

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0001525 (43) 공개일자 2011년01월06일
(51) Int. Cl.		(71) 출원인
C07K 19/00 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)		고려대학교 산학협력단
A61L 27/52 (2006.01) A61K 47/30 (2006.01)		서울 성북구 안암동5가 1
(21) 출원번호 10-2009-0059090		(72) 발명자
(22) 출원일자 2009년06월30일		박용두
심사청구일자 2009년06월30일		서울특별시 성북구 길음뉴타운 222동 1403호
		선경
		서울특별시 노원구 월계3동 18 그랑빌아파트 116동 302호
		윤소정
		대전광역시 서구 도마동 삼성하이츠 7동 303호
		(74) 대리인
		이문섭

전체 청구항 수 : 총 14 항

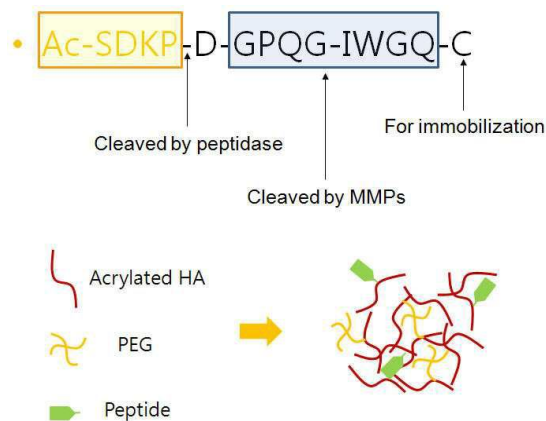
(54) 조직재생을 위한 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드의 스마트 방출지지체

(57) 요약

본 발명은 조직재생을 위한 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드의 생체내 활성에 따라 방출속도가 조절되는 차세대형 스마트 방출지지체에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, MMP(Matrix Metalloprotease) 또는 플라스민(plasmin)에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 시스테인 아미노산이 N' → C' 방향으로 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드 및 Ac-SDKP 펩타이드 스마트 방출 지지체로서 상기 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 조직재생 효과가 있는 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드가 생체내 활성에 따라 방출속도가 조절됨으로써 심장재생과 같은 조직재생용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, MMP(matrix metalloprotease) 또는 플라스민(plasmin)에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 시스테인 아미노산이 N' → C' 방향으로 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드와 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 사이에 펩티다제에 의한 절단을 위한 D(Aspartic acid) 아미노산이 더 포함된 합성 펩타이드.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드는 MMP에 의해 절단 가능한 펩타이드인 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드는 아세틸화된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 합성 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 하이드로젤은 아크릴화된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 합성 펩타이드의 C' 말단에 있는 시스테인의 SH기가 상기 하이드로젤의 아크릴(Acryl)기와 아미드 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 하이드로젤은 아크릴화된 히알루론산인 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 10

제 6항에 있어서, 상기 하이드로젤은 PEG(Poly Ethylene Glycol)를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 11

제 6항에 있어서, 상기 하이드로젤은 주사형인 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤.

청구항 12

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 따른 합성 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조직재생용 약학적 조성물.

청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 합성 펩타이드는 하이드로젤에 고정화되어 있는 것을 특징으로 하는 조직재생용 약학적 조성물.

청구항 14

제 12항에 있어서, 상기 조직재생은 심장재생인 것을 특징으로 하는 조직재생용 약학적 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 조직재생을 위한 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드의 생체내 활성에 따라 방출속도가 조절되는 차세대형 스마트 방출지지체에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 시스테인 아미노산이 N' → C' 방향으로 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드 및 Ac-SDKP 펩타이드의 스마트 방출 지지체로서 상기 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조직공학 및 재생의학은 치료 물질인 세포 및 성장인자들의 적절한 전달을 통하여 손상된 조직과 재생을 복원하는데 목표를 가지고 있다. 현재는 세포치료 특히 줄기세포를 이용한 다양한 치료법이 전임상 임상적으로 시행되고 있으나, 세포의 단순 주입의 경우 낮은 생착률 및 분화조절의 어려움 등으로 인해 효과를 극대화하는데 어려움을 겪고 있다.

[0003] 따라서 줄기세포의 생착률 및 분화조절능을 생체 내에서 극대화시키기 위해 지지체를 이용한 다양한 방법이 개발되고 있다. 조직은 다양한 세포가 복잡한 조직체를 이루고 있는 일종의 시스템이다. 따라서 특정 조직을 재생하는데 있어 이상적인 조직의 형태나 세포 구성 등이 존재하며 지지체는 이러한 세포의 융합된 조직체를 이루는데 일종의 틀 역할을 수행한다. 또한 손상된 조직은 비정형의 손상 형태를 갖고 있기 때문에 단순히 세포를 주입하는 것만으로 손상 부위를 재생하는 데는 한계가 있다. 예컨대, 화상 환자의 병변은 세포 수준에서 보았을 때 광범위하며 이를 세포만으로 치료하기에는 적용할 수 있는 세포의 수라든지 세포의 병변 내 고정화와 생존, 증식에 있어서 제한 요소가 될 수 있고, 치료 효과도 미미할 것이다. 따라서 효과적인 조직재생을 위하여 세포들이 안착하여 생존하고, 증식할 수 있는 구조적 지지체가 필수적이다.

