 혼합된 젤(gel) 타입의 물질을 의미한다. 상기 피브린 젤은 뛰어난 생체 적합성뿐만 아니라 생분해성이 우수하므로, 세포가 탑재된 구조의 제조에 널리 이용되고 있다. 또한, 상기 피브린 젤은 별도의 합성을 필요로 하지 않으므로 조직 재생을 위한 특정 인자를 쉽게 고정시킬 수 있고, 고정시킬 수 있는 특정 인자의 수도 제한적이지 않으며, 단 시간에 고형화가 가능하므로, 세포가 탑재된 구조의 제조 시 세포 손상을 최소화 할 수 있다는 장점이 있다.
- [0018] 상기 세포는 예를 들어, 줄기세포, 심장세포, 혈관내피세포 또는 섬유아세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 상기 폴리펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드가 링커(Linker)로 연결된 것일 수 있다.
- [0020] 상기 링커는 당업계에서 펩타이드를 연결하기 위하여 이용되는 어떠한 링커도 포함할 수 있다.
- [0021] 상기 폴리펩타이드는 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0022] 상기 폴리펩타이드는 효소 결합(Enzyme-Linked)을 통해 피브린 젤 내에 고정된 것일 수 있다. 효소-기질의 결합을 통해 폴리펩타이드를 피브린 젤 내 피브리노겐의 α사슬(alpha-chain)에 고정시킴으로써, 펩타이드 서열끼리의 결합인 단백질 결합 보다 안정적인 결합을 유도할 수 있다.
- [0023] 상기 피브린 젤은 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드, 피브리노겐, Ca^{2+} 및 트롬빈을 포함하는 것일 수 있다.
- [0024] 상기 피브린 젤에서 상기 폴리펩타이드의 농도는, 예를 들어, 1 내지 50 μM , 1 내지 45 μM , 1 내지 40 μM , 1 내지 35 μM , 1 내지 30 μM , 1 내지 25 μM , 1 내지 20 μM , 1 내지 15 μM , 1 내지 10 μM , 10 내지 50 μM , 15 내지 50 μM , 20 내지 50 μM , 25 내지 50 μM , 30 내지 50 μM , 35 내지 50 μM , 40 내지 50 μM , 45 내지 50 μM , 10 내지 40 μM , 20 내지 30 μM 또는 10 μM 인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 피브린 젤에서 상기 피브리노겐의 농도는, 예를 들어, 1 내지 20 mg/mL, 1 내지 15 mg/mL, 1 내지 10

mg/mL, 1 내지 5 mg/mL, 5 내지 20 mg/mL, 10 내지 20 mg/mL, 15 내지 20 mg/mL, 5 내지 15 mg/mL 또는 5 mg/mL인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0026] 상기 피브린 겔에서 상기 Ca^{2+} 의 농도는, 예를 들어, 2.5 mM인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기 피브린 겔에서 상기 트롬빈의 농도는, 예를 들어, 1 내지 5 U/mL, 1 내지 4 U/mL, 1 내지 3 U/mL, 1 내지 2 U/mL 또는 2 U/mL인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 피브린 겔은 피브린 겔 100 중량%에 대하여, 폴리펩타이드를 30 내지 80 중량%, 피브리노겐을 0.01 내지 1 중량%, Ca^{2+} 을 0.1 내 10 중량% 및 트롬빈을 0.1 내지 10 중량%로 포함하는 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 또 다른 일 양태는 하기의 단계를 포함하는 피브린 겔 제조방법에 관한 것이다.
- [0030] 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 혼합하는 제1 혼합 단계;
- [0031] Ca^{2+} 를 혼합하는 제2 혼합 단계; 및
- [0032] 트롬빈을 혼합하는 제3 혼합 단계.
- [0033] 상기 제조방법은 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 제조하는 준비 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 제1 혼합 단계는 실온에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0035] 상기 제1 혼합 단계는 1 시간 동안 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 제2 혼합 단계는 실온에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 상기 제2 혼합 단계는 5 분 이내로 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0038] 상기 제3 혼합 단계는 37 °C에서 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0039] 상기 제3 혼합 단계는 5 분 이내로 수행될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 수 초 내에 고형화가 가능하므로, 종래의 하이드로겔 보다 제조 시간을 단축시킬 수 있으며, 단 시간에 고형화가 가능하여 세포 손상을 최소화 할 수 있다는 장점이 있다.
- [0040] 상기 폴리펩타이드 및 이를 포함하는 피브린 겔의 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략한다.
- [0041] 본 발명의 다른 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것이다.
- [0042] 상기 조직은 재생이 필요한 어느 장기(Organ)의 조직(Tissue)일 수 있고, 예를 들어, 상피조직(epithelial tissue), 근육조직(muscular tissue), 신경조직(nervous tissue) 또는 결합조직(connective tissue)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 상기 근육은 골격근(Skeletal muscle), 심근(cadiac muscle) 또는 평활근(smooth muscle)일 수 있다.
- [0044] 상기 조직 재생용 조성물은 조직 재생 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약제학적'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 약제학적 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며, 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제나 슈크로오즈, 알부민 등이 있다. 적합한 보존제로는 DMSO, glycerol, ethylene glycol, sucrose, trehalose, dextrose, polyvinylpyrrolidone 등이 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 조직 재생 방법에 관한 것이다.
- [0046] 상기 개체는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0047] 상기 조직 재생용 조성물은 조성물이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

