



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0088443
(43) 공개일자 2021년07월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 31/663 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01) A61K 9/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 31/663 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-0000275
(22) 출원일자 2021년01월04일
심사청구일자 2021년01월04일
- (30) 우선권주장
1020200001700 2020년01월06일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
- (72) 발명자
고정민
서울특별시 강남구 삼성로 151, 6동 302호(대치동, 선경아파트)
- (74) 대리인
특허법인태백

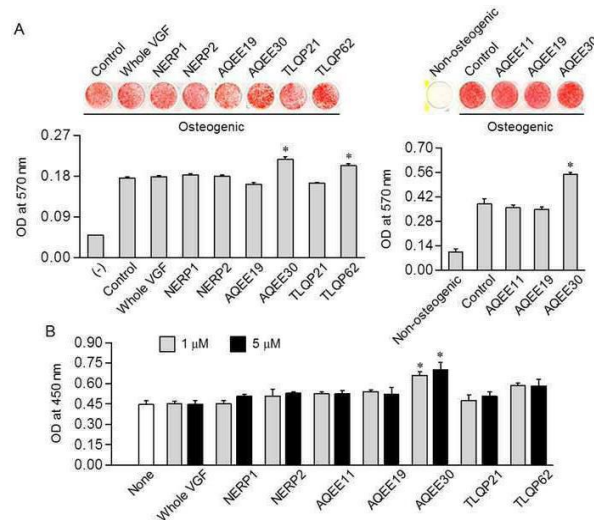
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 VGF 유래 펩티드를 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 VGF 유래 펩티드를 포함한 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 피질 골 강화 효과를 나타내는 다양한 VGF 유래 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 골 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 38/185 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

A61P 19/00 (2018.01)

명세서

청구범위

청구항 1

$X_1X_2X_3X_4AEAEERRLQEQEELNYIEHVLX_5X_6X_7X_8$ 로 이루어진 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 $X_1X_2X_3X_4ADAEERRLQEQEELNYIEHVLX_5X_6X_7X_8$ 로 이루어진 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에서,

X_1 은 아미노산이 없거나 알라닌(A)이고;

X_2 는 아미노산이 없거나 글루타민(Q)이고;

X_3 은 아미노산이 없거나 글루탐산(E)이고;

X_4 는 아미노산이 없거나 발린(V) 또는 글루탐산(E)이고;

X_5 는 아미노산이 없거나 류신(L)이고;

X_6 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)이고;

X_7 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R)이고;

X_8 은 아미노산이 없거나 프롤린(P)이고;

여기서,

X_4 에 아미노산이 없는 경우 X_1 내지 X_3 에도 아미노산이 없고;

X_3 에 아미노산이 없는 경우 X_1 및 X_2 에도 아미노산이 없으며;

X_2 에 아미노산이 없는 경우 X_1 에도 아미노산이 없고;

X_5 에 아미노산이 없는 경우 X_6 내지 X_8 에도 아미노산이 없으며;

X_6 에 아미노산이 없는 경우 X_7 및 X_8 에도 아미노산이 없고;

X_7 에 아미노산이 없는 경우 X_8 에도 아미노산이 없는, 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 6으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 골 질환은 골다공증, 치주질환, 골절 및 파제트병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 질환인 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 골절은 비척추 골절인 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 골 흡수 억제제와 병용되는 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 골 흡수 억제제는 비스포스포네이트인 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 펩티드는 주사제로 투여되는 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 주사제는 데포 (depot) 주사제인 것을 특징으로 하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

$X_1X_2X_3X_4AEAEERRLQEQEELNIEHVLX_5X_6X_7X_8$ 로 이루어진 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 $X_1X_2X_3X_4ADAEEERRLQEQEELNIEHVLX_5X_6X_7X_8$ 로 이루어진 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로서,

상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에서,

X_1 은 아미노산이 없거나 알라닌(A)이고;

X_2 는 아미노산이 없거나 글루타민(Q)이고;

X_3 은 아미노산이 없거나 글루탐산(E)이고;

X_4 는 아미노산이 없거나 발린(V) 또는 글루탐산(E)이고;

X_5 는 아미노산이 없거나 류신(L)이고;

X_6 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)이고;

X_7 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R)이고;

X_8 은 아미노산이 없거나 프롤린(P)이고;

여기서,

X_4 에 아미노산이 없는 경우 X_1 내지 X_3 에도 아미노산이 없고;

X_3 에 아미노산이 없는 경우 X_1 및 X_2 에도 아미노산이 없으며;

X_2 에 아미노산이 없는 경우 X_1 에도 아미노산이 없고;

X_5 에 아미노산이 없는 경우 X_6 내지 X_8 에도 아미노산이 없으며;

X_6 에 아미노산이 없는 경우 X_7 및 X_8 에도 아미노산이 없고;

X_7 에 아미노산이 없는 경우 X_8 에도 아미노산이 없는, 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 펩티드는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열, 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열 또는 서열번호 5로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능

식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 VGF 유래 펩티드를 포함한 골 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 피질 골 강화 효과를 나타내는 다양한 VGF 유래 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 골 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 뼈의 발생, 성장 및 대사과정에는 뼈의 형성(bone modeling)과 재형성(remodeling) 과정이 중요한 역할을 한다. 뼈의 형성은 태생기부터 시작하여 이후 골격이 성숙되어 성장이 끝나는 청장년기까지 지속되어 20대에서 30대 초반까지 최대 골량을 형성하게 된다. 이후 약 30년 동안은 뼈를 제거하고 다시 이를 보충하는 골재형성 과정을 반복하게 되는데 이때는 골형성과 골흡수가 서로 짝을 이루어 균형을 유지하게 된다. 이 시기가 지난 후에는 골 흡수에 따른 골소실을 골형성이 충분히 따라갈 수 없어 결국 연 0.3~0.5% 정도의 골량 감소를 겪게 되며, 특히 여성의 경우에는 폐경 초기에 연 2~3%의 상당한 골손실을 겪게 된다.
- [0003] 골 조직은 연골과 골격계를 구성하며 기계적 기능으로 지지와 근 부착의 역할을 하고, 생체기관 및 골수를 보호하는 기능을 하며, 칼슘과 인 이온의 항상성 유지를 위해 이들을 보존하는 기능을 담당한다. 골 조직은 교원질, 당단백질과 같은 세포 기질과 조골세포, 파골세포 및 골세포 등 여러 종류의 세포들로 이루어진다. 골수 내 간질세포(bone marrow stromal cell)로부터 유래한 조골세포는 골 형성에 주된 역할을 담당하며, 조혈모세포로부터 유래 되는 파골세포는 파괴되고, 노화된 골의 흡수를 담당하여, 조골세포와 파골 세포의 균형 있는 작용을 하여 골의 재형성(remodeling)을 유지하게 된다. 그러나 파골세포의 과도한 활성화나 조골세포의 활성 저하는 골형성의 리모델링 과정에서 불균형을 초래하여, 생체 내에서 파골세포와 조골세포와의 평형이 깨짐으로써 골 질환을 유발하게 된다.
- [0004] 골 질환의 대표적인 예로서 골다공증은 정도에 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가하고 있다. 또한, 전 세계적으로 골 질환 치료와 관련되어 약 1300억 달러의 시장이 형성되어 있는 것으로 알려져 있으며, 앞으로 더 증가할 것으로 예상되기 때문에 세계적인 각 연구 기관과 제약회사에서는 골질환 치료제 개발에 많은 투자를 하고 있다.
- [0005] 지금까지 여러 물질이 골다공증 치료제로 개발되었다. 그 중 골다공증 치료제로 가장 많이 사용되는 에스트로겐은 그 실제적인 효능이 아직 검증되지 않은 상태이며 생애 동안 계속 복용해야 하는 단점이 있으며, 장기간 투여하는 경우 유방암이나 자궁암이 증가하는 부작용이 있다. 알렌드로네이트(alendronate)도 그 효능이 명확하지 않고 소화관에서의 흡수가 더디며 위장과 식도점막에 염증을 유발하는 문제가 있다. 칼슘제제는 부작용이 적으면서도 효과가 우수한 것으로 알려져 있지만 치료제라기보다는 예방제에 해당한다. 그 외에 칼시토닌과 같은 비타민 D 제제가 알려져 있으나 아직 효능 및 부작용에 대한 연구가 충분히 되어있지 않은 상태이다.
- [0006] 한편 치주질환은 치아지지조직의 염증상태에 따라 치은염과 치주염으로 분리되며 진행된 치주염은 치아 상실을 일으키는데 40세 이후의 성인에 있어서 치아를 뽑게 되는 원인 중 치주염이 차지하는 비율이 40%나 된다는 보고가 있을 정도로 치주염으로 인한 치아상실은 심각한 문제이다.
- [0007] 치주질환에서의 치주인대와 치조골의 파괴는 이들 조직의 주성분인 교원질(collagen)의 분해에 의한 것이다. 정확한 기작은 아직 밝혀져 있지는 않지만, 교원질의 분해는 숙주가 분비하는 콜라게나아제와 치주질환 유발 세균으로부터 분비된 중성 단백질 분해 효소에 의한 것으로 알려져 있다. 따라서 콜라게나아제 효소 및 단백질 분해 효소의 활성을 억제함으로써 치주질환의 진행을 억제하려는 연구가 시도되고 있다. 치주질환의 치료는 환자의 개선된 구강위생의 확립, 비외과적 혹은 외과적인 치식제거술, 치근활택술, 치은소파술과 신부착을 응용한 치주 조직의 재생술들이 이용되어 왔다. 그러나 이런 외과적인 치료 방법은 치료를 위해 치과를 가야하는 번거로움으로 인해 효과적인 치료가 어렵고 또한 병의 예방보다는 병이 어느 정도 진행되었을 경우 행하는 치료에 국한되어 있어, 치료를 하지 않을 경우 대부분이 만성으로 진행되는 경우가 대부분이다.
- [0008] 부가적인 치료로 전신적인 항생제의 복용과 국소 서방형 제제가 사용되어 왔으나, 불필요한 부위에도 약물이 너무 많이 전달되어 그로 인한 부작용과 최근 사용되는 항생제에 대한 내성을 나타내는 치주질환균이 분리된 예가

보고되고 있어 심각한 문제점을 안고 있다. 이러한 외과적 치료의 한계성과 항생제 사용의 문제점을 보완하기 위해 항세균성, 항치태 제제가 함유된 치약 및 구강청정제 등 의 구강 조성물의 사용은 치아 우식증 및 치주질환 등의 세균성 구강질환의 예방 및 치료 보조제로서 효과가 보고 되었다.

