(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0088402
(43) 공개일자 2014년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0000236
(22) 출원일자 2013년01월02일
심사청구일자 2013년01월02일
기술이전 희망 : **기술양도**, **실시권허여**, **기술지도**

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
정원교
광주광역시 서구 풍암1로 53, 104동 302호(풍암동, 현대삼환아파트)
천충길
전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220 (조선대학교 해양생물연구교육센터)
(74) 대리인
위병갑

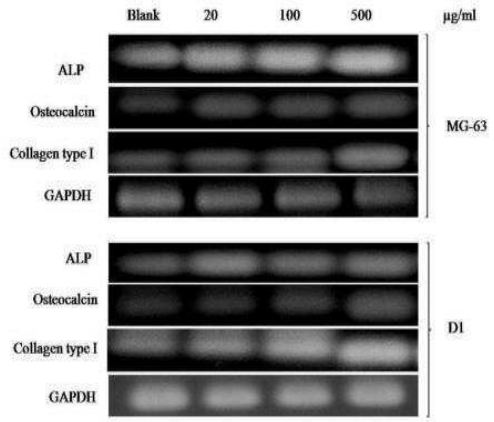
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **해양 미세조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 조골세포의 분화를 촉진시키는 작용을 함으로써 골다공증과 같은 골질환의 예방 또는 치료에 효과를 갖는다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-0003111
부처명	교육과학기술부
연구사업명	교육과학기술부 일반연구자지원사업
연구과제명	해양생물 유래 조골세포 분화 및 미네랄 형성 촉진 선도물질 탐색과 그 작용기전 연구
기 여 율	1/2
주관기관	조선대학교
연구기간	2010.05.01 ~ 2013.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	312019-5
부처명	농림수산식품부
연구사업명	수산실용화기술개발사업
연구과제명	해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발
기 여 율	1/2
주관기관	조선대학교
연구기간	2012.08.24 ~ 2017.08.23

특허청구의 범위

청구항 1

MPDW의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 해양 미세조류로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 미세조류는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 해양 미세조류인 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소 가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 펩티드는 alcalse, flavourzyme, neutrase, PTN 또는 protamex 효소를 사용하여 기질인 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물과 효소 대 기질을 1:100 (w/w)의 비율로 혼합하고, 8시간 동안 37℃에서 반응시켜 수득한 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 골질환은 골다공증인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 펩티드는 조골세포의 분화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

MPDW의 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강 기능 식품.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분으로 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증은 낮은 골밀도와 뼈조직의 미세 구조상의 악화를 특징으로 하는 전신 골격 질환이며, 결과적으로 골취약성 및 골절 민감도의 증가로 이어진다. 세계보건기구(WHO) 정의에 따르면, 골다공증은 폐경 후 여성의 30%에 영향을 주며, 80세 이상의 여성 70%에 영향을 준다(Fazzalari, 2008). 또한, 다양한 질환의 치료에 정기적으로 사용되는 일부 약물들은, 골격에 해로운 영향을 미치거나 골다공증 질환을 유발한다(Gherardo et al., 2010). 골흡수가 골형성보다 더 큰 골다공증은 자연 외상성 골절의 발생 위험을 증가시키는 중요한 공중 보건 문제가 되고 있다. 이 질환은 파골세포 및/또는 조골세포의 활동을 통해서 치료될 수 있다(Khajuria et al., 2011). 따라서, 골형성(조골세포) 촉진 및/또는 골흡수(파골세포) 억제를 통해 작용하는 약물들은 바람직한 치료 방법이 될 수 있을 것이다.

[0003] 조골세포 분화의 과정은 뼈 강화와 재형성에 필요하며, 증식 단계, 세포외 기질 합성 및 성숙 단계, 무기질 침착 단계 등 연속적인 3단계로 세분할 수 있다(Zamurovic et al., 2004). 조골세포가 분화하는 동안, 무기질 침착에 수반되는 알칼리성 인산가수분해효소(ALP), 1형 콜라겐, 오스테오칼신과 같은 표현형 표지자들이 높게 발현되며, 조골세포 분화는 BMP-Smads(Noth et al., 2003; Cao and Chen, 2005; Wan and Cao, 2005), 미토겐활성화단백질키나아제(MAPKs)(Gallea et al., 2001; Xiao et al., 2002; Zhang and Liu, 2002; Hu et al., 2003; Ge et al., 2007), 및 핵인자-카파B(NF-κB)와 같은 다양한 신호전달경로에 의해 조절된다(Novack, 2011). MAPKs 패밀리는 증식, 분화, 발생, 전환, 및 세포자멸사와 같은 복잡한 세포 프로그램에서 중요한 역할을 한다(Zhang et al., 2002). MAPK 신호계는 또한 조골세포 분화에서 매우 중요한 역할을 한다. 골형성세포의 골분화 과정 동안 MAPK 신호계 연쇄반응은 다양한 골표지자의 발현과 함께 활성화된다(Xiao et al., 2002). Smads는 조골세포 분화에서 중요한 역할을 한다. 뼈형성단백질(BMP)-특이 R-Smads인 Smad1, 5 및 8은 활성화된 BMPRs(BMP 수용체)와 함께 일시적으로 직접 상호작용하고 인산화된다. 그 다음에 Smad1/5/8은 Smad4(Co-Smad)와 함께 이가 동의복합체(heteromeric complexes)를 형성하고 핵으로 들어가서 다양한 표적 유전자들의 전사를 조절한다. Smad 경로는 잘 특성화된 BMP 신호전달경로이다. 그러나, BMPs는 또한 비-Smad interacellular 신호전달경로를 개시한다. 몇몇 증거들은 BMPs가 신호전달 분자의 MAPK 패밀리, 예를 들어서, ERK1/2, p38, 및 SAPK/JNK(SAP인산화효소/Jun N-terminal 인산화효소)를 활성화한다는 것을 제시한다(Wan and Cao, 2005).

