(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0064051
(43) 공개일자 2022년05월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/00 (2006.01) *C12M 1/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/001 (2013.01)
C12M 25/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0150136
(22) 출원일자 2020년11월11일
심사청구일자 2020년11월11일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
아주대학교산학협력단
경기도 수원시 영통구 월드컵로 206 (원천동)
(72) 발명자
박용두
서울특별시 강북구 삼양로19길 113, 삼각산아이원아파트 115-804호
이재연
서울특별시 중랑구 봉우재로65길 49, 201호
최상돈
경기도 수원시 팔달구 권광로 373, 월드메르디앙아파트 103동 3001호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

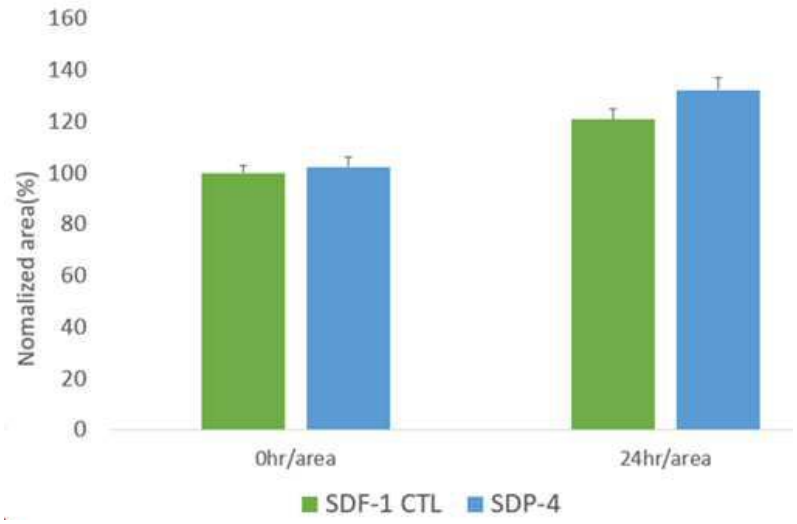
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **CXCR4와 상호작용하여 줄기세포 이동을 유도하는 신규한 SDP-4 펩타이드**

(57) 요 약

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드는 CRCX4 수용체에 대한 친화도가 우수하여 줄기세포의 이동을 유도하기 위해 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12N 2533/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711105722
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	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드:

[일반식 1](서열번호 1)

Leu-Ser-Tyr-Xaa1-Cys-Xaa2-Cys-Xaa1-Phe-Gly-Gly-Gly-Phe-Xaa1-Cys-Xaa2-Cys-Xaa1-Tyr-Ser-Leu

상기 Xaa1은 Lys 또는 Arg이고,

상기 Xaa2는 Gly 또는 Pro이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 SDF-1에 의해 이동을 유도할 수 있는 줄기세포인,

줄기세포 이동용 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 CXCR4 수용체를 발현하는 줄기세포인,

줄기세포 이동용 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 다능성 중간엽줄기세포, 다능성 조혈모줄기세포, 다능성 신경줄기세포, 다능성 내피줄기세포, 다능성 상피줄기세포, 다능성 표피줄기세포, 역분화 줄기세포, 다능성 근육줄기세포, 다능성 성체 줄기세포, 다능성 췌장줄기세포, 다능성 심근줄기세포, 다능성 혈관줄기세포, 다능성 모낭줄기세포, 다능성 각막줄기세포, 다능성 지방줄기세포, 다능성 제대/제대혈 줄기세포, 다능성 치아줄기세포, 다능성 간줄기세포, 및 다능성 암줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것인,

줄기세포 이동용 펩타이드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 C-말단이 아미드화된 것인,

줄기세포 이동용 펩타이드.

청구항 7

제1항의 줄기세포 이동용 펩타이드를 포함하는 줄기세포 이동용 조성물.

청구항 8

제1항의 줄기세포 이동용 펩타이드를 포함하는 조직 재생용 지지체.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CXCR4와 상호작용하여 줄기세포 이동을 유도하는 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 줄기세포 이동을 위한 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)는 다분화능(multipotent)을 가진 기질세포(stromal cell)이다. MSC는 조골세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포 등 다양한 세포로 분화할 수 있으므로 이를 이용해 조직재생이 필요한 질환을 치료하고자 하는 연구가 활발하다.

[0003] 혈액 또는 골수 내에서 순환하는 MSC가 손상된 조직 부위로 이동하는 현상을 호밍(homing)이라고 한다. 호밍은 인간 기질세포 유도체(Stromal cell-derived factor, SDF-1a) 또는 면역반응 유도 사이토카인과 같은 화학주성 인자(chemotactic substance)에 의해 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 화학주성인자들을 이용하여 중간엽 줄기세포를 조직 손상 부위로 유도하는 방법이 연구되고 있다. 종래에는 재조합된 SDF-1a을 사용하여 줄기세포의 이동을 유도하였으나 충분한 효과를 나타내지 못하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제 10-2012-0102501호(2012.09.18)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 일 구체예에 따르면 줄기세포의 이동(호밍)을 유도할 수 있는 신규한 펩타이드를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008] 일 양상은 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드를 제공한다.