- [0048] 상기 조직 재생용 조성물은 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다.
- [0049] 상기 조직 재생용 조성물은 개체 내에 투여하여 피브린 겔을 생성할 수 있어 뼈, 신경 등 결손된 조직에 최소의 손상을 주고, 이들 결손된 조직을 재생하는데 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 또 다른 일 양태는 서열번호 1의 아미노산 서열 및 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드 및 피브리노겐을 포함하는 조성물의 조직 재생 용도에 관한 것이다.

발명의 효과

- [0051] 본 발명은 피브린 겔, 상기 피브린 겔의 제조방법, 및 상기 피브린 겔을 포함하는 조직 재생용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 피브린 겔은 생체 적합성을 가진 동시에 제작 과정이 짧고, 효소 결합으로 인해 보다 안정적인 결합을 형성하므로, 조직 재생 용도로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0052] 도 1은 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔의 모식도이다.
- 도 2a는 본 발명의 일 실시예에 따른 트롬빈의 최적 농도를 확인하기 위하여, 피브린 겔의 고형화 속도를 확인한 결과이다.
- 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따른 트롬빈의 최적 농도를 확인하기 위하여, 피브린 겔의 고형화 정도를 확인한 결과이다.
- 도 2c는 본 발명의 일 실시예에 따른 피브리노겐의 최적 농도를 확인하기 위하여, 피브린 겔 내 세포의 Live/Dead 분석을 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔의 AMC 형광 분석 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔에서 배양된 HCAEC 스페로이드(spheroids)의 스프라우팅(sprouting) 정도를 확인한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔에서 배양된 HCAEC 스페로이드에 대하여, F-액틴(F-actin) 염색 후 HCAEC 스페로이드의 스프라우팅 정도를 확인한 결과이다.
- 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔에 대하여, 합성 폴리펩타이드의 농도에 따른 피브린 겔의 점도를 측정한 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 겔의 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0053] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] 제조예 1. P 물질(Substance P)-제13인자(Factor XIII) 반응기질 결합 펩타이드(합성 폴리펩타이드)의 제조

- [0056] P 물질(Substance P, Anygen, Korea) 펩타이드(서열번호 1) 및 제13인자(Factor XIII, Anygen) 반응기질 펩타이드(서열번호 2)를 결합시켜, 합성 폴리펩타이드(서열번호 3)를 제조하였다.

[0058] 실험예 1. 피브리노겐(Fibrinogen) 및 트롬빈(Thrombin)의 최적 농도 확인

- [0059] 2.5, 5, 10 또는 15 mg/ml 농도의 피브리노겐(Sigma-Aldrich, Germany) 및 1 U/mL 또는 2 U/mL 농도의 트롬빈(Sigma-Aldrich)을 실온에서 섞고, 37 °C에서 방치하여 피브린 겔을 제조하였다.
- [0060] 또한, 트롬빈의 최적 농도를 확인하기 위하여, 트롬빈 농도(1 U/mL 또는 2 U/mL)에 따른 피브린 겔 강도 측정을 실시하였다. 이때, 피브리노겐의 농도는 5 mg/ml로 고정하였고, 겔의 고형화가 시작되는 시점부터 끝날 때까지

의 강도를 측정하였다.

[0061] 도 2a 및 2b에서 확인할 수 있듯이, 1 U/mL 농도의 트롬빈을 사용한 피브린 겔보다 2 U/mL 농도의 트롬빈을 사용한 피브린 겔의 고형화 시간이 단축됨을 확인하였으며, 1 U/mL 농도의 트롬빈을 사용한 피브린 겔보다 2 U/mL 농도의 트롬빈을 사용한 피브린 겔이 고형화 정도를 단단하게 유지하고 있는 것을 확인하였다. 따라서, 고형화 속도 측면에서 트롬빈의 농도를 2 U/mL로 확정하고, 피브리노겐 농도를 확정하기 위하여 하기와 같이 추가 실험을 진행하였다.

[0063] 5 또는 10 mg/mL 농도의 피브리노겐을 사용(트롬빈 농도: 2 U/mL)하여 피브린 겔을 제조하고, 이에 인간유래 중간엽 줄기세포(human mesenchymal stem cells; hMSCs)(Lonza, #PT-2501)를 접종하여 37 °C에서 14 일 동안 배양 후 Live/Dead 분석을 진행하였다.

[0064] 도 2c에서 확인할 수 있듯이, 10 mg/mL 농도의 피브리노겐을 사용한 피브린 겔보다 5 mg/mL 농도의 피브리노겐을 사용한 피브린 겔에서 세포의 부착능 및 활성도가 증가됨을 확인하였다. 따라서, 세포 부착성 측면에서 피브리노겐의 농도를 5 mg/mL로 확정하였다.