[0004] 해양 미세조류, 또는 식물성 플랑크톤은 대부분 해양 생물을 대표하며, 가장 잘 알려진 것은 규조류(규조문 Bacillariophyta), 쌍편모조류(와편모조식물문 Dinophyta), 녹조류(녹조식물문 Chlorophyta) 및 남조류(남조식물문 Cyanophyta)이다. 단세포 해양 미세조류는 카로티노이드, 지질, 다당류가 풍부한 공급원으로 알려져 왔고, 식품보충제 및 바이오연료 생산 분야에서 널리 연구되었다(Liau et al, 2010). 온대기후에서 육상식물은 1% 이하로만 광변환 효율을 가지는 반면, 미세조류는 태양에너지를 화학에너지로 5%까지 변환할 수 있다(Rosch et al, 2012). 미세조류는 효율적으로 태양에너지를 지질, 단백질, 탄수화물, 색소 및 비타민 등의 대사 물질로 변환한다. 뿐만 아니라, 미세조류는 메탄, 바이오수소, 바이오디젤과 같은 다양한 유형의 재생가능한 에너지원을 공급할 수 있다(Borges et al, 2011). 따라서, 미세조류는 식품, 사료, 천연 합성물, 또는 수경재배 분야와 바이오연료 분야에 적용될 수 있다. 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 주로 해양 환경뿐만 아니라 깨끗한 기수로부터 알려진 미세조류이다.

[0005] 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 아스타크산틴, 제아잔틴, 칸타잔틴과 같은 다양한 색소를 고동도로 만들 수 있고, 생장이 쉽고, 주로 불포화지방산 및 상당한 비율의 팔미트산으로 된 높은 오일 함유량(건조 중량의 28.7%)으로 인하여 조류 바이오연료 생산에 적합한 것으로 알려져 왔다. 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 또한 양질의 바이오디젤을 위한 불포화지방산, 리놀렌산, 다가불포화지방산을 충분하게 함유하고 있다. 뿐만 아니라, 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 탄수화물뿐만 아니라 높은 비율의 단백질을 포함하고 있다(Banerjee et al., 2011). 따라서, 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 사용은 인간의 식사와 바이오매스에서 인정받고 있고, 고혈압 쥐에서 혈압을 감소시키는 유익한 효과가 식용 실험에서 나타났다(Rebolloso-Fuentes et al., 2001).

[0006] 다양한 질병의 치료 또는 예방에서의 치료 가능성으로 인해 해양 생활성 펩타이드가 기능성식품, 약효식품 또는 의약품으로 사용될 수 있다는 많은 연구들이 보고 되고 있다(Byun and Kim, 2001; Kim et al., 2001a,b; Rajapakse et al., 2005). 해양 미세조류에서 유래한 펩타이드는 항산화, 항고혈압, 항암에 잠재적인 작용을 한다(Kim, and Kang, 2011). 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는, 단백질분해효소 가수분해에 의해 펩타이드, 아미노산, 또는 단백질분획으로 분해되는 수많은 단백질을 가지고 있다.

[0007] 그러나, 현재까지 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)로부터 분리된 펩티드 성분이 골질환에 효

과를 나타낸다는 연구결과는 전무한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) 1. ENA-A(ENA actimineral resource A) 이온수가 MC3T3-E1 조골세포의 활성과 분화에 미치는 영향, 이지원 외, 생명과학회지 2006.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 미세조류 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이도디젤 부산물로부터 효소적 가수분해에 의하여 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 MPDW로 표시되는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)로부터 유래된 것이다.

[0012] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 것이다.

[0013] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물로부터 분리된 것이다.

[0014] 상기 골질환은 골다공증인 것이 바람직하다.

[0015] 상기 펩티드는 조골세포의 분화를 유도하는 방식으로 작용한다.

[0016] 또한, 본 발명은 MPDW로 표시되는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 조골세포의 분화를 촉진시키는 작용을 함으로써 골다공증과 같은 골질환의 예방 또는 치료에 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명의 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*) 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물의 MG-63 및 D1 세포에서의 세포 생존 및 ALP 활성을 측정한 결과를 나타낸다.

도 2a 내지 도 2f는 ALP 활성 펩티드의 정제 프로파일을 보여주는 결과이다.

도 3a 및 도 3b는 본 발명의 펩티드의 MG-63 및 D1 세포에서의 무기질화의 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 펩티드의 MG-63 및 D1 세포의 조골세포 분화에서 특이적으로 발현되는 몇 종류의 마커의 mRNA 발현 양상을 보여주는 결과이다.

도 5a 내지 도 5c는 본 발명의 펩티드의 MG-63 및 D1 세포의 MAPK 및 Smad 경로를 확인하기 위한 웨스턴 블랏 분석 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0020] 본 발명의 발명자들은 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물에서 유래한 펩티드가 조골세포 분화를 유도할 수 있는지 연구하고자, 상기 펩티드를 정제한 후, 모세포

(MG-63) 및 중간엽 줄기세포 (D1)에서 조골세포 분화에 미치는 펩티드의 효과를 연구하였다. 그 결과, MAPKs와 Smads의 활성화를 확인하였으며, 이러한 신호전달경로의 활성화는 조골세포 분화를 조절할 수 있고, 골 항상성과 골질환의 관리에 기여할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0021] 따라서, 본 발명은 MPDW의 아미노산 서열로 이루어진 표시되는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)로부터 유래된 것이다.

[0023] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 것이다.

[0024] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물로부터 분리된 것이다.

[0025] 상기 골질환은 골다공증인 것이 바람직하다.

[0026] 상기 펩티드는 조골세포의 분화를 유도하는 방식으로 작용한다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0028] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리쓰리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

[0029] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.

[0030] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0031] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 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, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0033] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 MPDW로 표시되는 펩티드의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 ㎏ 당 1 내지 5,000 ㎎, 바람직하게는 100 내지 3,000 ㎎을 매일 또는 격일 투여하거나 1 일 1 내지 3 회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하

는 것은 아니다.

[0034] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0035] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.

[0036] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.

[0037] 또한, 본 발명은 MPDW로 표시되는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 골질환 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

[0038] 본 발명의 건강 기능 식품은 골질환의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 MPDW 아미노산 서열로 이루어진 펩티드를 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 MPDW 아미노산 서열로 이루어진 펩티드는 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.

[0040] 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0041] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.

