



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0129467  
(43) 공개일자 2018년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/08 (2006.01) A61K 31/167 (2006.01)  
A61K 47/02 (2006.01) A61K 47/42 (2017.01)  
A61K 9/06 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 7/08 (2013.01)  
A61K 31/167 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0065564

(22) 출원일자 2017년05월26일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

서울대학교산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

서강대학교산학협력단

서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

오석배

경기도 과천시 별양로 180, 812동 901호(부림동, 주공아파트)

조맹효

서울특별시 관악구 관악로 1(신림동, 서울대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 피씨알

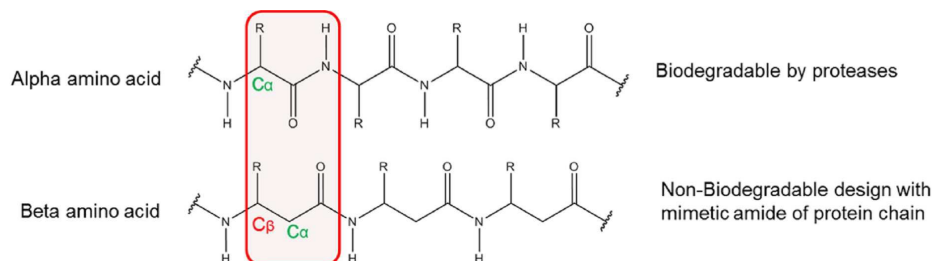
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 생분해성 조절 단백질 및 이를 이용한 하이드로젤

(57) 요약

본 발명은 생분해성 조절 단백질 및 이를 이용한 하이드로젤에 관한 것으로, 상기 하이드로젤은 α- 및 β-아미노산이 혼합된 생분해성 조절 단백질을 포함하고 있어 생체적합성이 우수하며, α- 및 β-아미노산의 함량 비율에 따라 생분해성을 조절하여 약물의 해리속도를 조절할 수 있으므로 효과적으로 약물을 전달할 수 있다.

대표도 - 도1



|                                                    | M.W.             | Alpha peptide ratio |
|----------------------------------------------------|------------------|---------------------|
| (1) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480             | 0 %                 |
| (2) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480 - 12 = 2468 | 5.6 %               |
| (3) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480 - 24 = 2456 | 11.1 %              |
| (4) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480 - 36 = 2444 | 16.7 %              |
| (5) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480 - 48 = 2432 | 22.2 %              |
| (6) Ac - KVK EVF FVK EVF FVK EVY - NH <sub>2</sub> | 2480 - 60 = 2420 | 27.8 %              |

● = Alpha amino acid

(52) CPC특허분류

**A61K 47/02** (2013.01)  
**A61K 47/42** (2013.01)  
**A61K 9/06** (2013.01)  
**C07K 2319/60** (2013.01)

(71) 출원인

**연세대학교 산학협력단**

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

**성균관대학교 산학협력단**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066 (천천동, 성균관대학교내)

**가천대학교 산학협력단**

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 (복정동)

(72) 발명자

**김용호**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066(천천동, 성균관대학교)

**김용호**

경기도 성남시 수정구 성남대로 1342(복정동, 가천대학교)

**송창식**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066(천천동, 성균관대학교)

**김문기**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066(천천동, 성균관대학교)

**김동철**

서울특별시 마포구 백범로 35(신수동, 서강대학교)

**한동석**

서울특별시 서대문구 연세로 50(신촌동, 연세대학교)

**엄길호**

경기도 수원시 장안구 서부로 2066(천천동, 성균관대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3D1A1952882

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 통증 센싱 및 제어를 위한 지능형 스마트 생체소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 서울대학교

연구기간 2016.12.29 ~ 2017.03.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기 일반식 I로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 생분해성 조절 단백질:

[일반식 I]

(Lys-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Tyr)<sub>n</sub>

상기 아미노산 서열에서 Lys, Val 및 Glu는 β-아미노산이고,

Tyr은 α-아미노산이며,

Phe는 α- 또는 β-아미노산이고,

상기 n은 1 이상 3 이하의 정수이다.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아미노산 서열은 N-말단에 형광물질을 추가로 포함하는 것인 단백질.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 형광물질은 시아닌 3 카르복시산(cyanine 3 carboxylic acid), 시아닌 5 카르복시산 및 시아닌 7 카르복시산으로 이루어진 군에서 선택되는 것인 단백질.

#### 청구항 4

제1항의 생분해성 조절 단백질을 포함하는 하이드로젤.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 하이드로젤은 전도성 나노물질을 추가로 포함하는 것인 하이드로젤.

#### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 전도성 나노물질은 탄소 나노튜브(carbon nanotube, CNT), 풀러렌(fullerene, C<sub>60</sub>), 전도성 고분자 나노와이어, 전도성 고분자 나노튜브, 전도성 고분자 나노입자, 메탈 나노와이어 및 메탈 나노입자로 이루어진 군에서 선택되는 것인 하이드로젤.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 탄소 나노튜브는 단일벽 탄소 나노튜브(single-walled carbon nanotube) 또는 다중벽 탄소 나노튜브(multi-walled carbon nanotube)인 것인 하이드로젤.

## 청구항 8

제4항의 하이드로젤 및 상기 하이드로젤에 담지된 약물을 포함하는 약물 전달체.

## 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 약물은 리도카인(lidocaine)인 것인 약물 전달체.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 생분해성 조절 단백질 및 이를 이용하여 제조한 하이드로젤에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 단백질 또는 펩티드 조작기술은 신약개발과 기초의학분야에서 각광받는 연구분야이며, 그 성장성과 시장 파급력이 큰 연구분야로 생체재료, 의공학분야, 국방산업과 같은 다양한 산업분야로 응용이 가능하다. 설계를 통하여 만들어진 단백질들은 크기, 안정성 또는 용해성에 있어서 기존의 단백질보다 장점을 가질 수 있고, 생체 내에 존재하지 않은 유용한 기능을 갖는 단백질을 개발할 수도 있다. 또한, 단백질 분해효소에 의해 분해되는 천연 아미노산으로 이루어진 단백질의 뼈대구조를 생체 내에서 효소에 의해 분해되지 않는 인공 아미노산으로 치환하여 단백질의 생체 내 안전성 및 구조의 안전성을 유지하려는 연구도 진행되고 있다.

