



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0099205
(43) 공개일자 2018년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/50 (2017.01) A61K 33/24 (2006.01)
A61K 47/18 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6903 (2017.08)
A61K 33/24 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0026326
(22) 출원일자 2017년02월28일
심사청구일자 2017년02월28일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
이은지
대전광역시 유성구 상대남로 26, 906동 1101호(상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)
류주연
대전광역시 대덕구 계족산로 136 선비마을5단지아파트 506동 1404호
김인혜
전라북도 군산시 조촌로 214, 903동 1502호 (경암동, 경암 제일 오투그란데 아파트)
(74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 15 항

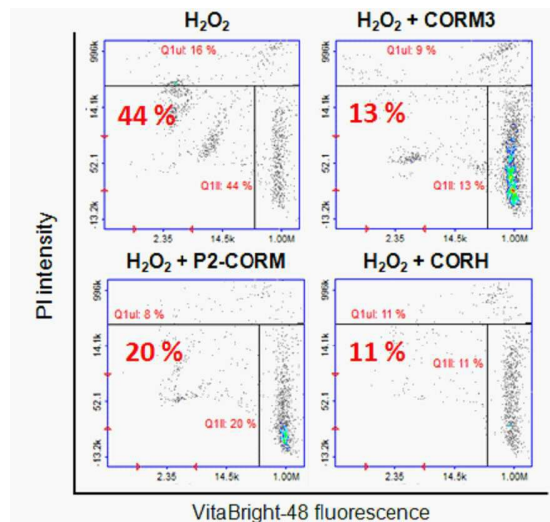
(54) 발명의 명칭 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 합성된 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)은 우수한 기계적 물성을 가짐과 동시에 산화 스트레스에 의한 손상에 대한 우수한 효과를 나타내며, 체내에서 서서히 방출되는 특성을 가지고 있어, 일산화탄소의 적절한 방출을 통해 심근 세포의 보호 및 세포사멸을 감소 효과를 얻을 수 있으며, 이를 통해 치료제 형태로 폭넓게 활용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 47/183 (2013.01)

A61K 47/64 (2017.08)

A61K 9/0019 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4012322

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업/중견연구

연구과제명 유기고분자 액상 결정화/가시화 기술 기반 유무기 나노하이브리드 구조 제어

기 여 율 50/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3A9E1918321

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 사건시간 추정을 위한 첨단장비 연계형 분석법 개발

기 여 율 40/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2016.07.01 ~ 2021.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A6A9064166

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 연구장비엔지니어양성사업

연구과제명 연구장비엔지니어양성사업 (연구장비 전문교육기관 지원)

기 여 율 10/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.01 ~ 2023.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

하이드로겔화제(hydrogelator) 및 하기 화학식 I로 표시되는 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

[화학식 I]

Phe-Phe-X-Asp

(상기 펩티드에서,

X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 수용성 펩티드는 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 수용성 펩티드는 글루탐산(Glu), 세린(Ser) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 수용성 펩티드는 글루탐산(Glu)-글루탐산(Glu)-리신(Lys)인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

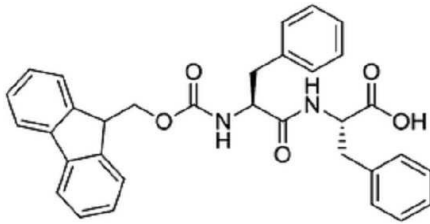
상기 하이드로겔화제는 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides), 양친매성 저분자를 골격으로 가지는 물질, 생체 내 성분을 모티브로 한 골격을 가지는 물질, 반인공형 저분자를 골격으로 가지는 물질로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fmoc-peptides)는 하기 화학식 II의 구조인 Fmoc-FF 또는 Fmoc-PhePhe인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

[화학식 II]



청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 일산화탄소 방출 분자(CORM)의 구조는 하기 화학식 III으로 표시되는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

[화학식 III]

$\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$

청구항 8

제 1항에 있어서,

pH 5 내지 8에서의 용해도가 100 g 증류수에 대해 0.065 내지 0.085 g인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물.

청구항 9

하기 화학식 I로 표시되는 펩티드를 합성하는 단계;

[화학식 I]

Phe-Phe-X-Asp

(상기 펩티드에서,

X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)

합성된 펩티드와 일산화탄소 방출분자(CORM)를 반응시키는 단계; 및

하이드로겔화제를 혼합시키는 단계;

를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서,

상기 수용성 펩티드는 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함하는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 11

제 9항에 있어서,

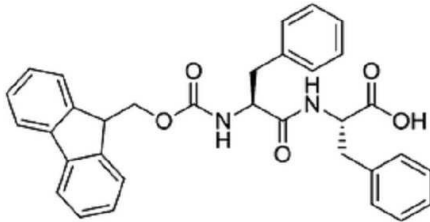
상기 하이드로겔화제는 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides), 양친매성 저분자를 골격으로 가지는 물질, 생체 내 성분을 모티브로 한 골격을 가지는 물질 및 반인공형 저분자를 골격으로 가지는 물질로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 12

제 11항에 있어서,

상기 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드는 하기 화학식 II의 구조인 Fmoc-FF 또는 Fmoc-PhePhe인 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

[화학식 II]



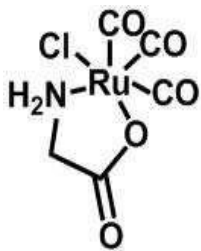
청구항 13

제 9항에 있어서,

상기 일산화탄소 방출 분자(CORM)의 구조는 하기 화학식 III으로 표시되는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

[화학식 III]

$\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$



청구항 14

제 9항에 있어서,

상기 합성된 펩티드와 일산화탄소 방출분자(CORM)을 반응시키는 단계는 pH 4 ~ 8의 조건에서 수행하는 것을 특징으로 하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법.

청구항 15

제 1항 내지 제8항으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 한 항의 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물을 포함하는 주사제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일산화탄소는 혈액에서 산소 전달을 담당하고 있는 헤모글로빈과의 강한 친화력으로 인해 소리없는 살인자(silent killer)로 잘 알려져 있다. 그러나, 일산화탄소는 필수적인 생물학적 신호 분자로도 인식되고 있다. 일산화탄소는 헴 옥시게나아제-1(heme oxygenase-1; HO-1) 효소를 통해 헴 이화작용의 부산물 중 하나로 생산되었

다. 일산화탄소는 조직에서 보호의 역할을 수행하는데, 예를 들면, 항-염증(anti-inflammatory), 항-증식(anti-proliferative) 및 항-세포사멸(anti-apoptotic) 활동을 들 수 있으며 이러한 인체에서의 효과를 바탕으로 치료 용도를 위한 매력적인 후보라 할 수 있다.

[0003] 그러나, 일산화탄소는 고농도에서의 독성으로 인해 취급 및 전달이 용이하지 않은 문제점을 가지고 있다. 따라서, 일산화탄소 방출 분자(CO-releasing molecule; CORM) 개발의 중요성이 제기되었다. 일산화탄소 방출 분자 중에서, CORM3은 물에 대한 용해성과 리간드 치환에 따른 일산화탄소 방출이 우수하다. 그럼에도 불구하고, 일산화탄소 방출 분자와 같은 작은 크기의 약물은 신체에 주입 후 급속하게 퍼져나가 치료 효과가 높지 않고, 조직에 대한 부작용의 위험을 나타낸다.

[0004] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 연구자들은 고분자, 펩티드, 단백질을 포함하는 일산화탄소 방출 물질이 일산화탄소의 전달 제어 능력을 제공한다는 결과를 제시하여, 일산화탄소 방출 물질이 국부적 일산화탄소 전달을 가능하게 하고 또한 특정 조직에 주입 형태의 치료에 적합함을 증명하고자 노력하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국 공개특허공보 2016/0008291 A1(2016.01.14.).

비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) Silvia Cavalli et al. Chem. Soc. Rev. 2010, 39:241-263.