[0009] [일반식 1](서열번호 1)

[0010] Leu-Ser-Tyr-Xaa1-Cys-Xaa2-Cys-Xaa1-Phe-Gly-Gly-Gly-Phe-Xaa1-Cys-Xaa2-Cys-Xaa1-Tyr-Ser-Leu

[0011] 상기 Xaa1은 Lys 또는 Arg이고, 상기 Xaa2는 Gly 또는 Pro이다.

[0012] 상기 일반식 1의 아미노산 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드는 유연성이 뛰어난 9번째 내지 13번째 아미노산 Phe-Gly-Gly-Gly-Phe을 중심으로 좌우로 8개의 서열이 대칭되는 구조이다. 따라서 CXCR4가 상기 펩타이드의 N-말단 및 C-말단 모두 인식할 수 있다. 상기 일반식 1은 서열번호 1의 서열이다.

[0013] 일 구체예에 따르면, 상기 일반식 1의 서열로 이루어진 줄기세포 이동용 펩타이드는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0014] 상기 서열번호 2의 펩타이드는 본 발명자가 머신러닝 기반 단백질 설계 알고리즘을 이용하여 SDF-1과 CXCR4수용체의 상호작용 원리에 기반하여 설계한 신규한 화학주성 펩타이드(chemotactic peptide)로서 SDP-4로 명명하였다. 일 실시예에 따르면, 상기 SDP-4는 CXCR4 수용체와 강한 상호작용을 할 수 있으며, CXCR4의 TM5 및 TM6를 형태적 전환(conformational change)시켜 줄기세포의 이동을 유도하는 신호전달을 활성화시킬 수 있다. In

vitro 실험 결과 SDP-4는 SDF-1보다 줄기세포 이동 유도 효과가 10% 이상 우수한 것으로 확인되었다.

[0015] 용어 "이동"은 줄기세포가 이식부위 또는 투여부위로부터 손상부위 또는 줄기세포의 이동이 필요한 부위로 이동하는 이동 활성(migratory activity)를 의미하며, 호밍(homing)을 의미할 수도 있다.

[0016] 용어 "화학주성(chemotaxis)"는 화학적 자극들에 의해 유도되는 줄기세포의 양성(자극을 향하는 방향) 또는 음성(자극으로부터 멀어지는 방향) 이동을 의미하며, 화학주성인자(chemotactic substance, 예를 들면 케모카인)에 의해 활성화되고, 이에 상응하는 세포 표면 수용체에 의해 매개된다.

[0017] 일 구체예에 따르면 상기 줄기세포는 SDF-1에 의해 이동을 유도할 수 있는 줄기세포 또는 CXCR4를 발현하는 줄기세포일 수 있다. 일 실시예에 따르면, SDP-4 펩타이드는 SDF-1이 CXCR4 수용체에 결합하여 신호전달을 활성화시키는 기전과 동일한 원리로 더 강한 상호작용을 할 수 있다. 따라서, 본 발명의 SDP-4 펩타이드는 SDF-1에 의해 이동이 유도되는 줄기세포 또는 CXCR4 수용체를 발현하는 줄기세포에 대해 강한 호밍 효과를 가질 수 있다. 일 구체예에 따르면, 상기 줄기세포는 SDF-1에 의해 이동을 유도할 수 있는 줄기세포 또는 CXCR4를 발현하는 줄기세포라면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 다능성(multipotent) 중간엽줄기세포, 다능성 조혈모줄기세포, 다능성 신경줄기세포, 다능성 내피줄기세포, 다능성 상피줄기세포, 다능성 표피줄기세포, 역분화 줄기세포, 다능성 근육줄기세포, 다능성 성체 줄기세포, 다능성 췌장줄기세포, 다능성 심근줄기세포, 다능성 혈관줄기세포, 다능성 모낭줄기세포, 다능성 각막줄기세포, 다능성 지방줄기세포, 다능성 제대/제대혈 줄기세포, 다능성 치아줄기세포, 다능성 간줄기세포, 및 다능성 암줄기세포로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0018] 일 구체예에 따르면, 상기 줄기세포 이동용 펩타이드는 C-말단이 아미드화(C-terminus amidation)된 것일 수 있다. 아미드화된 C-말단은 peptide-C(=O)-NH_2의 C-말단 형태이다. 펩타이드의 C-말단 아미드화는 일반적으로 펩타이드의 활성, 안정도, 저장기간(shelf life)을 증가시킬 수 있는 것으로 통상기술자에게 알려져 있다. 상기 줄기세포 이동용 펩타이드의 C-말단이 아미드화되면 CXCR4 수용체가 펩타이드를 인식하는데 도움을 주며, 활성이 증가할 수 있다(Radzicka, A.; Wolfenden, R. Rates of uncatalyzed peptide bond hydrolysis in neutral solution and the transition state affinities of proteases. J. Am. Chem. Soc. 1996, 26, 6105-6109.).