[0042] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시르히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르탐 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 눈개승마 추출물 100중량부 당 0.01 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0043] 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 하나의 구체예일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예의 범위로 한정되는 것은 아니다.

[0044] **<실시예>**

[0045] **1. 재료 및 방법**

[0046] **1-1. 재료**

[0047] 인간의 골육종 (MG-63)은 미국의 미국균주보존협회 (American Tissue Culture Collection, ATCC)로부터 구입하였다. 쥐류의 중간엽 줄기세포 (D1)는 ATCC에서 구입하였다 (Manassas, VA). 둘베코변형이글배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM)와 소태아혈청 (fetal bovine serum, FBS)은 Gibco-BRL, Life Technologies에서 구입하였다 (Grand Island, NY, USA). 가수분해물 효소 등 정제에 필요한 모든 화학물질은 미국의 Sigma Chemical Co.와 덴마크의 Novo Co.에서 구입하였다. 알리자린 레드-에스 (Alizarin red-S), p-NPP, 세틸피리디

늄 클로라이드 모노하이드레이트, 덱사메타손, MTT는 Sigma에서 구입하였다 (St. Louis, MO, USA). RT-PCR 시약은 Promega에서 구입하였다 (Madison, WI, USA). 웨스턴 블롯 분석에 사용된 1차 및 2차 항체는 각각 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)와 Amersham Pharmacia Biosciences (Piscataway, NJ, USA)에서 구입하였다. 사용한 다른 화학물질 및 시약은 분석용 품위이다.

[0048] **1-2. 효소가수분해물의 준비**

[0049] 조골세포 분화를 유도하는 펩타이드를 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물을 alcalse, flavourzyme, neutrase, PTN, 및 protamex (Novo Co., Denmark) 효소를 사용하여 이들 효소에 의한 가수분해를 수행하였다. 여기서 상기 바이오디젤 부산물은 해양 미세조류로부터 추출한 것을 사용하였는데, 즉 해양 미세조류인 Nannochloropsis oculata에 CHCl3:MeOH (2:1(v:v))을 첨가하여 지질을 추출한 후 3000 g 으로 30분간 원심 분리한 다음, 침전된 찌꺼기를 세척, 투석 및 동결건조하여 바이오디젤 부산물을 수득하였다. 상기 가수분해는 먼저 효소/기질 비율 1/100 (w/w)에서 1%의 기질(바이오디젤 부산물)과 효소를 혼합하였다. 이 혼합물을 8시간 동안 37℃에서 배양하였고 그 후 효소를 비활성화하기 위하여 끓는 물 용기에서 10분 동안 가열하였다. 가수분해 정도는 10% (v/v) 트라이클로로아세트산에서 용해되는 질소 함량을 측정함으로써 결정하였고, 감압 하에 동결건조한 가수분해물은 사용할 때까지 -80 ℃ 이하에서 보관하였다.

[0050] **1-3. 조골세포를 활성화하는 펩타이드 정제**

[0051] **1-3-1. 재순환법 조제용 고속액체크로마토그래피 (HPLC)**

[0052] 조골세포를 활성화하는 펩타이드는 재순환법 조제용 고속액체크로마토그래피 (HPLC)를 사용하여 Jaigel W253 칼럼에서 효소 가수분해물로부터 정제하였다. 감압 하에 동결건조한 단백질 (20 mg/ml)은 20 mM의 인산완충액 (pH 6.8)에서 평형을 맞추어 칼럼에 충전하였고, 3 ml/min의 속도로 유출하였다. 각각의 분획을 215 nm에서 모니터링 하고, -80 ℃ 이하에서 동결건조기를 사용하여 건조시켰다. 또한 조골세포 분화 활성을 조사하였고, 가장 높은 조골세포 활성화 분획은 다음 단계에서 크로마토그래피에 의해 정제하는 것으로 결정하였다.

[0053] **1-3-2. 고속액체크로마토그래피 (HPLC)**

[0054] 분획이 나타내는 조골세포 분화 활성화는 역상 HPLC (RP-HPLC)를 사용하여 acetonitrite의 경사자계 (60분 동안 0~60%)가 있는 YMC pack pro C18 칼럼 상에서 1.0 ml/min의 속도로 추가 정제하였다. 용리 최고점은 215 nm에서 발견되었다. 강한 최고치를 수집하고, 동결건조하고, 조골세포 분화 활성화를 평가하였다. 최종적으로 정제된 펩타이드는 아미노산 배열을 분석하였다.

[0055] **1-4. 아미노산배열결정법**

[0056] 정제된 펩타이드의 정확한 분자량과 아미노산 배열은 전자분무이온화 (ESI) 이온발생원과 결합된 Q-TOF 질량분석계 (Micromass, Altrincham, UK)로 결정되었다. 정제된 펩타이드는 메탄올/물 (1:1, v/v)에서 용해된 후 전자분무 이온발생원으로 주입되었고, 펩타이드의 분자량은 질량스펙트럼에서 2가 전하를 띤 $(M+2H)^{2+}$상태에 의해 결정되었다. 분자량을 결정한 후, 펩타이드는 조각화를 위해 자동적으로 선택되었고, 배열 정보는 탠덤 질량분석법 (MS) 분석에 의해 구하였다.

[0057] **1-5. 세포 배양 및 생존력 결정**

[0058] 쥐류 중간엽 줄기세포 (D1)가 보존되었고 인간의 골육종 (MG-63)은 5% CO_2와 37 ℃의 습한 공기에서 10% 소태아혈청 (FBS)과 항생제 (페니실린 G 100 IU/ml 및 스트렙토마이신 100 μg/ml)를 보충한 둘베코변형이글배지 (DMEM)에서 배양하였다. 세포들은 1×10^4 세포/cm^2에 놓여졌고 세포들이 면적의 약 80% 정도에 도달한 후에 실험을 수행하였다. D1 세포에서 골형성 분화를 유도하기 위해서, 3일째에 배지는 50 μg/ml 아스코르브산, 10^{-8} M 덱사메타손, 및 10 mM 베타-글리세롤인산으로 보충한 ODM DMEM으로 변경하였다. 이후에 3일 동안 배양한 후, 한

그룹은 ODM에서만 배양하였고, 또 다른 그룹은 ODM에 정제된 펩타이드를 더하여 배양하였다. 그리고 나서 D1 세포들을 24시간 또는 48시간 후에 분석하였다.