(비특허문헌 0002) John B. Matson et al., Soft Matter. 2012, 8(25):2689-2692.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 본 발명에서는 자기 조립 펩티드-기반 하이드로겔을 통해 효과적으로 일산화탄소를 전달하고자 하였다. 펩티드-기반 하이드로겔은 세포 배양, 약물 전달 및 재생 의학 등의 바이오 의학 분야에서 잠재력을 가지고 있다. 20 개의 아미노산을 이용한 합성 펩티드는 합성 과정이 간단하고, 생활성, 생적합성 및 생분해성과 같은 장점을 보유하고 있으나, 펩티드-기반 하이드로겔은 보통 약한 분자간 비공유 상호작용에 의한 자기 조립 행동 때문에 기계적 물성이 좋지 않은 단점이 있다.

[0008] 본 발명에서는 이를 해결하기 위해 짧은 길이의 방향족 펩티드가 가진 π - π 스택 또는 비공유 상호작용을 통해 기계적 물성이 향상된 정돈된 나노 구조를 형성시키고자 하였다. 또한, 자기 조립된 하이드로겔 제작을 위해 펩티드에서 β -시트를 형성하는 서열을 통합하여 도입한 나노 섬유를 사용하는 방법으로 접근하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 하이드로겔화제(hydrogelator) 및 하기 화학식 I로 표시되는 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물에 관한 것이다.

[0010] [화학식 I]

[0011] Phe-Phe-X-Asp

[0012] (상기 펩티드에서,

[0013] X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)

[0015] 또한 본 발명은

[0016] 하기 화학식 I로 표시되는 펩티드를 합성하는 단계;

- [0017] [화학식 I]
- [0018] Phe-Phe-X-Asp
- [0019] (상기 펩티드에서,
- [0020] X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)
- [0021] 합성된 펩티드와 일산화탄소 방출분자(CORM)를 반응시키는 단계; 및
- [0022] 하이드로겔화제를 혼합시키는 단계;
- [0023] 를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0025] 또한 본 발명은 상기 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물을 포함하는 주사제에 관한 것이다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 합성된 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)은 우수한 기계적 물성을 가짐과 동시에 산화 스트레스에 의한 손상에 대한 우수한 효과를 나타내며, 체내에서 서서히 방출되는 특성을 가지고 있어, 일산화탄소의 적절한 방출을 통해 심근 세포의 보호 및 세포사멸의 감소 효과를 얻을 수 있으며, 이를 통해 치료제 형태로 폭넓게 활용될 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 실시예 2에 따른 펩티드 P2의 a) 아미노산 서열 b) HPLC 스펙트럼 및 c) MALDI-TOF/TOF 질량분석 결과이다.
- 도 2는 실시예 3에 따른 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체 P2-CORM의 a) 반응식 및 b) MALDI-TOF/TOF 질량분석 결과이다.
- 도 3은 산성 및 염기성 조건에서 실시예 3에 따른 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체 P2-CORM의 FT-IR 스펙트럼이다.
- 도 4는 실시예 4에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)의 일산화탄소 방출 동적 그래프이다.
- 도 5는 실시예 4에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)의 FT-IR 스펙트럼이다.
- 도 6은 시험예 4에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)의 a) 변형 스위프(strain sweep) b) 주파수 스위프(frequency sweep)에 관한 결과이다.
- 도 7은 시험예 4에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)의 2wt% 우라닐 아세테이트로 음성 염색된 TEM 영상이다.
- 도 8은 시험예 4에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)의 600 MHz D₂O에서의 2D ¹H-NMR (NOESY) 결과이다.
- 도 9는 시험예 5에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)과 대조군의 과산화수소 처리에 따른 세포사멸 감소 효과를 나타낸 것이다.
- 도 10은 시험예 5에 따른 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(P2-CORM)의 공자기 조립체인 하이드로겔(CORH)과 대조군의 H9c2 세포에서 과산화수소 처리에 따른 활성 산소종(ROS) 생성에 대한 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명은 하이드로겔화제(hydrogelator) 및 하기 화학식 I로 표시되는 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자

의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물에 관한 것이다.

[화학식 I]

Phe-Phe-X-Asp

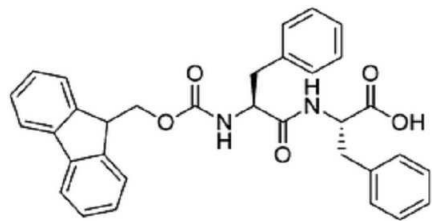
(상기 펩티드에서,

X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)

본 발명에서 상기 수용성 펩티드는 특별히 제한되지는 않으나 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있으며 바람직하게는 글루탐산(Glu), 세린(Ser) 또는 그 조합을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 글루탐산(Glu)-글루탐산(Glu)-리신(Lys)을 사용할 때 수용성이 효과적으로 증가하여 바람직하다.

본 발명에서 상기 하이드로겔화제는 특별히 제한되지는 않으나 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides), 양친매성 저분자를 골격으로 가지는 물질, 생체 내 성분을 모티브로 한 골격을 가지는 물질, 반인공형 저분자를 골격으로 가지는 물질로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides) 계열을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 하기 화학식 II의 구조인 Fmoc-FF 또는 Fmoc-PhePhe를 사용하는 것이 좋다.

[화학식 II]



양친매성 저분자를 골격으로 가지는 물질로는 인공 지질 막을 모델로 한 것으로 4급 암모늄염부를 친수부로 하고 알킬 장쇄를 소수부로 한 계면활성제형 겔화제, 두 개의 계면활성제형 분자의 친수부를 연결한 쌍계면활성제형 겔화제 등을 들 수 있다. 이러한 겔화제에 의한 하이드로 겔의 일 예로, 분기형 알킬기를 소수부에 가지는 양이온성 양친매성 화합물의 분산수용액에 분자량 90 이상의 음이온을 첨가함으로써 형성되는 분자조직성 하이드로겔을 사용할 수 있다.

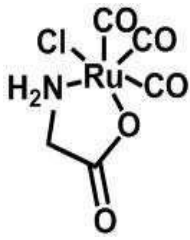
또한, 생체 내 성분을 모티브로 한 골격을 가지는 물질로는 펩티드 2차 구조 골격(α -헬릭스 구조나 β -시트 구조 등)에 의한 분자집합체간의 회합을 이용한 겔화제를 들 수 있다.

또한 반인공형 저분자를 골격으로 가지는 물질로는 DNA 염기나 펩티드 쇠, 당 쇠 등의 생체 내 성분(친수부)과 알킬 쇠(소수부) 등의 조합으로 이루어지며, 앞서 예를 든 두 개의 겔화제의 특징을 조합한 겔화제라 할 수 있다. 여기서 DNA 염기, 펩티드 쇠 및 당 쇠는 친수성을 높일 뿐만 아니라, 수소결합 등의 분자간 상호작용을 부여하는 역할을 담당한다. 예를 들면 N-아세틸화된 단당류 또는 이당류의 글리코시드구조를 가지는 당 구조 부위를 가지는 글리코시드아미노산 유도체로 이루어진 하이드로겔화제, 일반식 「 $\text{RCO}(\text{NHCH}_2\text{CO})_n\text{OH}$ 」로 나타나는 펩티드 지질과 천연금속으로부터 자기집합성을 가져서 형성되는 미세중공섬유 등을 들 수 있다. 또한, <소수부-시스테인 잔기(네트워크 형성시에 디설피드결합 형성)-글리세린 잔기(유연성을 부여)-인산화세린 잔기-세포접착성 펩티드>라는 구조를 가지는 양친매성 펩티드가 소수부를 핵으로 β -시트형 파이버 네트워크를 형성하는 것을 사용할 수 있으며, 케미컬 라이브러리를 이용해 당지질형 초분자 하이드로겔을 작성하여 사용할 수도 있다.

본 발명에서 상기 일산화탄소 방출 분자(CORM)의 구조는 특별히 제한되지는 않으나 하기 화학식 III으로 표시되는 화합물을 사용하는 것이 물에 대한 용해도를 증가시킬 수 있고, 리간드 치환을 통해 일산화탄소의 방출을 촉진할 수 있어 바람직하다.

[화학식 III]

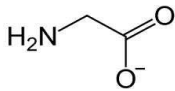
[0043] $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$



[0044]

[0045] 상기 화학식에서 글리시네이트(glycinate)는 하기 화학식 IV의 구조를 갖을 수 있다.