[0066] 실시예 1. 10 μM 농도의 합성 폴리펩타이드(P 물질)를 포함하는 혼합물의 제조

[0067] 플라스크에 0.5 mg/mL 농도로 용해된 합성 폴리펩타이드 528 μL, 피브리노겐 5 mg 및 20 mM TBS(Tris-Buffered Saline) 342 μL(Bio-RAD, US)를 넣고, 37 °C에서 1 시간 동안 녹였다. 그 다음, 50 mM Ca²⁺ 50 μL(Sigma-Aldrich)를 넣고 실온에서 섞어 액체 상태의 혼합물을 제조하였다.

[0069] 실시예 2. 50 μM 농도의 합성 폴리펩타이드(P 물질)를 포함하는 혼합물의 제조

[0070] 2.5 mg/mL 농도로 용해된 합성 폴리펩타이드를 사용한 것을 제외하고, 실시예 1의 방법과 동일하게 액체 상태의 혼합물을 제조하였다.

[0072] 비교예. 합성 폴리펩타이드(P 물질)를 포함하지 않는 혼합물의 제조

[0073] 플라스크에 피브리노겐 5 mg 및 20 mM TBS 342 μL를 넣고, 37 °C에서 1 시간 동안 녹였다. 그 다음, 50 mM Ca²⁺ 50 μL를 넣고 실온에서 섞어 액체 상태의 혼합물을 제조하였다.

[0075] 실험예 2. 피브린 겔 내 합성 폴리펩타이드의 가교 여부 확인

[0076] 먼저, 실시예 1 및 실시예 2에 대하여, 합성 폴리펩타이드 내 P 물질 펩타이드의 N-말단에 형광물질인 AMC(7-amino-4-methylcoumarin) 펩타이드(여기(excitation); 360 nm, 빛 방출; 460 nm)를 부착하였다.

[0077] 상기 AMC 펩타이드가 부착된 실시예 1 및 2의 혼합물, 및 비교예의 혼합물을 25 μL씩 12 웰에 넣고, 100 U 트롬빈 80 μL를 사용하여 고형화시켜 피브린 겔을 제조하였다. 그 다음, 투-포톤 현미경(two-photon laser microscopy, ECLIPSE Ti2, Nikon)을 사용하여 가교 여부를 확인하였다. 합성 폴리펩타이드가 피브린 겔에 단순 포함되는 경우, 피브린 겔에서 자연적으로 발생하는 수분에 의해 빠져 나오게 되어 발색을 확인할 수 없게 된다.

[0078] 도 3에서 확인할 수 있듯이, P 물질이 첨가된 실시예 1(SP 10 μM) 및 실시예 2(SP 50 μM)의 혼합물을 사용하여 고형화시킨 피브린 겔에서만 발색되어, 상기 두 종류의 피브린 겔에 합성 폴리펩타이드가 결합되어 있는 것을 알 수 있었다.

[0080] 실험예 3. 합성 폴리펩타이드에 의한 혈관 생성(angiogenesis) 확인

[0081] 내피 기본 배지(Endothelial Basal Medium; EBM)(Lonza) 및 내피 성장 배지(Endothelial Growth Medium;

EGM)(Lonza)가 8:2의 비율로 혼합된 배지에서 인간 심장 대동맥 내피세포(Human cardiac aortic endothelial cell; HCAEC)(Lonza, Basel, Swiss)를 37 °C에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양된 HCAEC를 1,000 cells/25 uL의 농도로 방울(Hanging-drop) 배양(37 °C, 24 시간)하여 스페로이드(spheroids)를 형성하도록 하였다.

[0082] 비교예, 실시예 1 및 실시예 2의 혼합물에 상기 형성된 HCAEC 스페로이드를 넣고 섞은 후, 100 U 트롬빈 80 μL를 사용하여 고형화시킨 피브린 젤을 제조하였다.

[0084] 각각 6 시간 및 12 시간 후, 투-포톤 현미경을 사용하여 HCAEC 스페로이드의 스프라우팅(sprouting) 정도를 확인하였다.

[0085] 도 4에서 확인할 수 있듯이, 비교예(Control)에 비하여, P 물질이 첨가된 실시예 1(SP 10 μM)의 혼합물 및 실시예 2(SP 50 μM)의 혼합물을 사용하여 고형화시킨 피브린 젤에서 HCAEC 스페로이드의 가지들이 더 많고 길게 뻗어 나가는 것을 알 수 있었다.

[0087] 또한, 12 시간 후에는, 추가적으로 HCAEC 스페로이드를 4 % 파라포름알데하이드(Biosesang, #0694)로 20 분간 고정시키고 0.4 % 트리톤 X-100(Life science, #0694)을 20 분간 처리한 후, Alexa Fluor 488 팔로이딘(Thermo fisher, US)을 1:200의 농도로 하여 HCAEC 스페로이드의 F-액틴(F-actin)을 염색하였다. 그 다음, 공초점 현미경(confocal microscope, Eclipse TE2000-U, Nikon)를 사용하여 스프라우팅 정도를 확인하였다.

