



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0061933  
(43) 공개일자 2015년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/08 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0146317

(22) 출원일자 2013년11월28일

심사청구일자 2013년11월28일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,  
부경대학교)

(72) 발명자

에스 더블유 에이 히마야

부산광역시 남구 용소로 45, 해양바이오프로세스연  
구단(대연동, 부경대학교)

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호(사직  
동, 쌍용예가)

(74) 대리인

위병갑

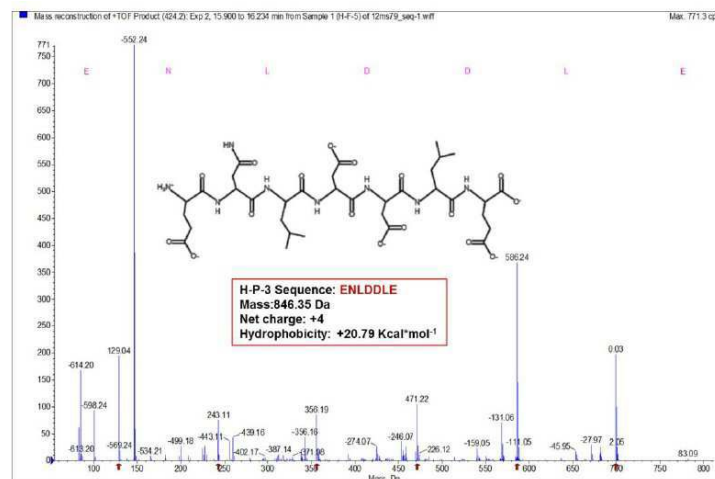
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 및 예방용 조성물

### (57) 요약

본 발명은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 장 신경교세포의 과도한 활성을 억제하여 정상 장 세포를 보호하는 효과를 발휘하는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 관련 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화로 야기되는 정상 장세포의 밀착 결합(tight junction) 손상을 감소시키고, 정상 장 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시키며, 정상 장 세포의 세포사멸을 억제하는 효과를 가지고 있어 다양한 장 질환 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 CD20130113

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 해양과학기술진흥원

연구사업명 해양생명공학사업

연구과제명 해양생물 유래 생리활성물질의 임상평가를 통한 제품화 및 산업화

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2012.01.01 ~ 2013.01.31

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 클라미도모나스(*Chlamydomonas* sp.) 유래인 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서,

상기 펩타이드는 클라미도모나스를 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*) 및/또는 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 분획하여 정제한 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화로 야기되는 정상 장 세포의 밀착 결합(tight junction) 손상을 감소시켜 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시켜 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포의 세포사멸을 억제하여 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포의 NF- $\kappa$ B의 핵 내부로의 이동을 억제하여 iNOS 유전자 발현을 저해함으로써 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 장 질환은 과민성 대장 증후군 또는 염증성 장 질환인 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 9

제9항에 있어서,

상기 염증성 장 질환은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물.

#### 청구항 10

서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 건강기능식품.

#### 청구항 11

클라미도모나스를 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해하는 단계;

상기 가수분해한 클라미도모나스의 가수분해물을 이온 교환 크로마토그래피로 분획하는 단계; 및

상기 분획한 분획물로부터 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는 장 질환 치료용 펩타이드 제조방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서,

상기 가수분해하는 단계는 50~200rpm, 30~40℃의 교반 배양기에서 12~72시간 동안 교반하여 가수분해하는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료용 펩타이드 제조방법.

#### 청구항 13

제13항에 있어서,

상기 가수분해하는 단계는 클라미도모나스를 세포벽 분해 효소로 처리하고 초음파를 처리하여 클라미도모나스의 세포벽을 분해시킨 후 바실러스 섭틸러스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸러스(*Candida utilis*)로 가수분해하는 것을 특징으로 하는 장 질환 치료용 펩타이드 제조방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001]

본 발명은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것으로, 더 상세하게는 장 신경교세포의 과도한 활성을 억제하여 정상 장 세포를 보호하는 효과를 발휘하는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 관련 질환 치료 및 예방용 조성물에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002]