[0059] 세포 생존능력은 세포 생존능력의 표지자로서 MTT를 사용하여 측정하였다. 이 결정법의 원리는 포르마잔에 대한 미토콘드리아-의존적인 감소에 따랐다. 세포들은 96 웰-플레이트에서 자랐고 그 후 다양한 농도의 효소 가수분해물로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후에, 세포들을 다시 씻어내고 100 μl의 MTT (1 mg/ml)를 추가하여 4시간 동안 배양하였다. 마지막으로, 형성된 포르마잔염의 용해도를 높이기 위해서 디메틸술폭시드 (DMSO) 150 μl를 추가하였고, 포르마잔염의 양은 마이크로플레이트 리더를 이용하여 540 nm에서 OD를 측정함으로써 결정하였다 (PowerWave XS model; BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

[0060] **1-6. 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP) 활성**

[0061] ALP 활성을 평가하기 위하여, 골육종과 쥐류의 중간엽 줄기세포는 24-웰 플레이트에서 배양하였다. 배지는 각각 효소 가수분해물 또는 정제된 펩타이드를 추가한 DMEM 또는 ODM으로 교체하였고, 세포들을 48시간 동안 배양하였다. 배양 후에, 세포들은 PBS 완충액으로 씻어내고, 0.1% 트리톤 X-100을 포함하는 25 mM 탄산염 완충액 (pH 10.3)에서 균질화하였다. 다음으로, 세포 활성은 1.5 mM $MgCl_2$와 15 mM p-NPP를 포함하는 탄산염 완충액 250 mM에서 37 ℃에서 1시간 동안 배양함으로써 측정하였다. ALP가 존재할 때, p-NPP는 파라-니트로페놀과 무기인으로 변환된다. 표본의 ALP 활성은 분광광도계를 사용하여 405 nm에서 흡광도로부터 측정하였다.

[0062] **1-7. 무기질화**

[0063] 무기질화의 정도는 6-웰 플레이트를 사용해서 알리자린 레드-에스 염색에 의해 결정하였다. 요약하자면, 세포들은 PBS로 두 번 씻었고, 얼음같이 찬 70% (v/v) 에탄올에서 1시간 동안 고정한 후, 공기로 건조하였다. 에탄올로 고정한 세포와 기질은 40 mM 알리자린 레드-에스 (pH 4.2)로 1시간 동안 염색하였고 물로 잘 씻었다. 이어서 세포들은 10 mM 인산나트륨 완충액 (pH 7.0)에서 10% 세틸피리디움 클로라이드로 15분 동안 얼룩을 제거하였다. 흡광도는 UV 마이크로플레이트 리더를 사용하여 562 nm에서 측정하였다 (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria).

[0064] **1-8. RT-PCR 분석**

[0065] RNA는 TRIzol 시약으로 분리하였고, total RNA 1μg을 AMV 역전사효소를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. PCR을 위한 올리고뉴클레오티드 서열들은 다음 표 1에 나태내었다.

표 1

[0066]

유전자	방향	서열(5'-3')
human ALP	forward	ccacgtcttcacatttggtg
human ALP	reverse	agactgcgcctagtagttgt
human GAPDH	forward	ttcaccaccaccatggagaaggc
human GAPDH	reverse	ggcatggactgtggtcatga
osteocalcin	forward	atgagagccctcacactcctc
osteocalcin	reverse	gccgtagaagcgccgataggc
collagen type1	forward	ccagattgagaccctcctca
collagen type1	reverse	atgcaatgctgttcttgcag

[0067] PCR 산물을 1.2% 아가로오스 겔에서 전기영동하고 영상화하였다.

[0068] **1-9. 웨스턴 블롯 분석**

[0069] 표준 절차에 따라 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. 제조사의 지침에 따라서, 각각의 단백질을 발견하기 위해서 화

학발광 ECL 분석 키트 (Amersham Pharmacia Biosciences)와 각각 다른 항체들 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)을 사용하였다. LAS3000 발광 영상 분석기를 사용하여 웨스턴 블롯을 시각화하였고 단백질 발현은 MULTI GAUGE V3.0 소프트웨어에 의해 정량화하였다 (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan).

[0070] **1-10. 통계 분석**

[0071] 모든 자료들은 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 평균값들은 새롭게 준비된 시약을 사용하여 다른 날에 수행된 최소한 3회의 독립적인 실험으로부터 구한 자료를 바탕으로 계산하였다. 통계분석은 스튜던트 t-검정을 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$이면 달성된 것으로 간주하였다.

[0072] **2. 결과**

[0073] **2-1. 효소 가수분해물이 세포 생존 능력과 알칼리성 인산가수분해효소 활성에 미치는 효과**

[0074] 바이오디젤 부산물 단백질은 조골세포를 활성화하는 펩타이드를 추출하기 위하여 alcalse, flavourzyme, neutrase, PTN, 및 protamex (각각의 약어 BD-A, BD-F, BD-N, BD-PT, 및 BD-Pr) 에 의해 가수분해되었다. 인간의 조골세포 (MG-63)와 쥐류의 중간엽 줄기세포 (D1)의 생존 능력에 대한 효소 가수분해물의 효과를 연구하기 위해 MTT 분석을 사용하였다. 24시간 동안 가수분해물 (10-1000 μg/ml)로 두 가지 세포주를 처리한 것은 세포 생존 능력에 영향을 주지 않았고 (도 1a 및 도1b), 조골세포 분화에 대한 가수분해물의 효과를 연구하기 위하여 20-500 μg/ml의 가수분해물 농도를 사용하였다.