[0046] [화학식 IV]



[0047]

[0048] 본 발명에서 상기 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물은 특별히 제한되지는 않으나 pH 2 내지 10에서의 용해도가 100 g 증류수에 대해 0.065 내지 0.085 g의 물성을 갖을 수 있으며, 바람직하게는 pH 5 내지 pH 7에서의 용해도가 100 g 증류수에 대해 0.072 내지 0.080 g의 형태일 수 있으며, 상기 범위에서 생체 내로의 투여가 용이하고, 생체 내 투여시 일산화탄소의 방출 지연 효과가 적절하게 유지될 수 있다.

[0050] 또한 다른 양태로 본 발명은

[0051] 하기 화학식 I로 표시되는 펩티드를 합성하는 단계;

[0052] [화학식 I]

[0053] Phe-Phe-X-Asp

[0054] (상기 펩티드에서,

[0055] X는 2 ~ 6개의 수용성 아미노산으로 구성된 수용성 펩티드이다.)

[0056] 합성된 펩티드와 일산화탄소 방출분자(CORM)를 반응시키는 단계; 및

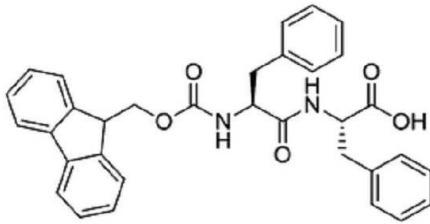
[0057] 하이드로겔화제를 혼합시키는 단계;

[0058] 를 포함하는 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물의 제조방법에 관한 것이다..

[0059] 본 발명에서 상기 수용성 펩티드는 특별히 제한되지는 않으나 세린(Ser), 트레오닌(Thr), 티로신(Tyr), 시스테인(Cys), 아스파라긴(Asn), 글루타민(Gln), 리신(Lys), 아르기닌(Arg), 히스티딘(His), 아스파르트산(Asp) 및 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 포함할 수 있으며 바람직하게는 글루탐산(Glu), 세린(Ser) 또는 그 조합을 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 글루탐산(Glu)-글루탐산(Glu)-리신(Lys)을 사용할 때 수용성이 효과적으로 증가하여 바람직하다.

[0060] 본 발명에서 상기 하이드로겔화제는 특별히 제한되지는 않으나 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides), 양친매성 저분자를 골격으로 가지는 물질, 생체 내 성분을 모티브로 한 골격을 가지는 물질, 반인공형 저분자를 골격으로 가지는 물질로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 또는 둘 이상을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 플루오레닐 메톡시 카보닐 펩티드(Fluorenylmethoxycarbonyl peptides; Fmoc-peptides) 계열을 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 하기 화학식 II의 구조인 Fmoc-FF 또는 Fmoc-PhePhe를 사용하는 것이 좋다.

[0061] [화학식 II]

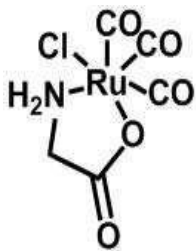


[0062]

[0063] 본 발명에서 상기 일산화탄소 방출 분자(CORM)의 구조는 특별히 제한되지는 않으나 하기 화학식 III으로 표시되는 화합물을 사용하는 것이 물에 대한 용해도를 증가시킬 수 있고, 리간드 치환을 통해 일산화탄소의 방출을 촉진할 수 있어 바람직하다.

[0064] [화학식 III]

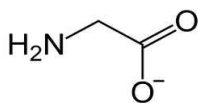
[0065] $\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}(\text{glycinate})$



[0066]

[0067] 상기 화학식에서 글리시네이트(glycinate)는 하기 화학식 IV의 구조를 갖을 수 있다.

[0068] [화학식 IV]



[0069]

[0070] 본 발명에서 상기 합성된 펩티드와 일산화탄소 방출분자(CORM)을 반응시키는 단계는 특별히 제한되지는 않으나 pH 2 ~ 10의 조건에서 수행할 수 있으며, 바람직하게는 pH 3 ~ 9, 더욱 바람직하게는 pH 4 ~ 8의 조건에서 수행할 수 있으며, 이 경우 수용성 용매에 대한 용해도가 증가하게 되어 본 발명의 목적에 부합하는 효과를 얻을 수 있다.

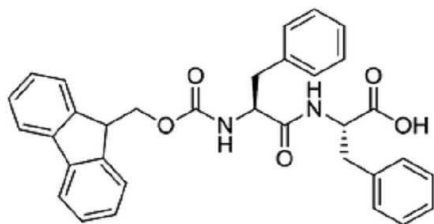
[0072] 또한 또 다른 양태로 본 발명은 상기 일산화탄소 방출용 하이드로겔 조성물을 포함하는 치료용 제품에 관한 것이다. 상기 치료용 제품으로는 특별히 제한되지는 않으나, 통상적으로 허용되는 형태라면 무방하며, 예를 들면 주사제(injection), 경피 투과제(cutaneous permeable agent) 등의 형태를 가질 수 있다.

[0074] 이하, 본 발명의 내용을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이들에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0076] [실시예 1] Fmoc-FF (하이드로겔화제)의 합성

[0077] 하기 화학식 II로 표시되는 Fmoc-FF는 2-클로로트리틸 클로라이드 레진(2-chlorotrietyl chloride resin)을 이용하여 마이크로파와 통상적인 고상 펩티드 합성법(solid phase peptide synthesis)으로 합성하였다.

[0078] [화학식 II] Fmoc-FF (Fmoc-PhePhe)



[0079]

[0080] 먼저, 레진을 진탕 배양기(shaking incubator)에서 디클로로메탄(dichloromethane; DCM) 하에서 30분 이상 팽윤시켰다. 상온의 진탕 배양기에서 20분 동안 디클로로메탄(dichloromethane; DCM, Daejung Chemical & Metal Co., Ltd.) 하에서 Fmoc-Phe-OH (Merck)(2 equiv.) 및 N,N-디이소프로필에틸아민(N,N-Diisopropylethylamine; DIPEA, Merck)(4 equiv.)을 이용하여 레진 상에 첫 번째 아미노산을 부착하였다.

[0081] 혼합물을 여과한 후, 디클로로메탄으로 세척하고, 진탕 배양기에서 30분 동안 1:2:17의 부피비로 혼합된 N,N-디이소프로필에틸아민:메탄올:디클로로메탄으로 추가로 덮었다. Fmoc 제거는 마이크로파를 이용하여 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF, Fisher) 하에서 20% 피페리딘 용액을 이용하여 수행하였다. 용액을 여과시킨 후, 레진은 디클로로메탄과 디메틸포름아미드로 세척하였다. 펩티드 커플링을 위해 Fmoc-Phe-OH (3 equiv.)에 커플링제인 HBTU(Sigma-Aldrich) (3 equiv)와 함께 N,N-디이소프로필에틸아민 (6 equiv.)의 N-메틸-2-피롤리돈(N-Methyl-2-pyrrolidone; NMP, Sigma-Aldrich) 용액에 혼합하고, 10 분간 마이크로파 처리하였다. 혼합물을 여과한 후, 레진을 N-메틸-2-피롤리돈 및 디클로로메탄으로 세척하였다.

[0082] Fmoc-FF (Fmoc-PhePhe)는 디메틸포름아미드에서 펩티드 절단 용액인 20% 헥사플루오로-2-프로판올(hexafluoro-2-propanol; HFIP, Alfa-aesar)을 사용하여 레진으로부터 수동으로 절단하여 얻었다. 레진을 여과한 후, 유상의 산물(crude oily product)은 차가운 디에틸에테르(diethyl ether; Et₂O)에 침전시키고, 이후 4000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다.

[0083] Fmoc-FF (Fmoc-PhePhe)는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(reverse phase HPLC; SUPELCO, DiscoveryR Bio Wide Pore C-18, 5 um, 10 x 250 mm)로 정제하였다. 이 때 이동상으로는 물(0.1% 트리플루오로 아세트산)과 아세트오니트릴(0.1% 트리플루오로 아세트산)에 α-시아노-4-히드록시 신나 산(α-cyano-4-hydroxycinnamic acid)을 용해하여 사용하였다.

[0084] MALDI-TOF/TOF 질량분석기(Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)를 이용하여 Fmoc-FF (Fmoc-PhePhe)의 분자량을 확인하였다.