[0019] 다른 양상은 상기 줄기세포 이동용 펩타이드를 포함하는 줄기세포 이동용 조성물을 제공한다.

[0020] 상기 줄기세포 이동용 펩타이드는 줄기세포에 대해 강한 호밍 효과를 발휘할 수 있으므로 이를 포함하는 줄기세포 이동용 조성물을 손상된 조직에 투여하면 중간엽 줄기세포의 유입을 높은 효율로 촉진할 수 있다.

[0021] 상기 조성물이 치료 목적의 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 더 포함할 수 있다.

[0022] 상기 조성물은 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0023] 상기 줄기세포 이동용 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 예를 들면 손상된 조직에 주사로 투여할 수 있다. 상기 줄기세포 이동용 조성물은 줄기세포 치료제의 투여 전, 줄기세포 치료제와 함께, 또는 줄기세포 치료제의 투여 후에 투여할 수 있다.

[0024] 상기 줄기세포 이동용 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 조성물은 다른 세포 치료제와 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 비만의 중증도,

성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있다.

[0026] 다른 양상은 상기 줄기세포 이동용 펩타이드를 포함하는 세포 치료제를 제공한다.

[0027] 상기 줄기세포 이동용 펩타이드는 줄기세포에 대해 강한 호밍 효과를 발휘할 수 있으므로 이를 포함하는 세포 치료제를 손상된 조직에 투여하면 중간엽 줄기세포의 유입을 높은 효율로 촉진할 수 있다.

[0028] 상기 세포치료제의 조성 및 투여에 대해서는 상술한 줄기세포 이동용 조성물을 참고하여 이해할 수 있으며, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0029] 상기 세포 치료제를 적용할 수 있는 질환으로는 골손상, 관절손상, 신경손상, 골수암, 림프종양, 또는 피부손상일 수 있다. 상기 골손상 및 관절손상은 체내 모든 골격부위의 손상을 포함할 수 있고, 류마티스 관절염, 골다공증, 연골형성부전증, 연골종, 추간판 탈출증, 사고에 의한 손상, 자가면역질환에 의한 손상, 암으로 인한 손상, 당뇨병으로 인한 손상 등을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 신경손상은 병리학적 또는 물리적으로 인한 신경조직 손상을 모두 포함하며, 예를 들면 파킨슨병, 알츠하이머, 다발성 경화증, 신경위축성 경화증(ALS), 뇌허혈, 뇌출혈, 척수손상, 운동신경원질환, 탈수초성질환, 청신경손상 또는 헌팅턴일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 피부손상은 화상, 찰과상, 동상, 관통상, 타박상, 피부궤양, 욕창, 암에 의한 손상, 또는 사고에 의한 손상일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 세포 치료제는 청각 손실 환자의 청각 재생을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면 상기 펩타이드는 청각 전구 세포를 원하는 위치로 이동하도록 유도할 수 있고, 치료가 필요한 위치에서의 유모세포로 분화시킴으로써 청각 재생 치료에 사용될 수 있다.

[0031] 또 다른 양상은 상기 줄기세포 이동용 펩타이드를 포함하는 조직 재생용 지지체를 제공한다.

[0032] 상기 줄기세포 이동용 펩타이드는 줄기세포에 대해 강한 호밍 효과를 발휘할 수 있으므로 이를 포함하는 조직 재생용 지지체를 손상된 조직에 이식하면 중간엽 줄기세포의 유입을 높은 효율로 촉진할 수 있다.

[0033] 상기 조직 재생용 지지체는 생활성(bioactive) 또는 생체활성 지지체로 지칭할 수 있다. 상기 생활성 또는 생체활성은 생체적합성(biocompatible) 및/또는 생분해성을 의미할 수 있다. 상기 생활성 또는 생체활성은 지지체를 이식받는 숙주의 삽입 부위 조직과 적절한 반응을 나타내어 기대하는 기능을 수행하고, 숙주에 독성 등에 의한 해로움을 주지 않으면서 존재할 수 있는 것을 의미할 수 있다.

[0034] 상기 지지체는 생분해성 지지체(biodegradable scaffolds)일 수 있다. 구체적으로 상기 줄기세포 이동용 펩타이드를 화학주성인자로서 함유한 3차원 구조체일 수 있다. 상기 지지체는 재생이 필요한 손상 조직에 이식되면 줄기세포의 이동을 유도할 수 있고, 물리적 지지를 제공함으로써 이동한 줄기세포가 분화하여 조직을 형성하는데 도움을 줄 수 있다. 상기 지지체는 다공성 지지체일 수 있다.