[0075] ALP 활성에 대한 가수분해물의 효과를 연구하기 위해, MG-63 및 D1 세포들을 다양한 농도의 가수분해물에서 배양하였다. 도 1c 및 도 1d에서 보여진 바와 같이, alcalase 가수분해물 (BD-A)는 MG-63과 D1 세포 모두에서 블랭크 또는 다른 가수분해물과 비교해서 가장 높은 ALP 활성을 나타내었다. 또한, 알칼리성 인산가수분해효소 활성은 MG-63 세포 (도 1c)에서 alcalase 가수분해물이 존재할 때 용량-의존적으로 증가하였으나, D1 세포에서는 BD-A 20 μg/ml의 농도에서 최고점에 도달하였다 (도 1d). ALP는 조골세포 분화의 초기 표지자로 알려져 있으며 특정 세포주에서의 ALP 활성은 조골세포 분화 과정에 긍정적인 영향을 주는 생활성 물질이 존재할 때 증가할 것이다. 그러므로, 후속 연구를 위하여 BD-A 가수분해물을 선택하였다.

[0076] **2-2. 미세조류 Nannochloropsis oculata로부터 추출한 펩타이드의 정제 프로파일**

[0077] 감압 동결건조한 BD-A 단백질을 인산완충액 (pH 6.8) 20 mM에서 용해하였고, jaigel W253 칼럼에 충전하였다. 용리 최고점은 215 nm에서 측정되었고, 신호는 UV (자외선) 및 RI (굴절률) 검출기로 결정되었다 (도 2a). UV 검출기는 UV를 쉽게 흡수하는 물질을 선택적으로 검출하지만, RI 검출기는 UV를 흡수하는 능력이 없는 물질에도 높은 민감성을 가지기 때문에 다용도로 쓰인다. 이 2가지 검출기의 결합은 광범위한 물질들의 분석과 준비를 가능하게 한다. 그러므로, 도 2a에서와 같이 4가지 분획이 다음 정제 단계를 위해 수집되었다. 각 분획을 모아서 동결건조한 후, 분획의 ALP 활성을 측정하였다. 분획 II는 다른 분획과 비교해서 MG-63 및 D1 세포 모두에서 ALP 활성이 증가함으로써 가장 높은 조골세포 분화를 나타내었다 (도 2c 및 도 2d). 동결건조된 활성 분획 II는 RP-HPLC를 사용하여 아세토니트릴의 경사자계 (0-60%)가 있는 YMC pack pro C18 칼럼에서 추가적으로 분리되었고, 한 개의 명확한 분획이 수집되었다 (도 2e). 마지막으로, 강력한 활성 효과를 가진 한 개의 펩타이드가 정제되었다. 정제된 펩타이드의 아미노산배열은 MPDW로 결정되었다 (MW 601 Da, 도 2f). ESI/MS 분광법으로 측정한 펩타이드는 아미노산배열로부터 계산한 이론적인 질량과 잘 일치하였다.

[0078] **2-3. MG-63 및 D1 세포에서 무기물화에 대한 펩타이드의 효과**

[0079] ALP는 조골세포 분화의 초기 단계 표지자로 알려졌고, 골 무기질화는 마지막 단계로 알려져야 한다. 본 발명에서 유기 조직이 칼슘염의 생리적 침착에 의해 강화되는 과정인 골 무기질화는 펩티드의 존재 하에 염색한 배양 세포로부터 추출된 알리자린 레드-에스의 흡광도 측정에 의해 정량화되었다. 그림 3은 MG-63과 D1 세포 모두 정제된 펩타이드의 농도 (20-500 μg/ml)의 증가에 따라 명확하게 빨간색을 보임을 설명한다. 그러나, 무기물화 신호는 펩타이드가 존재할 때 MG-63 세포보다 D1 세포에서 더 강하게 나타난다. 이 결과는 펩타이드가 초기 단

계 및 말기 단계 모두에서 조골세포 분화를 유도할 수 있음을 나타낸다.

[0080] **2-4. MG-63 및 D1 세포에서 조골세포 분화 과정에 영향을 미치는 특이 유전자의 발현에 대한 본 발명의 펩타이드 효과**

[0081] 가장 자주 사용되는 조골세포 분화 과정 표지자의 일부는 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP), 콜라겐 I형, 및 오스테오칼신이다. I형 콜라겐은 골기질에서 가장 풍부한 단백질이다. 콜라겐 분해효소는 골 재형성에서 매우 중요한 기능을 한다 (Lorenzo et al., 2011). 오스테오칼신과 알칼리성 인산가수분해효소 (ALP)는 각각 조골세포 분화 과정의 말기 및 초기 표지자로서 알려져야 한다. 따라서, 우리는 MG-63 및 D1 세포에서 이러한 표지자의 유전자 발현을 연구하였다. 결과는 정제된 펩타이드가 두 가지 세포 모두에서 용량-의존적으로 이러한 모든 유전자들의 mRNA 발현을 증가시키는 것으로 나타났다 (도 4). 또한, I형 콜라겐 mRNA의 수준은, ALP 또는 오스테오칼신 mRNA의 수준에 비해서, 펩타이드에 대해 더 민감하였다. 그러므로, 결과는 조골세포 분화에 대한 정제된 펩타이드의 현저한 효과를 시사할 것이다.

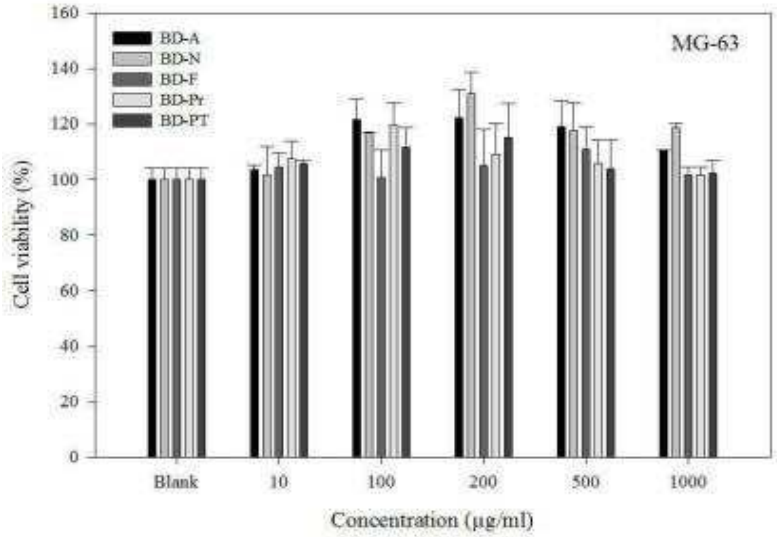
[0082] **2-5. MAPK 및 Smad 경로에 대한 펩타이드의 효과**