[0004] 지지체는 현재 단순히 세포 및 성장인자를 전달하는 기능인 1세대의 물질 개발에서, 생물학적으로 활성이 있는

물질을 포함시켜 능동적으로 생체 내에서 조직재생을 돕는 2세대 3세대 물질이 개발되고 있다. 특히, 최근에는 지지체중의 하나인 하이드로젤에 다양한 펩타이드 및 성장인자를 부착시켜 체내의 활성을 증대시키고 조직의 재생능력을 극대화하려는 기술들이 개발되고 있다. 특히, 효과적인 조직 재생을 위해서는 손상된 조직에 혈관이 생성되어야 하는데, VEGF(Vascular endothelial growth factor), FGF(Fibroblast growth factor), PDGF(Platelet-derived growth factor) 이나 EGF(Epidermal growth factor) 등의 다양한 성장인자를 포함시켜 혈관생성을 촉진시키는 기술들이 개발되고 있지만, 아직까지는 만족스러운 수준에 이르지 못하고 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 상기 종래기술들의 문제점들을 극복하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 혈관생성능이 큰 티모신 베타-4 분자 중 핵심서열인 Ac-SDKP 펩타이드를 이용하여 조직재생을 촉진시키는 지지체를 개발하였다. 또한 단순히 짧은 서열의 펩타이드를 생체 내에 첨가하는 방식이 아니라 생체내 활성에 따라 방출되는 정도가 조절되는 차세대형 스마트 방출지지체를 개발함으로써 많은 양의 펩타이드가 아닌 손상된 조직에 특이적으로 낮은 농도로도 작용하는 새로운 방출시스템의 조직재생 및 재건효과를 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0006] 따라서, 본 발명의 주된 목적은 탁월한 혈관생성능을 갖는 조직재생을 위한 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드의 생체내 활성에 따라 방출속도가 조절되는 차세대형 스마트 방출지지체를 개발 및 적용하고 이를 손상조직에 특이적으로 작용하는 조직재생용 하이드로젤을 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기의 Ac-SDKP 펩타이드가 고정화된 하이드로젤을 이용한 조직재생용 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 시스테인 아미노산이 N' → C' 방향으로 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드를 제공한다.

[0009] 본 발명에서 용어, “티모신 베타-4(Thymosin beta-4)”는 4.9 kDa 크기의 43개의 아미노산으로 구성된 생체 내에 존재하는 아주 작은 크기의 단백질로서 상기의 티모신 베타-4 단백질은 낱개의 분리된 형태의 G-액틴(G-actin)과 결합하여 G-액틴이 결합된 형태인 F-액틴(F-actin)을 형성하는 것을 막아주는 기능을 담당하며 이러한 G-액틴과 F-액틴의 전환을 조절하여 액틴세포골격(actin cytoskeleton)의 구조를 변경하고 세포의 이동을 조절하는 역할을 하는 단백질이다. 특히, 티모신 베타-4의 주된 기능은 세포 이동을 조절하여 세포 이동을 촉진시키는 것으로서 이로 인해 혈관내피세포의 이동, 상처치유에 관여하는 세포들의 이동, 모발 근원세포, 그리고 암세포의 이동 등을 촉진시켜 혈관형성, 상처치유, 모발성장, 암전이 등에 관여한다. 생체 내의 티모신 단백질은 각각의 등전점(isoelectric points)에 의해 3개의 주된 그룹으로 나뉜다. pH 5.0 이하의 α-티모신, pH 5.0 ~ pH 7.0 사이의 β-티모신 및 pH 7.0 이상의 γ-티모신 이다. 티모신 베타-4는 β-티모신에 속하며 혈관 형성을 촉진하는 대표적인 인자이다. 티모신 베타-4중 생체 내에서 발현되는 Ac(Acetyl)-SDKP 펩타이드는 티모신 베타-4를 전구체로 하여 프로릴 엔도펩티다제(prolyl endopeptidase) 혹은 AspN-like protease에 의해 형성되며 다능성 조혈줄기세포들(hematopoietic pluripotent stem cells)이 S-phase로 넘어가 분열하는 것을 차단하여 세포주기를 억제하는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0010] 본 발명에서 용어, “MMP”는 세포외 기질을 용해하는 효소로, 체내에 존재하는 4대 단백분해효소(seminethreonine-, aspartic-, cysteine-, metalloproteinase)의 한 가지로, 다음 5가지의 공통적 특성을 갖는 물질이다. 첫째, 세포외 기질 성분중 적어도 한 가지 이상을 분해시키며, 둘째, 효소 활성도에 Zn 이온이 필수적이며 킬레이팅(chelating) 약제에 의해 단백분해기능이 억제되며, 셋째, 비활성형으로 분비되어 활성화 과정을 거쳐 단백분해능을 가진다. 넷째, MMP에 선택적 억제제인 TIMP(tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase)에 의해 그 기능이 억제되며, 다섯째, 공통의 아미노산 서열을 함유한다. 상기 MMP는 기질의 특이성, 억제제의 결합부위, 기질의 결합부위 그리고 세포막에서의 존재 위치에 따라 크게 콜라겐분해효소(collagenase), 스트로메리신(stromelysins), 젤라틴분해효소(gelatinases), 매트릴라이신(matrilysin) 그리고 세포막에 부착되어있는 MT(membrane type)-MMP의 5 가지 군으로 구분된다.

[0011] 본 발명에서 용어, “플라스민”은 혈액 속에 존재하는 단백질 분해효소로서 예컨대, 혈액응고에 관여하는 피브린을 용해하는 단백분해효소인 것이다.