[0035] 상기 지지체는 예를 들면 PLGA(poly(lactic-coglycolic acid)), PLA(polylactic acid), PGA(polyglycolic acid), PCL(poly-ε-caprolactone), PAA(poly(amino acid)), 폴리안하이드라이드, 폴리오소에스테르, 이들의 유도체, 공중합체, 및 이들의 혼합물; 히알루론산, 키토산, 콜라겐, 폴리비닐 알코올 스폰지, 폴리사카라이드(예를 들어, 알기네이트), 폴리포스파젠, 폴리아크릴레이트 및 폴리에틸렌 옥사이드-폴리프로필렌 글라콜 블랏 공중합체로 구성된 생분해성 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 상기 재생이 필요한 조직은 예를 들면 골조직, 관절조직, 신경조직 또는 피부조직일 수 있다.

[0037] 상기 조직 재생용 지지체는 청각 손실 환자의 청각 재생을 위해 사용될 수 있다. 예를 들면 지지체에 포함된 펩타이드에 의해 청각 전구 세포를 원하는 위치로 이동하도록 유도할 수 있고, 치료가 필요한 위치에서의 유모세포로 분화시킴으로써 청각 재생 치료에 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0039] 일 구체예에 따른 펩타이드는 줄기세포 호밍 효과가 우수하므로 손상된 조직 치료 목적으로 사용될 수 있다.

[0040] 일 구체예에 따른 펩타이드는 세포치료제 또는 조직재생용 지지체 등에 적용하여 손상된 조직의 치료 목적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 2D 스텐실 방법으로 줄기세포 이동을 확인하는 방법을 나타낸 것이다.

도 2는 2D 스텐실 방법에 의해 SDF-1 또는 SDP-4의 줄기세포 이동 효과를 확인한 결과이다.

도 3은 3D 스페로이드 방법으로 줄기세포 이동을 확인하는 방법을 나타낸 것이다.

도 4는 3D 스페로이드 방법에 의해 SDF-1 또는 SDP-4의 줄기세포 이동 효과를 확인한 결과이다.

도 5는 Transwell® 을 이용하여 줄기세포 이동을 확인하는 방법을 나타낸 것이다.

도 6은 트랜스웰에 의해 SDF-1 또는 SDP-4의 줄기세포 이동 효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: 펩타이드 설계 및 선별**

[0045] CXCR4 수용체 및 SDF-1(CXCL12) 케모카인의 결정 구조는 Protein Data Bank(PDB ID: 2N55)에서 다운로드하였다. SDF-1의 구조는 NMR 분광법 및 X-선 결정학 방법으로 분석하였다. SDF-1은 N-말단 비구조화 서열, 중앙 β-시트, 및 C-말단 α-나선 구조를 포함하는 3가지 모티프를 가지는 것으로 확인되었다.

[0046] CXCR4와 SDF-1의 결합 구조를 분석하여 이들 사이의 정전기적 상보성(electrostatic complementarity)을 확인하였다. SDF-1에 대한 SAR(structure-activity relationship) 분석에 따르면 CXCR4 수용체와 SDF-1의 N-말단 영역이 결합하며, 이는 CXCR4 수용체에 의한 신호 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다. 구체적으로, SDF-1의 첫번째 라이신(Lys4)는 CXCR4 수용체의 세포외 영역(extracellular region)에 위치한 Glu32(CXCR4 서열의 32번째 Glu)와 강한 극성 상호 작용을 형성한다. 상기 SDF-1의 Lys4 및 CXCR4의 Glu32 사이의 상호작용은 CXCR4의 TM5(transmembrane 5) 및 TM6(transmembrane 6)의 형태적 전환(conformational transition) 및 이동을 촉진하며, 이는 CXCR4 수용체에 의한 세포 내 신호 전달 활성화에 필수적임을 확인하였다.

[0047] CXCR4와 SDF-1의 결합 과정을 규명한 결과, 먼저 CXCR4 수용체의 N-말단이 SDF-1의 접힌 케모카인 도메인(folded chemokine domain)과 결합하며, 이는 CXCR4와 SDF-1 사이의 결합 에너지 대부분에 기여하는 것으로 확인되었다. 그 다음으로 SDF-1의 유연한(flexible) N-말단이 CXCR4 수용체의 막관통(TM) 도메인 내의 포켓에 결합(docking)하면 수용체 신호 전달이 활성화되는 것으로 확인되었다. SDF-1 케모카인 결합에 의한 CXCR4의 부위 1(site 1)의 역학적 변화(dynamic alteration)을 평가하였다. CXCR4의 부위 1은 CXCR4의 1번 내지 38번 아미노산에 의해 이루어진 Extracellular topological domain으로써, 서열번호 4의 CXCR4 서열을 참고하여 이해될 수 있다.

[0048] 상기 확인한 CXCR4 수용체와 SDF-1 사이의 상호작용을 기초로, CXCR4 잔기와 극성 상호작용이 강하고, TM5 및 TM6를 형태적 전환시켜 수용체를 활성화시킬 수 있는 SDF-1 유래 펩타이드를 설계했다.