[0083] 조골세포 활성화의 일반적인 메커니즘은 미토겐활성화단백질키나아제 (MAPK) 및 Smad 패밀리의 세린-트레오닌인산화효소에 의해 적절하게 중재된다. 그러므로, Smad1/5/8 및 3가지 다른 MAPKs인 EPK, JNK, 및 p38의 발현에 대한 펩타이드의 효과를 연구하였다. 결과는 MG-63 및 D1 세포 모두에서 펩타이드가 존재할 때 EPK, JNK, 및 p38 발현의 인산화반응이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 5a 및 도 5b). 이러한 키나아제의 인산화반응의 발현은 MG-63 세포에서 용량-의존적으로 증가하였다 (도 5a). 그러나, 키나아제의 인산화반응의 발현은 D1 세포에서 EPK 및 p38의 인산화반응의 경우, 20 μg/ml 농도에서 최고점에 도달한 후 감소하였으나 블랭크 (처리하지 않음)보다는 여전히 높았다 (도 5b). 또한, 펩타이드가 존재할 때 결과적으로 MG-63 및 D1 세포 모두에서 Smad1/5/8의 인산화반응의 발현이 유의하게 증가하였다. 따라서, 조골세포 분화의 활성화는 MAPK 및 Smad가 중재하는 상향-조절의 결과임을 시사할 수 있을 것이다.

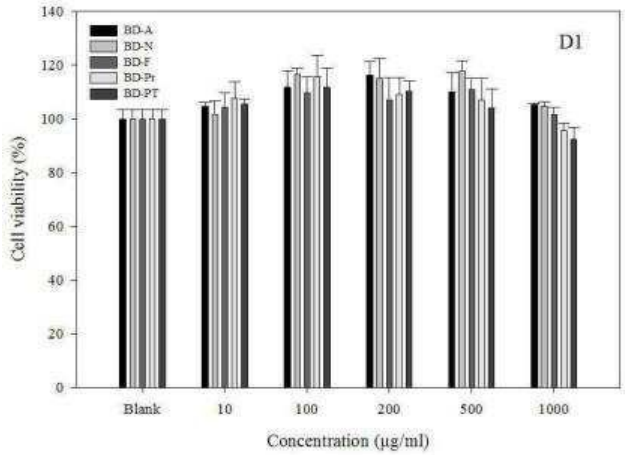
[0084] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

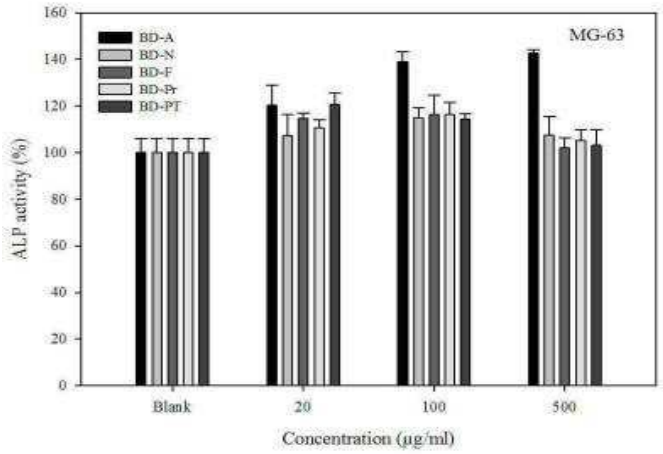
도면1a


BD-A
BD-N
BD-F
BD-Pr
BD-PT
MG-63
Cell viability (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Blank
10
100
200
500
1000
Concentration (μg/ml)

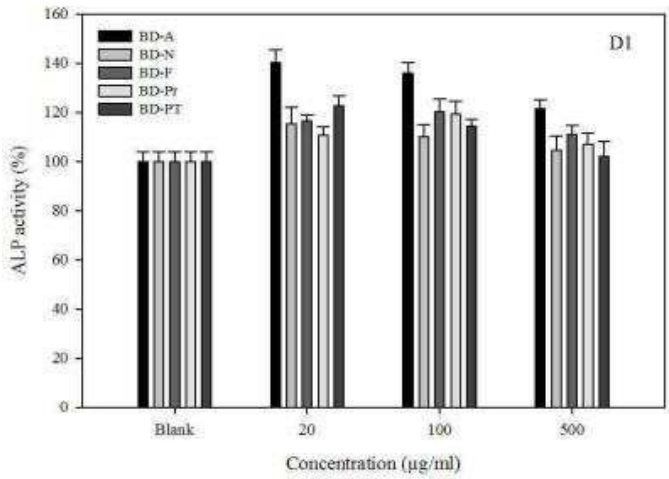
도면1b


BD-A
BD-N
BD-F
BD-Pr
BD-PT
D1
Cell viability (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
Blank
10
100
200
500
1000
Concentration (μg/ml)

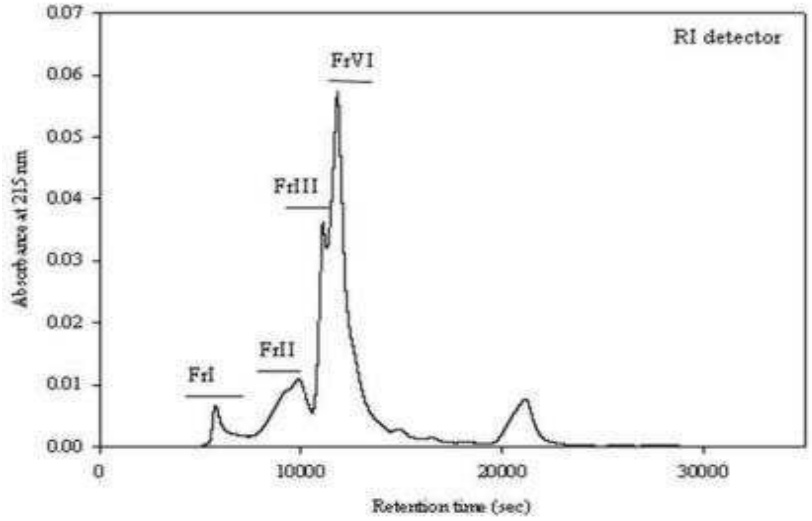
도면1c


MG-63
BD-A
BD-N
BD-F
BD-Pr
BD-PT
ALP activity (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Blank
20
100
500
Concentration (μg/ml)