[0012] 본 발명의 합성 펩타이드에서, 상기 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드와 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 사이에 펩티다제(peptidase) 절단을 위한 D(Aspartic acid, Asp) 아미노산이 더 포함된 합성 펩타이드인 것이 바람직하다. 이것에 의해, 인체 내에서 프로테아제 엔도펩티다제 혹은 Asp-N-like protease에 의해 절단되어 Ac-SDKP 펩타이드가 방출 될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드는 당업계에서 MMP 또는 플라스민의 절단부위로 알려진 어떤 펩타이드 서열도 가능하나, 바람직하게는 MMP의 경우 GPQGIWGQ, 플라스민의 경우 LIKMKPM 인 것을 특징으로 한다. 특히, MMP 절단부위를 갖는 경우 심장 리모델링 과정 중에 분비되는 MMP에 의해 절단되어 Ac-SDKP 펩타이드를 타겟부위에 효과적으로 방출시킬 수 있다.

[0014] 본 발명의 합성 펩타이드에서, 상기 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드는 아세틸화된 것을 특징으로 하는 것이 바람직하다.

[0015] 본 발명의 합성 펩타이드는 상기 구성요소 펩타이드들을 포함하는 한 어떤 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 바람직하게는 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 다음 표 1은 합성 펩타이드의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

[0016] [표 1]

이름	아미노산 서열 (N' → C')	서열번호
Ac-SDKP 합성 펩타이드	Acetyl-Ser-Asp-Lys-Pro-Asp-Gly-Pro-Gln-Gly-Ile-Trp-Gly-Gln-Cys	1

[0017]

[0018] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드, MMP 또는 플라스민에 의해 절단 가능한 펩타이드 및 시스테인 아미노산이 N' → C' 방향으로 결합된 것을 특징으로 하는 합성 펩타이드가 고정화된 하이드로젤에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서, 하이드로젤이란 약물전달체계, 생체 조직적 합성재료 등 의약품 재료로 사용 가능한 수팽윤성 고분자를 의미하는데, 이러한 수팽윤성 고분자는 물을 흡수하나 물에 용해되지 않는 고분자 즉 충분한 양의 수분을 보유하고 있는 친수성고분자를 말하며, 이는 히알루론산(hyaluronic acid, HA), 콜라겐 등의 천연고분자와 폴리비닐알코올(poly(vinyl alcohol), PVA), 폴리하이드록시에틸메타아크릴레이트(poly(hydroxyethylmethacrylate), PHEMA) 등의 합성 고분자 등을 이용하여 제조할 수 있다. 본 발명에서 사용한 하이드로젤은 바람직하게는 히알루론산 기반의 하이드로젤이다. 상기의 히알루론산은 생분해성, 생체적합성 재료로서 약 1,000 ~ 10,000,000 g/mole의 넓은 분자량 범위를 갖는 천연고분자이다. 이러한 히알루론산은 결합 조직의 세포외기질(Extracellular matrix, ECM)의 주요 구성성분으로 독특한 점탄성 특성과 생물학적 기능으로 관절염 치료, 안과수술, 약물전달과 조직공학적 응용에 유용한 재료로서 연구되고 있으며, 조직의 수화를 조절하고 ECM 내의 콜라겐섬유와 수화된 네트워크를 이루고 있으며, 또한 상처 치유와 그 과정에서 세포의 이동성과 분화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 히알루론산 기반의 하이드로젤은 아크릴화(Acrylate)된 것이 바람직하며, 특히, 상기 하이드로젤의 아크릴(Acryl)기와 하이드로젤에 고정화된 합성 펩타이드의 C' 말단에 결합된 시스테인 아미노산의 SH기가 아미드 결합되어 형성된 것이다.

[0021] 또한, 본 발명에서 상기 히알루론산 기반의 하이드로젤은 PEG(Poly Ethylene Glycol)를 더 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 상기의 PEG는 가교제로 사용하였으며, 사용한 PEG의 티올기와 생체내 환경 (pH 8, 37도)에서 Michael type addition 반응에 의해 10분 이내에 젤이 만들어지므로 주사형 지지체로 만들 수 있다. 주사형 지지체는 약물이 손상조직에 천천히 방출되도록 속도를 조절함으로써 약물의 농도를 오랫동안 치료 부위에 유지시킬 수 있으며 국소적으로 약물을 환부에 전달시킬 수 있는 장점이 있다.

[0022] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 합성 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조직재생용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 본 발명의 조직재생용 약학적 조성물에 있어서, 통상적으로 사용되는 생체조직재생 기능을 포함할 수 있으나,

바람직하게는 상기 조직재생은 심장재생인 것을 특징으로 한다. 본 발명은 신혈관생성을 촉진시켜 심장재생에 효과를 가지는 것으로 알려진 43개의 아미노산으로 이루어진 티모신 베타-4에서 특히 그 자체적으로 혈관형성에 생활성을 지니는 일부 펩타이드인 Ac-SDKP를 효과적으로 타겟 부위에 방출시켜 심장의 재생을 이루는 기술에 관한 것이다. 작은 펩타이드 조각인 Ac-SDKP를 안정적으로 타겟 부위에 전달하기 위해 펩티다아제와 심장 리모델링 과정 중에 분비되는 MMP에 의해 이차적으로 잘라지는 펩타이드를 디자인 하여 이를 최종적으로 170 kDa의 히알루론산 수화젤에 결합시킨 약물 전달형 지지체이다. 상기 구조물은 심장의 기능이 현격히 떨어진 클로닉 상태의 심근경색 모델에 적용시킨 결과 심장의 기능과 심근의 재생에 효과를 보였다.