장 신경 체계(ENS)는 혈액의 흐름, 영양분의 흡수, 분비, 면역과 장내 염증 과정을 조절한다. 장 신경 체계에는 크게 신경세포(neuron)와 장의 신경교세포(enteric glial cell) 두 가지의 주요 세포군이 존재하는데, 장의 신경교세포는 신경세포의 약 4배에 달한다. 장의 신경세포와 유사하게 장의 신경교세포도 신경 능(neural crest)에서 유래하고, 그 형상과 기능의 유사성에 기인하여 성상교세포에 대응하는 장내 세포로 인식되고 있다. 장의 신경교세포는 장을 물리적으로 지지해주고, 신경전달물질로 작용하며, 면역과 항상성 유지에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 최근 실험 결과들을 통하여 위장과 장 운동 및 상피 장벽 손상 등에 있어서, 장의 신경교세포가 장의 생리 및 병리학적으로 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 한편, 장의 신경교세포의 손상이 장에 부정적인 영향을 미칠 수 있다고 알려져 있는데, 형질 전환 마우스 모델에서 장의 신경교세포의 손실은 장내 신경총 구조를 파괴시키고, 상피의 건강한 상태를 파괴하여 장 염증을 초래하고 궁극적으로는 마우스 모델이 사망에 이르는 것으로 나타났다. 이러한 연구 결과는 장내 신경교세포가 장의 건강성을 유지하는데 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사하는데, 비록 장의 신경교세포가 장의 장벽 기능을 조절하고 면역 반응을 조절하지만, 장 신경교 세포의 지나친 활성화는 암과 염증성 장 질환과 같은 인간의 병리로 이어질 수도 있다.

[0003]

장의 상피는 장강(gut lumen)을 덮는 단일 세포층으로 구성되어 있으며, 외부 항원, 미생물과 이들의 독소와 같은 유해 물질이 내장 기관을 통과하는 것을 막는 장벽으로의 역할을 수행하고, 음식물의 영양분, 전해질 및 물

을 장강으로부터 순환기로 이동시키는데 있어서 필터 역할을 수행한다. 장 상피세포 간의 결합과 상호작용은 데스모솜(desmosomes), 어드헤린 정선(adherens junctions (AJ)), 타이트 정선(tight junctions (TJ))으로 조절되는데, 데스모솜과 어드헤린 정선은 인접한 세포간의 물리적 결합 기능을 발휘하고, 타이트 정선은 상피세포의 정점부에 위치하며 세포 내 공간을 밀봉하여 결합 기능을 발휘한다. 생체 내 및 시험관 내 실험을 통하여 장 투과성은 외생적 요인, 상피세포 사멸, 사이토카인 및 면역 세포 등을 포함하는 다양한 요인에 의해 조절된다고 알려져 있다.

[0004] 장 상피 장벽(Intestinal epithelial barrier, IEB)은 생리학적 및 병리학적 조건에서 장 건강성 유지 및 항상성 유지를 위해 매우 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 그러나, 장 신경교세포의 과도한 활성화는 장 침투성을 증가시켜 장벽 기능 장애에 기인한 광범위한 소화기 질환을 야기할 수 있다. 이러한 현상은 정상교세포와 대뇌 내피와의 장벽 조절 혼선 양상(crosstalk pattern)과 연결지어 생각해 볼 수 있는데, 이는 장-뇌 질환 패러다임이라고 명명되었다. 정상교세포와 유사하게 장 신경교세포도 외부 자극에 의해 독성 인자를 생산할 수 있고, 사이카인이나 LPS에 의한 iNOS의 과발현은 시험관 내 연구를 통해 장 세포 운동성을 유도한다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 장 손상 및 장 신경교세포 활성화에 대한 기전에 대해서는 그 연구가 미비한 실정이다.

[0005] 따라서 본 발명자들은 본 발명을 통하여 장 신경교세포에 의해 유도되는 생체 내 분자적 기전에 대해 연구하고 이를 조절할 수 있는 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 이용하여 다양한 장 관련 질환의 치료에 활용해 보고자 시도하던 끝에 본 발명을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국특허 제10-2011-0125576호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드를 이용하여 장 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 바름은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 클라미도모나스(*Chlamydomonas* sp.) 유래일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 클라미도모나스를 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*) 및/또는 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 분획하여 정제한 것일 수 있다.

[0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화로 야기되는 정상 장 세포의 밀착 결합(tight junction) 손상을 감소시켜 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시켜 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포의 세포사멸을 억제하여 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화에 의해 발생하는 정상 장 세포의 NF- $\kappa$ B의 핵 내부로의 이동을 억제하여 iNOS 유전자 발현을 저해함으로써 정상 장 세포를 보호하는 효과를 나타내는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 장 질환은 과민성 대장 증후군 또는 염증성 장 질환일 수 있다.