[0004] 하이드로젤을 생체 재료로 이용하기 위해서는 수분 함량, 점탄성의 조절, 생체 조직, 혈액, 체액 등과 접촉시 생체 거부반응이나 독성반응 등을 나타내지 않는 생체 적합성, 주입가능성 등을 고려해야 하기 때문에 단백질 또는 펩티드를 이용한 하이드로젤 개발의 중요성이 부각되고 있다. 현재까지 엘라스틴, 콜라겐, 젤라틴, 구형 단백질 등의 천연 단백질-기반 하이드로젤, 콜라겐-기반 합성 하이드로젤, 엘라스틴 유사 폴리 펩티드, 실크-엘라스틴 유사 폴리 펩티드, 코일드-코일 모티프 기반 하이드로젤 등의 생합성 폴리펩티드-기반 하이드로젤,  $\beta$ -병풍구조를 형성하는 펩티드를 이용한 하이드로젤, 양친매성 펩티드, 멀티도메인 펩티드 등의 올리고 펩티드 하이드로젤, 폴리머와 결합한 하이브리드 하이드로젤 등이 생체 재료로서 하이드로젤 개발 연구에 활용되고 있다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0006] (비특허문헌 0001) 1. PNAS, Vol.106, no.35 (2009), 14751 ~ 14756

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 일 목적은 하기 일반식 I로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 생분해성 조절 단백질을 제공하는 것이다:

[0008] [일반식 I]

[0009] (Lys-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Tyr)<sub>n</sub>

[0010] 상기 아미노산 서열에서 Lys, Val 및 Glu는  $\beta$ -아미노산이고,

[0011] Tyr은  $\alpha$ -아미노산이며,

[0012] Phe는  $\alpha$ - 또는  $\beta$ -아미노산이고,

- [0013] 상기 n은 1 이상 3 이하의 정수이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적은 상기 생분해성 조절 단백질을 포함하는 하이드로젤을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 하이드로젤 및 하이드로젤에 담지된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명의 일 양상은 하기 일반식 I로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 생분해성 조절 단백질을 제공한다:
- [0018] [일반식 I]
- [0019] (Lys-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Tyr)<sub>n</sub>
- [0020] 상기 아미노산 서열에서 Lys, Val 및 Glu는 β-아미노산이고,
- [0021] Tyr은 α-아미노산이며,
- [0022] Phe는 α- 또는 β-아미노산이고,
- [0023] 상기 n은 1 이상 3 이하의 정수이다.
- [0025] 본 명세서의 용어, '생분해성 조절 단백질'은 α- 및 β-아미노산의 함량 비율에 따라 생분해성을 조절할 수 있는 단백질을 의미한다.
- [0026] 본 명세서의 용어, 'α-아미노산'은 카르복실기(carboxyl group; -COOH)와 아미노기(amino group; -NH<sub>2</sub>)가 같은 탄소에 결합되어 있는 아미노산을 말하며, 일반적인 생물의 단백질은 모두 α-아미노산으로 이루어져 있어 단백질 분해효소에 의하여 분해될 수 있다. 카르복실기와 아미노기의 상대적인 거리에 따라서 β-, γ-, δ-아미노산 등으로 분류한다.
- [0027] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 일반식 I의 아미노산 서열은 α- 및 β-아미노산으로 이루어져 있어 생체적 합성이 우수하면서 생체 내에서 비특이적 단백질 분해효소에 의하여 분해될 수 있다.
- [0028] 또한, 상기 일반식 I의 서열은 N-말단에 형광물질을 추가로 포함할 수 있으며, 형광물질은 시아닌 3 카르복시산(cyanine 3 carboxylic acid), 시아닌 5 카르복시산 및 시아닌 7 카르복시산으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으나 이에 제한되지 아니한다.
- [0029] 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 생분해성 조절 단백질은 (Lys-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Phe-Phe-Val-Lys-Glu-Val-Tyr)(서열번호 1)의 아미노산 서열이 n=1 내지 n=3 범위에서 반복되어 이루어진 것일 수 있다.
- [0030] 아울러, 본 발명의 일 실시예에 따르면 상기 생분해성 조절 단백질을 합성하는 방법은 일반식 I의 아미노산을 고체상 레진에 결합시키는 단계; 아미노산에 있는 Fmoc(flourenylmethyloxycarbonyl) 보호기를 제거하고, 다음 아미노산을 연결하여 펩티드를 합성하는 단계; 및 합성된 펩티드를 고체상 레진에서 분리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 양상은 상기 생분해성 조절 단백질을 포함하는 하이드로젤(hydrogel)을 제공한다.
- [0032] 상기 하이드로젤은 전도성 나노물질을 추가로 포함할 수 있으며, 전도성 나노물질은 탄소 나노튜브(carbon nanotube, CNT), 풀러렌(fullerene, C<sub>60</sub>), 전도성 고분자 나노와이어, 전도성 고분자 나노튜브, 전도성 고분자 나노입자, 메탈 나노와이어 및 메탈 나노입자로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 또한, 상기 탄소 나노튜브는 단일벽 탄소 나노튜브(single-walled carbon nanotube) 또는 다중벽 탄소 나노튜브(multi-walled carbon nanotube)일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 양상은 상기 하이드로젤 및 하이드로젤에 담지된 약물을 포함하는 약물 전달체를 제공한다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 약물 전달체는 약물을 포함하는 수용액을 하이드로젤에 담지하여 제조할

수 있으며, 상기 약물은 리도카인(lidocaine)일 수 있다.

### 발명의 효과

[0036] 본 발명의 하이드로젤은  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산이 혼합된 생분해성 조절 단백질을 포함하고 있어 생체적합성이 우수하며,  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산의 함량 비율에 따라 생분해성을 조절하여 약물의 해리속도를 조절할 수 있으므로 효과적으로 약물을 전달할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산 함량 비율에 따른 펩티드의 아미노산 서열 및 예상 분자량을 보여주는 도이다.

도 2A는 본 발명의 일 실시예에 따른  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드의 정제 결과를 보여주는 도이다.