[0024] 본 발명의 조성물은 치료용 약제로 이용되기 위해서 약제학적 분야에서 공지된 방법에 의해 제조될 수 있으며, 약학적으로 허용되는 담체, 부형제, 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제, 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다. 또한 이들을 비경구 투여(예컨대, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여될 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 치료용 약제의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 건강상태, 질병의 증상, 투여시간, 투여방법에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 바람직하게는 성인기준 1일 0.1 ~ 100 mg이 투여될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0027] 통계학적 분석.

[0028] 모든 data는 평균과 표준오차(mean $\pm$ standard deviation (SD))이다. 데이터 분석은 오리진프로 7.5(OriginPro 7.5) (OriginLab Co., Northampton, MA, USA)을 사용하여 수행하였다. 두 그룹 사이의 비교분석은 스튜던트 *t*-test를 이용하여 수행하였다. $P < 0.05$ 를 유의한 차이가 있는 값으로 해석하였다.

[0029] 제조예 1. 합성 펩타이드 (Ac-SDKP-D-GPQG-IWGQC)가 고정화된 고체형 하이드로젤의 제조.

[0030] 히알루론산(Lifecore Biomedical Co., Chaska, MN, USA)을 증류수 40 ml에 용해시켜 0.25 mmole의 히알루론산 용액을 만든 후, EDC(1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide) (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA) (0.24 g, 1.25 mmole), HOBt(1-hydroxybenzotriazole hydrate) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (0.17 g, 1.25 mmole)의 존재 하에 아디프산 디하이드라지드(adipic acid dihydrazide) (Fluka Chemical Co., Buchs, Switzerland) (2.2 g, 12.5 mmole)와 상온에서 8시간 동안 반응시킨다. 이어서, 투석 막(MWCO 14,000, SpectraPor; Rancho Dominguez, CA, USA)을 사용하여 상기에 제조된 반응물을 100 mM의 NaCl 용액에서 2.5일 동안 투석시킨 후, 증류수에서 다시 1일 동안 투석시킨다. 투석시킨 반응물에 NAS(N-Acryloxysuccinimide) (Polyscience, Inc., Warrington, PA, USA) (0.5 g, 3 mmole)을 첨가하여 12시간 동안 반응시킨다. 상기의 제조된 반응물을 100 mM의 NaCl 용액에서 2.5일 동안 투석시킨 후, 증류수에서 다시 1일 동안 투석시킨다. 이어서, 3일 동안 동결건조 하여 분말상태의 아크릴화된 히알루론산을 얻어낸다. 이 후, 젤 제조를 위해 아크릴화된 히알루론산을 트리에탄올아민-완충 용액(TEA; 0.3 M, pH 8)에 넣고 용해시킨 후, 가교제인 티올레이티드 폴리 에틸렌 클리콜 PEG-SH₄ (MW 10,000)을 아크릴 그룹과 티올 그룹의 몰 비가 1:1이 되게 첨가시킨다. 히알루론산 기반의 하이드로젤은 Michael-type addition 반응을 이용하여 제조한다. 이어서, 펩타이드(Ac-SDKP-D-GPQG-IWGQC, MW 1529.6) 고정화를 위해 생리식염수에 녹인 펩타이드 용액을 반응 혼합물과 혼합시켜 용액상태에서 하이드로젤의 형태가 이루어지게 한다. 도 1은 펩타이드 디자인 및 개발된 펩타이드를 포함한 지지체의 모식도를 나타낸다.

[0031] 제조예 2. 생체내(in vivo) 실험을 위한 심근경색 모델 제조.

[0032] 6 주령된 Sprague-Dawley 수컷 쥐를 엔플루란(enflurane) (Choong Wae Pharma Co., Korea)으로 마취시키고 2 % isoflurane(Choong Wae Pharma Co., Korea)과 0.3 L/min oxygen을 기관 내 삽입 하여 마취를 유지시킨다. 상기

의 쥐들은 분당 80 사이클 비율의 호흡을 갖도록 2.5 mL 부피의 산소를 공급하였다. 동물들의 좌측 가슴부분을 개흉시켜 관상동맥의 한 부분인 약 2~3 mm 좌전하행지(left anterior descending, LAD) 말단부분을 7-0 폴리프로필렌으로 된 봉합사로 동여매었다. 그 결과, 심근의 허혈부분에 색변화가 일어나는 것을 관찰하여 심근경색이 만들어졌음을 확인하였다. 폐를 다시 확장 시킨 후, 가슴을 3-0 실크로 봉합하였으며 또한 근육과 피부도 3-0 실크로 봉합하였다. 감염 예방을 위해 수술한지 1일 후 5% 세파졸린 나트륨(cefazolin sodium) (Chong Kun Dang Pharm., Korea) 1회 분량을 근육 주사하였다. 동물들이 국부마취로부터 깨어날 때 까지 물리적으로 환기를 시켜주었다. 모조 실험을 위한 동물들은 LAD 봉합과정을 제외하고는 상기의 과정을 동일하게 실시하였다.

실시예 1. 심근경색 모델 동물의 심장기능 분석 실험.

압력-용량에 관계된 생체내 평가를 위해 먼저, 실험에 사용된 동물들을 세 군 (각 군마다 n=6)으로 나누었다.