[0086] [실시예 2] 수용성 펩티드 합성

[0087] 일산화탄소 방출 분자를 결합시키기 위한 펩티드(아미노산 서열: FFEEKD or PhePheGluGluLysAsp)는 마이크로파와 통상적인 고상 펩티드 합성법(solid phase peptide synthesis)을 통해 Rink Amide MBHA(4-methylbenzhydrylamine) 레진(Merck)에서 합성하였다(CEM Focused Microwave System, Discover; CEM Corporation, NC, USA). 레진을 디클로로메탄으로 세척한 후, 진탕 배양기에서 디메틸포름아미드와 디클로로메탄의 1:1 혼합 용액 하에서 30 분 이상 팽윤시켰다.

[0088] Fmoc는 디메틸포름아미드(dimethylformamide; DMF) 하에서 20% 피페리딘 용액을 이용하여 마이크로파를 3분 이상 조사하여 제거하고, 레진은 디클로로메탄과 디메틸포름아미드로 충분히 세척하였다. Fmoc-Lys(mtt)-OH (5 equiv.)에 커플링제인 HBTU(Merck) (4.9 equiv)와 함께 N,N-디이소프로필에틸아민 (5 equiv.)의 N-메틸-2-피롤리돈(N-Methyl-2-pyrrolidone; NMP, Daejung Chemical & Metal Co., Ltd.) 용액에 혼합하고, 10 분간 마이크로파 처리하였다. 이후, Fmoc-Glu(OtBu)-OH 및 Fmoc-Phe-OH (Merck)를 FFEEK-잔기 서열을 갖는 펩티드의 N-말단에 커플링하였다. 리신(lysine; Lys)의 아민으로부터 메틸트리틸(methyltrityl) 그룹은 진탕 배양기에서 디클로로메탄 하에서 4% 트리플루오로아세트산(Sigma-Aldrich)과 4% 트리이소프로필실란(triisopropylsilane; TIPS, TCI Chemicals Co., Ltd.)으로 제거하였다.

[0089] 이후 Boc-Asp-OtBu (Beadtech)를 리신에 첨가하고, 진탕 배양기에서 95:2.5:2.5의 부피비로 혼합된 트리플루오로아세트산:트리이소프로필실란:물의 절단 용액을 이용하여 레진을 3시간 이상 처리하였다. 트리플루오로아세트

산의 초과분은 회전 증발을 통해 제거하였고, 유상의 산물(crude oily product)은 차가운 디에틸에테르(diethyl ether; Et₂O)에 침전시키고, 이후 4000 rpm으로 5 분간 원심분리하였다.

[0090] 합성된 펩티드는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(reverse phase HPLC; SUPELCO, DiscoveryR Bio Wide Pore C-18, 5 um, 10 x 250 mm)로 정제하였다. 이 때 이동상 용매로는 물(0.1% 트리플루오로 아세트산)과 아세토니트릴(0.1% 트리플루오로 아세트산)을 사용하였다. 이후 MALDI-TOF/TOF 질량분석기(Bruker Daltonik GmbH, Bremen Germany)를 이용하여 합성된 펩티드의 분자량을 확인하였다.

[0091] 상기 결과를 도 1에 도시하였다.

[0093] [비교예 1]

[0094] 상기 실시예 1에서 펩티드의 아미노산 서열을 FFKD 또는 PhePheLysAsp로 하는 것을 제외하고 다른 과정은 동일하게 진행하였다.

[0096] [비교예 2]

[0097] 상기 실시예 1에서 펩티드의 아미노산 서열을 GGIILLK 또는 GlyGlyIleIleLeuLeuLys로 하는 것을 제외하고 다른 과정은 동일하게 진행하였다.

[0099] [비교예 3]

[0100] 상기 실시예 1에서 펩티드의 아미노산 서열을 FFPETSWD 또는 PhePheProGluThrSerTrpAsp로 하는 것을 제외하고 다른 과정은 동일하게 진행하였다.

[0102] [실시예 3] 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 합성

[0103] 일산화탄소 방출 분자(carbon monoxide releasing molecules; CORM)는 트리카보닐디클로로루테늄(II) 2량체(Tricarbonyl dichloro ruthenium (II) dimer, [Ru(CO)₃Cl₂]₂, Sigma-Aldrich)를 이용하였고, 상기 실시예 2에서 합성한 정제 펩티드를 결합시키기 위해 메톡시화 나트륨(CH₃ONa; Sigma-Aldrich)을 함께 사용하였다.

[0104] 4.5 mg의 정제 펩티드를 450 uL의 헥사플루오로-2-프로판올에 용해시킨 후 진공 기화를 통해 헥사플루오로-2-프로판올을 제거하였다. 이후 1036 uL의 건조 메탄올과 63.2 uL의 0.5 M 메톡시화 나트륨 용액에 섞어 현탁액을 제조하였다. 상기 현탁액에, 176.7 uL의 건조 메탄올에 용해된 2.0 mg 트리카보닐디클로로루테늄(II) 2량체를 첨가하고, CORM에서 리간드 치환을 통해 일산화탄소가 방출이 촉진되는 것을 방지하기 위해 빛으로부터 차단된 상태에서 36 시간 동안 흔들었다.

[0105] 이후 산물은 진공 기화를 통해 수득하였다. 수득한 노란색의 화합물을 3 mL의 0.05% 암모니아수에 용해시킨 후 동결건조하여 담황색 분말을 얻었다.

[0106] 합성된 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 분자량은 상기 실시예에서와 같이 MALDI-TOF/TOF 질량분석기를 이용하여 확인하였다.

[0107] 상기 결과를 도 2에 도시하였다.

[0109] [시험예 1] 펩티드 구조에 따른 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체의 용해 특성

[0110] 비교예 1 내지 3에서 각각 제조한 펩티드에 대하여, 실시예 3에서 실시예 2에서 제조한 펩티드 대신 동일한 과정을 거쳐 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체를 제조한 후 pH 7의 물 100 g에 대한 용해도를 각각 측정하였다. 용해도 측정은 물에 상기 제조한 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체를 소량씩 추가하여 혼합하면서, 침전물이 생성 후 없어지지 않는 시점에서의 투여량을 측정하였다.

[0111] 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0113] 펩티드 구성에 따른 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체의 수용성 특성 측정

펩티드 실험군 (X)	아미노산 서열	용해도 (g/g Water)
실시예 2 (P2)	FFEEKD	0.0763
비교예 1 (P1)	FFKD	0.0012
비교예 2 (P3)	GGIILLK	0.0016
비교예 3 (P4)	FFPETSWD	0.0190

[0115] 상기 결과로부터, 본 발명에서와 같이 수용성 펩티드를 선택적으로 도입한 경우 물에 대한 용해도가 대조군 대비 최소 4 배 내지 64배 정도로 현저히 우수한 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

[0117] [실시예 4] 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 공자기 조립체의 제조

[0118] 상기 실시예에서 제조한 하이드로겔화제 Fmoc-FF와 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체를 각각 헥사플루오로-2-프로판올(hexafluoro-2-propanol; HFIP)에 용해시킨 후 진공 기화하여 헥사플루오로-2-프로판올을 제거하였다.

[0119] 공자기 조립체의 제조를 위해 1:1의 부피비로 Fmoc-FF와 X-CORM를 아세톤에 용해시켜 100 mg/mL의 농도로 만든 후, 정제된 물을 첨가하여 50 mg/mL로 희석하였다. 혼합 용액을 실온에 12 시간 방치한 후, 증류 정제수를 첨가하여 최종 농도를 5.0 mg/mL이 되도록 하였다.

[0121] [시험예 2] 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 일산화탄소 방출

[0122] 주변 pH 조건에 따른 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 안정적인 일산화탄소 결합 여부를 확인하기 위해 0.1 mM 수산화나트륨(NaOH)를 이용하여 수용액의 pH를 2, 6 및 13으로 변경하면서 FT-IR 분광법으로 산성 및 염기성 조건에서의 결과를 분석하였다.

[0123] FT-IR 분광법은 ZnSe 펠릿(pellet)을 이용하여 수행하였다(FTS-175C; Bio-Rad Laboratories, Cambridge, USA). 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체의 상기 조건에서의 백그라운드(background) 스펙트럼을 측정하기 위해 해당 pH에 대한 0.1 mM 염화나트륨(NaCl)의 D₂O 용액을 사용하였다.