[0009] 골절은 뼈가 깨진 상태를 말하며 골절의 치료에는 상당한 기간이 걸리고, 인구 고령화에 따라 병적 골절의 하나인 골다공증 환자의 골절이 현저히 증가되고 있어, 현재 골다공증 치료제로 사용되고 있는 칼슘과 에스트로겐(estrogen), 칼시토닌(calcitonin), 활성형 비타민 D, 비스포스포네이트(bisphosphonate) 제제 등을 골절 치료에 사용하여 골절 치료효과를 기대하였으나, 골밀도 감소를 억제하여 골절의 위험을 낮출 수 있을 뿐, 골절부위의 접합 및 골을 형성하지는 않았다. 이는 골다공증의 발생기전이 유전적 또는 체질적 요인으로 골의 음성평형 상태가 지속되어 섬세한 골격의 자질을 가지는 상태, 골질이 정상속도로 흡수되지만 골의 형성이 부진한 상태 및 골이 정상속도로 형성되지만 골의 흡수가 증가된 상태이기 때문인 것으로, 이와 같이 골다공증과 골절은 발생기전이 전혀 달라 골다공증 치료제로 골절을 치료할 수 있다고 유추할 수 없다.

[0010] 상기와 같은 골다공증과 골절의 기전 차이로 인하여 골흡수(bone resorption)를 억제하여 골다공증 치료효과를 나타내는 약제는 골형성(bone formation)도 억제하여 오히려 골절 치료를 지연시킬 수 있는데, 예를 들어 비스포스포네이트제제인 인카드로네이트 디소듐(incadronate disodium)을 장기간 연속적으로 투여하였을 경우 랫트의 대퇴골(femur)의 골절 치유를 지연시켰다는 보고가 있고(Li C et al., J. Bone Miner Res. 2001 Mar;16(3):429-36), 인카드로네이트를 전처리했을 때 골절 후 16주에서 골절 치유에 영향을 미치지 않는 반면 지속적인 인카드로네이트 치료는 가골은 증가시키지만, 골절 치유 동안 리모델링 과정을 지연시킨다는 보고도 있다(Li J et al., J. Bone Miner Res. 1999 Jun; 14(6):969-79). 또한, 골다공증과 깊은 관련이 있는 것으로 알려진 골생성 바이오 마커인 bFGF 등은 골절치유와는 아무런 관련이 없는 것으로 보고되고 있다(Xu 등, Chin. J. Traumatol. 6, 160~166, 2003).

[0011] 따라서, 일반적인 골절 발생시 정상상태로의 치유를 효과적으로 촉진하기 위하여 골다공증 치료제를 사용하기에는 상기와 같은 이유로 한계가 있어, 고유한 골절 치유 효과를 갖는 약제의 개발이 절실히 요구되고 있는 실정이다.

[0012] 이에, 본 발명자는 새로운 작용 기전의 골형성 촉진 치료 표적 및 피질골 강화 목적의 신규 치료 표적을 발굴하여 피질골을 강화하는 골형성 촉진제를 개발하고자 하였고, 신경분비성 성장인자인 VGF 유래 펩티드가 조골세포의 자극성 G알파-결합 (Galphas-coupled) GPCR을 자극하여 cAMP를 촉진함으로써 골형성 촉진 작용을 나타내며 또한 생체 수준에서 피질골 강화 효과를 나타냄을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] VGF 폴리펩티드의 의약품도와 관련하여, 국제공개특허 WO 01/07477호에는 VGF 폴리펩티드의 비만, 불임, 약액질, 섭식장애 등에 대한 치료효과가 개시되어 있으나, 골 질환에 대한 치료효과에 대해서는 개시된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 국제공개특허 WO 01/07477 (2001.02.01 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 피질골 강화 효과를 나타내는 골 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상술한 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 다양한 형태의 VGF 유래 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및/또는 골 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 VGF 유래 펩티드는 $X_1X_2X_3X_4AEAEERRLQEQEELNYIEHVLX_5X_6X_7X_8$ (서열번호 1)의 아미노산 서열 또는 $X_1X_2X_3X_4ADAEERRLQEQEELNYIEHVLX_5X_6X_7X_8$ (서열번호 2)의 아미노산 서열을 포함하

며, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에서,

[0018] X_1 은 아미노산이 없거나 알라닌(A)일 수 있고; X_2 는 아미노산이 없거나 글루타민(Q)일 수 있고; X_3 은 아미노산이 없거나 글루탐산(E)일 수 있고; X_4 는 아미노산이 없거나 발린(V) 또는 글루탐산(E)일 수 있고; X_5 는 아미노산이 없거나 류신(L)일 수 있고; X_6 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)일 수 있고; X_7 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R)일 수 있고; X_8 은 아미노산이 없거나 프롤린(P)일 수 있고; 여기서, X_4 에 아미노산이 없는 경우 X_1 내지 X_3 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_3 에 아미노산이 없는 경우 X_1 및 X_2 에도 아미노산이 없을 수 있으며; X_2 에 아미노산이 없는 경우 X_1 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_5 에 아미노산이 없는 경우 X_6 내지 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있으며; X_6 에 아미노산이 없는 경우 X_7 및 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_7 에 아미노산이 없는 경우 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있다.

[0019] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 펩티드는 AQEEAEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 3), AEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 4), VAEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 5) 또는 AQEEADAERRLQEQEELNYIEHVLLHRP (서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 골 질환은 골다공증, 치주질환, 골절 및 파제트병으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 골절은 비척추 골절일 수 있다.

[0022] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 펩티드는 골 흡수 억제제와 병용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 골 흡수 억제제는 비스포스포네이트일 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 다른 일실시예에 따르면, 상기 펩티드는 주사제로 투여될 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 또 다른 일실시예에 따르면, 상기 주사제는 데포 (depot) 주사제일 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따른 AQEE30을 비롯한 이의 다양한 변형된 형태의 VGF 유래 펩티드는 자극성 G알파-결합 (Galphas-coupled) GPCR을 자극하여 cAMP를 촉진함으로써 골형성 촉진 효과를 나타내며, 피질골 강화 효과가 있어 골 질환의 근본적인 치료가 가능하다. 또한, 기존의 대부분의 골다공증 치료제는 소주골로 이루어진 척추 골절에 대한 예방 효과를 나타낼 뿐, 피질골로 이루어진 비척추 골절의 예방 효과는 미미한 반면, 본 발명의 다양한 VGF 유래 펩티드는 피질골 강화 효과가 우수하여 비척추 골절의 예방 및 치료 효과가 탁월하다는 특징점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 래트에서의 다양한 VGF 펩티드를 나타낸 것이다.

도 2는 상동성 모델링을 이용한 AQEE30의 3D 구조를 나타낸 것이다.

도 3은 VGF가 골세포(Osteocyte)에 미치는 작용을 확인한 결과이다.

도 4는 VGF 유래 펩티드인 hAQEE30의 조골세포 분화 촉진 효과를 나타낸 것으로, A는 조골세포 분화 촉진 배지에 각각 AQEE11, AQEE19 및 hAQEE30 펩티드를 처리하여 석회화를 유도한 후 알리자린 레드 S (alizarin red S) 염색으로 석회화의 정도를 확인한 것이고, B는 A와 동일한 방법으로 전체 VGF, NERP1, NERP2, AQEE11, AQEE19, hAQEE30, TLQP21 및 TLQP62 펩티드를 각각 1 μ M 또는 5 μ M로 처리하여 석회화의 정도를 확인한 것이다.

도 5는 조골세포에서 hAQEE30의 cAMP 촉진 효과를 나타낸 것이다.

도 6은 VGF KO 마우스의 마이크로-CT 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 VGF KO 마우스의 오스테오칼신의 정량적 측정 결과 및 C-텔로펩티드 (C-Telopeptide) 검사 결과를 나타낸 것이다.

도 8 및 도 9는 hAQEE30의 생체 치료 효능 검증을 위해, 두개뼈(Calvaria bone) 형성을 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 8 및 도 9에 기재된 표에서 고동색 바탕을 가진 숫자는 "p < 0.05 vs. PBS"를 의미한다.

도 10은 hAQEE30 및 이의 변형 펩티드의 조골세포 분화 촉진 효과를 나타낸 것이다.

도 11은 mAQEE30의 조골세포 생존능 및 증식능 촉진 효과 확인 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 mAQEE30의 조골세포 분화 촉진 효과 확인 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 상술한 바와 같이, 기존의 골다공증 치료제는 다양한 부작용을 나타낼 뿐만 아니라, 골다공증으로 인한 골절을 효과적으로 치료할 수 없다는 치명적인 단점이 있었다. 이에, 본 발명자는 새로운 작용 기전의 골형성 촉진 치료 표적 및 피질골 강화 목적의 신규 치료 표적을 발굴하여 피질골을 강화하는 골형성 촉진제를 개발하고자 하였고, 신경분비성 성장인자인 VGF 유래 펩티드가 조골세포의 자극성 G알파-결합 (Galphas-coupled) GPCR을 자극하여 cAMP를 촉진함으로써 골형성 촉진 작용을 나타내며 또한 생체 수준에서 피질골 강화 효과를 나타냄을 확인함으로써 상술한 문제의 해결방안을 모색하였다.
- [0029] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 $X_1X_2X_3X_4$ AEAEERRLQEELENYIEHVL $X_5X_6X_7X_8$ (서열번호 1)의 아미노산 서열 또는 $X_1X_2X_3X_4$ ADAEEERRLQEELENYIEHVL $X_5X_6X_7X_8$ (서열번호 2)의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0031] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드는 신경분비성 성장인자인 VGF 유래 펩티드로, 인간, 래트 또는 마우스 유래일 수 있다.
- [0032] 구체적으로, 인간 VGF 펩티드의 아미노산 서열은 NCBI Reference Sequence: NP_003369.2에 공지되어 있고, 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 NCBI Reference Sequence: NM_003378.4에 공지되어 있다. 래트 VGF 펩티드의 아미노산 서열은 NCBI Reference Sequence: NP_112259.1에 공지되어 있고, 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 NCBI Reference Sequence: NM_030997.1에 공지되어 있다. 마우스 VGF 펩티드의 아미노산 서열은 NCBI Reference Sequence: NP_001034474.1에 공지되어 있고, 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 NCBI Reference Sequence: NM_001039385.1에 공지되어 있다.
- [0033] 여기서, 인간, 래트 및 마우스의 AQEE30 펩티드의 아미노산 서열 및 이를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 표 1에 기재된 바와 같다.

표 1

펩티드	아미노산 서열	서열번호	뉴클레오티드 서열	서열번호
인간 AQEE30	AQEEAEAEER RLQEELENYIEHVLRRP	3	gcgcaggagg aggcggaggc ggaggagcgc cgctgcagg agcaggagga gctggagaat tacatcgagc acgtgctgct ccggcgccccg	7
래트 및 마우스 AQEE30	AQEEADAER RLQEELENYIEHVLHRP	6	gcgcaggagg aagcggagcgc ggaggagcgc cgctgcagg agcaggagga gctggagaat tacattgagc acgtgctgct gcaccgccccg	8

- [0035] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열에서, X_1 은 아미노산이 없거나 알라닌(A)일 수 있고; X_2 는 아미노산이 없거나 글루타민(Q)일 수 있고; X_3 은 아미노산이 없거나 글루탐산(E)일 수 있고; X_4 는 아미노산이 없거나 발린(V) 또는 글루탐산(E)일 수 있고; X_5 는 아미노산이 없거나 류신(L)일 수 있고; X_6 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R) 또는 히스티딘(H)일 수 있고; X_7 은 아미노산이 없거나 아르기닌(R)일 수 있고; X_8 은 아미노산이 없거나 프롤린(P)일 수 있고; 여기서, X_4 에 아미노산이 없는 경우 X_1 내지 X_3 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_3 에 아미노산이 없는 경우 X_1 및 X_2 에도 아미노산이 없을 수 있으며; X_2 에 아미노산이 없는 경우 X_1 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_5 에 아미노산이 없는 경우 X_6 내지 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있으며; X_6 에 아미노산이 없는 경우 X_7 및 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있고; X_7 에 아미노산이

없는 경우 X_8 에도 아미노산이 없을 수 있다.