도 2B는 본 발명의 일 실시예에 따른  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드의 MALDI-TOF 질량 분석 결과를 보여주는 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드를 고해상 투과전자현미경으로 확인한 결과를 보여주는 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 생분해성 조절 단백질을 포함하는 하이드로젤을 보여주는 도이다.

도 5는 단백질 분해효소 처리 유무에 따른  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드의 분해 여부를 확인한 결과를 보여주는 도이다.

도 6A는 스트레인 모드에서 하이드로젤의 농도에 따른 저장탄성( $G'$ )과 손실탄성( $G''$ )을 측정한 결과를 보여주는 도이다.

도 6B는 주파수 스윙 모드에서 하이드로젤의 농도에 따른 저장탄성( $G'$ )과 손실탄성( $G''$ )을 측정한 결과를 보여주는 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 하이드로젤의 처리 시간에 따른 생체의 생체적합성 세포 실험 결과를 보여주는 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 하이드로젤의 처리 시간에 따른 세포 독성 유무를 확인한 결과를 보여주는 도이다.

도 9는  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드-Cy3를 포함하는 하이드로젤을 마우스 생체 내에 삽입한 후 이광자 전자현미경으로 관찰한 도이다.

도 10은  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드-Cy3를 포함하는 하이드로젤을 마우스 생체 내에 삽입한 후 미세아교세포 및 성상교세포의 활성을 확인한 결과를 보여주는 도이다.

도 11은 생체 내 환경에서 시간에 따른 생분해성 조절 하이드로젤의 안정성을 보여주는 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1:  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산을 포함하는 혼합 펩티드 제조 및 분석

[0042] 1-1:  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산을 포함하는 혼합 펩티드(이하  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드) 서열 선정

[0043]  $\beta$ -아미노산(beta amino acid)만으로 구성되어 있는 Ac-KVK EVF FVK EVF FVK EVY-NH<sub>2</sub> 서열을 갖는 펩티드(대한민국 등록특허 제10-1551143호)에서 특정  $\beta$ -아미노산을  $\alpha$ -아미노산으로 치환하였다. 구체적으로, 단백질 하이드로젤이 형성될 때 구조를 유지하는 아미노산은 제외하고, 나머지 아미노산을 치환하였다. 따라서, 6개의 펩티드가 모여 하이드로젤을 형성할 때 중심을 형성하는 아미노산인 발린(Val, V), 수용액 상태에서 각각의  $\alpha$

나선 구조끼리의 결합을 지지하는 라이신(Lys, K) 및 글루탐산(Glu, E)를 제외한 나머지 아미노산인 페닐알라닌(Phe, F) 및 타이로신(Tyr, Y)을  $\alpha$ -아미노산으로 치환하여  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드 모델을 설계하였다.

[0044] 도 1에  $\alpha$ - 및  $\beta$ -아미노산 함량 비율에 따른 상기  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드 모델의 아미노산 서열 및 예상 분자량을 표시하였다.

## [0046] 1-2: $\alpha/\beta$ 혼합 펩티드 및 형광 $\alpha/\beta$ 혼합 펩티드 합성

[0047] 펩티드 합성은 microwave 합성기 (Discover SPS, 200-240V/50/60Hz, CEM, 미국)를 이용하였다. 고체상 펩티드 합성방법을 이용하여 HBTU(2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium hexafluorophosphate)로 활성화된 C-말단 아미노산을 비활성 고체상 H-rink amide 레진(PCAS 0.6mmol substitution)에 Fmoc(fluorenylmethyloxycarbonyl carbamate) 방법으로 연결하였다. 상기 실시예 1-1에서 설계한  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드 서열을 기초로  $\alpha$ -또는  $\beta$ -아미노산을 각각 적용하였다.

[0048] 먼저, 비활성 고체상 H-rink amide 레진을 N, N-다이메틸포름아마드(N,N-dimethylformamide, 이하 DMF)에서 30분 동안 팽창시킨 후, DMF 용액에 20% 농도로 혼합되어 있는 피페리딘(piperidine)을 이용하여 80℃에서 3분 동안 3번 디프로텍팅(deprotecting)시켰다. 이후 아미노산을 고체상 지지대와 커플링시킬 때 아미노산:HBTU:DIEA(N,N-Diisopropylethylamine):레진의 비율은 3:2.5:4:1이다. 아미노산, HBTU 및 DIEA를 잘 섞어준 후 레진에서의 반응은 70℃에서 2분 동안 총 3번 진행하였다.

[0049] 각각의 디프로텍션 및 커플링 단계 후에 DMF 및 염화메틸렌(dichloromethane, 이하 DCM)으로 번갈아 가며 3번씩 세척 과정을 거쳤다. C-말단부터 6개의 아미노산 잔기가 합성된 후에는 디프로텍션 및 커플링 반응 시간을 4분으로 증가시키고, 12개의 아미노산 잔기가 합성된 후에는 반응 시간은 8분으로 증가시키고, 디프로텍션은 4번 반응시켰다. 모든 아미노산 잔기가 합성된 후에는 N-말단에 있는 아미노산의 Fmoc 보호기를 전단계와 동일한 디프로텍션 반응으로 제거하였다. 이후 DMF 및 DCM으로 각각 번갈아 가며 3번씩 세척 과정을 거친 후, 마지막으로 에탄올을 사용하여 남아있을 수 있는 시료들을 제거한 후 진공 상태에서 6시간 동안 건조시켰다.

[0050] 고체상 레진 위에 합성된 펩티드는 클리비지 용액[Trifluoroacetic acid(이하 TFA): Triisopropylsilane(이하 TIS):증류수=95:2.5:2.5]과 2시간 동안 반응시켜 분리한 후 석면필터로 레진을 여과하였다. 질소 기체가 존재하는 상태에서 여과된 클리비지 용액을 증발시키고, 증발 후 남은 침전물에 차갑게 보관한 다이에틸 에테르(diethyl ether)를 넣어준 후 원심분리 하였다. 원심분리 이후 침전된 물질을 진공 상태에서 건조시켜 펩티드를 수득하고, 증류수 및 아세토나이트릴(acetonitrile, 이하 ACN)의 비율을 맞춘 용액에 펩티드를 용해시킨 후 동결 건조하였다.