1. control group : 모조실험 (sham operation, SHAM) 군과 심근경색 (myocardial infarction, MI) 군

2. 170 kDa 히알루론산 기반의 하이드로젤 (170HA)을 주사한 군

3. 펩타이드가 고정화된 170 kDa 히알루론산 기반의 하이드로젤 (Tb4F/170HA)을 주사한 군

상기 각 군의 동물들을 심근경색 시킨 지 4주 후, 개흉을 실시하여 합성된 하이드로젤 (총 부피; 50 μ l)을 100 (micro) 헤밀턴 주사기와 26-Gage 곡침을 사용하여 경색부 가장자리의 외심막에 주사하였다. 이어서, 주사 4주 후, 심장기능을 밀리 카테터를 이용하여 평가하였다. 상기 분류시킨 그룹들 중 생존하는 쥐들에 제2에 제시된 방법과 동일하게 국소마취 시켰다. 이어서, 2F Micro-tip P-V 카테터(Model SPR-838; Millar Instruments Inc, Houston, TX, USA)를 오른쪽 경동맥을 통해 좌심실로 삽입시켰다. 상기의 카테터를 압력전도성 시스템(MPVS-300, Millar Instruments, USA)과 연결시킨 후, 압력 및 용량의 지속적인 신호들은 특수화된 소프트웨어(Chart 5 v5.4.2, ADInstruments, Australia)를 사용하여 실시간으로 모니터링 하였으며, 심장의 수축성(contractility)를 알 수 있는 지표인 심박출량(Cardiac Output, CO), 박출계수(Ejection Fraction, EF), 일회심박출량(Stroke Volume, SV)과 심근의 탄성도를 알 수 있는 지표인 동맥탄성도(Arterial Elastance, Ea)의 매개 변수들을 분화된 심장의 압력-용량 분석(PVAN v3.5, Millar Instruments, USA)을 이용하여 측정하였다. 안정화된 후, 얻어진 신호를 바탕으로 LV 압력-용량 루프가 baseline을 기준으로 기록되었다. 도 2 내지 5는 좌심실 기능의 정량적 분석 결과를 나타낸 것이다. 좌심실 기능의 관찰 결과, SHAM 군에 비해 MI 군의 기능이 확실히 기능이 떨어진 것으로 보아 MI 군이 비교군으로 적절하게 만들어 졌음을 확인 하였다. 또한, 170HA 군과 MI 군 사이에서 유의적인 차이가 나지 않는 것으로 보아, 170 kDa 히알루론산 기반의 수화젤 만으로는 심장기능 회복에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 반면, MMP 단백질분해효소에 의해 잘려지는 펩타이드가 부착된 수화젤을 주사한 Tb4F/170HA 군에서는 심박출량을 제외한 나머지 지표에서 모두 170HA, MI 군에 비해 유의적으로 기능이 개선되었음을 확인하였다.

실시예 2. 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 이용한 생체내(in vivo) 조직재생 실험.

심장기능 분석 후, 조직평가를 위해 각각의 동물들의 심장을 수집하였다. 상기의 심장을 심장확장기를 이용하여 포르말린(formalin)을 주입함으로써 심장을 정지시켰다. 또한, 정지시킨 심장을 절단시킨 후, 포르말린으로 고정화 하였다. 이어서, 3개의 짧은 축추, 3 mm 두께의 슬라이스를 심실로부터 얻은 후, 파라핀(paraffin)으로 처리한 후, 모든 슬라이스는 5 μ m 두께로 절단시켰다. 좌심실 조직은 마손트릭롬(Masson's Trichrome) 염색으로 얻어내었다. 광학현미경을 통해 이미지를 얻은 후, CAD(Computer-aided design)를 이용해 Infarct size와 심근두께에 대한 정량적인 계측을 시행하였다. 마손트릭롬 염색에 의한 각 군의 좌심실의 형태를 관찰한 결과, 도 6에서 보이는 것과 같이 SHAM 군에 비해 MI 군에서 현저히 심근이 얇아지고 경색부위가 큰 것을 확인하였다. 170HA 군의 경우 MI 군과 큰 차이가 없었으나, Tb4F/170HA 군에서는 MI 군에 비해 심근이 확실히 두꺼워졌음이 관찰되었다.

또한, 심근재생 정도의 확인을 위해 Infarct Size와 심근두께를 측정하였다. Infarct Size는 좌심실의 경색부위의 크기를 비교한 것으로서 심장내막과 심장외막 총 길이에 대한 경색부위의 길이의 각각의 비를 평균하여 백분율로 환산하였다. 심근두께는 정상심근의 두께에 대한 경색부위의 심근의 두께의 비로 구하여졌다. 도 7은 Infarct Size(%) 측정결과를 나타낸 것이다. 도 7에 나타낸 것과 같이 Tb4F/170HA 군은 MI 군 및 170HA 군과 비교했을 때 모두 유의적인 차이를 보이며 경색부위의 감소가 나타남을 볼 수 있다. 도 8은 심근두께 측정결과를

나타낸 것이다. 정상심근과 경색부위의 심근의 비를 비교한 결과, Infarct Size와 마찬가지로 Tb4F/170HA 군에서 MI 군과 170HA 군에 비해 유의적으로 심근이 두꺼워졌음을 관찰하였다.