- [0036] 예를 들어, 상기 펩티드는 AQEEAEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 3), AEAEEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 4), VAEAEEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP (서열번호 5) 또는 AQEEADAEERRLQEQEELNYIEHVLLHRP (서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0037] 여기서, 상기 서열번호 3의 아미노산 서열은 인간(human) AQEE30으로, 본 명세서에서는 hAQEE30으로 지칭된다.
- [0038] 여기서, 상기 서열번호 6의 아미노산 서열은 마우스(mouse) AQEE30으로, 본 명세서에서는 mAQEE30으로 지칭된다.
- [0039] 본 발명의 약학 조성물은 대사성 골 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있으며, 특히 조골세포 및 파골세포의 불균형으로 인해 유발되는 골 관련 질환에 제한없이 사용될 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 골 질환은 골다공증, 치주질환, 골절 또는 파제트병일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0041] 본 발명에서 용어 "골 질환의 예방 또는 치료"란, 대사성 골 질환, 특히 골다공증, 치주질환, 골절 및 파제트병의 예방 및 완전한 또는 부분적인 치료를 포함하며, 또한 골대사성 질환 증상의 감소, 개선, 그 증상의 고통 경감, 대사성 골 질환 발병률의 감소 또는 치료 결과를 증가시키는 환자의 모든 변화를 포함한다.
- [0042] 상기 "골다공증(osteoporosis)"은 골 조직의 석회화 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지는 상태로, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다.
- [0043] 골량은 유전적 요인, 영양 섭취, 호르몬의 변화, 운동 및 생활 습관의 차이 등 여러 가지 요인들에 의해 영향을 받으며, 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소절제 등이 알려져 있다.
- [0044] 상기 "치주질환"은 세균에 의해 야기되는 치아지지 조직의 염증상태를 말하며, 치은염 및 치주염으로 분리할 수 있다. 발병원인은 불량한 구강 위생상태로 인한 구강 세균이 치면세균막을 형성하는데 있다. 치면세균막이란 침에 있는 끈끈한 물질을 접착제로 이용하여 세균이 치아 표면에 달라붙은 후 증식한 세균덩어리를 말한다. 치면세균막은 그냥 방치해 두면, 염증이 생겨 가끔 잇몸에서 피가 나고, 구취가 나는 경우가 있으며 이러한 증상을 치은염이라고 한다. 치은염이 더 진행되면, 치아와 잇몸사이의 벌어진 틈이 더 깊어져서 치주낭이 생기고, 여기에 치주질환을 일으키는 세균들이 번식하여 치주염이 발생 된다. 치주염이 진행되면 잇솔질과 같은 약한 자극에도 잇몸에서 피가 나기도 하며 붓고, 종종 급성염증으로 변화되어 통증을 유발한다. 이러한 염증은 골을 만드는 기능은 저하시키고, 골을 흡수하는 작용이 높아져서 치조골이 점점 낮아지게 되어 치조골이 파괴되고 결국 치아를 상실하게 된다.
- [0045] 상기 "골절"은 뼈나 골단관 또는 관절면의 연속성이 비정상적으로 끊어진 상태로, 뼈의 깨짐을 일컫는다. 골절을 유발하는 원인으로는 교통사고 등의 외상, 산업장애에서 일어나는 안전사고, 골다공증, 골암, 대사이상증 등의 질병으로 인한 뼈의 변화 및 스포츠나 하중으로 인한 반복적인 뼈에 대한 스트레스 등이 있다. 또한, 골절 상태는 골절선(골 절단면에 의해 발생된 뼈끝단을 따른 선)에 근거하여, 균열 골절, 그린스틱(greenstick) 골절, 횡상 골절, 사상 골절, 나선상 골절, 분절 골절, 분쇄골절, 건열 골절, 압박 골절, 함몰 골절 등으로 분류된다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물에 포함되는 펩티드는 피질골 강화 효과를 특징점으로 하는바, 피질골로 이루어진 비척추 골절의 예방 또는 치료에 탁월한 효과를 나타낸다.
- [0047] 본 발명에서, 용어 "약학 조성물(pharmaceutical composition)"은 본 발명의 다양한 VGF 유래 펩티드 및 이의 변형된 형태에 희석제 또는 담체와 같은 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 포함하는 혼합물을 의미한다. 이러한 약학 약학조성물은 임의로 하나 이상의 추가 치료 활성제를 포함할 수도 있다. 일부 실시예에 따르면, 본 발명의 펩티드를 포함하는 약학 조성물을 그 필요에 따라 대상체에게 투여하는 방법이 제공되어 있다. 일부 실시예에서, 본발명의 조성물은 인간에게 투여할 수 있다.
- [0048] 본원에 제공된 약학적 조성물의 설명은 원칙적으로 인간에게 투여하기 위한 약학 조성물에 관한 것이지만, 통상의 기술자는 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에게 투여하기 적합함을 이해하게 될 것이다. 다양한 동물에게 투여하기 위한 약학 조성물의 변형을 잘 이해하고, 숙련된 수의학 약리학자는 필요하다면 단순히 통상적인 실험으로 이러한 변형을 설계 및/또는 수행할 수 있다.
- [0049] 본원에서 기술한 약학 조성물은 약리학 분야에 알려져 있거나 이후 내용에서 전개되는 임의의 방법에 의해 제조

될 수도 있다. 일반적으로, 이러한 정제용 방법은 활성 성분을 부형제 및/또는 하나 이상의 다른 보조 성분과 연관시키는 단계를 포함하고, 이어서 필요하거나 원하는 경우 생성물을 원하는 단일- 또는 다중-용량 단위로 성형 및/또는 포장하는 단계를 포함한다.

- [0050] 본 발명의 약학 조성물은 단일 단위 용량 및/또는 복수의 단일 단위 용량으로서 제조, 포장, 및/또는 포장하지 않은 채로 판매될 수도 있다. 본원에서 사용하는 바와 같이, "단위 용량"은 사전 설정된 양의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 대상체에게 투여되는 활성 성분의 투여량 및/또는 그러한 투여량의 편리한 분획 예컨대 예를 들어 투여량의 1/2 또는 1/3과 일반적으로 동일하다.
- [0051] 본 발명의 약학 조성물 내 활성 성분, 제약상 허용되는 부형제, 및/또는 임의의 추가 성분의 상대량은 치료 대상체의 동일성, 크기, 및/또는 장애에 따라 그리고 조성물이 투여되는 경로에 따라 변할 것이다. 예로서, 조성물은 0.1% 내지 100% (w/w) 활성 성분을 포함할 수도 있다.
- [0052] 본원에서 사용하는 바와 같이, 제약상 허용되는 부형제는 특정한 투여 형태 목적에 적합한 임의의 모든 용매, 분산 매질, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산액 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장화제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함한다. 레밍턴(Remington)의 문헌[The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro, (Lippincott, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006)]은 약학 조성물 조제에 사용된 다양한 부형제 및 이의 제조를 위한 공지된 기술을 개시한다. 임의의 통상적인 담체 배지가 예컨대 임의의 원하지 않는 생물학적 효과를 제공하거나 다르게는 약학 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용함으로써 물질 또는 그 유도체와 공존할 수 없는 것을 제외하고, 그 용도는 본 발명의 범위 내에 있는 것으로 고려한다.
- [0053] 일부 실시예에서, 제약상 허용되는 부형제는 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 순수하다.
- [0054] 일부 실시예에서, 부형제는 인간 및 수의학적 용도에서 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국식품의약품국에 의해 승인되어 있다. 일부 실시예에서, 부형제는 제약 등급이다. 일부 실시예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전(EP)의 표준을 충족한다.
- [0055] 약학 조성물의 제조에 사용된 제약상 허용되는 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 봉해제, 결합제, 보존제, 완충제, 윤활제, 및/또는 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 이러한 부형제는 임의로 본 발명의 제제에 포함될 수도 있다. 부형제 예컨대 코코아 버터 및 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미제, 및 향미제는 조제사의 판단에 따라 조성물에 존재할 수 있다.
- [0057] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 칼슘 히드로젠 포스페이트, 인산나트륨 락토스, 수크로스, 셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말형 당, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 소듐 스타치 글리콜레이트, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로스 및 목재 생성물, 천연 스폰지, 양이온-교환 수지, 탄산칼슘, 규산염, 탄산나트륨, 가교-결합형 폴리(비닐-피롤리돈) (크로스포비돈), 소듐 카르복시메틸 전분 (소듐 스타치 글리콜레이트), 카르복시메틸 셀룰로스, 가교-결합형 소듐 카르복시메틸 셀룰로스 (크로스카르멜로스), 메틸셀룰로스, 예비젤라틴화 전분 (전분 1500), 미세결정질 전분, 수불용성 전분, 칼슘 카르복시메틸 셀룰로스, 규산알루미늄마그네슘 (비검), 소듐 라우릴 술포에이트, 4급 암모늄 화합물, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0059] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제 (예를 들어 아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산나트륨, 트라가칸트, 촌드럭스(chondrux), 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카세인, 양모 지방, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토 (예를 들어 벤토나이트 [규산알루미늄] 및 비검 [규산알루미늄마그네슘]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알콜 (예를 들어 스테아릴 알콜, 세틸 알콜, 올레일 알콜, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세릴 모노스테아레이트, 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알콜), 카르보머 (예를 들어 카르복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카르복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로스 유도체 (예를 들어 카르복시메틸셀룰로스 소듐, 분말화 셀룰로스, 히드록시메틸 셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스), 소르비탄 지방산 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트 [트윈 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 [트윈 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트 [트윈 80], 소르비탄 모노팔미테이트 [스판 40], 소르비탄 모노스테아레이트 [스