[0051] 또한, 합성한 하이드로젤을 생체 내에 주입하는 경우 형광으로 위치를 확인할 수 있도록  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드에 시아닌 3 카르복시산(cyanine 3 carboxylic acid, 이하 Cy3)을 연결시켰다.

[0052] 상기  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드와 동일한 방법으로 펩티드를 합성한 후, 80% DMF 및 20% 피페리딘 용액을 이용하여 80℃에서 8분 동안 각각 5번씩 반응시켜 Fmoc 보호기를 제거하였다. 이후 Cy3:HBTU:DIEA:레진을 1.5:2.5:4:1 비율로 혼합하고, 73℃ 및 30W 반응 조건에서 11분 동안 반응시켰다. 다음으로 상온에서 자력 교반기를 이용하여 1시간 동안 교반시키고, 교반이 끝나면 DMF 및 DCM을 이용하여 번갈아 가며 3번씩 세척 과정을 진행하였다. 이후 상기와 동일한 방법을 이용하여 고체상 레진에서 펩티드를 분리한 후 진공 상태에서 건조시키고, 증류수 및 ACN 혼합용액에 용해시킨 후 동결 건조시켰다.

## [0054] 1-3. 합성한 $\alpha/\beta$ 혼합 펩티드 분석

[0055] 고체상 합성 방법으로 합성한 펩티드는 순도를 높이기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피를 이용한 정제가 필요하기 때문에 Waters prep 150 LC system 및 XBridge BEH300 Prep C4 5 um 컬럼을 이용하여 상기 실시예 1-2에서 합성한 펩티드를 정제하였다.

[0056] 도 2A는 정제한 펩티드를 Agilent ZORBAX 300SBC-C18 컬럼으로 분석한 결과를 보여주는 그래프로, 정제한 펩티드가 90% 이상의 고순도를 가지는 것을 알 수 있다.

[0057] 도 2B는 정제한 펩티드를 MALDI-TOF(Matrix Associated Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) 질량 분석한 결과를 보여주는 그래프로, 정제한 펩티드의 질량이 도 1에서 예상한 질량과 동일한 것을 알 수 있었다.

- [0058] 또한, 상기 합성한 펩티드를 고해상 투과전자현미경(high resolution transmission electron microscope, HRTEM; HEM-2100F)으로 분석하였다. 먼저, 우라닐 아세테이트(uranyl acetate) 100 mg을 가열된 증류수 5 ml에 용해시키고(20 mg/ml), 교반기를 이용하여 10분 동안 혼합시킨 후 0.22  $\mu\text{m}$  시린지 필터로 여과하였다. 이후 마이크로 튜브에 우라닐 아세테이트 용액 500  $\mu\text{l}$  및 NaOH 용액(200 mM) 12.5  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 혼합 용액을 준비하였다. Formvar/carbon TEM grid 위에 상기 실시예 1-2에서 합성한 펩티드 용액을 올린 후 필터 종이를 이용하여 과량의 용액을 흡수시키고, 펩티드 용액이 마르기 전에 미리 준비한 우라닐 아세테이트 및 NaOH 혼합 용액을 떨어뜨려 염색하였다.
- [0059] 도 3은 합성한 펩티드를 고해상 TEM으로 분석한 결과를 보여주는 사진으로,  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드가 섬유화의 양상을 보이는 것을 확인할 수 있다.
- [0061] **실시예 2: 생분해성이 조절되고, 생체적합성을 가지는 하이드로젤 제조 및 특성 분석**
- [0062] **2-1. 하이드로젤 제조**
- [0063] 5 mg/ml의 농도로 리도카인(lidocaine) 수용액을 제조하고, 리도카인 수용액에 상기 실시예 1-2에서 합성한 각각의  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드 분말을 50 mg/ml 농도로 용해시켰다. 리도카인-펩티드 혼합 용액을 실온에 24시간 동안 보관하여 리도카인을 담지한 각각의 하이드로젤을 제조하였다.
- [0064] 도 4는 본 실시예에서 제작한 생분해성 조절 단백질을 포함하는 하이드로젤을 보여주는 사진이다.
- [0066] **2-2. 제조한 하이드로젤의 생분해성 확인**
- [0067] 상기 실시예 2-1에서 제조한 하이드로젤의 생분해성 여부를 확인하기 위하여 단백질의 펩티드 결합을 비특이적으로 분해하는 트립신(trypsin), 키모트립신(chymotrypsin) 및 서브틸리신(subtilisin)을 이용하여 분해 여부를 확인하였다.
- [0068] 200  $\mu\text{M}$  농도의 TBS(Tris-buffered saline) 완충용액(pH 7.5)을 제조한 후  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드 분말을 용해시켜 펩티드 저장용액(stock solution; 100  $\mu\text{M}$ )을 제조하였다. 펩티드 저장용액 40  $\mu\text{l}$  및 각각의 단백질 분해효소 용액 10  $\mu\text{l}$ 를 마이크로 튜브에서 혼합한 다음 실온에서 각각 1일, 7일 및 30일 동안 반응시킨 후 분해 여부를 관찰하였다. 효소 반응은 1% TFA(trifluoroacetic acid) 용액 100  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 중단시키고, 단백질 분해효소를 처리하지 않은 펩티드 저장용액 40  $\mu\text{l}$ 에 1% TFA를 처리하여 펩티드 표준샘플(대조군)로 이용하였다.
- [0069] 반응이 종료한 후, 고성능 액체 크로마토그래피인 Agilent 분석용 C3 컬럼을 이용하여 펩티드가 분해된 정도를 확인하였다.
- [0070] 도 5A 및 5B는 단백질 분해효소 처리 유무에 따른  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드의 분해 정도를 보여주는 그래프로, 펩티드 서열에서  $\alpha$ -아미노산의 비율이 증가함에 따라 펩티드 표준샘플과 비교하여 펩티드의 분해가 더 빠르게 진행되는 것을 알 수 있다.
- [0072] **2-3. 제조한 하이드로젤의 물리적 특성 분석**
- [0073] 동적 레오미터(MCR 302, Anton Paar)의 25 mm 평행 플레이트를 사용하여 25 및 0.2 mm 갭(gap)의 측정 조건에서 상기 실시예 2-1에서 제조한 하이드로젤(각각 20, 30 및 50 mg/ml 농도)의 점탄성(viscoelasticity)을 측정하였다.
- [0074] 먼저, 각 하이드로젤의 선형 점탄성(linear viscoelasticity) 영역을 확인하기 위해 스트레인(strain)은 0부터 10%까지, 각주파수(angular frequency)는 1 rad/s의 진폭에서 관찰하였다.
- [0075] 도 6A는 스트레인 모드에서 생분해성이 조절되는 하이드로젤의 농도에 따른 저장탄성( $G'$ )과 손실탄성( $G''$ )을 측정한 결과를 보여주는 그래프로, 50 mg/ml 농도의 하이드로젤은 시료의 탄성을 나타내는 저장 탄성(storage modulus,  $G'$ )과 점성 부분의 특성을 나타내는 손실 탄성(loss modulus,  $G''$ )의 차이가 30 mg/ml 농도 하이드로젤의  $G'-G''$ 의 차이보다 큰 것을 확인하여 높은 농도의 하이드로젤이 더 우수한 고체적 성질을 띠는 것을 알 수 있다. 또한, 50 mg/ml 농도의 하이드로젤은 선형 한계(elastic limit) 값이 1%이고, 30 mg/ml 농도의 단백질젤은