[0088] 도 5에서 확인할 수 있듯이, P 물질이 첨가된 실시예 1(SP 10 μM)의 혼합물 및 실시예 2(SP 50 μM)의 혼합물을 사용하여 고형화시킨 피브린 젤에서 HCAEC 스페로이드의 가지들이 더 많고 길게 뻗어 나가는 것을 알 수 있었다.

[0090] 실험예 4. 피브린 젤의 점도(Viscosity) 확인

[0091] 비교예, 실시예 1 및 실시예 2의 혼합물에 100 U 트롬빈 80 μL을 넣고, 레오미터(Brookfield DV-III+ programmable rheometer, US)를 이용하여 각각 0(트롬빈을 넣은 직후), 20, 40, 60, 80 및 100(고형화 완료 시점) 초에서 점도를 측정하였다.

[0092] 도 6에서 확인할 수 있듯이, P 물질이 첨가된 실시예 1(SP 10 μM)의 혼합물 및 실시예 2(SP 50 μM)의 혼합물을 사용하여 고형화시킨 피브린 젤의 점도는 2000~3000 Pas로, 인체의 지방(1500~2000 Pas)과 유사한 점성을 가지고 있음을 확인하였다.

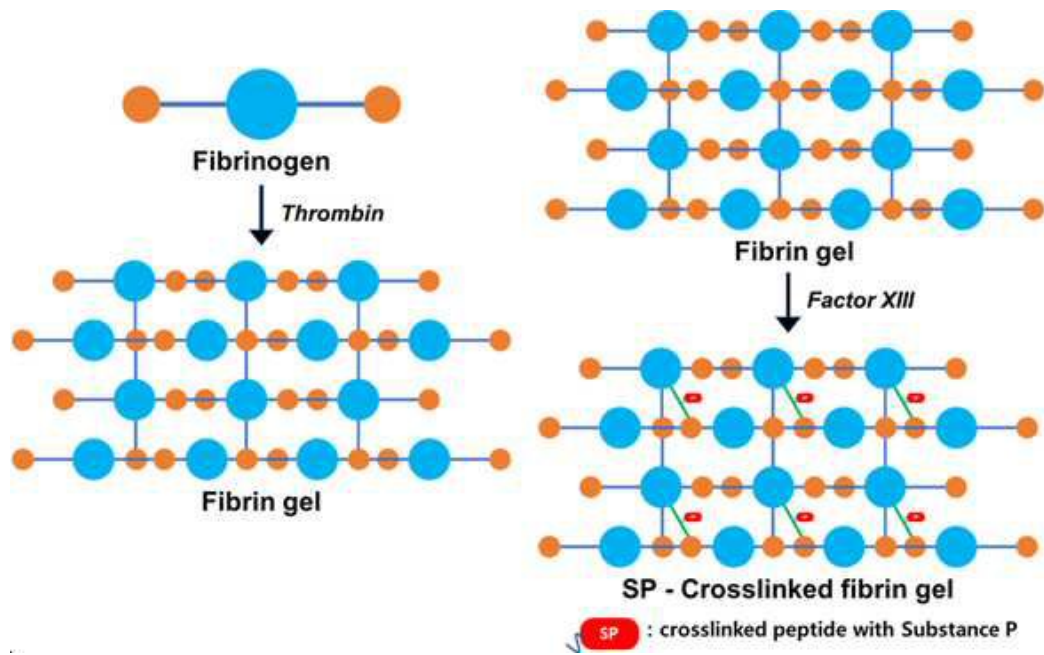
[0094] 제조예 2. 합성 폴리펩타이드가 고정된 피브린 젤의 제조

[0095] 상기 실험예 1 내지 4의 결과를 바탕으로, 하기와 같이 합성 폴리펩타이드가 결합된 피브린 젤을 제조하였다. 제조된 피브린 젤의 사진은 도 6에 나타내었으며, 사용된 각 조성의 최적 농도는 다음과 같다(최종 부피: 1 mL): 피브리노겐 5 mg/mL, 트롬빈 2 U/mL, Ca²⁺ 2.5 mM, 및 합성 폴리펩타이드 264 μg/mL(10 μM).