- [0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 염증성 장 질환은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 기능 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 클라미도모나스를 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)로 가수분해하는 단계; 상기 가수분해한 클라미도모나스의 가수분해물을 이온 교환 크로마토그래피로 분획하는 단계; 및 상기 분획한 분획물로부터 펩타이드를 정제하는 단계;를 포함하는 장 질환 치료용 펩타이드 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가수분해하는 단계는 50~200rpm, 30~40℃의 교반 배양기에서 12~72시간 동안 교반하여 가수분해하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가수분해하는 단계는 클라미도모나스를 세포벽 분해 효소로 처리하고 초음파를 처리하여 클라미도모나스의 세포벽을 분해시킨 후 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)로 가수분해하는 것일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0021] 본 발명의 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 장 신경교세포의 과도한 활성화로 야기되는 정상 장세포의 밀착 결합(tight junction) 손상을 감소시키고, 정상 장 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시키며, 정상 장 세포의 세포사멸을 억제하는 효과를 가지고 있어 다양한 장 질환 치료 또는 예방을 위한 약학적 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 클라미도모나스를 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)로 가수분해한 후 이를 분획한 분획물의 아미노산 서열을 분석한 결과이다.
- 도 2는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 ZO-1 발현을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 3은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 Occludin 발현을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 4는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 ROS 생성을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 5는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 DNA 손상을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 6은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 세포사멸을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 7은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 세포사멸 신호전달 분자의 발현을 억제하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 8은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포의 세포 주기를 억류하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 9는 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포에서 DNA 손상 신호전달 분자를 조절하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 10은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 억제하여 IEC-6 세포에서 NF- $\kappa$ B의 핵내 이동을 저해하는 효과를 관찰한 결과이다.
- 도 11은 장 신경교세포 활성화가 IEC-6 세포의 증식에 미치는 영향과 다양한 저해제가 이를 효과적으로 차단할 수 있는지 관찰한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.
- [0024] 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 또는 예방용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 클라미도모나스(*Chlamydomonas*)는 단세포 녹조류(*Chlorophyta*)로서 민물, 해양, 눈, 극지 등 다양한 환경에 분포하는 진핵생물이며, 클라미도모나스는 6-8 시간의 doubling time을 가지는 미세조류로서 3-5일의 doubling time을 가지는 50% 이상의 지질 고함유 미세조류보다 증식속도가 10배 이상 빠르다. 클라미도모나스는 생리, 생화학, 분자생물학, 유전체 연구(genome project 완성되었음)가 가장 앞서 있어서 유전자 재조합이 쉽게 가능한 미세조류로서 녹색효모(*Green yeast*)라 불린다.
- [0026] 본 발명자들은 클라미도모나스를 가수분해하여 수득한 펩타이드의 효과를 연구하였으며, 서열번호 1의 펩타이드가 장 신경교 세포의 과도한 활성화로 야기되는 정상 장 상피 세포의 밀착 결합(tight junction) 손상을 감소시키고, 정상 장 상피 세포 내의 산화적 스트레스를 감소시키며, 정상 장 상피 세포의 세포사멸을 억제하는 효과를 가지고 있어, 장벽 기능을 효과적으로 조절할 수 있음을 실험적으로 확인하였다.
- [0027] 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 장 질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공하며, 상기 펩타이드의 약제학적으로 허용가능한 염이 제공된다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약제학적으로 허용가능한 염은 염화물 염이다.
- [0028] 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 펩타이드 혹은 상기 펩타이드의 전구체는, 예를 들어, 박테리아(예컨대, 대장균(*E. coli*) 또는 고초균(*Bacillus subtilis*)), 곤충 세포 시스템(예컨대, 초파리(*Drosophila*) Sf9 세포 시스템), 효모 세포 시스템(예컨대, 사카로마이세스 세레비시예(*S. cerevisiae*), 에스. 사카로마이세스(*S. saccharomyces*)) 또는 섬유상 진균 발현 시스템, 또는 동물 세포 발현 시스템(예컨대, 포유동물 세포 발현 시스템)을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아닌 임의의 공지된 단백질 발현 시스템에서 재조합 방식으로 생산될 수 있다. 상기 펩타이드 혹은 상기 펩타이드의 전구체는 또한 화학적으로 합성될 수도 있다. 당업자에게 충분히 공지되고 또한 박테리아 이외의 단백질 발현 시스템에서의 본 명세서에 기재된 펩타이드의 미숙 및 성숙 형태 그리고 변종의 생산에 적합한 일반적인 유전적 작제물 및 방법이 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는데 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 화학적으로 생산될 수 있다. 펩타이드는 전통적인 BOC 혹은 FMOC 보호를 이용해서 용액 및 고상 합성을 포함하는 다수의 상이한 방법에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드는 연속적인 아미노산 커플링을 이용하여 2-클로로트리틸 혹은 왕 수지(Wang resin) 상에 합성될 수 있다. 이하의 보호기가 이용될 수 있다: 플루오레닐메틸옥시카보닐 혹은 tert-부틸옥시카보닐(알파-아미노기, N-말단); 트리틸 혹은 tert-부틸(Cys의 티올기); tert-부틸(존재한다면, 글루탐산의 -카복실 및 트레오닌의 하이드록실기); 및 트리틸(존재할 경우 아스파라긴 측쇄의  $\beta$ -아미드 기능 및 티로신의 페놀기). 커플링은 3차 아민의 존재 하에 DIC 및 HOBt와 함께 작용할 수 있고, 펩타이드는 카테일(트라이플루오로아세트산 81%, 페놀 5%, 티오아니솔 5%, 1,2-에탄다이티올 25%, 물 3%, 다이메틸설파이드 2%, 요오드화 암모늄 1.5% w/w)을 이용해서 고형 담체로부터 탈보호되어 분리될 수 있다. 트라이플루오로아세트산 및 기타 휘발물의 제거 후, 유기 용매를 이용해서 펩타이드를 석출시킬 수 있다. Cys 잔기들 간의 다이설파이드 결합은 다이메틸 설파사이드를 이용해서(Tam et al. (1991) J. Am. Chem. Soc. 113:6657-62) 또는 공기 산화 전락을 이용해서 형성될 수 있다. 얻어진 펩타이드는 역상 크로마토그래피에 의해 정제되고 동결 건조될 수 있다.
- [0030] 상기 펩타이드는, 염기의 형태로 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염으로서 제조, 분리 혹은 이용될 수 있다. 염의 예로는 펩타이드의 아세트산염, 염화물염, 황산염 및 인산염을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 다른 양상에 있어서, 펩타이드가, 단독으로 혹은 배합되어, 임의의 약제학적으로 허용가능한 담체 혹은 매체와 조합될 수 있는 조성물이 제공된다. 펩타이드는 환자에게 투여될 경우 부작용, 알레르기 혹은 바람직하지 않은 기타 상황을 일으키지 않는 재료와 조합될 수 있다. 이용되는 담체 혹은 매체는 용매, 분산제, 코팅, 흡수 촉진제, 제어된 방출제(즉, 서방제), 및 1종 이상의 불활성 부형제(전분, 폴리올, 과립제, 극미세 셀룰로스(microfine cellulose), 미세결정형 셀룰로스(예컨대, 셀피어, 셀피어 비즈(Celphere beads)(등록상표)), 희석제, 윤활제, 결합제(binder), 붕해제 등을 포함함) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수도 있다. 약제학적으로 허용가능한 담체 및 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체로서 이용하기 위한 부형제 그리고 상기 추가의 성분의 예로는, 결합제, 충전제,