더 큰 선형 한계 값을 가지는 것을 확인하였다.

[0076] 또한, 각 하이드로젤의 주파수 스위프(frequency sweep)를 1% 스트레인에서 주파수를 0부터 10 rad/s까지 변화시키면서 측정하였다.

[0077] 도 6B는 주파수 스위프 모드에서 생분해성이 조절되는 하이드로젤의 농도에 따른 저장탄성( $G'$ )과 손실탄성( $G''$ )을 측정한 결과를 보여주는 그래프로 저주파 범위에서는 50 및 30 mg/ml 단백질젤 모두  $G' > G''$ 인 것을 확인하여 안정적인 고체 구조를 가지는 것을 알 수 있다.

[0079] **실시예 3: 생분해성이 조절되고, 생체적합성을 가지는 하이드로젤의 약물 방출 여부 확인**

[0080] **3-1. 하이드로젤의 생체 외 세포 독성 분석**

[0081] 상기 실시예 2-1에서 제조한 하이드로젤의 생체 외(*in vitro*) 세포 독성 분석을 위하여 Cell counting kit-8(CCK-8, Sigma-Aldrich, 미국)를 이용하였다.

[0082] 먼저, 10 ml/mg 농도의 하이드로젤을 제조하여 96-웰 플레이트에 코팅하고, 신경아세포종 세포주(Neuroblastoma cells)인 SY-SH5Y를 각 웰당  $2.0 \times 10^4$  농도로 분주하였다. 대조군은 하이드로젤 대신 라미닌(laminin)을 코팅하였다. 오차를 최소화하기 위해 각 샘플은  $n=5$ 로 실험하였고, 37°C에서 각각 5, 24 및 48시간 동안 배양한 후 제조사의 프로토콜에 따라 흡광도를 측정하였다.

[0083] 도 7은 생분해성이 조절되는 하이드로젤의 처리 시간에 따른 생체의 생체적합성 세포 실험 결과를 보여주는 사진으로, 라미닌을 코팅한 경우와 비교하여 하이드로젤을 코팅한 플레이트에서 세포 생장이 우수한 것을 확인할 수 있다.

[0084] 도 8은 생분해성이 조절되는 하이드로젤의 처리 시간에 따른 세포 독성 유무를 Cell counting kit-8(CCK-8)을 이용하여 확인한 결과를 보여주는 그래프이다.

[0086] **3-2. 생체 내 세포 독성 분석**

[0087] 0.02% 생분해성 조절 하이드로젤과 4 uM 생분해성 조절 하이드로젤-Cy3를 포함하는 50 mg/ml 농도의 하이드로젤을 의료용 폴리테일렌 튜브(내부 지름 0.2 mm)에 주입하였다. 상기 폴리테일렌 튜브를 인공 두개골 뼈가 삽입된 마우스 모델(대한민국 등록특허 제10-1597131호)의 대뇌 피질에 삽입하고, 이광자 전자현미경(two-photon microscopy; SPX-8, Leica Microsystems)을 이용하여 미세아교세포(Microglia, 마이크로글리아) 및 성상교세포(Astrocyte, 아스트로사이트)의 활성을 20일 동안 관찰하였다.

[0088] 도 9는  $\alpha/\beta$  혼합 펩티드-Cy3를 포함하는 생분해성 조절 하이드로젤을 마우스 생체 내에 삽입한 후 이광자 전자현미경으로 관찰한 결과를 보여주는 사진이다.

[0089] 도 10은 관찰 결과를 보여주는 사진으로, 하이드로젤이 드러난 부분의 미세아교세포 및 성상교세포의 활성이 폴리테일렌 튜브 주변에 있는 세포의 활성과 유사한 것을 확인하여 생분해성 조절 하이드로젤이 생체 내 환경에서 독성이 없는 것을 알 수 있다. 도 10에서 Iba1(ionized calcium-binding adapter molecule 1)은 미세아교세포를 염색한 것이고, GFAP(glial fibrillary acidic protein)은 성상교세포를 염색한 것이다.

[0091] **3-3. 생분해성 및 생체적합성 하이드로젤의 약물 해리능력 측정 및 분석**

[0092] 상기 실시예 2-1에서 제조한 리도카인 약물을 담지한 하이드로젤을 마이크로 튜브에 담은 후, 100 uM 농도의 TBS 완충용액(pH 7.5)에 용해시킨 트립신, 키모트립신 및 서브틸리신 각각을 마이크로 튜브에 첨가하였다. 실온에 각각 10분, 30분, 60분, 1일, 7일 및 30일 동안 방치하고, 반응이 종료하면 하이드로젤을 제외한 상층액만 취하여 UV 분광광도계(Agilent, 8453)를 이용하여 리도카인의 흡광 영역인 263 nm에서 흡광도를 측정하였다.