팬 60], 소르비탄 트리스테아레이트 [스팬 65], 글리세릴 모노올레에이트, 소르비탄 모노올레에이트 [스팬 80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르 (예를 들어 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트 [미르즈 45], 폴리옥시에틸렌 수산화 피마자 오일, 폴리옥시실화 피마자 오일, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트, 및 솔루톨), 수크로스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르 (예를 들어 크레모포르), 폴리옥시에틸렌 에테르, (예를 들어 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르 [브리즈 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 올레산나트륨, 칼륨 올레에이트, 에틸 올레에이트, 올레산, 에틸 라우레이트, 소듐 라우릴 술페이트, 플루로닉 F 68, 폴록사머 188, 세트리모늄 브로마이드, 세틸피리디늄 클로라이드, 벤즈알코늄 클로라이드, 도큐세이트 소듐, 및/또는 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0060] 예시적인 결합제는 전분 (예를 들어 옥수수 전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당 (예를 들어 수크로스, 글루코스, 텍스트로스, 텍스트린, 당밀, 락토스, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검 (예를 들어 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리쉬 모스의 추출물, 판워 검, 새티 검, 이사폴 후스쿠스의 점액, 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필 메틸셀룰로스, 미세결정질 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 폴리(비닐-피롤리돈), 규산알루미늄마그네슘 (비검), 및 라치 아라보갈락탄); 알기네이트; 폴리에틸렌 옥시드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘 염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알콜; 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0061] 예시적인 보존제는 항산화제, 킬레이트화제, 향미생물 보존제, 항진균 보존제, 알콜 보존제, 산성 보존제, 및 다른 보존제를 포함할 수도 있다. 예시적인 항산화제는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 메타중아황산칼륨, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 및 아황산나트륨을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 킬레이트화제는 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA), 시트르산 1수화물, 이나트륨 에데테이트, 이칼륨 에데테이트, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 소듐 에데테이트, 타르타르산, 및 트리소듐 에데테이트를 포함한다. 예시적인 향미생물 보존제는 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드, 벤질 알콜, 브로노폴, 세트리미드, 세틸피리디늄 클로라이드, 클로르헥시딘, 클로로부탄올, 클로로크레졸, 클로로크실레놀, 크레졸, 에틸 알콜, 글리세린, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알콜, 페닐질산수은 (phenylmercuric nitrate), 프로필렌 글리콜, 및 티메로살을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 항진균 보존제는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 히드록시벤조산, 칼륨 벤조에이트, 소르브산칼륨, 벤조산나트륨, 프로피온산나트륨, 및 소르브산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 알콜 보존제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀계 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 히드록시벤조에이트, 및 페닐에틸 알콜을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 산성 보존제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로틴, 시트르산, 아세트산, 데히드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산, 및 피트산을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 보존제는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 데테록시메 메실레이트, 세트리미드, 부틸화 히드록시아니솔 (BHA), 부틸화 히드록시톨루엔드 (BHT), 에틸렌디아민, 소듐 라우릴 술페이트 (SLS), 소듐 라우릴 에테르 술페이트 (SLES), 중아황산나트륨, 메타중아황산나트륨, 칼륨 술파이트, 메타중아황산칼륨, 글리칸트 플러스, 페노립, 메틸파라벤, 저물 115, 게르바벤 II, 네올론, 카톤, 및 에옥실을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 특정 실시예에서, 보존제는 항-산화제이다. 다른 실시예에서, 보존제는 킬레이트화제이다.

[0062] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충 용액, 아세트이트 완충 용액, 포스페이트 완충제 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 칼슘 시트레이트, 칼슘 글루비오네이트, 칼슘 글루셉테이트, 칼슘 글루코네이트, D-글루콘산, 글리세로인산칼슘, 락트산칼슘, 프로판산, 칼슘 레볼리네이트, 펜탄산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 수산화칼슘 포스페이트, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 글루콘산칼륨, 칼륨 혼합물, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산칼륨, 인산칼륨 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 시트르산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 피로젠-자유수, 등장성 염수, 링거(Ringer's) 용액, 에틸 알콜, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0063] 예시적인 윤활제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 활석, 맥아, 글리세릴 베하네이트, 수산화 식물성 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 마그네슘 라우릴 술페이트, 소듐 라우릴 술페이트, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0064] 예시적인 오일은 아몬드, 살구 커널, 아보카도, 바바수야자, 베르가모트, 흑색 커런트 종자, 보리지, 케이드, 카모마일, 카놀라, 카라웨이, 카르나우바, 카스토르, 시나몬, 코코아 버터, 코코넛, 대구 간, 커피, 옥수수, 목화 종자, 예뮬, 유칼립투스, 달맞이꽃, 생선, 아마 씨, 게라니올, 호박, 포도 종자, 개암, 히습, 이소프로필 미

리스테이트, 호호바, 쿠쿠이 너트, 라반딘, 라벤더, 레몬, 리트세아 쿠베바, 마카데미아 너트, 아욱, 망고 종자, 메도우폼 종자, 민트, 넛맥, 올리브, 오렌지색의 오렌지색 라피, 팜, 팜핵, 복숭아 커널, 땅콩, 양귀비 종자, 호박 종자, 평지씨, 쌀겨, 로즈마리, 홍화, 샌달우드, 사스쿠아나, 세이보리, 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 티트리, 엉겅퀴, 쓰바키, 베티버, 호두, 및 밀 배아 오일을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 오일은 부틸 스테아레이트, 카프릴산 트리글리세리드, 카프르산 트리글리세리드, 시클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 미네랄 오일, 옥틸도데칸올, 올레일 알콜, 실리콘 오일, 및 이들의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0065] 경구 및 비경구 투여를 위한 액체 투여 형태는 제약상 허용되는 에멀전, 마이크로에멀전, 용액, 현탁액, 시럽 및 엘릭시르를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 활성 성분 외에, 액체 투여 형태는 본 기술분야에 공동으로 사용된 불활성 희석제 예컨대, 예를 들어, 물 또는 다른 용매, 가용화제 및 유화제 예컨대 에틸 알콜, 이소프로필 알콜, 에틸 카르보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일 (특히, 목화씨, 땅콩, 옥수수, 쌀, 올리브, 아주까리, 및 참깨 오일), 글리세롤, 테트라히드로프루피톨 알콜, 소르비탄의 폴리에틸렌 글리콜 및 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물을 포함할 수도 있다. 불활성 희석제 외에, 경구 조성물은 아주반트 예컨대 습윤제, 유화제 및 현탁화제, 감미제, 향미제, 및 피복제를 포함할 수 있다. 비경구 투여를 위한 특정 실시예에서, 본 발명의 펩티드는 가용화제 예컨대 크레모포르, 알콜, 오일, 변성 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 시클로텍스트린, 중합체, 및 이들의 조합과 혼합된다.

[0066] 주사가능한 제제, 예를 들어, 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액은 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 공지된 기술 분야에 따라 조제될 수도 있다. 멸균 주사가능한 제제는 비독성 비경구 허용되는 희석제 또는 용매, 예를 들어, 1,3-부탄디올 내 용액에서의 멸균 주사가능한 용액, 현탁액 또는 에멀전일 수도 있다. 허용되는 비히클 및 용매 중에서 채택될 수도 있는 것은 물, 링거(Ringer's) 용액, U.S.P. 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 또한, 멸균, 고정 오일은 통상적으로 용매 또는 현탁 매질로서 채택되고 있다. 이를 위하여 합성 모노- 또는 디글리세리드를 포함하는 임의의 무자극 고정 오일이 채택될 수 있다. 또한, 지방산 예컨대 올레산이 주사제의 제조에 사용되고 있다.

[0067] 주사가능한 제제는 예를 들어 박테리아-보유 필터를 통한 여과에 의해, 또는 사용 전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사가능한 배지에 용해 또는 분산될 수 있는 멸균 고체 조성물의 형태인 멸균제를 포함시킴으로써 멸균될 수 있다.

[0068] 약물의 효과를 연장하기 위하여, 흔히 피하 또는 근육내 주사로부터 약물의 흡수를 느리게 하는 것이 바람직하다. 이는 낮은 수용해도를 갖는 결정질 또는 무정형 물질의 액체 현탁액을 사용함으로써 이루어진다. 그러면 약물의 흡수율은 결국 결정 크기 및 결정질 형태에 좌우될 수 있는 용해율에 좌우된다. 대안으로, 비경구 투여 약물의 지연된 흡수는 오일 비히클에서 약물을 용해 또는 현탁화함으로써 이루어진다.

[0069] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 주사제는 데포 (depot) 주사제일 수 있다.

[0070] 경구 투여를 위한 고체 투여 형태는 캡슐, 정제, 환제, 분말, 및 과립을 포함한다. 이러한 고체 투여 형태에서, 활성 성분은 하나 이상의 불활성 제약상 허용되는 부형제 또는 담체 예컨대 시트르산나트륨 또는 인산이칼슘 및/또는 a) 충전제 또는 증량제 예컨대 전분, 락토스, 수크로스, 글루코스, 만니톨, 및 규산, b) 결합제 예컨대, 예를 들어, 카르복시메틸셀룰로스, 알기네이트, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈, 수크로스, 및 아카시아, c) 합습제 예컨대 글리세롤, d) 붕해제 예컨대 한천, 탄산칼슘, 감자 또는 타피오카 전분, 알긴산, 특정 규산염, 및 탄산나트륨, e) 용해 지연제 예컨대 파라핀, f) 흡수 촉진제 예컨대 4급 암모늄 화합물, g) 습윤제 예컨대, 예를 들어, 세틸 알콜 및 글리세롤 모노스테아레이트, h) 흡수제 예컨대 카올린 및 벤토나이트 점토, 및 i) 윤활제 예컨대 활석, 스테아르산칼슘, 스테아르산마그네슘, 고체 폴리에틸렌 글리콜, 소듐 라우릴 술페이트, 및 이들의 혼합물과 혼합되어 있다.

[0071] 캡슐의 경우, 정제 및 환제, 투여 형태는 완충제를 포함할 수 있다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 그러한 부형제로서 사용하는 연질 및 결정-충진된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 채택될 수도 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여 형태는 코팅 및 셀 예컨대 장용 코팅 및 제약 조제 분야에 잘 알려진 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 포함할 수도 있고, 활성 성분만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분, 임의로는 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다. 유사한 유형의 고체 조성물은 락토스 또는 유당뿐만 아니라 고분자량 폴리에틸렌 글리콜 등을 그러한 부형제로서 사용하는 연질 및 경

질-충전된 젤라틴 캡슐에서 충전제로서 채택될 수도 있다.

[0072] 활성 성분은 상술한 하나 이상의 부형제와 함께 마이크로-캡슐화된 형태일 수 있다. 정제, 당의정, 캡슐, 환제, 및 과립의 고체 투여 형태는 코팅 및 쉘 예컨대 장용 코팅, 방출 제어 코팅 및 제약 조제 분야에 잘 알려진 다른 코팅과 함께 제조될 수 있다. 이러한 고체 투여 형태에서 활성 성분은 하나 이상의 불활성 희석제 예컨대 수크로스, 락토스 또는 전분과 혼합될 수도 있다. 이러한 투여 형태는 보통 실시에서처럼 불활성 희석제가 아닌 추가 물질, 예를 들어, 정제 윤활제 및 다른 정제 보조제 예컨대 스테아르산마그네슘 및 미세결정질 셀룰로스를 포함할 수 있다. 캡슐의 경우, 정제 및 환제, 투여 형태는 완충제를 포함할 수도 있다. 이들은 임의로 불투명화제를 포함할 수도 있고, 활성 성분만을, 또는 우선적으로, 장관의 특정 부분, 임의로는 지연된 방식으로 방출하는 조성물일 수 있다. 사용될 수 있는 포매 조성물의 예는 중합체 물질 및 왁스를 포함한다.