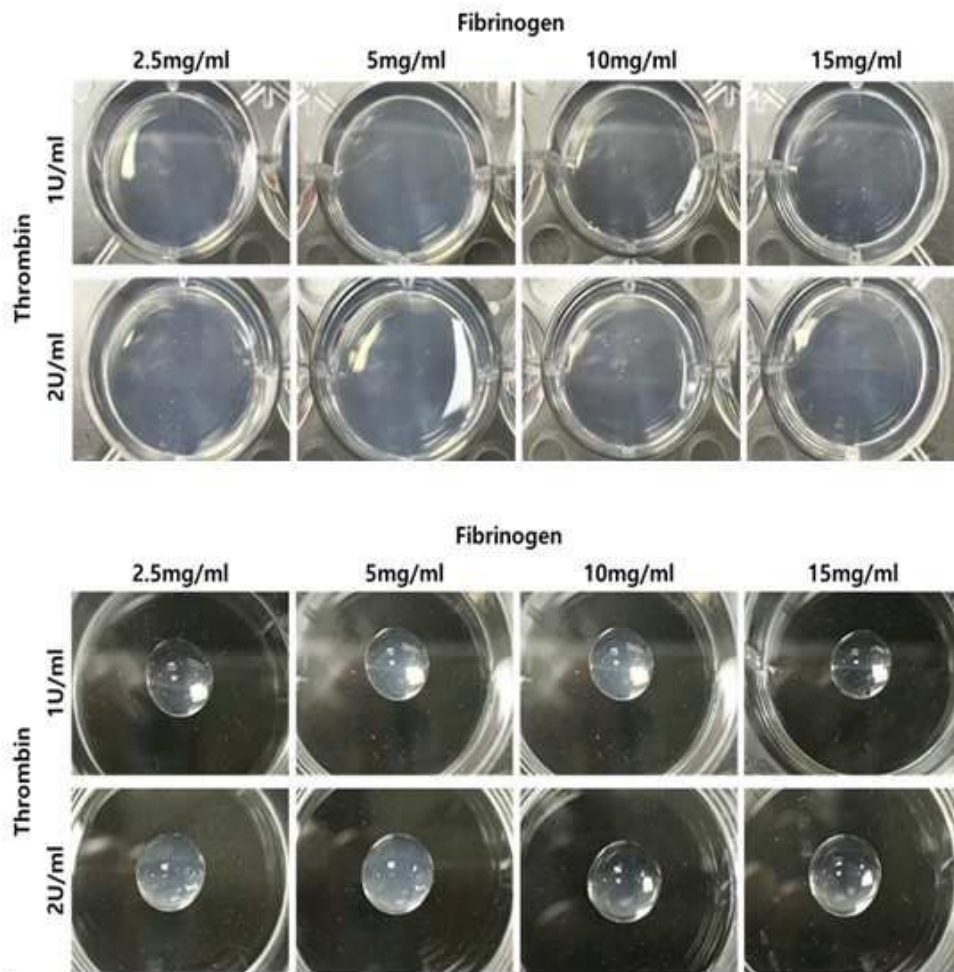
[0096] 구체적으로, 0.5 mg/mL 농도로 용해된 합성 폴리펩타이드 528 μL에 피브리노겐 5 mg 및 20 mM TBS 342 μL를 넣고, 37 °C에서 1 시간 동안 녹였다. 그 다음, 50 mM Ca²⁺ 50 μL를 넣고 섞어 액체 상태의 혼합물을 제조하였다. 제조된 혼합물에 100 U 트롬빈 80 μL를 넣고 섞어 고형화된 피브린 젤을 제조하였다.