[0049] MOE 단백질 빌더 및 단백질 설계 모듈을 사용하여 SDF-1의 아미노산 서열에서 각각의 잔기를 다른 아미노산으로 돌연변이시킨 펩타이드들을 제작하고, 돌연변이된 펩티드의 CXCR4 수용체에 대한 친화력(dAffinity 점수) 및 안전성(dStability 점수)를 확인하였다. 상기 친화력 및 안전성 점수를 기반으로 우수한 것으로 평가된 펩타이드 중 하나인 SDP4(서열번호 2) 펩타이드를 선별하였다.

[0050] SDP4 펩타이드의 C-말단에 아민기를 추가(아미드화)함으로써 N-말단 및 C-말단 모두에서 CXCR4에 인식될 수 있도록 설계하였다.

[0052] **실시예 2: In Vitro에서의 세포 이동 분석**

[0053] 2-1. 2D stencil을 이용한 줄기세포 이동(migration) 분석

[0054] Stencil mold는 지름 13mm이고, 세포가 파종될 2개의 영역이 있으며 이 사이의 간격은 1mm 이다. Stencil mold

에 PDMS를 부어 스텐실을 제작하였다. 제작된 PDMS 스텐실을 고온증기 멸균 후 건조하였다. 세포 파종(seeding) 하루 전에 건조된 스텐실을 12well 바닥에 위치시킨 후 스텐실이 완전히 잠기도록 배지(Media)를 채우고 하루동안 인큐베이팅하여 버블을 제거하였다. 이후 미디어를 제거 후 스텐실 위에 인간 중간엽 줄기세포(hMSC: Human Mesenchymal Stem Cells)를 $1x10^5$ cells/웰만큼 파종(seeding) 하고 스텐실 안쪽에 세포가 다 채워질 때까지 기다린 후 스텐실을 제거하였다. 스텐실을 제거한 웰을 1x PBS로 조심스럽게 세척(washing)하였다. 대조군은 SDF-1, 실험군은 SDP-4 펩타이드를 50nM 농도로 포함하는 DMEM serum free media를 2ml 넣은 후 0시간 및 24시간 경과 후 각각 현미경 촬영하였다.

[0055] 세포 이동량을 측정하기 위해 image j 프로그램으로 0시간 때 세포가 차지하는 면적과 24시간 후 세포가 차지하는 면적을 normalization (0시간: 0시간 면적/0시간면적)x100, 24시간: (24시간 면적/0시간면적)x100) 하여 스텐실이 제거된 영역으로 세포의 이동을 관찰하고 정량분석을 실시하였다. (도 1 참고)

[0056] 실험 결과, 스텐실이 제거된 영역으로 이동한 세포수는 SDP-4를 투여한 실험군이 SDF-1을 투여한 대조군보다 10% 이상 높은 것으로 확인되었다. (도 2 참고)

[0058] 2-2. 3D spheroid를 이용한 줄기세포 이동 분석

[0059] 인간 중간엽 줄기세포(hMSC: Human Mesenchymal Stem Cells)를 총량기준 약 $2x10^5$ 개로 준비한 뒤 10ml의 DMEM basal Media를 넣고 멀티 파이펫을 이용하여 dish 뚜껑에 25㎕의 드롭렛(droplet)을 만들었다. Dish 뚜껑을 뒤집어 행잉드롭(hanging drop) 방법으로 24시간동안 배양하여 한 drop당 약 500개의 세포로 이루어진 spheroid(size: 150-200㎛)가 형성되도록 하였다. 형성된 중간엽 줄기세포 spheroid를 2mg/ml 농도의 콜라겐 용액과 섞은 후 겔화(gelation)시켜 콜라겐겔 안에 spheroid가 위치하도록 제작하였다. 그 후, 10μM 농도의 SDF-1(대조군) 또는 SDP-4(실험군) peptide가 들어있는 DMEM basal media를 spheroid 포함 콜라겐겔 위에 넣고 16시간 동안 배양한 뒤 현미경을 이용하여 사진을 찍고 imageJ 프로그램을 이용하여 spheroid에서 뻗어나간 세포들의 길이를 측정하여 sprouting length를 구하였다. (도 3 참조)

[0060] 실험 결과, SDP4를 투여한 군은 대조군보다 약 10㎛ 더 멀리 이동하였으므로 10% 이상 호밍효과가 더 우수한 것으로 확인되었다. (도 4 참고)