[0073] 본원에서 기술한 본 발명의 펩티드는 전형적으로 쉬운 투여 및 균일한 투여를 위하여 투여 단위 형태로 제조된다. 그러나 본 발명의 약학 조성물의 총 일일 용법은 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 담당의에 의해 결정될 것임을 이해하게 될 것이다. 임의의 특정 대상체에 대한 특정한 치료 유효 용량 수준은 질환, 장애, 또는 치료 중인 장애 및 장애의 심각도를 포함하는 다양한 인자; 채택된 특정 활성 성분의 활성; 채택된 특정 조성물; 대상체의 나이, 체중, 전반적인 건강, 성별 및 다이어트; 채택된 특정 활성 성분의 투여 시간, 투여 경로, 및 배설율; 치료 기간; 채택된 특정 활성 성분과 조합하거나 동시에 사용한 약물; 및 의료 분야에 잘 알려진 인자 등에 좌우될 것이다.

[0074] 본 발명의 다양한 VGF 유래 펩티드, 또는 이의 약학 조성물은 임의의 경로로 투여될 수도 있다. 일부 실시예에서, 상기 펩티드, 또는 이의 약학 조성물은 경구, 정맥내, 근육내, 동맥내, 수질내, 척수강내, 피하, 뇌실내, 경피, 피내, 직장, 질내, 복강내, 국소(분말, 연고, 크림, 및/또는 액적에 의함), 점막, 코, 입, 경장, 설하; 기관내 점적주입, 기관지 점적주입, 및/또는 흡입; 및/또는 경구 스프레이, 비강 스프레이, 및/또는 에어로졸을 포함하는 다양한 경로에 의해 투여된다. 구체적으로 고려되는 경로는 침투성 정맥내 주사, 혈액 및/또는 림프 공급을 통한 국부 투여, 및/또는 환부 부위에 대한 직접 투여이다. 일반적으로 투여의 가장 적합한 경로는 작용제의 특성(예를 들어, 위장관의 환경에서의 안정성), 및 대상체의 장애(예를 들어 대상체가 경구 투여를 참을 수 있는지 여부)를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 것이다. 그러나 본 발명은 약물 전달 분야에서의 진전을 고려하는 임의의 적절한 경로에 의한 본 발명에 따른 약학 조성물의 전달을 포함한다.

[0075] 특정 실시예에서, 본 발명의 펩티드, 또는 이의 약학 조성물은 매일 대상체 체중의 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 50 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 40 mg/kg, 약 0.5 mg/kg 내지 약 30 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 약 0.1 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 1 mg/kg 내지 약 25 mg/kg을 하루에 1 회 이상 전달하기 충분한 투여량 수준으로 투여하여 원하는 치료 효과를 얻을 수도 있다. 목적 투여량은 하루에 세 번, 하루에 두 번, 하루마다, 이틀마다, 삼일마다, 매주마다, 2주마다, 3주마다, 또는 4주마다 전달될 수도 있다. 특정 실시양태에서, 목적 투여량은 다중 투여(예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 회 이상의 투여)를 통해 전달될 수도 있다.

[0076] 본원에서 기술한 용량 범위는 성인에게 제공된 약학 조성물의 투여에 대한 가이드를 제공할 수 있다. 예를 들어 어린이 또는 청소년에게 투여되는 양은 전문의 또는 본 기술분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있고, 성인에게 투여되는 것보다 적거나 동일할 수 있다. 유효량을 달성하는 데 요구되는 본 발명에 따른 펩티드의 정확한 양은 예를 들어 대상체의 종, 나이, 및 전반적인 장애, 부작용 또는 장애의 심각도, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다.

[0077] 본 발명의 펩티드 또는 이의 약학 조성물은 조합 요법으로 사용될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 조합 요법에 사용되기 위한 치료의 특정한 조합(치료제 또는 절차)은 달성될 목적 치료 효과 및 목적 치료제 및/또는 절차의 적합성을 고려할 것이다.

[0078] 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 또는 하나 이상의 치료 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. "조합"의 경우, 다음 전달 방법이 본 발명의 범위에 속하긴 하지만, 작용제가 꼭 동일한 시간에 투여되어야 하고/하거나 같이 전달되기 위해 제형화되어야 한다는 것을 시사하도록 의도되진 않는다. 조성물은 하나 이상의 다른 목적 치료제 또는 의료 절차와 동시에, 그보다 먼저, 또는 그 이후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각 작용제는 그 작용제에 대해 정해진 투여량 및/또는 시간 스케줄로 투여될 것이다. 추가로, 본 발명은 신체 내에서 그의 생체이용률을 개선시키고, 그의 대사를 감소 및/또는 수정하고, 그의 분비를 억제하고, 및/또는 그의 분포를 수정할 수 있는 작용제와 조합하여 본 발명의 약학 조성물을 전달하는 것을 아우른다. 이 조합에서 사용되는 본 발명의 펩티드 및 치료 활성제는 단일 조성물로 같이 투여되거나 상이한 조성물로 별도로 투여될 수 있다는 것이 더 이해될 것

이다.

- [0079] 조합 요법에 사용되는 특정한 조합은 달성될 목적 치료 효과 및/또는 본 발명의 펩타이드를 포함하는 절차 및/또는 치료 활성제의 적합성을 고려할 것이다. 사용되는 조합은 동일한 장애에 대해 목적 효과를 달성할 수 있고 (예를 들어, 본 발명의 펩티드는 동일한 장애를 치료하는 데 사용되는 또 다른 치료 활성제와 병용하여 투여될 수 있다), 및/또는 이것들은 상이한 효과를 달성할 수 있다(예를 들어, 임의의 부작용 제어)는 것이 이해될 것이다.
- [0080] 본원에서 사용되는, "치료 활성제"는 장애를 치료, 예방, 지연, 환원 또는 개선시키기 위한 의약으로서 사용되는 임의의 물질을 가리키고, 예방적 및 치유적 치료를 포함하는, 치료에 사용되는 물질을 가리킨다.
- [0081] 일부 실시예에서, 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 골 질환 증상을 치료, 경감, 개선, 완화시키고, 그 개시를 지연시키고, 그 진행을 억제시키고, 그 중증도를 감소시키고, 및/또는 그 발생률을 감소시키는 데 유용한 임의의 치료 활성제 또는 절차 (예를 들어, 수술, 방사선 요법)와 조합하여 투여될 수 있다.
- [0082] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 펩티드는 골 흡수 억제제와 병용될 수 있다. 병용되는 골 흡수 억제제의 종류는 졸레드론산을 포함하는 비스포스포네이트, SERM 또는 데노수맙이 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0083] 본 발명의 다양한 VGF 유래 펩티드 및 이의 변형된 형태는 식품 조성물로 제공될 수 있으며, 상기 식품 조성물은 건강기능식품으로 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드가 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩티드를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 다른 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0084] 본 발명에서의 용어 "건강기능식품"이란, 건강보조의 목적으로 특정 성분을 원료로 하거나 식품 원료에 들어있는 특정 성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말하며, 상기 성분에 의해 생체방어, 생체리듬의 조절, 질병의 방지와 회복 등 생체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발휘할 수 있도록 설계되고 가공된 식품을 말하는 것으로서, 상기 건강식품용 조성물은 질병의 예방 및 질병의 회복 등과 관련된 기능을 수행할 수 있다.
- [0085] 또한, 본 발명의 식품 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 펩티드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.
- [0086] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0087] <실시예 1> VGF의 골세포(Osteocyte)에 미치는 작용
- [0088] Cortical bone 강화를 위해서는, 조골세포에 의한 골형성과 파골세포에 의한 골흡수 뿐만 아니라, 피질골에 풍부하게 존재하는 골세포(Osteocyte)가 건강하여야 한다.
- [0089] 생체 수준에서 골세포(Osteocyte)에 대한 작용을 관찰하기 위하여 VGF 결핍 마우스 뼈를 4% 파라포름알데히드 용액에 24시간 고정시킨 후, 0.5M EDTA로 14일간 탈석회화(decalcification)를 시킨 후 파라핀 절단(paraffin section)하였다. 얻어진 절편은 H&E 염색을 수행하여 피질골에 존재하는 골세포(osteocyte) 세포수를 카운팅하였다.
- [0090] 세포 수준에서 세포사멸(apoptosis) 억제 효과를 확인하기 위하여 Tunnel staining Kit (Roche)와 Tunnel assay kit (Millipore)를 사용하여 측정하였다.
- [0091] 구체적으로, osteocyte-like cell line 중 하나인 MLO-Y4 cell을 24 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후 VGF hAQEE30 5 μ M을 48시간 처리하였다. 이때 세포사멸(apoptosis)을 유도하기 위하여 배양액에 serum을 제거하였고 음성대조군은 serum (2.5% FBS, 2.5% FCS)을 추가하였다. 세포 사멸(Apoptosis) 억제 효과는 상용화되어 있는 Tunnel staining Kit (Roche)와 Tunnel assay kit (Millipore)를 사용하여 확인하였다.