도면

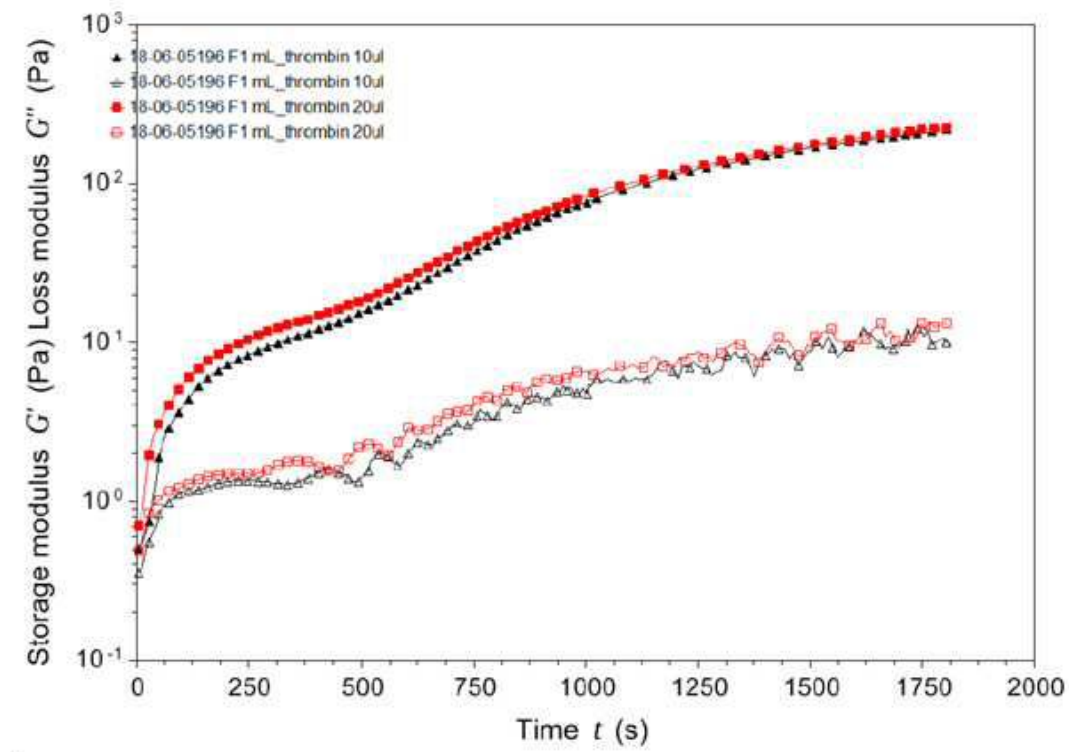
도면1



도면2a



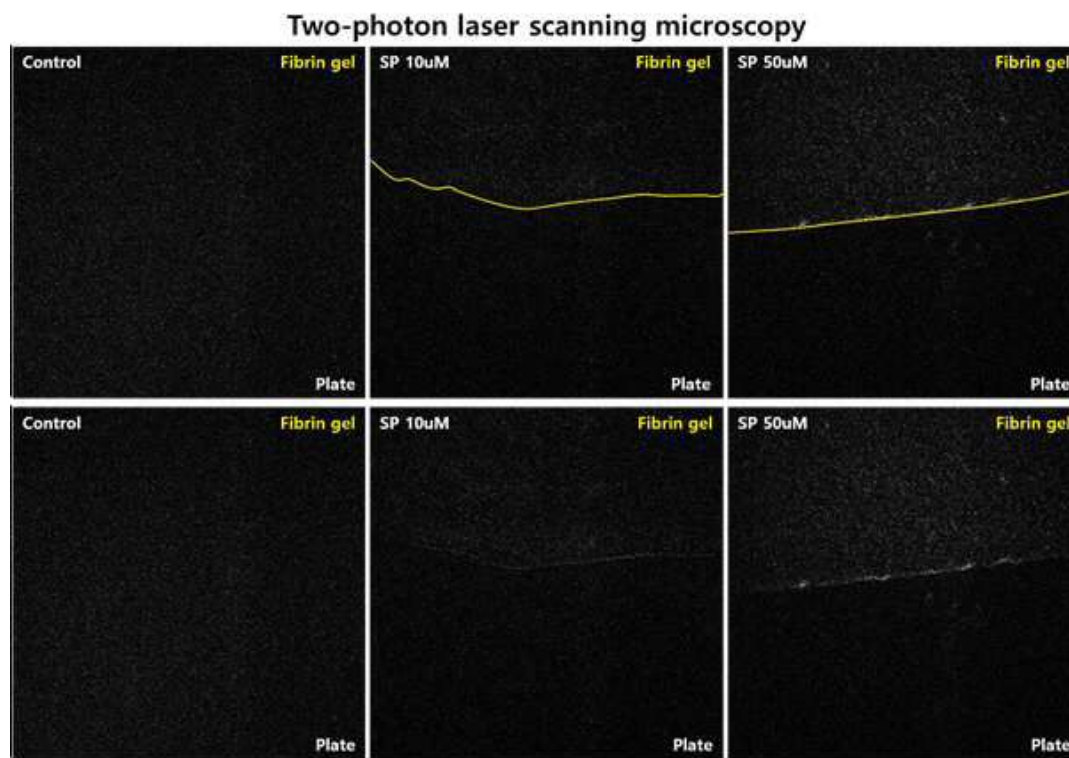
도면2b



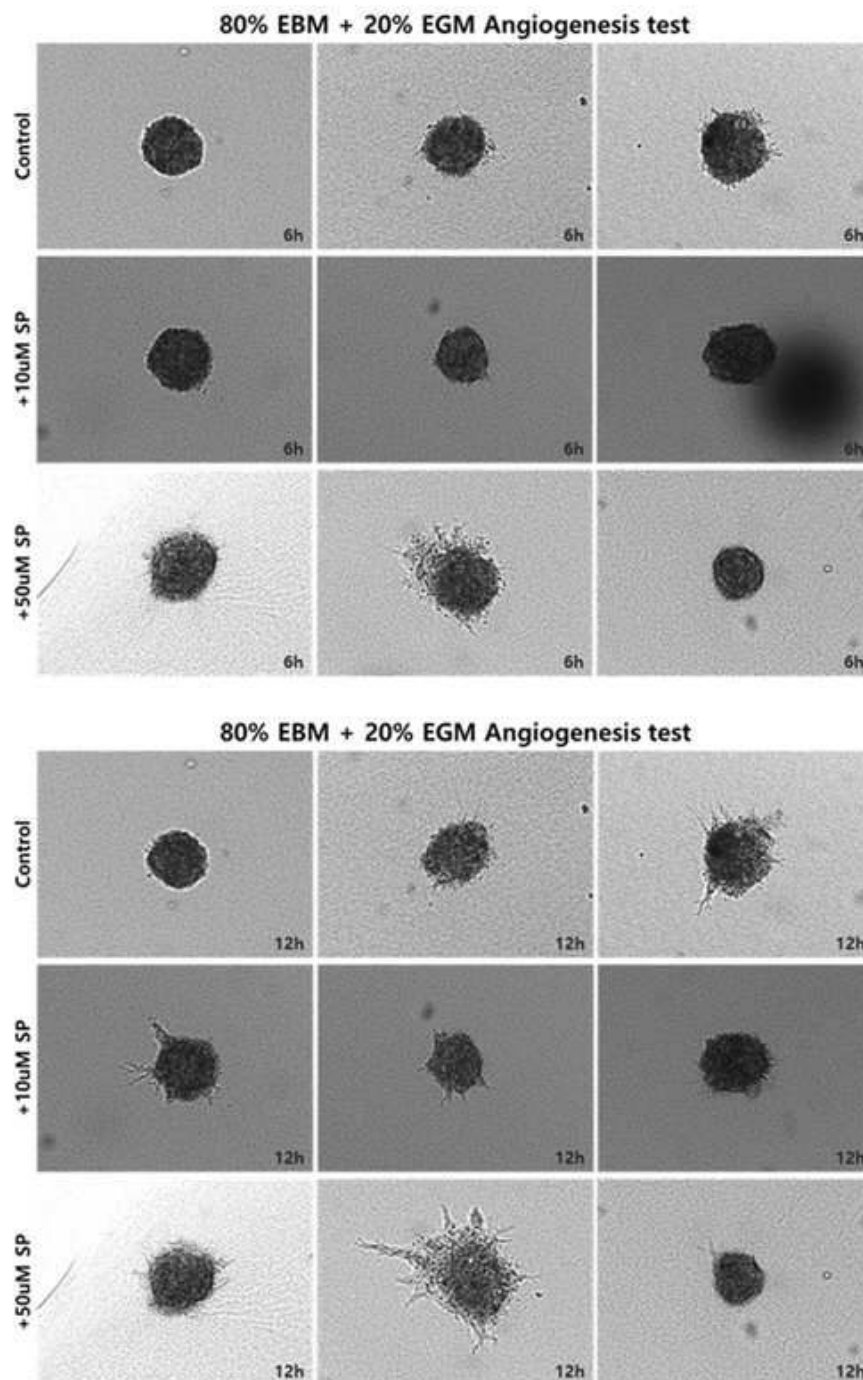
도면2c



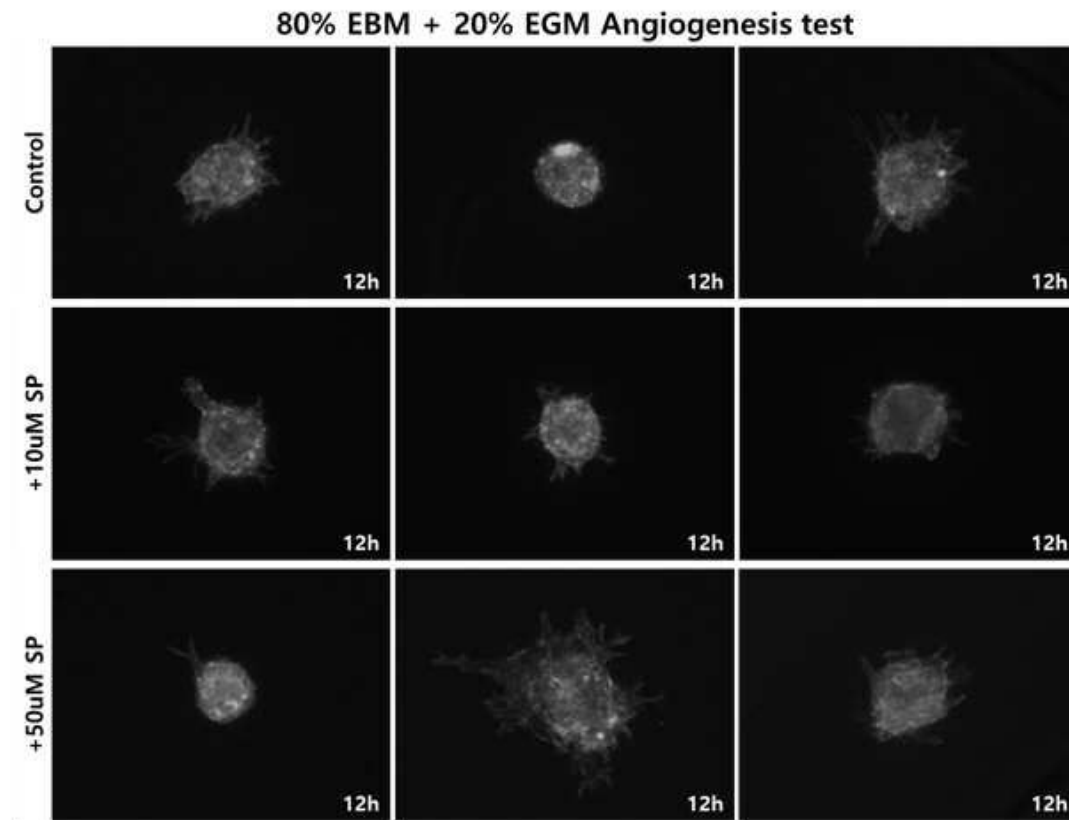
도면3



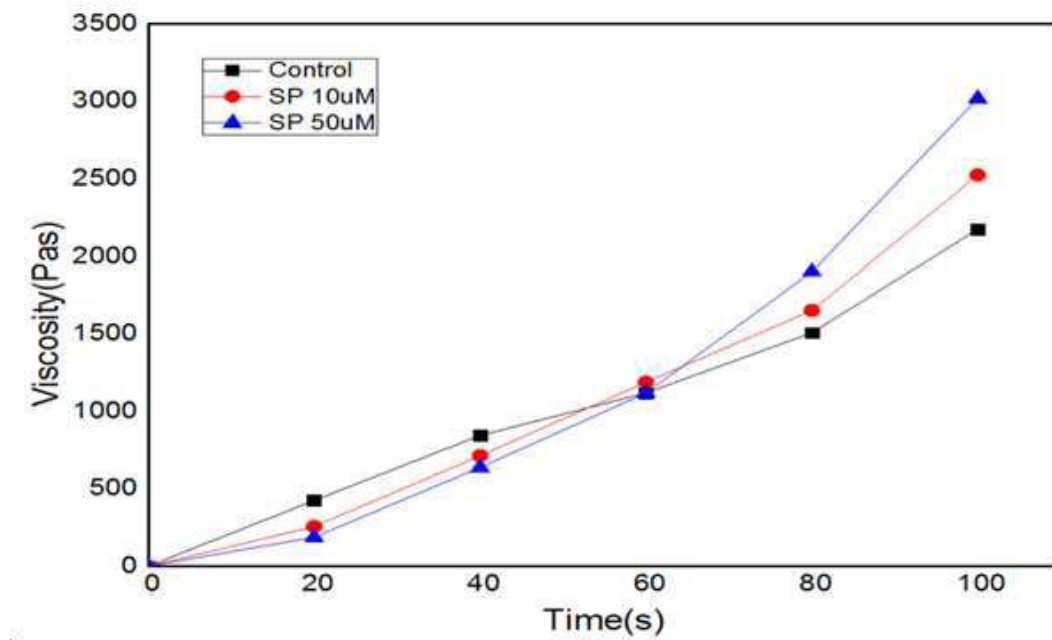
도면4



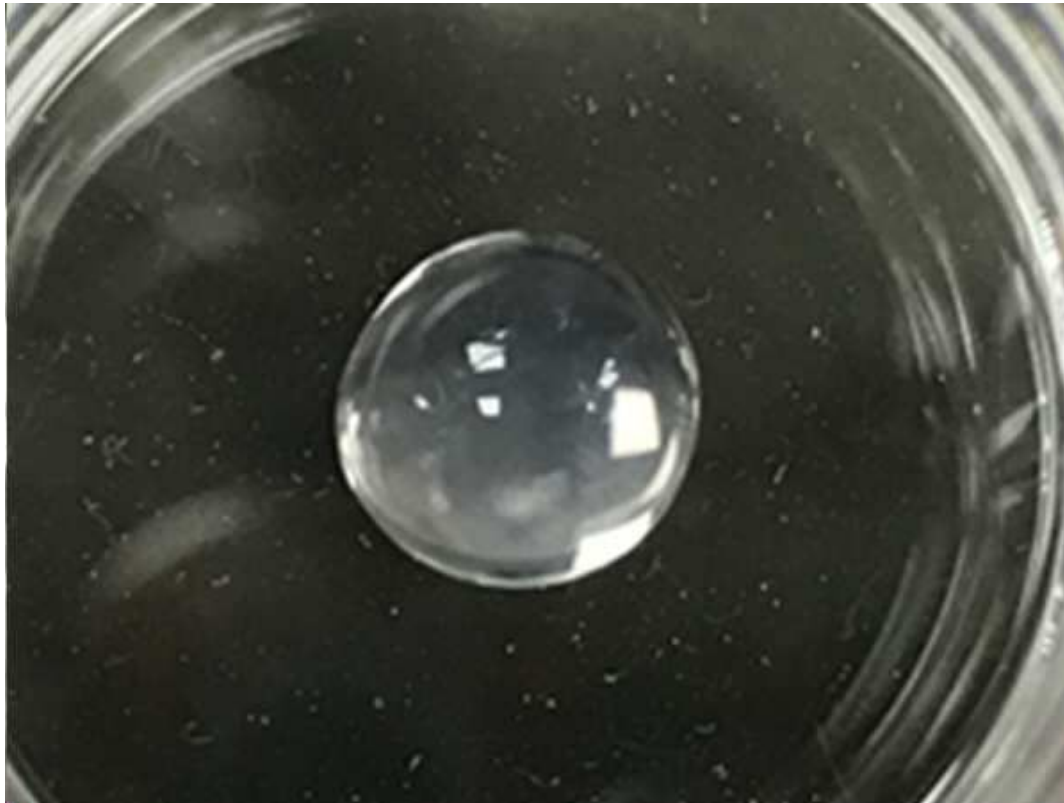
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> SUBSTANCE P PEPTIDE-FIXED FIBRIN GEL FOR TISSUE REGENERATION AND PREPARATION METHOD THEREOF
- <130> PN180071
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Substance P
- <400> 1
- Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 11
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> α2 Plasmin inhibitor

<400> 2

Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe Gly Leu Met

1 5 10

<210> 3

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthesis polypeptide

<400> 3

Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Arg Pro Lys Pro Gln Gln Phe Phe

1 5 10 15

Gly Leu Met