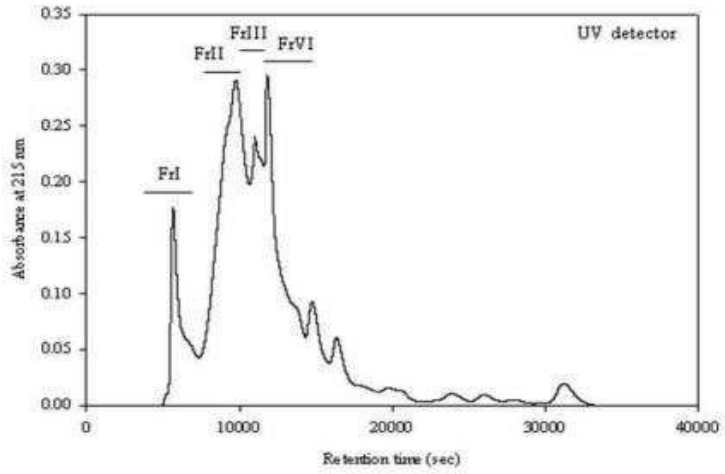
도면1d


D1
BD-A
BD-N
BD-F
BD-Pr
BD-PT
ALP activity (%)
0
20
40
60
80
100
120
140
160
Blank
20
100
500
Concentration (μg/ml)