[0124] 그 결과 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 산성 조건에서는 3개, 염기성 조건에서는 2개의 피크가 관찰되어, 염기성에서 CO 리간드가 CO₂ 리간드로 전환되는 것을 확인하였으며, 이를 통해 본 발명의 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체는 상기 pH 조건에서 일산화탄소 방출이 이루어질 수 있음을 확인하였다.

[0126] [시험예 3] 미오글로빈(myoglobin) 동적 특성 시험

[0127] 헤모글로빈 유사 분자인 미오글로빈에 대하여, 일산화탄소 방출 분자의 일산화탄소 방출 시험 관련 동적 시험(kinetic assay)을 수행하였다.

[0128] 모든 용액은 pH 7.4의 0.1 M 인산완충액(phosphate buffer)에서 제조하였다.

[0129] 2.0 mg/mL 농도의 미오글로빈 용액(myoglobin solution, Equine Heart) 66 μ L을 상기 인산완충액에서 제조한 후, 15분 이상 질소를 투입하여 가스를 제거하였다. 가스가 제거된 용액에 24.0 mg/mL 디티온산 나트륨(sodium dithionite, Junsei chemicals Co., Ltd.)을 가하여 미오글로빈을 디옥시-미오글로빈(deoxy-myoglobin; deoxy-Mb)로 전환시켰다. 디티온산 나트륨과 생성된 디옥시-미오글로빈의 부피비는 1:10 (v:v)로 측정되었다. 상기 디

옥시-미오글로빈 용액을 상기 제조한 펩티드-일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)에 혼합하여 약 40 μM 및 80 μM 의 용액을 수득하였다. 이 용액을 큐벳(cuvette)에 신속히 옮긴 후, 500 내지 600 nm의 UV-Vis 분광광도계 (NEOSYS-2000 spectrometer, Scinco, 대한민국)로 실온에서 가시 스펙트럼(visible spectra)을 측정하였다.

이로부터 일산화탄소의 방출량을 하기 식 1을 이용하여 계산하였다.

[식 1]

$$\frac{A_{542}}{A_{iso}} = \frac{\epsilon_{d542}[Mb] + \epsilon_{CO542}[MbCO]}{\epsilon_{iso}([Mb] + [MbCO])} = \frac{\epsilon_{d542}}{\epsilon_{iso}} - \frac{\epsilon_{d542} - \epsilon_{CO542}}{\epsilon_{iso}} \cdot \frac{[MbCO]}{[Mb] + [MbCO]}$$

$$\therefore \frac{[MbCO]}{[Mb] + [MbCO]} = \left(\frac{\epsilon_{d542}}{\epsilon_{iso}} - \frac{A_{542}}{A_{iso}} \right) \cdot \frac{\epsilon_{iso}}{\epsilon_{d542} - \epsilon_{CO542}}$$

상기 식에서 A_{542} , A_{iso} 는 각각 542 nm 및 550 nm 파장에서의 흡수력을 나타낸다. 또한, ϵ_{d542} , ϵ_{CO542} 및 ϵ_{iso} 는 각각 542 nm에서 Mb, 542 nm에서 MbCO 및 550 nm에서 Mb (및 MbCO)의 흡광 계수(extinction coefficient)를 나타내고, $[Mb]$ 및 $[MbCO]$ 는 Mb 및 MbCO 각각의 농도를 나타낸다.

디옥시-미오글로빈(deoxy-Mb)은 일산화탄소에 대해 높은 친화력을 가지고 있어, 일산화탄소 한 분자와 결합하여 카르보닐 미오글로빈(carbonyl myoglobin; MbCO)을 형성한다. 디옥시-미오글로빈과 카르보닐 미오글로빈의 최대 흡수도 차이로부터 일산화탄소 방출 분자에서의 일산화탄소 방출을 검출할 수 있다.

500 내지 600 nm의 범위에서, 디옥시-미오글로빈은 556 nm에서 최대 흡수 피크가 관찰되는 반면, 카르보닐 미오글로빈은 542 nm 및 578 nm의 두 곳에서 최대 흡수 피크가 관찰되는 차이점을 확인하였다.

또한, 상기 제조한 약 40 μM 및 80 μM 의 용액에 대하여, 일산화탄소 방출 상관관계를 확인하기 위해, 일산화탄소의 방출 시간에 대한 동적 특성을 계산하였다. 이 결과에 의하면, 40 μM X-CORM의 경우 일산화탄소 방출의 반감기가 13.7 분인 것으로 측정된 반면, 80 μM X-CORM인 경우 1.3 분으로, 일산화탄소 방출이 일산화탄소의 농도에 크게 연관되어 있음을 확인하였다.

상기 측정 결과를 바탕으로, 실시예를 통해 제조한 하이드로겔화제 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)의 공자기 조립체를 포함하는 일산화탄소 방출 하이드로겔(CO-releasing hydrogel; CORH)에 대하여, 상기과 마찬가지로의 미오글로빈 동적 특성 시험 방법으로 분석하였다.

그 결과, 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)에서 일산화탄소 방출 반감기는 20.2 분으로 측정된 반면, 하이드로겔 형성 전의 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)에서 일산화탄소 방출 반감기는 약 1분으로, 본원 발명의 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 경우, 일산화탄소 보유 시간이 하이드로겔 형성 전의 X-CORM에 비해 20배 가까이 우수하다는 새로운 결과를 확인할 수 있었다.

[시험예 4] 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 공자기 조립 특성

FT-IR 분광법을 이용하여 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 분광 테스트를 수행하여 CORH에서의 분자간 상호작용을 측정하였다. 이를 위해, 실시예를 통해 제조한 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)와 하이드로겔(Fmoc-FF)을 5:5 (v:v)의 비율로 혼합한 후 FT-IR 분광법으로 1.0 mg/mL D_2O 용액에서 1500 내지 1800의 파수(wavenumber)에 포함되는 스펙트럼을 얻었다(도 5).

공자기 조립된 Fmoc-FF/X-CORM 형태의 CORH는 1638 cm^{-1} 및 1690 cm^{-1} 의 파수를 갖는 두 가지 지배 피크를 갖는 것을 확인할 수 있었으며, 이로부터 상기 공자기 조립된 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)은 모두 역평행 β -시트(antiparallel β -sheet)인 것을 알 수 있다. 상기 역평행 β -시트는 하이드로겔화제인 Fmoc-FF로부터 관찰할 수 있는 것으로, 이로부터 Fmoc-FF와 X-CORM과의 공자기 결합에 의해 β -시트 구조가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