- [0092] 그 결과, VGF 결핍 마우스에서는 피질골의 골세포(Osteocyte)가 감소하는데, 이는 VGF hAQEE30이 골세포(Osteocyte)의 세포사멸(apoptosis)을 억제하기 때문임을 확인하였다(도 3).
- [0093] <실시예 2> hAQEE30의 조골세포 분화 촉진 효과의 확인
- [0094] 조골세포는 간엽줄기세포에서 기원하여 분화과정을 거쳐 뼈를 형성하는 성숙한 조골세포로 발달하게 되는데 조골세포의 분화에 의해 만들어지는 칼슘 등을 포함한 무기질화는 뼈의 세기를 유지시켜 줄 뿐만 아니라, 신체 전체의 호르몬 대사 및 칼슘 항상성에도 매우 중요한 기능을 한다.
- [0095] 따라서, 본 실시예에서는 조골세포를 안정화시킨 뒤, 전체 VGF, NERP1, NERP2, AQEE19, hAQEE30, TLQP21 및 TLQP62의 다양한 VGF 유래 펩티드를 각각 골 분화 배지에 처리하여 각 VGF 유래 펩티드의 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하였다.
- [0096] 구체적으로, 골 분화가 유도된 세포를 PBS로 두 차례 씻어주고, 70% 에탄올 용액으로 2분간 고정시킨 후, 2% 알리자린 레드 S 용액으로 30분간 염색하였다. 그 다음 비특이적으로 염색된 부분을 멸균수로 수차례 씻어 주었다. 탈색은 10%(w/v) 세틸피리디늄클로라이드(cetylpyridinium chloride) 용액으로 실온에서 30분간 반응시켰고, 상층액은 마이크로플레이트 판독기로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0097] 그 결과, 도 4의 A에 나타난 바와 같이 hAQEE30 및 TLQP62를 각각 처리한 그룹의 조골세포의 분화가 촉진되어 골 석회화가 다른 그룹에 비해 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.
- [0098] 또한, 상기와 동일한 방법으로 각 VGF 펩티드의 농도별 효과를 확인한 결과 도 4의 B에 나타난 바와 같이 hAQEE30만이 1 μ M 및 5 μ M의 농도에서 모두 조골세포의 분화를 촉진한다는 것을 확인하였다.
- [0099] <실시예 3> hAQEE30의 cAMP 촉진 효과의 확인
- [0100] 부갑상선 호르몬(PTH)은 수용체에 결합한 후 아데닐산 고리화효소(adenylyl cyclase)와 cAMP 증가를 경유하여 PKA (Protein Kinase A)를 활성화시키며 cAMP/PKA 신호전달이 조골세포에서의 중요한 신호전달체계인 것으로 알려져 있으며, 지속적인 cAMP 생성으로 칼슘 상승 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다.
- [0101] 따라서, 본 실시예에서는 hAQEE30과 PTH의 cAMP 촉진 효과를 확인하였다.
- [0102] 구체적으로, 조골세포에 5 μ M의 hAQEE30 및 100 nM의 PTH를 처리한 후 cAMP 분석 키트(Amersham Pharmacia, RPN 225)로 cAMP 양의 증가를 측정하였다.
- [0103] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 hAQEE30은 PTH와 동등한 수준의 cAMP 촉진 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [0104] <실시예 4> VGF KO (knock-out) 마우스의 마이크로-CT (micro-CT) 측정
- [0105] VGF KO 마우스로부터 대퇴골을 분리하여 80% 에탄올에 냉장 보관한 뒤, 마이크로-CT 촬영을 위해 마이크로 CT 스캐너(Inveon preclinical CT, Siemens Healthcare, Hoffman Estates, IL)로 측정하였다.
- [0106] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 VGF KO 마우스의 피질 면적(Ct.Ar), 피질골 면적/골막 외피 내부의 총 단면적(Ct.Ar/Tt.Ar), 피질골 두께(Ct.Th) 및 피질 단면적 두께(Ct.Cs.Th)가 유의적으로 감소되었음을 확인하였다.
- [0107] <실시예 5> VGF KO 마우스에서의 오스테오칼신의 정량적 측정 및 C-텔로펩티드(C-Telopeptide) 검사
- [0108] 1. 오스테오칼신 측정
- [0109] 오스테오칼린은 골기질에서 가장 중요한 비콜라겐 단백질로, 골 특이적이며, 비타민 K에 의존하는 칼슘-결합 단백질이다. 오스테오칼신은 골 형성 표지자로서 정의되고 이러한 목적으로 사용된다.
- [0110] 따라서, 본 실시예에서는 오스테오칼신 ELISA 키트(Biomedical Tech. Inc)와 ELISA 판독기를 이용하여 VGF KO 마우스로부터 분리된 혈청에서 오스테오칼신의 함량을 ng/ml의 단위로 측정하였다.
- [0111] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 VGF KO 마우스에서 오스테오칼신의 함량이 유의적으로 감소하였음을 확인하였다.
- [0112] 2. C-텔로펩티드 검사
- [0113] C-말단 텔로펩티드의 혈청 내 농도 상승은 골 소실률이 증가된 환자에서 나타나는 증상으로 보고되고 있으며,

골다공증이나 기타 뼈와 연관 질환에 대해 골소실 길항 치료(비스포스포네이트 또는 호르몬대체요법)에 대한 모니터링 방법으로 적합하다.

[0114] 따라서, 본 실시예에서는 VGF KO 마우스에서 골 흡수 지표인 C-텔로펩티드 활성을 RatLaps ELISA 키트 (Nordic Bioscience Diagnostics A/S, OsteoPark, Denmark)로 측정하였다.

[0115] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이 정상 대조군에 비해 KO VGF 마우스에서 C-텔로펩티드의 활성의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

[0116] <실시예 6> 마우스 독성 시험

[0117] 본 실시예에서는 hAQEE30의 단일 피하 주사에 따른 마우스의 생체 내 독성 (아나필락시스) 여부를 확인하였다.

[0118] 체중의 경우, 표 2에 나타난 바와 같이 모든 투여량에서 hAQEE30 투여 전후의 유의적인 변화가 관찰되지 않았다.

표 2

[0119] hAQEE30의 단일 피하 주사 전후의 체중 (g)

	대조군 (n = 5)	200 µg (n = 4)	500 µg (n = 5)	2,500 µg (n = 4)	7,500 µg (n = 4)	P-값
기준치	23.27±0.46	23.19±0.33	23.39±0.22	22.78±0.39	23.36±0.09	NS
1일	23.68±0.36	23.36±0.42	23.56±0.20	22.58±0.62	24.20±0.20	NS
4.5일	23.10±0.29	22.82±0.37	22.92±0.19	22.53±0.48	23.68±0.41	NS

[0120] 또한, 육안 검사에서도 뇌, 심장, 폐, 흉선, 간, 신장, 비장, 위, 소장, 지방, 근육, 두개관, 대퇴골, 경골 및 척추에 비정상적인 변화가 관찰되지 않았다. (데이터 미도시).마지막으로, 혈액 검사에서도 표 3에 나타난 바와 같이 투여 전후의 유의적인 해로운 변화는 관찰되지 않았다.

표 3

[0121]

	대조군 (n = 5)		7,500 µg (n = 4)		P-값
	Mean	SE	Mean	SE	
WBC (10 ³ / µL)	2.94	0.27805	4.1325	0.87237	NS
Hb (g/dL)	14.74	0.25612	14.8	0.21602	NS
Hct (%)	49.64	0.72842	50.7	0.67946	NS
혈소판 (10 ³ / µL)	731.36	226.13436	954	192.74638	NS
칼슘 (mg/dL)	8.892	0.07658	9.065	0.05909	NS
포스페이트 (mg/dL)	6.26	0.38417	6.255	0.18305	NS
AST (U/L)	26.2	1.75983	28.1	2.30326	NS
ALT (U/L)	93.66	18.55528	112.725	47.89411	NS
ALP (U/L)	406.6	10.283	360.975	21.74517	NS
BUN (mg/dL)	24.24	1.23919	25.425	0.83604	NS
크레아티닌 (mg/dL)	0.498	0.0097	0.4625	0.00629	0.023
글루코스 (mg/dL)	228.58	9.45862	210.725	9.35391	NS

[0122] <실시예 7> hAQEE30의 생체 내 효능의 확인

[0123] 본 실시예에서는 골다공증 마우스 모델에 피하 주사된 hAQEE30의 생체 내 효능을 확인하였다.

[0124] 표 4에 나타난 바와 같이, 30 µg의 hAQEE30 투여 후 BMD 및 BMC가 모두 유의적으로 증가함을 확인하였다.

표 4

[0125]

	대조군	hAQEE30 SQ		
		1 µg	10 µg	30 µg
처리 전 BMD (mg/cm ²)	0.0413±0.0003	0.0413±0.0005	0.0413±0.0003	0.0417±0.0003

처리 전 BMC (mg)	0.3923±0.0053	0.3923±0.0059	0.4070±0.0099	0.3847±0.0022
처리 후 BMD (mg/cm ²)	0.0443±0.0004	0.0447±0.0005	0.0450±0.0002	0.0460±0.0004*
처리 후 BMC (mg)	0.4158±0.0068	0.4393±0.0025	0.4418±0.0010	0.4567±0.0112*
BMD의 변화 %	7.25±1.18	8.43±0.72	8.88±0.88	10.27±1.03
BMC의 변화 %	5.98±0.42	12.13±1.25	8.78±2.49	18.7±2.90*

- [0126] 또한, hAQEE30의 생체 치료 효능 검증을 위해, 두개뼈(Calvaria bone) 형성을 확인하고자 하였다.
- [0127] 비척추 골절 예방에는 골격 외경과 골격 크기를 증가시키는 것이 가장 중요하다. 이를 확인 하기 위해 마우스 두개뼈(calvaria bone)의 좌측 외골막 (periosteal membrane)에 3 µg, 10 µg 의 hAQEE30을 5일간 주사 후, 마지막 주사로부터 14일 뒤 희생하였다. 얻어진 두개뼈는 4% 파라포름알데히드 용액에 24시간 고정시킨 후, 0.5M EDTA로 10일간 탈석회화(decalcification)를 시킨 후 파라핀 절단(paraffin section)하였다. 얻어진 절편은 Fast Green staining을 한 후 Image J 프로그램을 사용하여 두개뼈의 두께와 면적을 측정하였다.
- [0128] 그 결과, hAQEE30 10 µg 주사 군에서 두개뼈의 두께가 유의하게 증가되고, 주사 부위의 두개뼈 면적이 유의하게 증가됨을 확인하였다. 따라서 AQEE30이 비척추 골절 예방을 가능하게 할 수 있음을 입증하였다(도 8 및 도 9).
- [0129] <실시예 8> 변형된 hAQEE30 펩티드의 조골세포 분화 효과 확인
- [0130] 1. ALP 활성 측정
- [0131] 본 실시예에서는 표 5의 hAQEE30 및 이의 변형 형태의 펩티드의 효과를 확인하기 위해 조골세포의 알칼린 포스파타제 (ALP) 활성을 측정하였다.

표 5

[0132]

펩티드	아미노산 서열	서열번호
hAQEE30	AQEEAEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP	3
hAQEE30_sh_01	AEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP	4
hAQEE30_sh_02	VAEAEERRLQEQEELNYIEHVLLRRP	5

- [0133] 구체적으로, 일차 조골세포를 DMEM-HG에서 하룻밤 안정화시킨 뒤, 표 5의 펩티드를 각각 골 분화 배지에 처리하여 이들의 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하였다. ALP 염색은 패스트 바이올렛 B 염 키트 (Sigma Aldrich)로 30분간 반응시켰고, 다시 멸균수로 두 차례 씻어주었다. ALP 활성은 비색분석법 (colorimetric assay)으로 측정하였고, 5일간 분화를 유도한 후 차가운 PBS로 두차례 씻어주고, 0.5 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7.6)로 샘플링 하였다. 세포를 초음파 파쇄한 후, 12000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 따로 모아 p-니트로페닐포스페이트를 기질로 이용하여 450 nm에서 그 활성을 체크하였고, 이때 BCA 분석 키트를 이용하여 구한 전체 단백질의 농도를 기준으로 나누어 준 값을 비교하였다. 그 결과, 도 10의 A 및 B에 나타난 바와 같이 표 5의 펩티드를 처리한 모든 그룹에서 대조군보다 유의적으로 높은 ALP 활성을 나타냄을 확인하였다.
- [0134] 2. 알리자린 레드 S 염색
- [0135] 추가로, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 알리자린 레드 S 염색을 통해 표 5의 펩티드의 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하였다.
- [0136] 그 결과, 도 10의 C에 나타난 바와 같이 대조군을 제외한 모든 그룹에서 조골세포의 분화가 촉진되어 골 석회화가 유의적으로 증가하였음을 확인하였다.
- [0137] <실시예 9> 마우스 mAQEE30의 조골세포 생존능, 증식능 및 분화능 촉진 효과 확인
- [0138] 본 발명에 사용한 mAQEE30 펩티드의 아미노산 서열은 다음과 같다.
- [0139] AQEEADAEERRLQEQEELNYIEHVLLHRP (서열번호 6)

[0140] 1. mAQEE30의 조골세포 생존능 촉진 효과 확인

[0141] mAQEE30의 효과를 확인하기 위하여 조골세포의 생존능을 측정하였다.