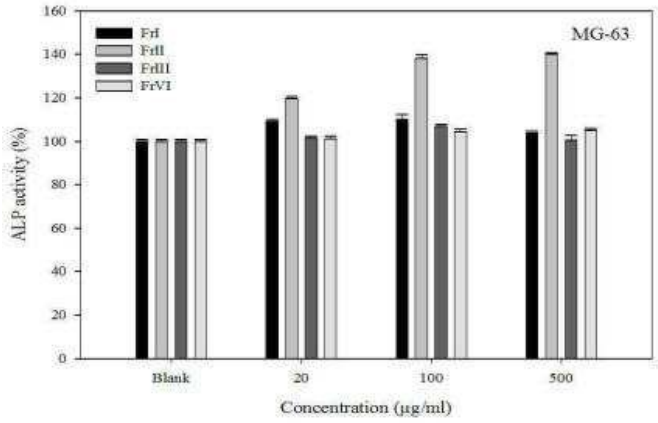
도면2a



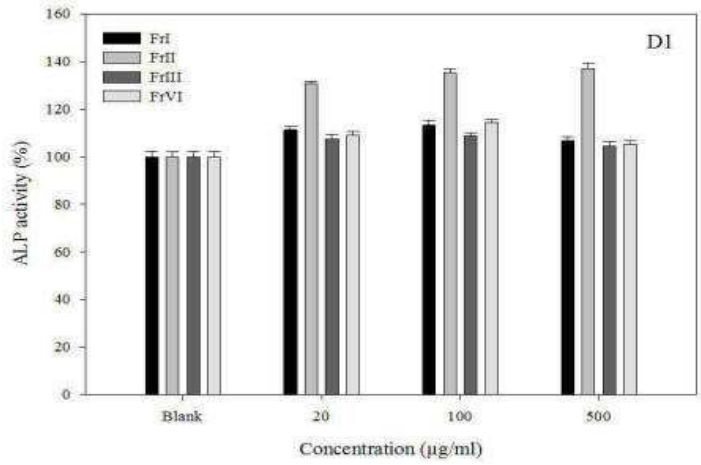
도면2b



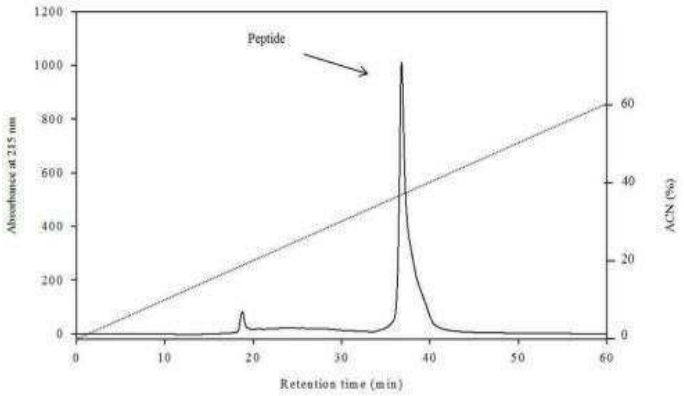
도면2c



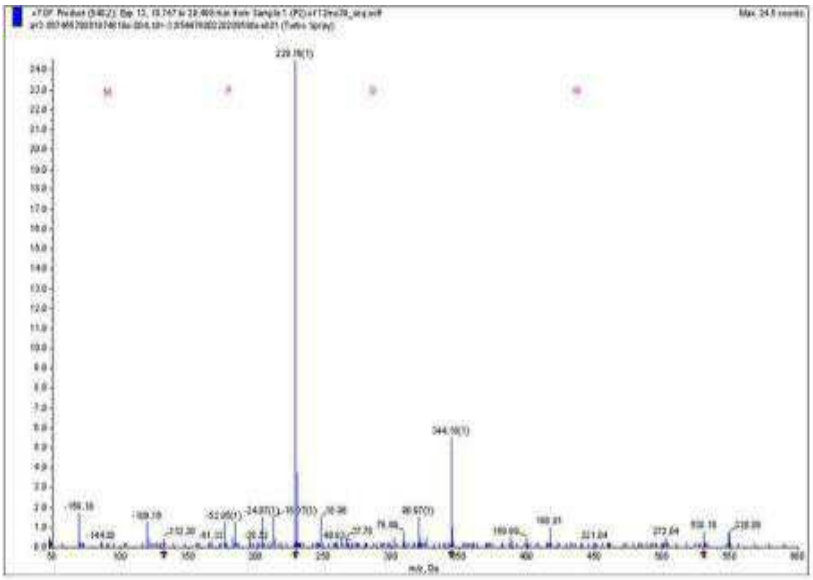
도면2d



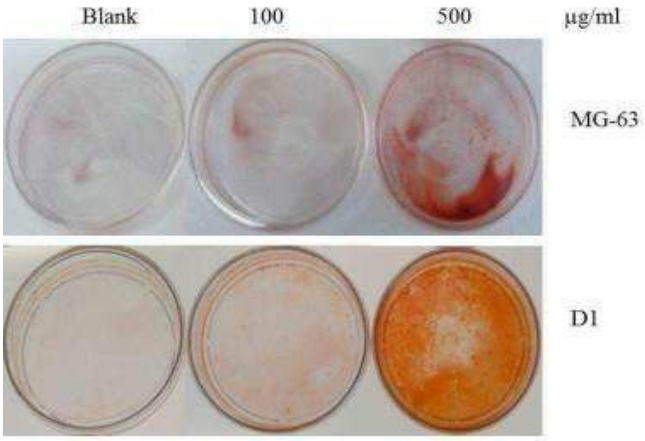
도면2e



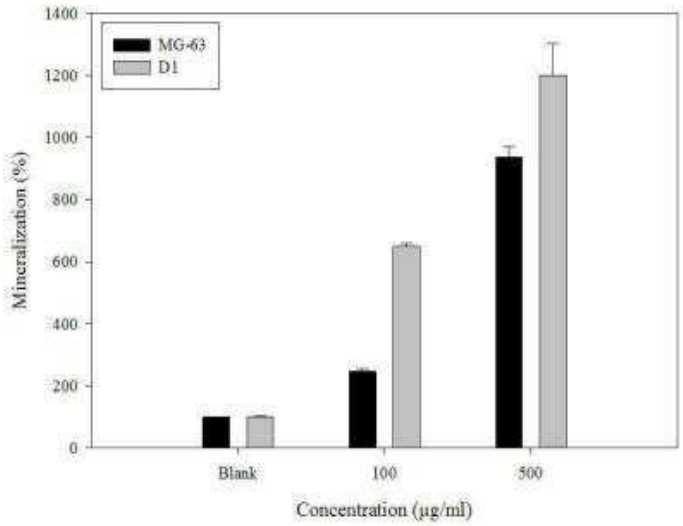
도면2f



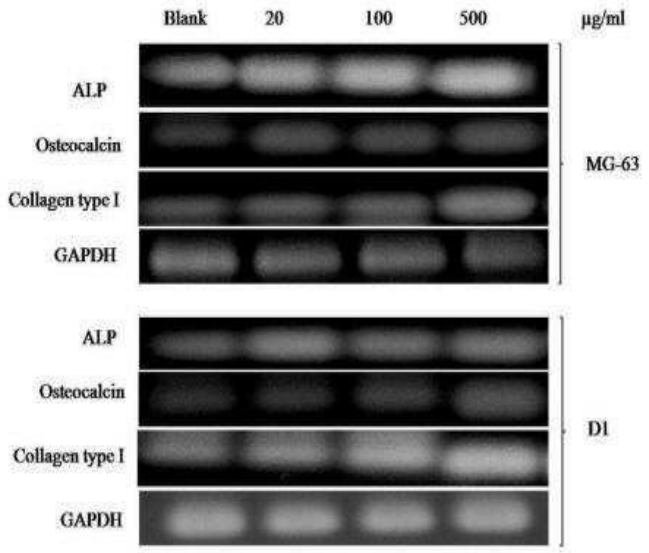
도면3a



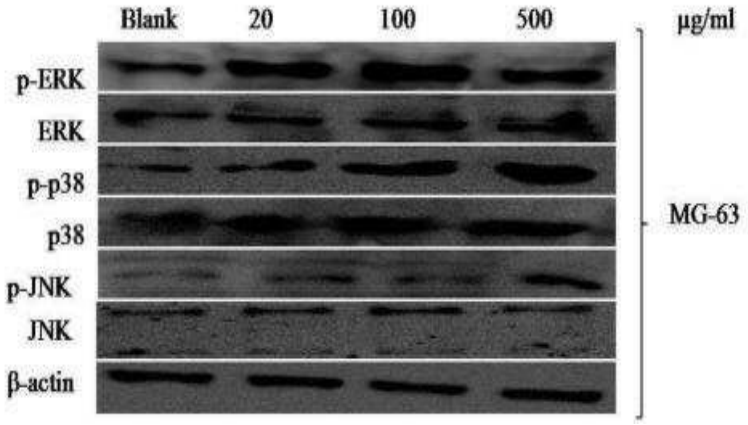
도면3b



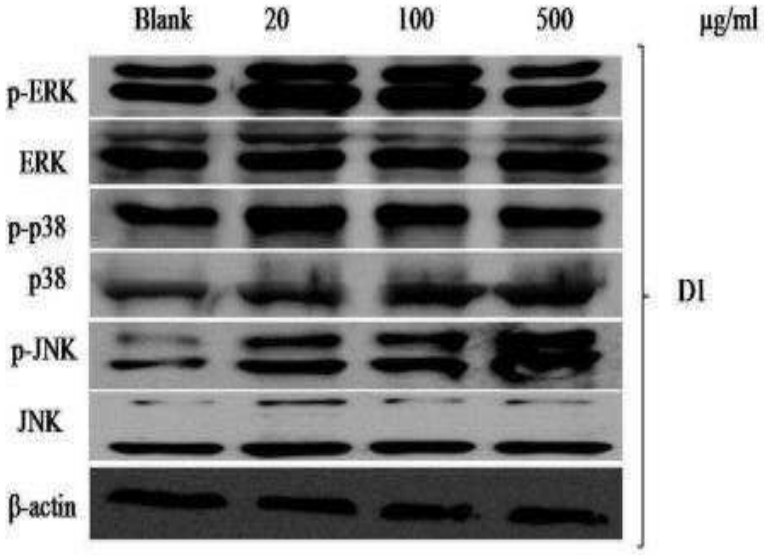
도면4



도면5a



도면5b



도면5c