- [0146] 공자기 조립체의 점탄성 특성(viscoelastic properties)
- [0147] 상기 공자기 조립체 CORH의 점탄성 특성은 유동학적 측정법(rheological measurement)을 통해 실온에서 유량계 MARS 40(HAAKE, Germany)을 이용하여 20 mm 평행 플레이트(parallel plate)에서 1 Hz의 시간 스위프(time sweep)으로 측정하였다. 측정시 선형 점탄성 지역을 결정하기 위해 0.01-1 % 진동 변형 및 1-100 Hz의 주파수 스위프(frequency sweep)을 가하여 측정하였다.
- [0148] 이로부터, 선형 지역에서 하이드로겔의 저장 탄성률(storage modulus, G')은 손실 탄성률(loss modulus, G'')에 비해 한 자릿수 이상 큰 값을 갖는 것을 발견하였으며, 이 유동 특성은 탄력이 있는 하이드로겔의 특성에 해당함을 알 수 있었다. 또한, 상기 하이드로겔은 3 kPa 이상의 저장 탄성률을 가짐으로 인해 매우 단단한 것을 확인하였다. 또한 상기 공자기 조립체인 CORH의 경우 저장 탄성률과 손실 탄성률 모두 50 Hz 이상의 주파수에 관계 없이 안정적인 일정 값을 갖는 것을 확인하였다(도 6).
- [0150] 공자기 조립체의 TEM 분석
- [0151] 상기 제조한 공자기 조립체인 CORH의 분자 구조를 확인하기 위해 투과 전자 현미경(transmission electron microscopy, TEM)으로 120 kV JEM-1400(JEOL, Japan)을 사용하여 측정하였고, 이를 Gatan Digital Micrograph 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.
- [0152] 상기 분석을 통해 본 발명의 실시예를 통해 제조한 공자기 조립체인 CORH는 10 내지 100 nm의 섬유 직경을 갖는 섬유 네트워크 구조를 갖는 것을 확인하였다(도 7).
- [0154] 공자기 조립체의 NMR 분석
- [0155] 상기 제조한 공자기 조립체인 CORH의 분자 구조를 확인하기 위해 2차원 핵자기공명(2-dimensional nuclear magnetic resonance, NMR) 분석법 및 2차원 핵 오버하우저 강화 분광법(2-dimensional nuclear Overhauser spectroscopy, NOESY)을 이용하였다(Bruker AVANCE III 600 NMR spectrometer w/ BBFO broadband probe; Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten, Germany).
- [0156] 핵 오버하우저 강화 분광법 측정시 상기 실시예를 통해 제조한 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)와 하이드로겔(Fmoc-FF)을 5:5 (v:v)의 비율로 혼합한 후 1.0 mg/mL D₂O 용액에서, 600 MHz, 혼합 시간 t_m = 100 ms, 스캔 횟수 n = 128로 설정한 후 측정하였다.
- [0158] 측정 결과, 디페닐알라닌(diphenylalanine)의 방향족 고리(aromatic ring)과 Fmoc 링커 영역의 메틸렌 사이의 상호작용이 존재함을 발견하였으며. 또한 디페닐알라닌의 방향족 고리와 디페닐알라닌의 메틸렌 그룹 양성자 간의 상호작용 또한 존재하는 것을 확인하였다(도 8).
- [0159] 이 결과로부터, 수용액 상에서 Fmoc-FF와 X-CORM 간의 성공적인 공자기 조립이 유도될 수 있음을 새롭게 발견하였다.
- [0161] [시험예 5] 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 치료 효과
- [0162] 라트 세포 배양
- [0163] 라트의 배아 심장 근육 모세포(embryonic cardiomyoblast)에서 유래한 H9c2 세포는 한국 세포주 은행(서울, 대한민국)에서 분양받아 사용하였다. 세포는 10% FBS(fetal bovine serum; Life Technologies, Inc.)이 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium, Logan, Utah, USA) 배지에 유지시켰고, 모든 세포주는 5% 이산화탄소가 공급되는 37 °C의 가습 대기(humidified atmosphere)에서 배양하였다.
- [0165] 세포 독성(cytotoxicity) 측정
- [0166] 세포를 웰당 100 μ L인 96-웰 플레이트(well plate)에 접종한 후 25 μ M, 50 μ M 및 100 μ M 농도의 일산화탄소 방

출 하이드로겔(CORH)를 처리하였다. 일산화탄소 방출 하이드로겔의 세포독성과의 비교를 위해, 하이드로겔 제조 단계에 사용한 일산화탄소 방출 분자(CORM3, 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)에 대해서도 동일한 분석을 수행하였다.

[0167] 세포 생존율과 세포 독성은 CCK-8(Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) 시험을 통해 권장되는 지침에 따라 측정하였다. 10 μ L의 CCK-8 용액을 각 웰에 첨가하고 3 시간 동안 배양하였다. 흡광도는 마이크로 플레이트 판독기(Spectra Max M5, Molecular Device Co.) 상에서 450 nm의 파장에서 측정하였다. 세포 생존율은 처리된 세포의 흡광도를 대조군 세포의 흡광도와 비교하여 얻었다. 모든 실험은 독립적으로 3 회 반복 수행한 결과를 사용하였다.

[0168] 그 결과, 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 경우 농도 증가에 따른 처리에도 세포 독성이 거의 나타나지 않음을 확인하였다.

[0170] 세포 생존율(cell viability) 측정

[0171] 세포 생존율 측정은 Live/Dead 분석 키트를 이용하여 육안으로 측정하였다. H9c2 세포를 트리카보닐디클로로루테늄(II) 2량체(CORM3), 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM) 및 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)로 처리한 후, 과산화수소를 첨가하고 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 생존한 세포와 죽은 세포를 Live/Dead 분석 키트를 이용하여 염색하고, 한국기초과학지원연구원(Korea Basic Science Institute, Daejeon, Korea)에 설치된 공초점 현미경 영상 시스템(LSM710, CarlZeiss, Germany)를 이용하여 시각화하였다.

[0172] 그 결과, 공자기 조립체인 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)를 처리한 경우, 과산화수소만을 첨가한 경우에 비해, 세포 생존율이 30% 정도 향상된 것을 확인하였으며, 이로부터 본 발명의 공자기 조립체 CORH는 H9c2 세포에 대하여, 과산화수소로 인한 산화 스트레스(oxidative stress)가 가해진 경우 대비하여, 세포 보호 효과가 현저히 우수한 것을 발견하였으며, 이로부터 심장 보호 효과가 있음을 확인하여, 본 발명의 공자기 조립체 CORH를 심장 보호를 위한 치료 용도로 활용할 수 있음을 새롭게 발견하였다.

[0174] 세포사멸(apoptosis) 측정

[0175] 과산화수소 처리에 따른 세포 내 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)의 측정을 위해, 클로로메틸-2,7-디클로로디히드로-플루오레신 디아세테이트(chloromethyl-2,7-dichlorodihydro-fluorescein diacetate, CM-H2DCFDA)를 이용하였다. H9c2 세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 세포/웰로 바닥의 검은 쪽에 도말하고, 형광 분석을 통해 활성 산소종을 측정하였다. 세포를 3개의 그룹으로 나누어 각각 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)과 함께 일산화 탄소 방출 입자인 트리카보닐디클로로루테늄(II) 2량체(CORM3) 및 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM)를 대조군으로 2 시간 동안 처리하였다. 이후 6-카복시-2',7'-디플루오레스cein diacetate; DCF-DA; Thermo Scientific, Rockford, IL, USA) 혼합물 및 과산화수소에서 30 분간 배양하였다. 이후, 마이크로 플레이트 판독기(Spectra max M5, Molecular Device Co.; λ_{ex} =405 nm, λ_{em} =527 nm)를 이용하여 형광을 측정하였다.

[0176] TUNEL(Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) 시험법은 DeadEnd Fluorometric TUNEL System (Promega, Madison, WI)을 이용하여 제조사 권장 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0177] 세포사멸 분석은 세포 활력 키트인 NucleoCounter® NC-3000™ system을 아용하였으며, 제조사의 지침에 따라 환원된 글루타티온(glutathione)의 자유 티올(free thiol)의 양을 측정하여 분석하였다.

[0179] 상기 과정을 통해 세포사멸에 대한 보호 효과를 측정한 결과, 과산화수소 처리된 세포에서 세포사멸의 비율은 44.0%이며, 일산화탄소 방출 분자를 첨가하는 경우, 일산화 탄소 방출 입자인 트리카보닐디클로로루테늄(II) 2량체(CORM3), 펩티드와 결합한 일산화탄소 방출 분자 결합체(X-CORM) 및 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)에 대하여 각각 13.0%, 20.0% 및 11.0%로 측정되었으며, 이로부터 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)의 경우, 가장 우수한 세포사멸 감소 효과를 나타내는 것을 발견하였다(도 9).

[0180] 과산화수소는 활성 산소종(ROS)의 생성 및 세포사멸을 촉진하는 영향을 주게 되는데, 상기 합성된 일산화탄소

방출 분자들이 50 μ M에서 첨가된 후 2시간 경과 후에 상기 CM-H2DCFDA 프로브를 이용하여 세포 내 활성 산소종을 측정된 결과를 도 10에 도시하였다.

[0181] 그 결과, 과산화수소에 의한 활성 산소종의 생산이 증가하였으나, 활성 산소종의 증가는 일산화탄소 바울 분자 전처리에 의해 현저히 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)을 처리하였을 때 현저히 우수한 것을 확인하였다.