붕해제, 윤활제, 향미생물제 및 코팅제를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "결착제"란 용어는 본 발명의 실시예에 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 결착제라면 어느 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 결착제의 예로는, 전분(예컨대, 옥수수 전분, 감자 전분 및 호화 전분(pre-gelatinized starch)(예컨대, 칼라콘사(Colorcon, Ltd)에서 판매되고 있는 스타치(STARCH) 1500(등록상표) 및 스타치 1500 LM(등록상표)) 및 기타 전분), 말토덱스트린, 젤라틴, 천연 및 합성 검, 예, 아카시아, 분말화 트래거캔스, 구아검, 셀룰로스 및 그의 유도체(예컨대, 메틸셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스(하이프로멜로스), 에틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트, 카복시메틸 셀룰로스 칼슘, 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 분말화 셀룰로스, 극미세 셀룰로스, 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 미국 팬실베이니아주의 마르쿠스 홀시에 소재한 에프엠시 코포레이션(FMC Corporation)에서 판매되고 있는 아비셀(AVICEL)(상표명), 예컨대, 아비셀 EL-PH-101(상표명), -103(상표명) 및 -105(상표명)), 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈(예컨대, 폴리비닐 피롤리돈 K30), 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0033] 약제학적 조성물에 특히 이용될 수 있는 결착제의 예로는 폴리비닐 알코올, 폴리비닐피롤리돈(포비돈), 전분, 말토덱스트린 혹은 셀룰로스 에터(예컨대, 메틸셀룰로스, 에틸셀룰로스, 카복시메틸셀룰로스, 하이드록시에틸 셀룰로스, 하이드록시에틸 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 셀룰로스 및 하이드록시프로필 메틸셀룰로스)를 들 수 있다.