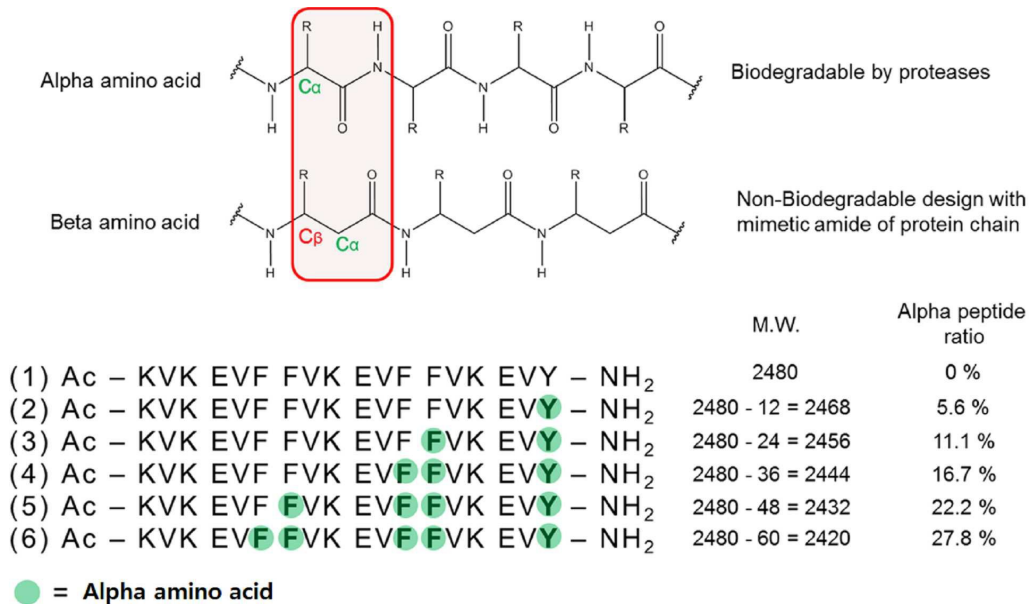
[0093] 도 11은 생체 내 환경에서 시간에 따른 생분해성 조절 하이드로젤의 안전성을 보여주는 사진이다.

[0095] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통

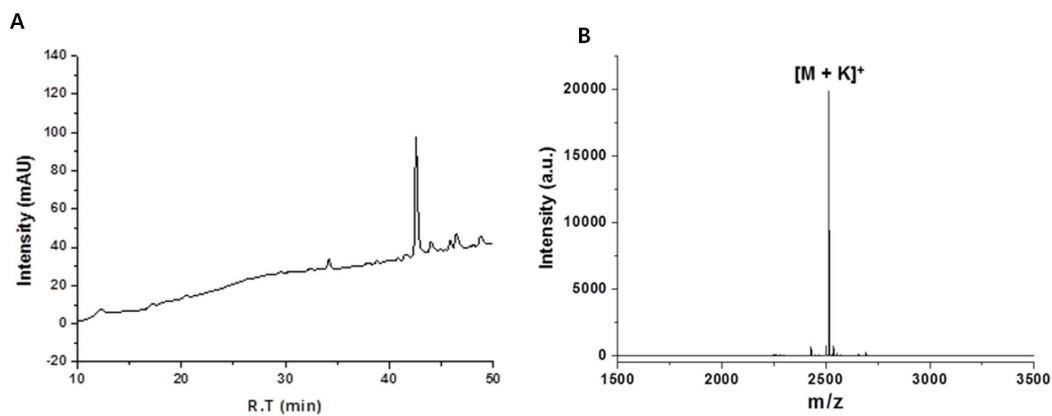
상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