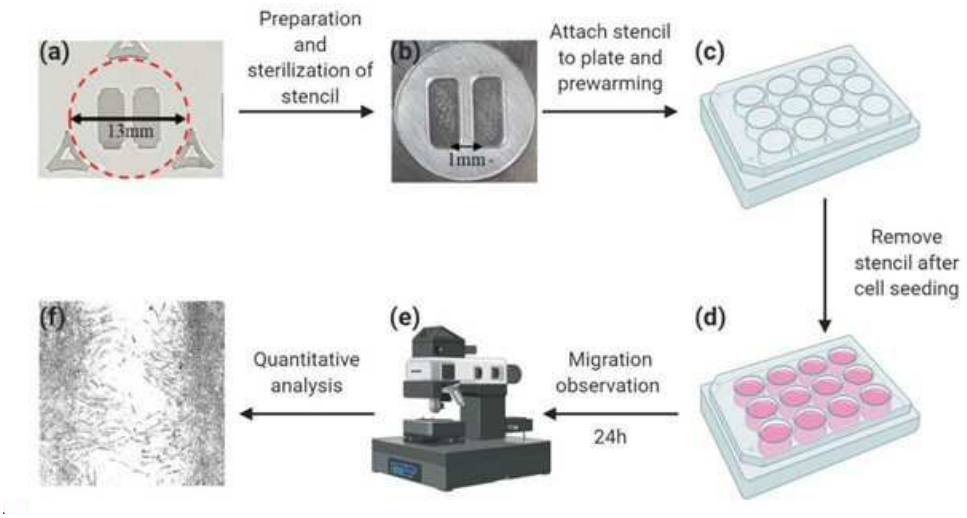
[0062] 2-3. Transwell을 이용한 줄기세포 이동 분석

[0063] 0.25% Trypsin-EDTA를 이용하여 Cell을 Detach 하였다. Filter membrane에 인간 중간엽 줄기세포(hMSC: Human Mesenchymal Stem Cells) $1x10^5$ cells/100ul cell suspension을 넣고 10분간 인큐베이션하였다. 50nM 농도의 chemo-attractant peptide(SDF-1 또는 SDP4)를 혼합한 배지를 트랜스웰 이행 플레이트(Transwell transmigration plate)의 하부 챔버(Bottom lower chamber)에 600㎕ 만큼 넣었다. 24시간 후 삽입된 plate를 제거하며, 면봉으로 조심스럽게 미디어를 제거하였다. 4% PFA를 600㎕를 추가하여 10분간 고정시켰다. 10분 후 남아있는 PFA를 면봉으로 제거하였다. 600㎕의 0.1% crystal violet을 넣고 RT에서 5~10분간 반응하였다. Crystal violet 용액을 면봉으로 제거하고 DW로 여러 번 washing 하였다. Membrane을 분리하여 슬라이드 글라스에 마운팅하고 마이크로포어를 통과하여 케모카인을 향해 이동한 세포를 현미경으로 관찰하였다. (도 5 참고)

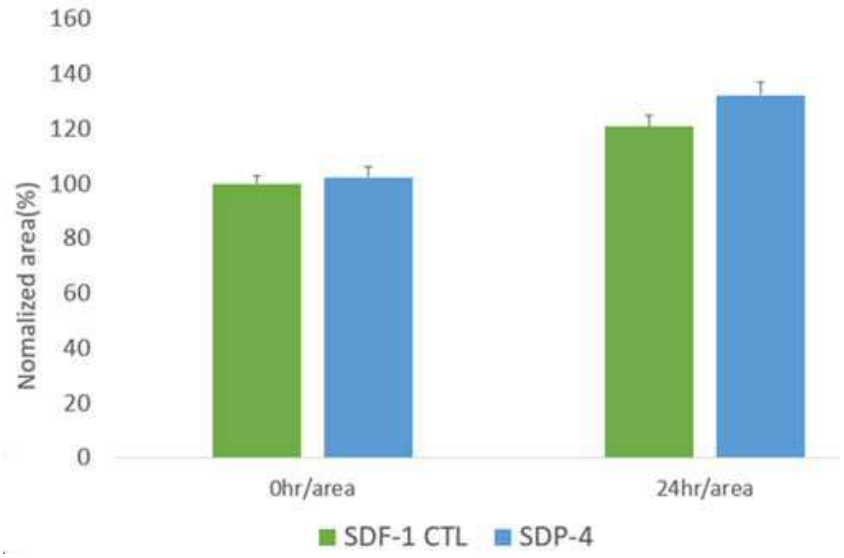
[0064] 실험 결과, SDP-4 실험군은 SDF-1을 사용한 대조군보다 하부 챔버로 이동한 세포의 수가 10% 이상 더 증가하였다. (도 6 참고)