[0142] 구체적으로, 조골세포를 96 well plate에 0.3×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후, mAQEE30 펩티드를 농도별로 48시간 처리하여 Cell Counting Kit-8 (CCK-8, Dojindo)을 사용하여 1시간 후 450nm에서 생존능을 측정하였다.

[0143] 그 결과, mAQEE30 처리한 그룹에서 대조군보다 유의적인 생존능 촉진 효과를 확인하였다(도 11).

[0144] 2. mAQEE30의 조골세포 증식능 촉진 효과 확인

[0145] mAQEE30의 효과를 확인하기 위하여 조골세포의 증식능을 측정하였다.

[0146] 구체적으로, 조골세포를 96 well plate에 0.3×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 세포를 안정화시킨 후, FBS 1 %가 포함된 배지로 변경하여 mAQEE30 펩티드를 농도별로 24시간 처리한 후 Brd-U labeling detection kit (Roche)를 사용하여 활성을 측정하였다.

[0147] 그 결과, mAQEE30 처리한 그룹에서 대조군보다 유의적으로 높은 증식 촉진 효과를 확인하였다(도 11).

[0148] 3. mAQEE30의 조골세포 분화 촉진 효과의 확인

[0149] mAQEE30의 효과를 확인하기 위하여 조골세포의 알칼린 포스파타제 (ALP) 활성을 측정하였다.

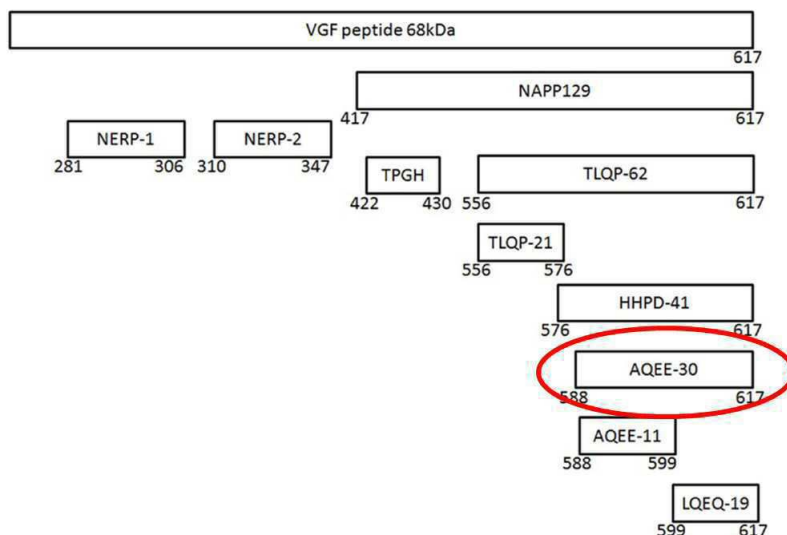
[0150] 구체적으로, 조골세포를 24 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 세포를 안정화시킨 뒤, mAQEE30 펩티드 1 μ M을 일반 배지와 골 분화 배지에 7일간 처리하여 이들의 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하였다. ALP 염색은 패스트 바이올렛 B 염 키트 (Sigma Aldrich)를 사용하여 스테이닝 하였고, ALP 활성은 비색분석법 (colorimetric assay)으로 측정하였다. 세포는 50 mM Tris-HCl (pH7.6)로 샘플링하여 초음파 파쇄한 후 원심분리하여 상층액을 따로 모아 p-니트로페닐포스페이트를 기질로 이용하여 450nm에서 그 활성을 체크하였고, 이때 BCA 분석 키트를 이용하여 얻어진 전체 단백질의 농도를 기준으로 나누어 준 값을 비교하였다.

[0151] 그 결과, 골분화 배지에 mAQEE30 처리한 그룹에서 대조군보다 유의적으로 높은 ALP 활성을 나타냄을 확인하였다(도 12).

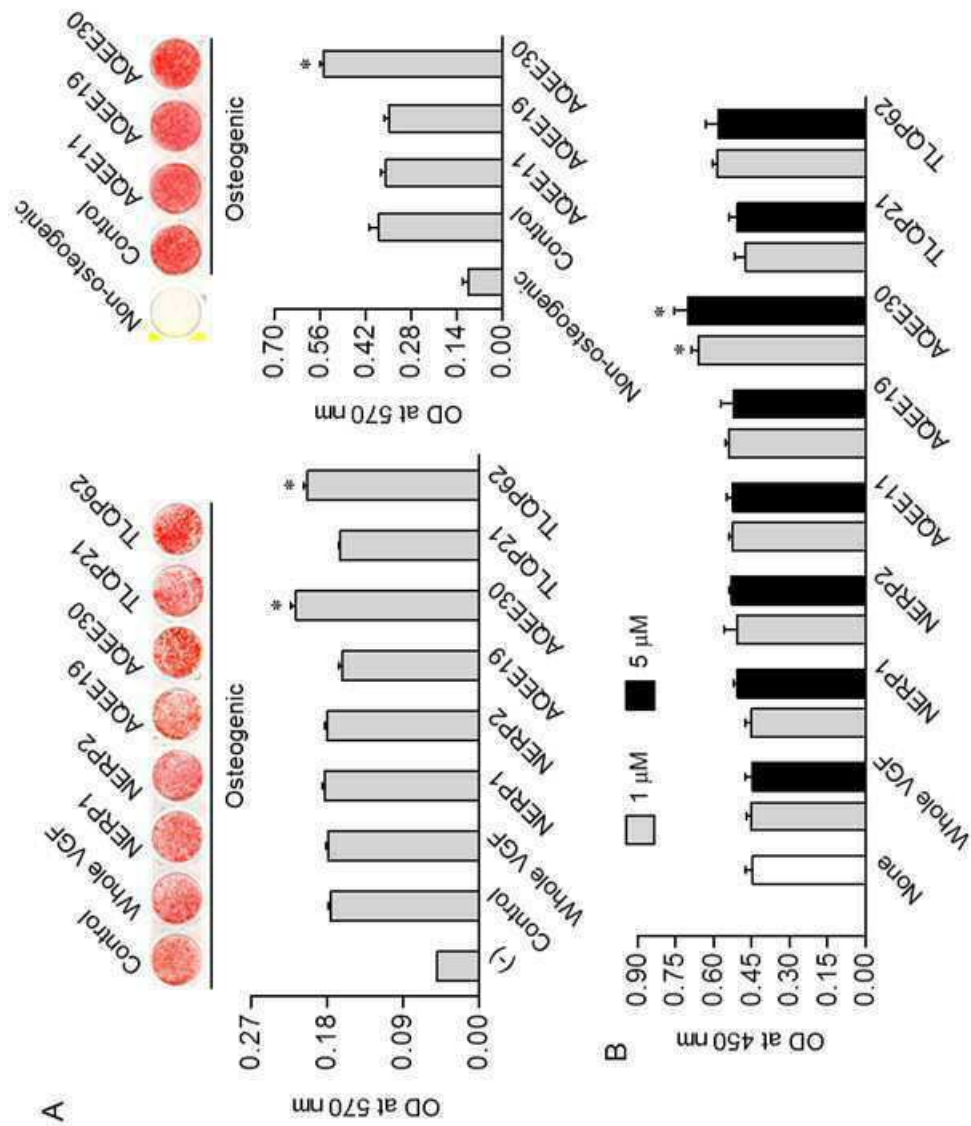
[0152] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