[0182] 이러한 결과는 합성된 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)이 심근 세포에서 산화 스트레스에 의한 손상에 대한 우수한 효과를 나타내는 것을 의미하며, 이를 통해 본 발명의 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH)이 치료용 조성물의 형태로 사용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0184] [제형예 1] 주사제

[0185] 본 발명의 실시예에서 제조한 일산화탄소 방출 하이드로겔(CORH) 30 mg

[0186] 아세톤 또는 에탄올 25 mL

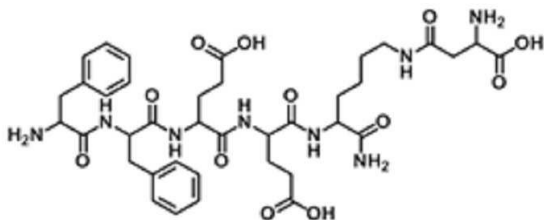
[0187] 증류수 75 mL

[0188] 를 혼합하여, 주사제 제조에 사용되는 통상의 방법을 이용하여 제조하였다.

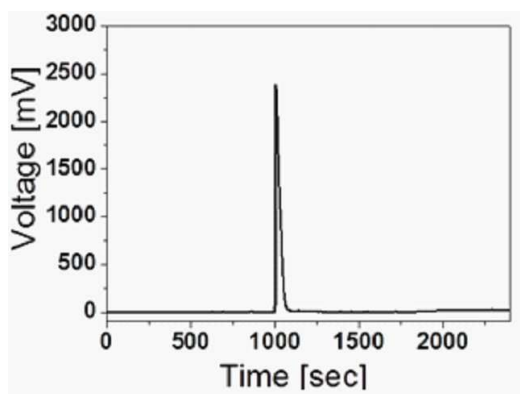
[0190] 상술한 바와 같이 본 발명의 바람직한 실시예를 통하여 발명의 내용을 설명하였지만, 해당 기술분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허 청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경할 수 있음은 자명한 것이다.