도면

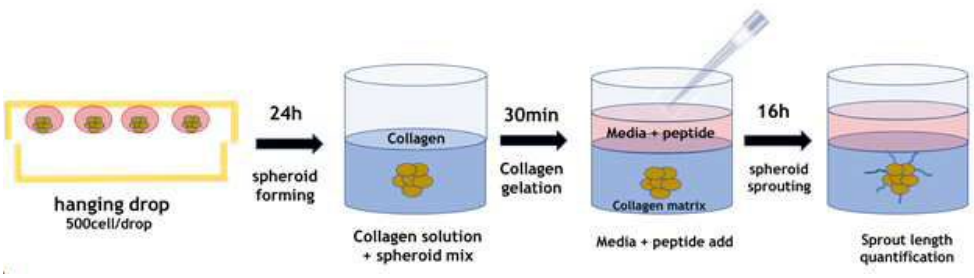
도면1



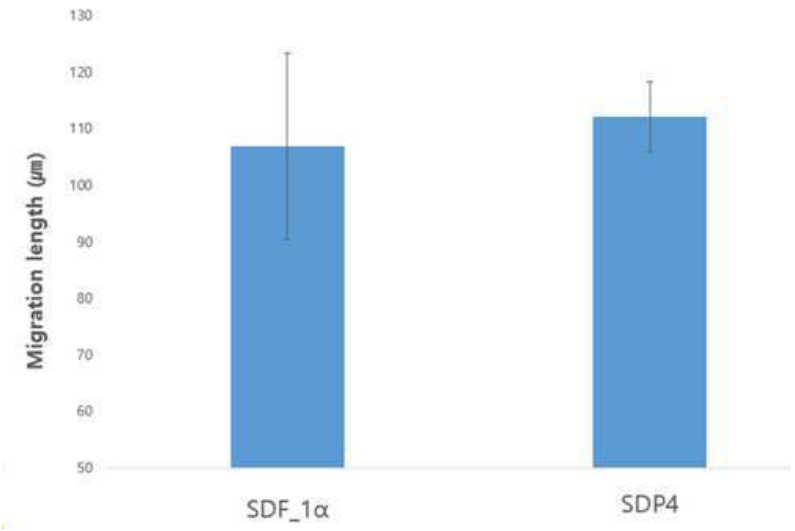
도면2



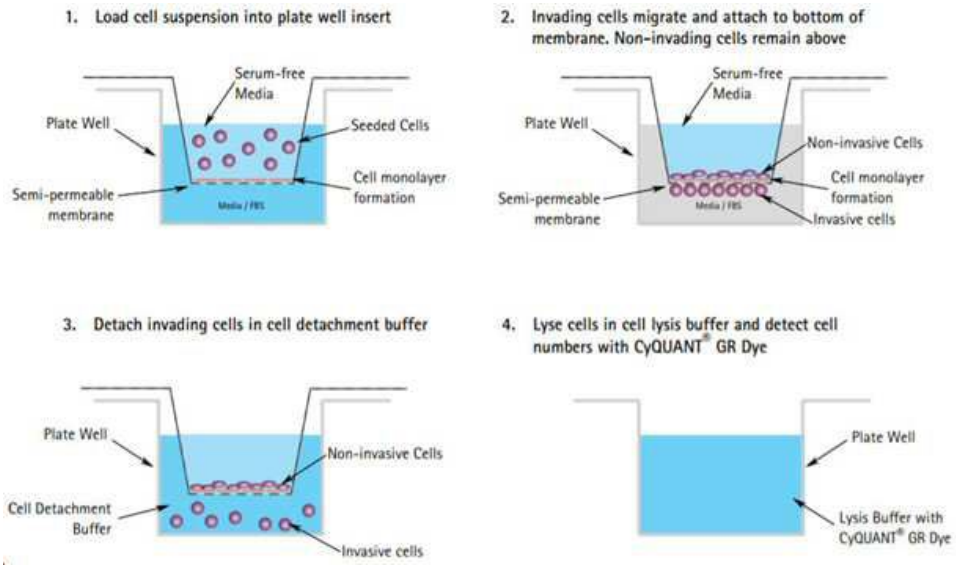
도면3



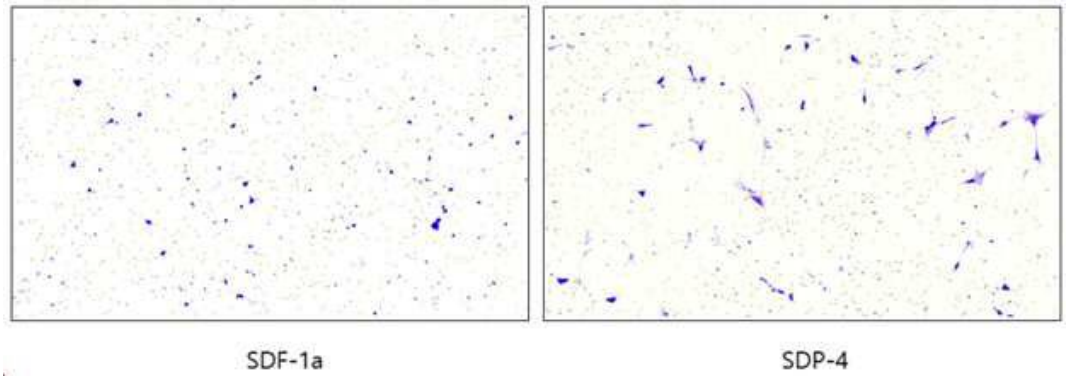
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Korea University Research and Business Foundation

AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> Novel SDP-4 Peptide Inducing Stem Cell Migration By Interacting With CXCR4

<130> PN200326

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Artificial peptide for inducing stem cell migration

<220><221> VARIANT

<222> (4)

<223> Xaa = Lys or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (6)

<223> Xaa = Gly or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (8)

<223> Xaa = Lys or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (14)

<223> Xaa = Lys or Arg

<220><221> VARIANT

<222> (16)

<223> Xaa = Gly or Pro

<220><221> VARIANT

<222> (18)

<223> Xaa = Lys or Arg

<400> 1

Leu Ser Tyr Xaa Cys Xaa Cys Xaa Phe Gly Gly Gly Phe Xaa Cys Xaa

1 5 10 15

Cys Xaa Tyr Ser Leu

20

<210> 2

<

211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SDP-4

<400> 2

Leu Ser Tyr Lys Cys Gly Cys Lys Phe Gly Gly Gly Phe Arg Cys Pro

1 5 10 15

Cys Arg Tyr Ser Leu

20

<210> 3

<211> 93

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SDF-1

<400> 3

Met Asn Ala Lys Val Val Val Val Leu Val Leu Val Leu Thr Ala Leu

1 5 10 15

Cys Leu Ser Asp Gly Lys Pro Val Ser Leu Ser Tyr Arg Cys Pro Cys

20 25 30

Arg Phe Phe Glu Ser His Val Ala Arg Ala Asn Val Lys His Leu Lys

35 40 45

Ile Leu Asn Thr Pro Asn Cys Ala Leu Gln Ile Val Ala Arg Leu Lys

50 55 60

Asn Asn Asn Arg Gln Val Cys Ile Asp Pro Lys Leu Lys Trp Ile Gln

65 70 75 80

Glu Tyr Leu Glu Lys Ala Leu Asn Lys Arg Phe Lys Met

85 90

<210> 4

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CXCR4 - homo sapiens

<220><221> DOMAIN

<222> (1)..(38)

<223> site 1 - Extracellular topological domain, important for chemokine binding

<400> 4

Met Glu Gly Ile Ser Ile Tyr Thr Ser Asp Asn Tyr Thr Glu Glu Met
1 5 10 15

Gly Ser Gly Asp Tyr Asp Ser Met Lys Glu Pro Cys Phe Arg Glu Glu
20 25 30

Asn Ala Asn Phe Asn Lys Ile Phe Leu Pro Thr Ile Tyr Ser Ile Ile
35 40 45

Phe Leu Thr Gly Ile Val Gly Asn Gly Leu Val Ile Leu Val Met Gly
50 55 60

Tyr Gln Lys Lys Leu Arg Ser Met Thr Asp Lys Tyr Arg Leu His Leu
65 70 75 80

Ser Val Ala Asp Leu Leu Phe Val Ile Thr Leu Pro Phe Trp Ala Val
85 90 95

Asp Ala Val Ala Asn Trp Tyr Phe Gly Asn Phe Leu Cys Lys Ala Val

100 105 110

His Val Ile Tyr Thr Val Asn Leu Tyr Ser Ser Val Leu Ile Leu Ala
115 120 125

Phe Ile Ser Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile Val His Ala Thr Asn Ser
130 135 140

Gln Arg Pro Arg Lys Leu Leu Ala Glu Lys Val Val Tyr Val Gly Val
145 150 155 160

Trp Ile Pro Ala Leu Leu Leu Thr Ile Pro Asp Phe Ile Phe Ala Asn
165 170 175

Val Ser Glu Ala Asp Asp Arg Tyr Ile Cys Asp Arg Phe Tyr Pro Asn

180 185 190

Asp Leu Trp Val Val Val Phe Gln Phe Gln His Ile Met Val Gly Leu
195 200 205

Ile Leu Pro Gly Ile Val Ile Leu Ser Cys Tyr Cys Ile Ile Ile Ser

210 215 220

Lys Leu Ser His Ser Lys Gly His Gln Lys Arg Lys Ala Leu Lys Thr

225 230 235 240

Thr Val Ile Leu Ile Leu Ala Phe Phe Ala Cys Trp Leu Pro Tyr Tyr

245 250 255

Ile Gly Ile Ser Ile Asp Ser Phe Ile Leu Leu Glu Ile Ile Lys Gln

260 265 270

Gly Cys Glu Phe Glu Asn Thr Val His Lys Trp Ile Ser Ile Thr Glu

275 280 285

Ala Leu Ala Phe Phe His Cys Cys Leu Asn Pro Ile Leu Tyr Ala Phe

290 295 300

Leu Gly Ala Lys Phe Lys Thr Ser Ala Gln His Ala Leu Thr Ser Val

305 310 315 320

Ser Arg Gly Ser Ser Leu Lys Ile Leu Ser Lys Gly Lys Arg Gly Gly

325 330 335

His Ser Ser Val Ser Thr Glu Ser Glu Ser Ser Ser Phe His Ser Ser

340 345 350