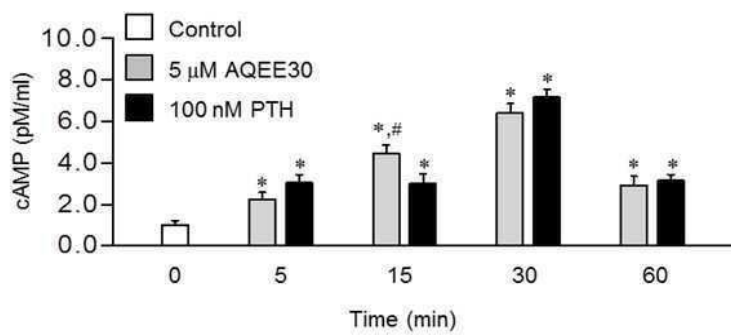
도면1



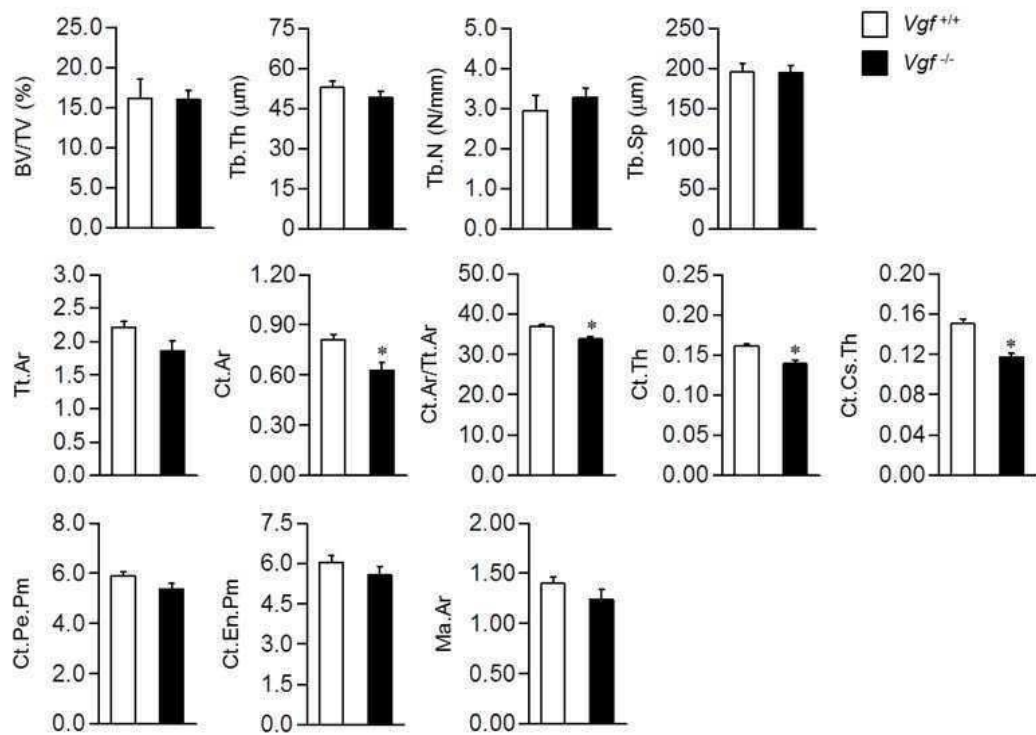
도면4



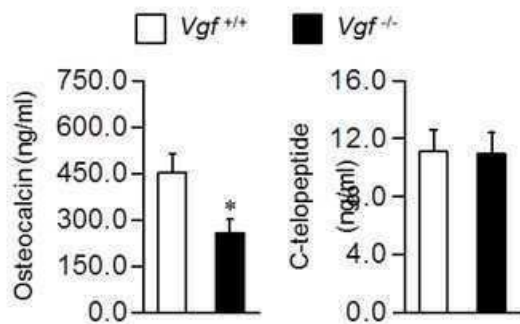
도면5



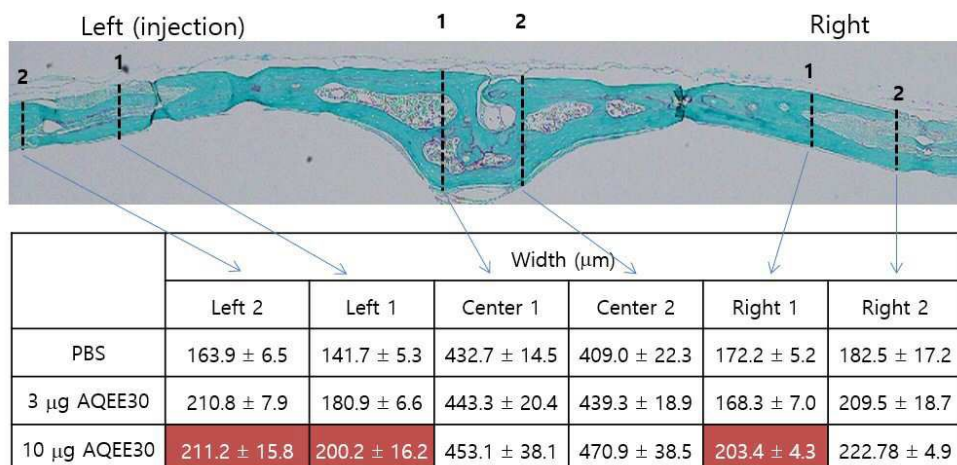
도면6



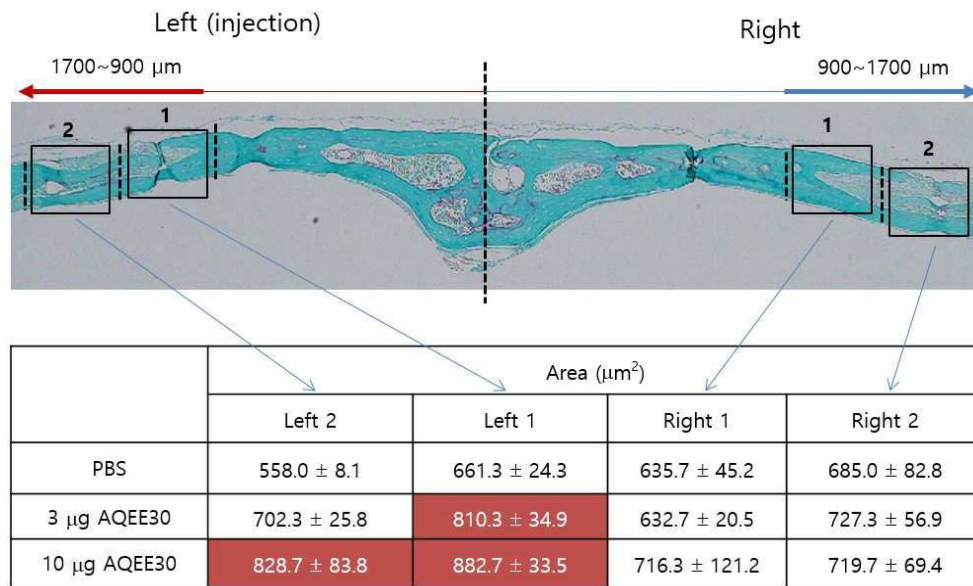
도면7



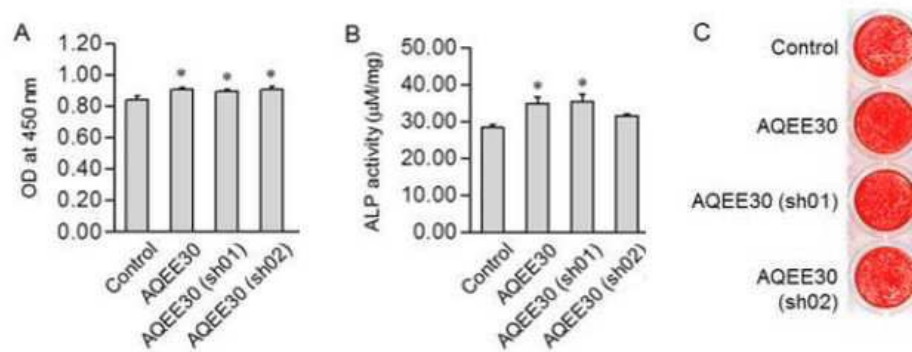
도면8



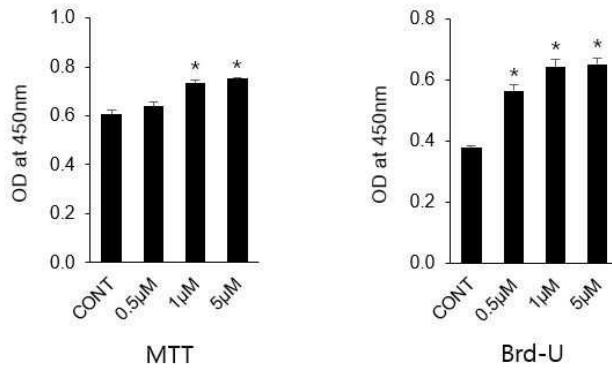
도면9



도면10



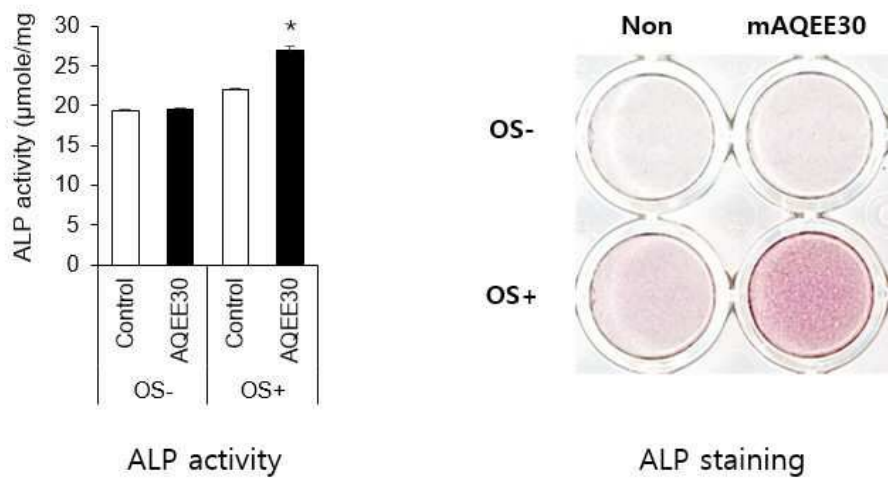
도면11



MTT	1	2	3	4	5	평균	표준편차	표준오차
CONT	0.587	0.634	0.605	0.652	0.550	0.606	0.040	0.018
0.5μM	0.607	0.598	0.678	0.634	0.678	0.639	0.038	0.017
1μM	0.686	0.740	0.752	0.741	0.748	0.733	0.027	0.012
5μM	0.742	0.744	0.755	0.744	0.772	0.751	0.012	0.005

Brd-U	1	2	3	4	5	6	평균	표준편차	표준오차
CONT	0.365	0.3948	0.4002	0.3871	0.3666	0.3548	0.378	0.018	0.008
0.5μM	0.5156	0.6236	0.5579	0.5638	0.5003	0.6224	0.564	0.052	0.021
1μM	0.7462	0.6755	0.6233	0.6097	0.5875	0.6229	0.644	0.058	0.024
5μM	0.593	0.6204	0.6443	0.6825	0.7225	0.6468	0.652	0.046	0.019

도면12



	ALP activity	1	2	3	평균	표준편차	표준오차
OS-	Control	19.1377	19.5456	19.3445	19.34	0.20	0.12
	AQEE30	19.4741	19.6152	19.7931	19.63	0.16	0.09
OS+	Control	21.8387	22.0108	22.3047	22.05	0.24	0.14
	AQEE30	27.5193	26.8039	26.8639	27.06	0.40	0.23

서열 목록

<110> THE ASAN FOUNDATION

University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation

<120> Composition for preventing or treating bone disease comprising
VGF-derived peptide

<130> ADP-2020-0621

<150> KR 10-2020-0001700

<151> 2020-01-06

<160> 8

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified hAQEE30 peptide

<400> 1

Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Glu Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Modified mAQEE30 peptide

<400> 2

Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Xaa Xaa Xaa Xaa

20 25 30

<210> 3

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAQEE30 peptide

<400> 3

Ala Gln Glu Glu Ala Glu Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Leu Arg Arg Pro

20 25 30

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAQEE30_sh_01 peptide

<400> 4

Ala Glu Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu Glu Leu Glu Asn

1 5 10 15

Tyr Ile Glu His Val Leu Leu Arg Arg Pro

20 25

<210> 5

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hAQEE30_sh_02 peptide

<400> 5

Val Ala Glu Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu Glu Leu Glu

1 5 10 15

Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Leu Arg Arg Pro

20 25

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> mAQEE30 peptide

<400> 6

Ala Gln Glu Glu Ala Asp Ala Glu Glu Arg Arg Leu Gln Glu Gln Glu

1 5 10 15

Glu Leu Glu Asn Tyr Ile Glu His Val Leu Leu His Arg Pro

	20	25	30	
<210>	7			
<211>	90			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	hAQEE30 nucleotide			
<400>	7			
	gcgcaggagg aggcggaggc ggaggagcgc cggctgcagg agcaggagga gctggagaat			60
	tacatcgagc acgtgctgct ccggcgcccg			90
<210>	8			
<211>	90			
<212>	DNA			
<213>	Artificial Sequence			
<220><223>	mAQEE30 nucleotide			
<400>	8			
	gcgcaggagg aagcggagc gcaggagcgc cggctgcagg agcaggagga gctggagaat			60
	tacattgagc acgtgctgct gcaccgccc			90