산업이용 가능성

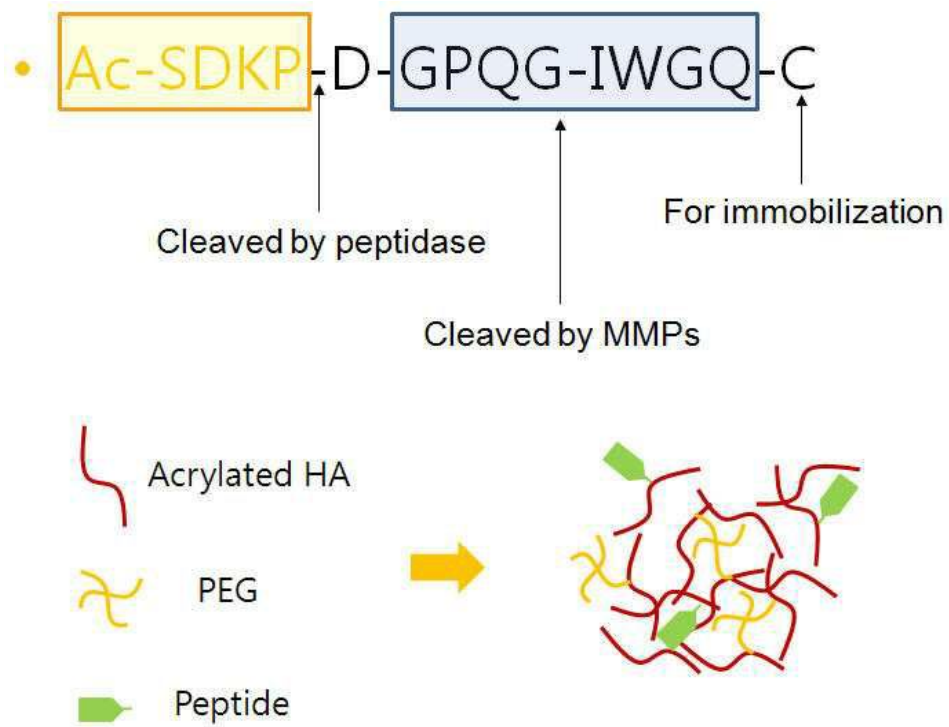
- [0042] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면, 조직재생 효과가 있는 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드가 생체 내 활성화에 따라 방출속도가 조절됨으로써 심장재생과 같은 조직재생용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0043] 상기 실시예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명은 조직재생을 위한 티모신 베타-4 유래 Ac-SDKP 펩타이드의 생체 내 활성화에 따라 방출속도가 조절되는 차세대형 스마트 방출지지체의 개발 및 적용에 관한 것으로, 현재의 기술로는 재생이 어려운 말기형 심근경색 모델에 Ac-SDKP 펩타이드가 고정화된 하이드로젤 주사형 지지체를 주입한 결과 대조군에 비해 유의미하게 조직 재건이 되는 것을 확인할 수 있었으며, 또한 심장의 기능도 유의미하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명은 혈관생성능이 뛰어난 티모신 베타-4 유래의 조직재생기능을 가진 Ac-SDKP 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조직재생용 약학적 조성물로서의 사용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

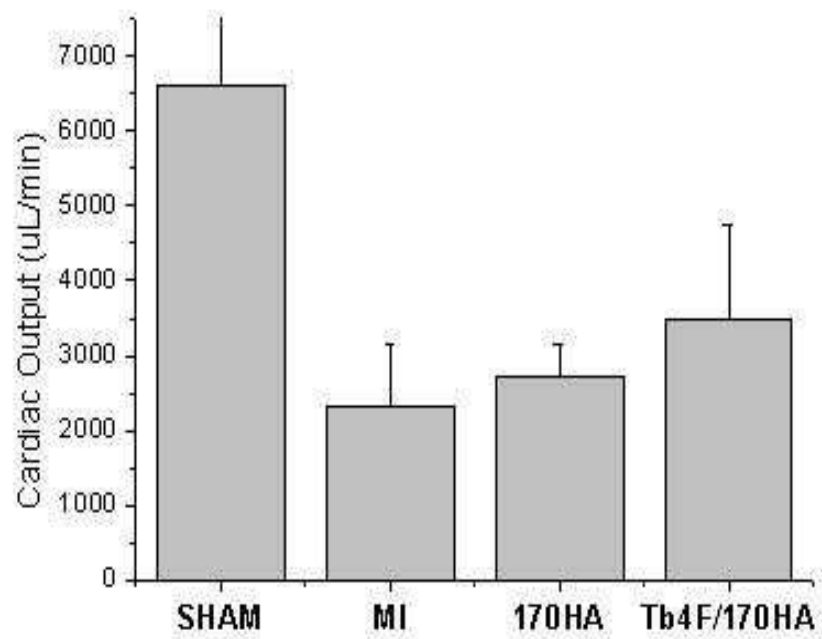
- [0044] 도 1은 펩타이드 디자인 및 개발된 펩타이드를 포함한 지지체의 모식도를 나타낸 것이다.
- [0045] 도 2는 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 심박출량(Cardiac Output, CO) 측정결과를 나타낸 것이다.
- [0046] 도 3은 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 박출계수(Ejection Fraction, EF) 측정결과를 나타낸 것이다.
- [0047] 도 4는 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 일회심박출량(Stroke Volume, SV) 측정결과를 나타낸 것이다.
- [0048] 도 5는 좌심실 기능의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 동맥탄성도(Arterial Elastance, Ea) 측정결과를 나타낸 것이다.
- [0049] 도 6은 마손트릭로움염색(Masson's Trichrome staining)에 의한 각 군의 좌심실의 형태를 나타낸 것이다.
- [0050] 도 7은 좌심실 형태의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, Infarct Size(%) 측정결과를 나타낸 것이다.
- [0051] 도 8은 좌심실 형태의 정량적 분석을 나타낸 것으로서, 심근두께 측정결과를 나타낸 것이다.