도면

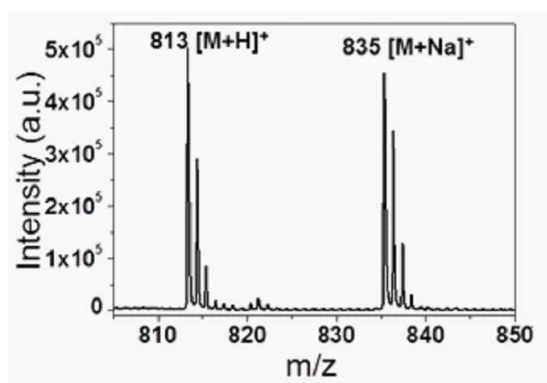
도면1a



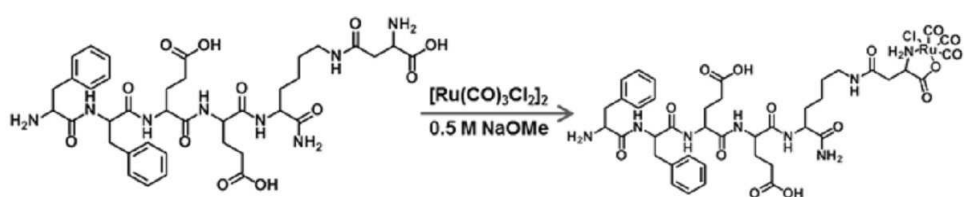
도면1b



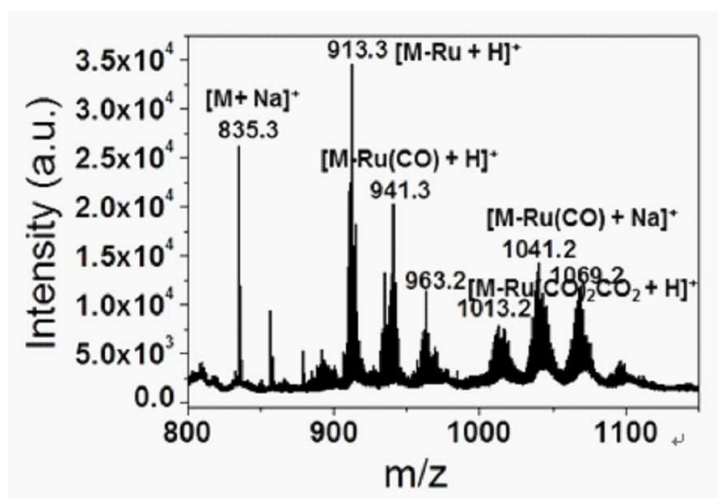
도면1c



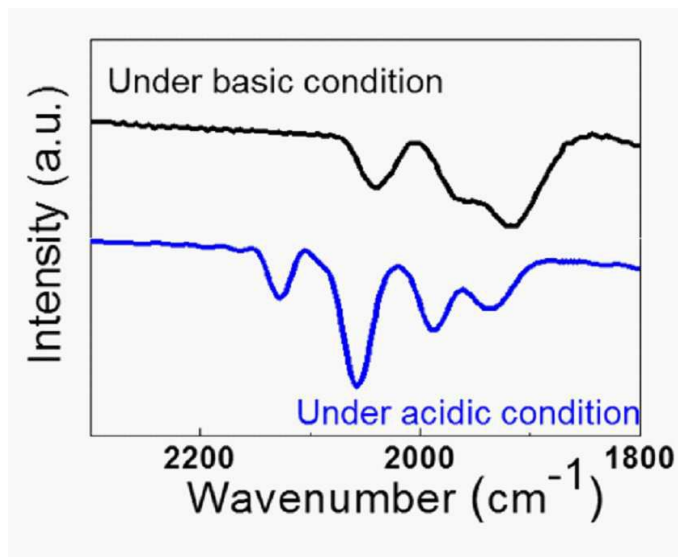
도면2a



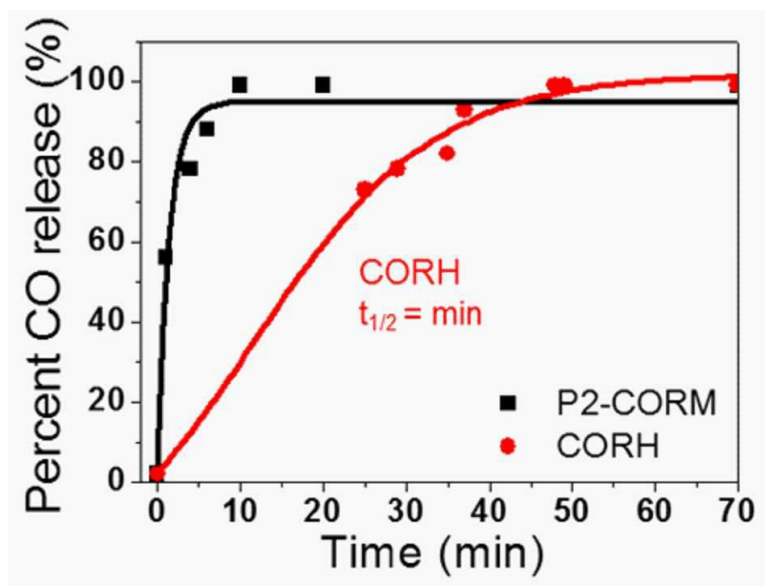
도면2b



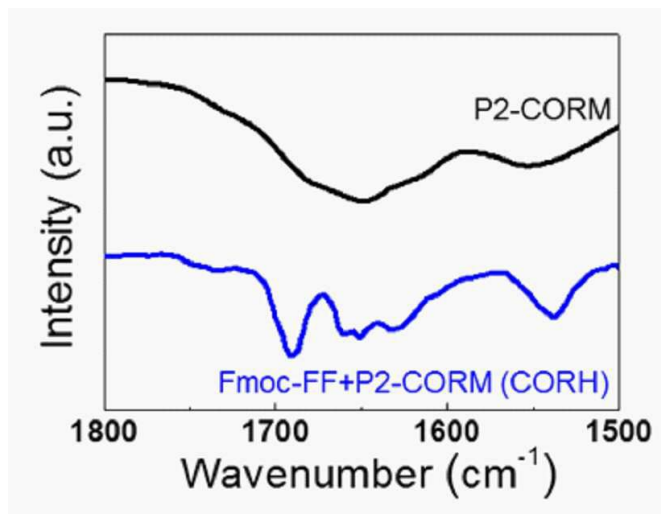
도면3



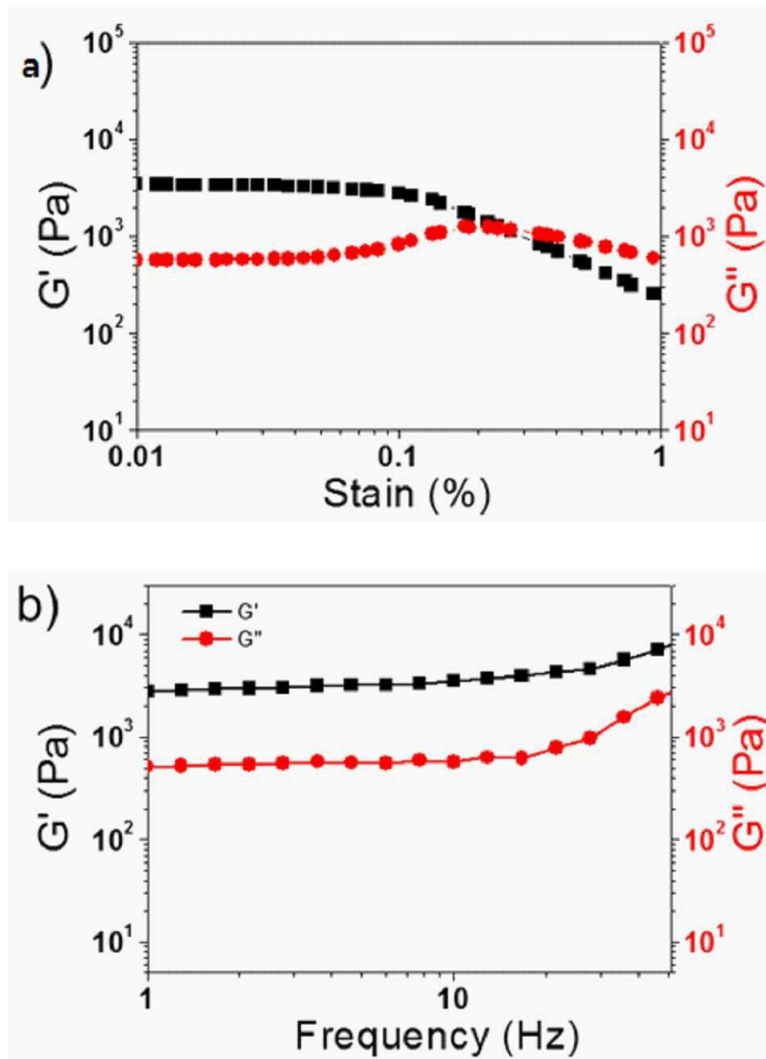
도면4



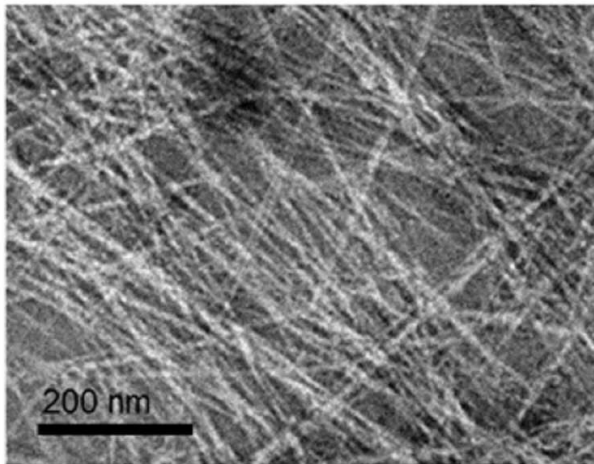
도면5



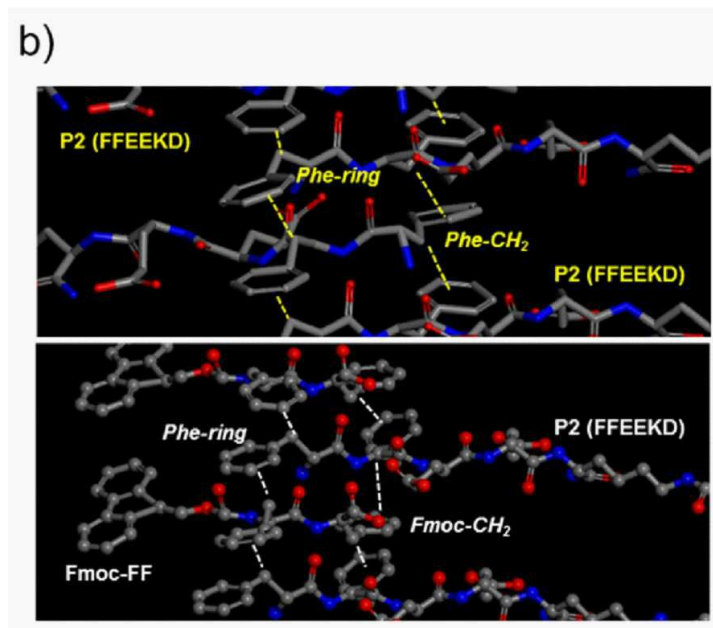
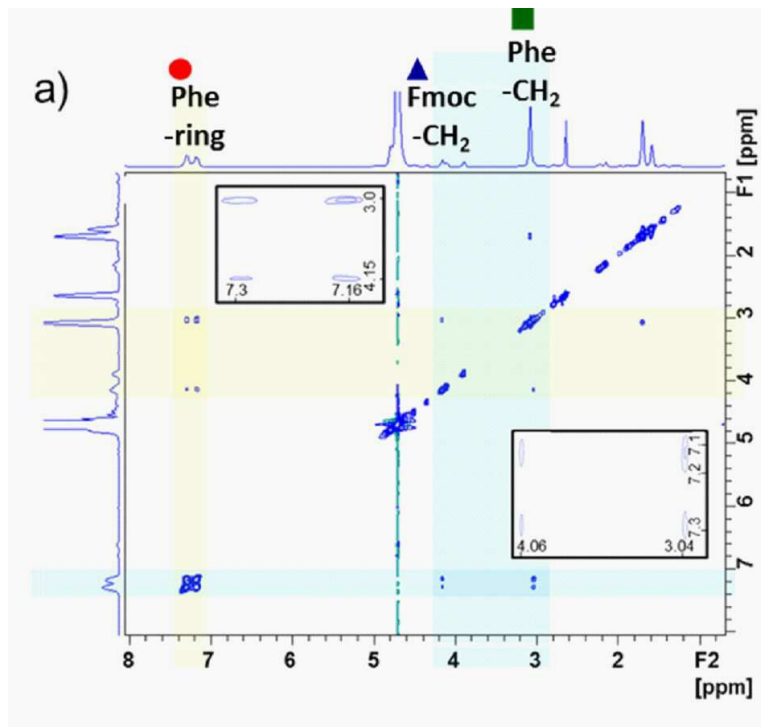
도면6



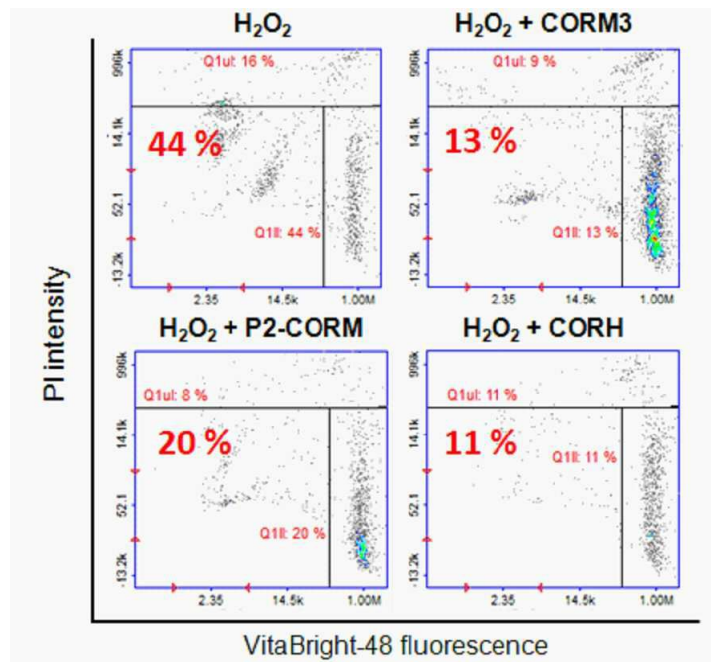
도면7



도면8



도면9



도면10