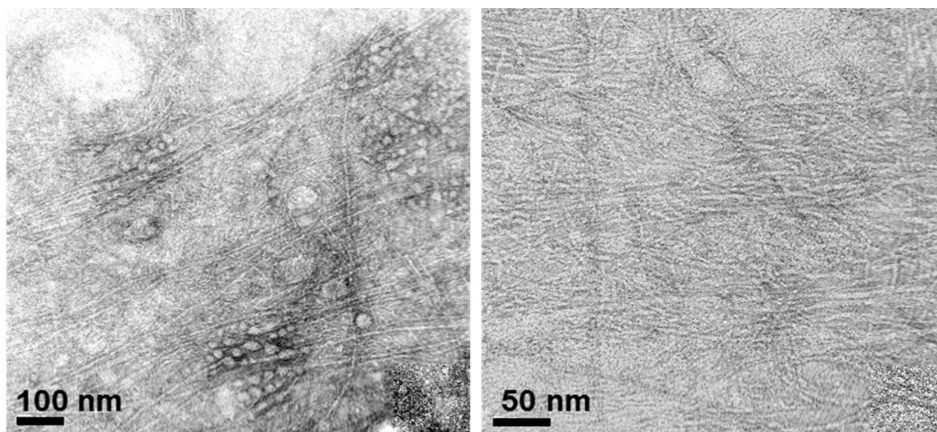
### 도면1



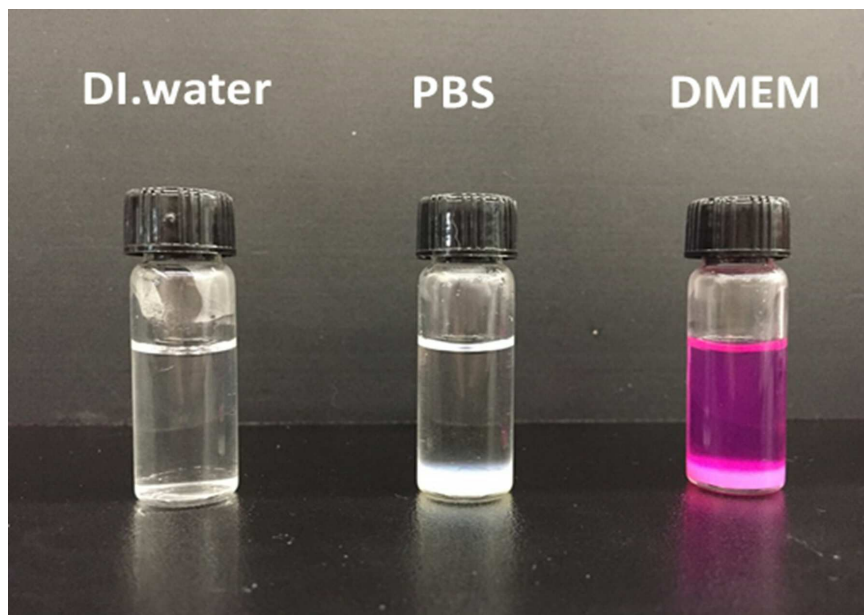
### 도면2



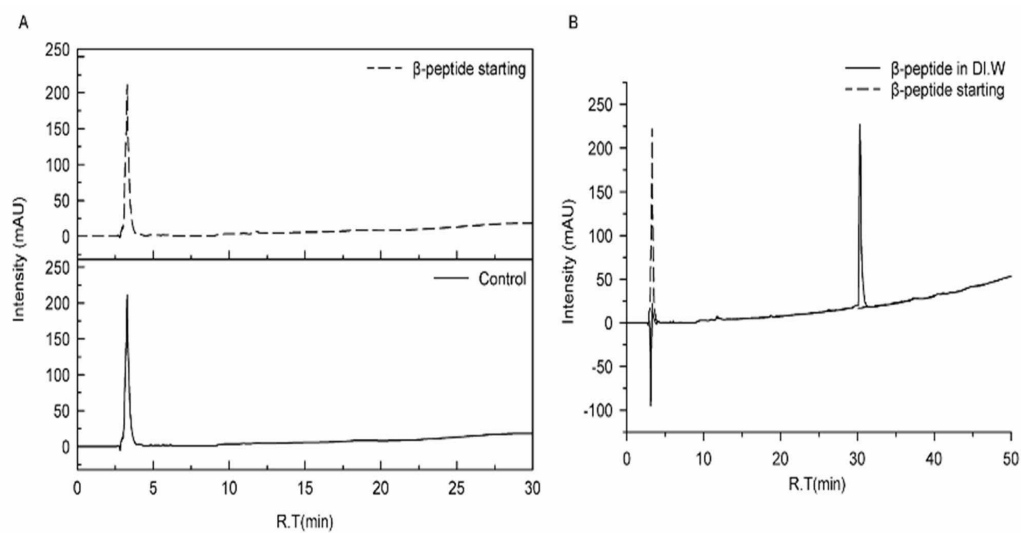
도면3



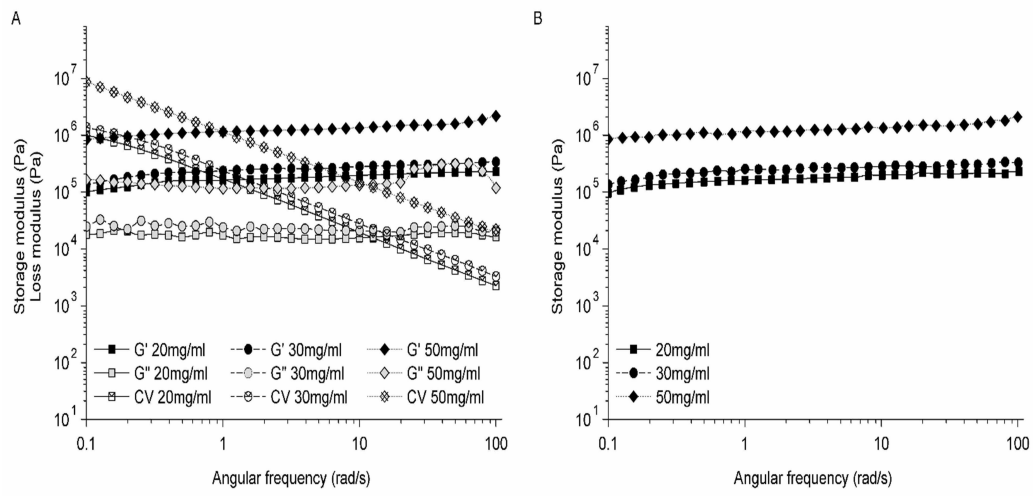
도면4



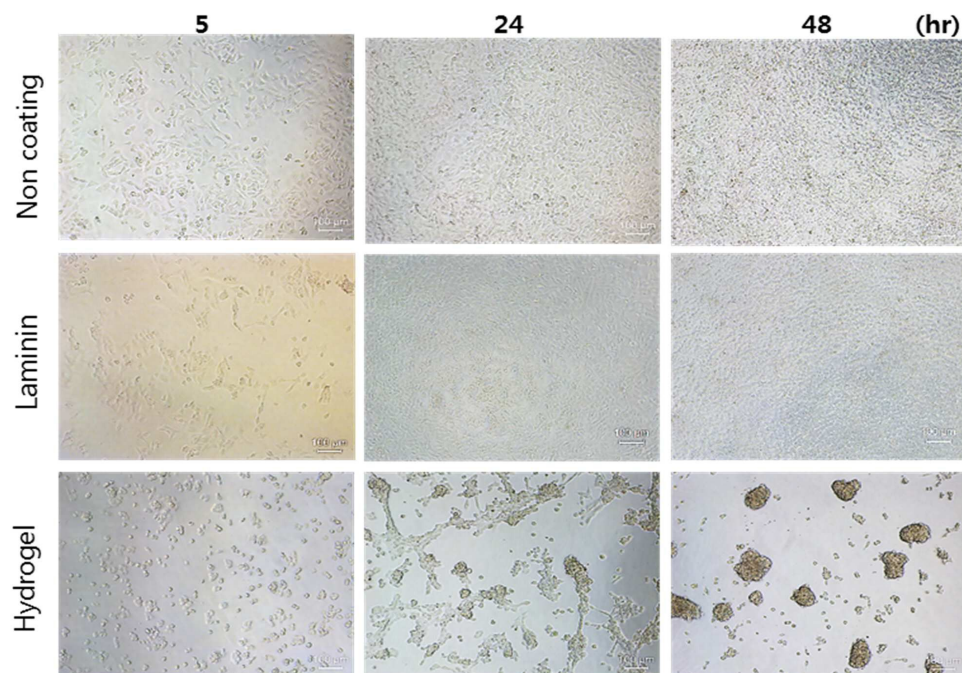
도면5



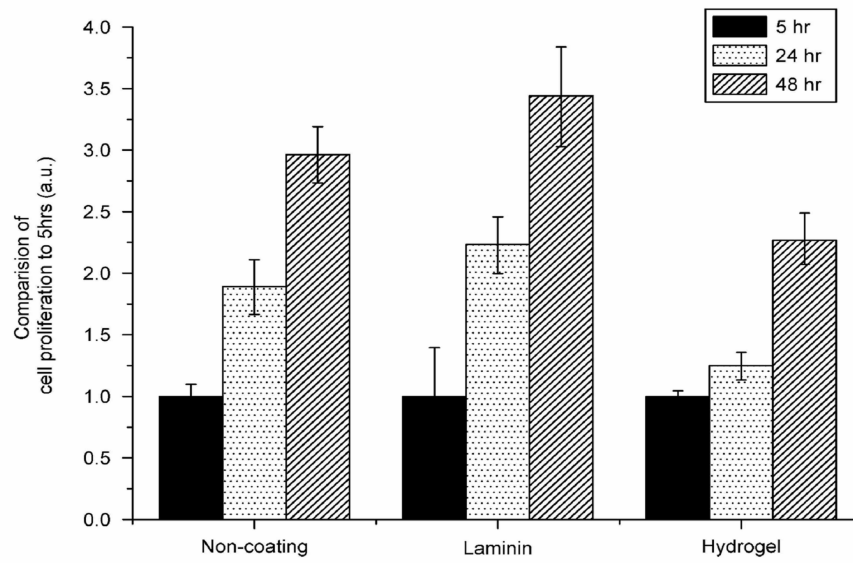
도면6



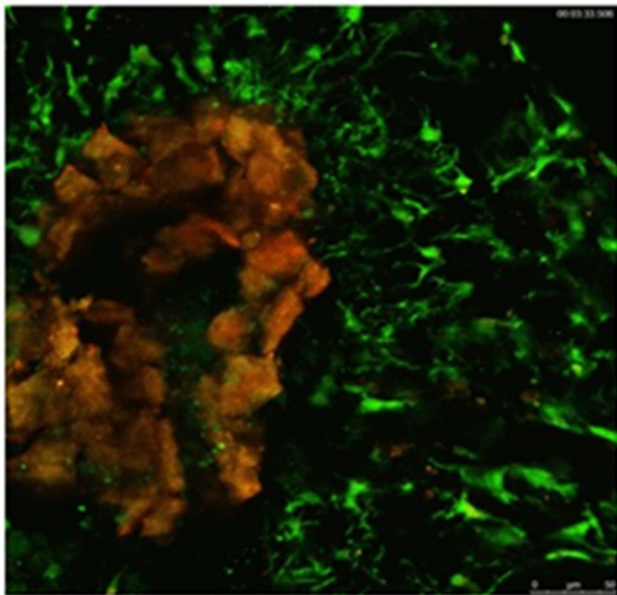
도면7



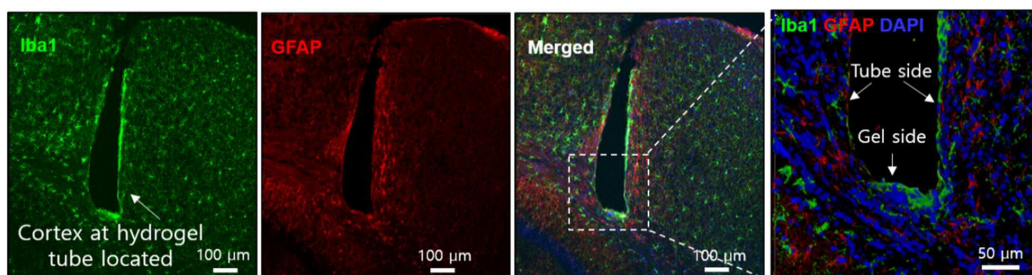
도면8



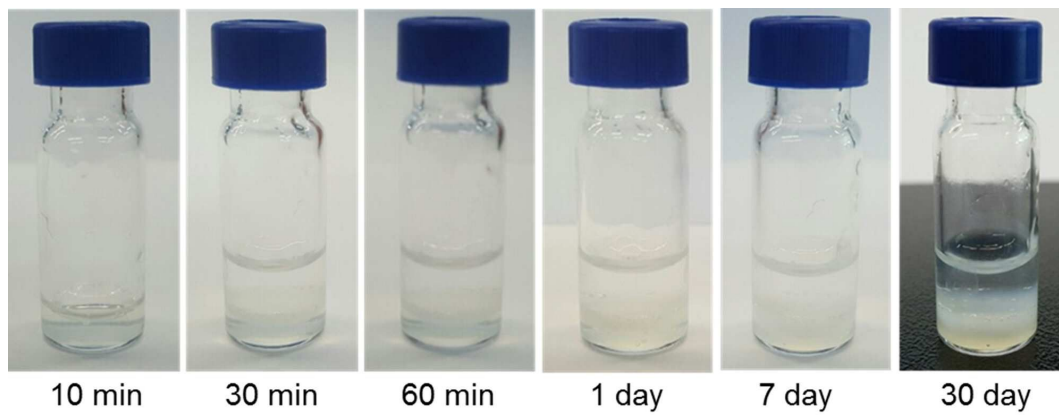
도면9



도면10



## 도면11



## 서열 목록

- <110> SKKU RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION  
SNU R&DB FOUNDATION  
GACHON UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION  
OFFICE OF RESEARCH AFFAIRS UIF, YONSEI UNIVERSITY  
SOGANG UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Protein with Adaptable Biodegradability and Uses Thereof
- <130> PN170107
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> synthetic polypeptides
- <400> 1

Lys Val Lys Glu Val Phe Phe Val Lys Glu Val Phe Phe Val Lys Glu

1 5 10 15

Val Tyr