도면

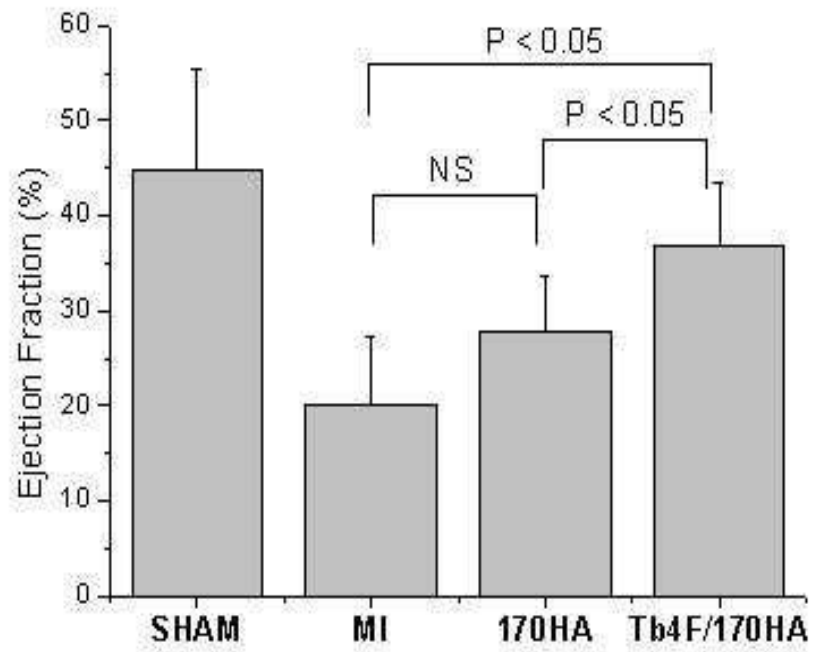
도면1



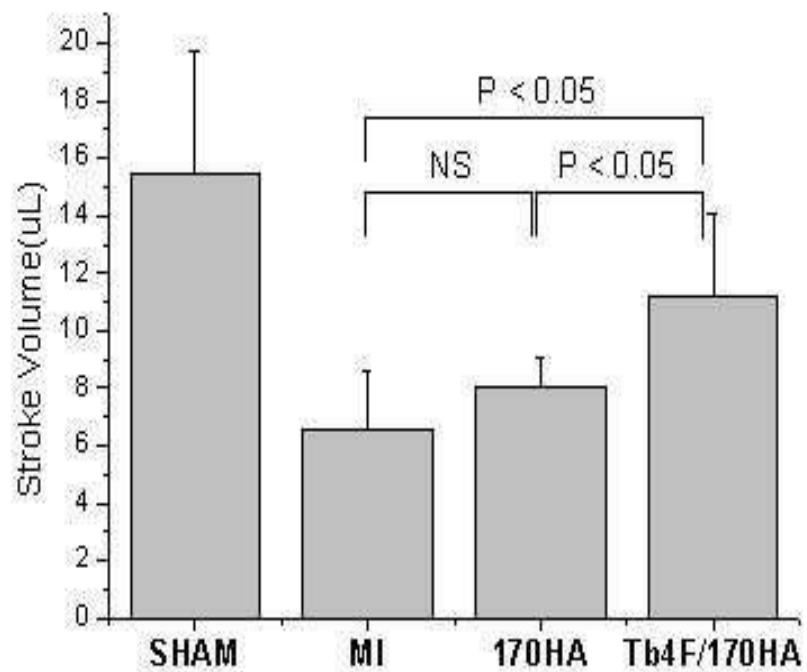
도면2



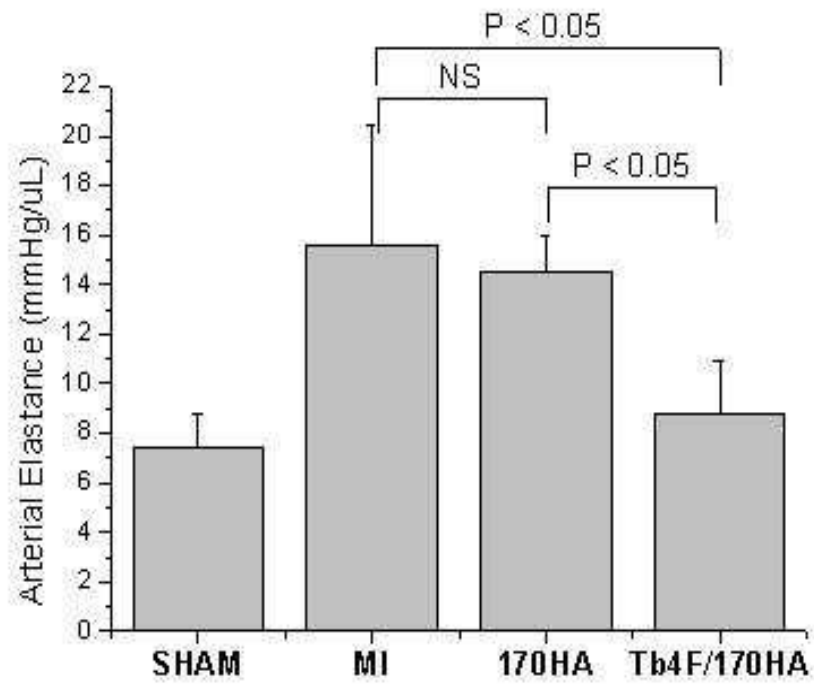
도면3



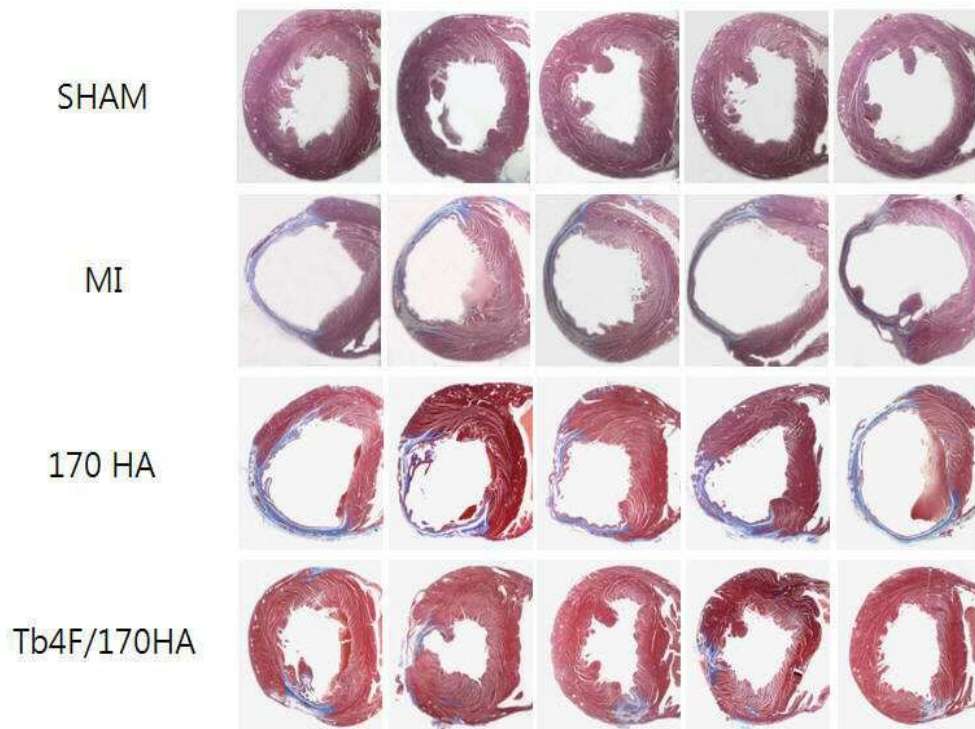
도면4



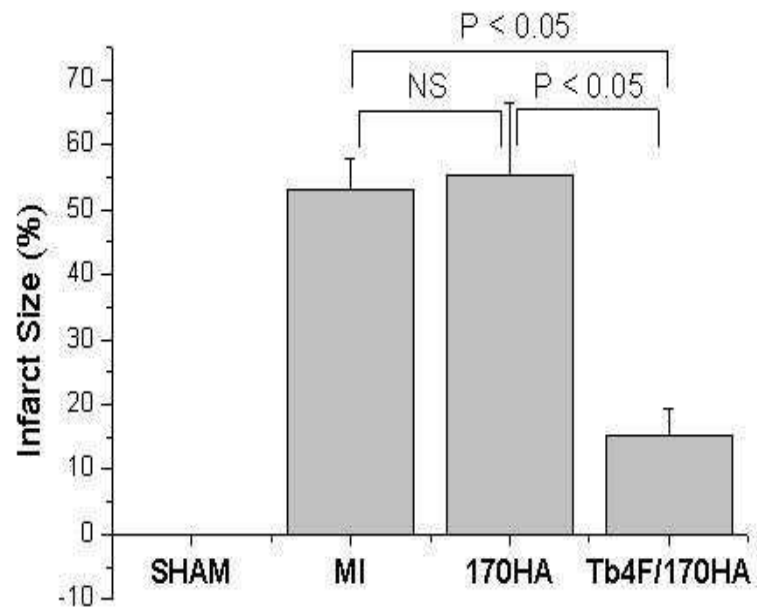
도면5



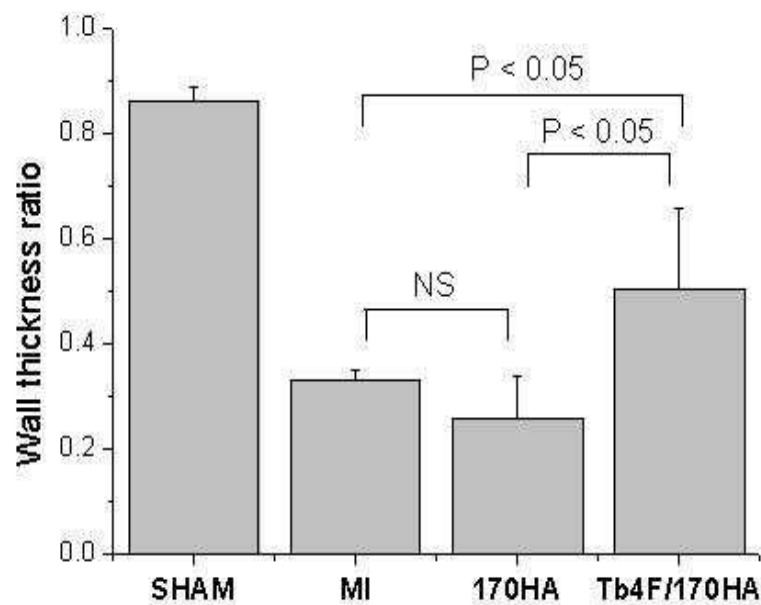
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation
 <120> Smart releasing scaffold of Thymosin beta-4 originated Ac-SDKP peptides for tissue regeneration

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Asp Lys Pro Asp Gly Pro Gln Gly Ile Trp Gly Gln Cys
 1 5 10