[0034] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "충전제"란 용어는 본 발명의 실시예에 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 충전제라면 어느 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 충전제의 예로는, 탭크, 탄산칼슘(예컨대, 과립 혹은 분말), 제2인산칼슘, 제3인산칼슘(tribasic calcium phosphate), 황산칼슘(예컨대, 과립 혹은 분말), 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 아비셀(Avicel) PH101 혹은 셀피어(Celphere) CP-305), 극미세 셀룰로스, 분말화된 셀룰로스, 텍스트레이트, 카올린, 만니톨, 규산, 솔비톨, 전분(예컨대, 스타치 1500), 호화 전분, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 아이소말트, 라피노스, 말티톨, 멜레지토스, 스타키오스, 락티톨, 팔라티니트, 자일리톨, 마이오이노시톨, 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 상기 펩타이드를 코팅하는데 특히 이용될 수 있는 약제학적으로 허용가능한 충전제의 예로는, 탭크, 미세결정성 셀룰로스(예컨대, 아비셀 PH101 혹은 셀피어 CP-305), 분말화 셀룰로스, 텍스트레이트류, 카올린, 만니톨, 규산, 솔비톨, 전분, 호화 전분, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 아이소말트, 제2인산칼슘, 라피노스, 말티톨, 멜레지노스, 스타키로스, 락티톨, 팔라티나이트, 자일리톨, 만니톨, 마이오이노시톨(myoinositol) 및 이들의 혼합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "첨가제"란 용어는 약제학적으로 허용가능한 첨가제이면 어떠한 것이라도 지칭한다. 약제학적으로 허용가능한 첨가제로는, 붕해제, 분산 첨가제, 윤활제, 활택제, 향산화제, 코팅 첨가제, 희석제, 계면활성제, 향미 첨가제, 보습제, 흡수 촉진 첨가제, 제어된 방출 첨가제, 응결 방지 첨가제, 향미생물제(예컨대, 방부제), 착색제, 건조제, 가소화제 및 염료를 들 수 있지만, 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 명세서에서 이용되는 바와 같이, "부형제"는 약제학적으로 허용가능한 첨가제, 충전제, 결착제 혹은 제제이면 어느 것이라도 가능하다.

[0038] 본 발명의 조성은 기타 치료제 성분, 응결방지제(anti-caking agent), 방부제, 감미제, 착색제, 향미료, 건조제, 가소제, 염료, 활택제, 부착방지제, 대전방지제, 계면활성제(습윤제), 향산화제, 필름 코팅제 등을 임의선택적으로 포함할 수도 있다. 임의의 이러한 임의선택적 성분은 제형의 안정성을 보증하기 위하여 본 명세서에 기재된 화합물과 상용성이어야만 한다. 상기 조성물은 필요에 따라 기타 첨가제, 예를 들어, 락토스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 트레할로스, 수크로스, 말토스, 라피노스, 말티톨, 멜레지토스, 스타키오스, 락티톨, 팔라티니트, 전분, 자일리톨, 만니톨, 마이오이노시톨 등, 및 이들의 수화물, 그리고 아미노산류, 예를 들어, 알라닌, 글라이신 및 베타인, 및 펩타이드류 및 단백질을 함유할 수 있다.

[0039] 상기 조성물은, 예를 들어, 추가의 용매, 분산제, 코팅제, 흡수 촉진 첨가제, 제어된 방출 첨가제 및 1종 이상의 불활성 첨가제(예를 들어, 전분, 폴리올, 과립화 첨가제, 미세결정성 셀룰로스, 희석제, 윤활제, 결착제, 붕해 첨가제 등) 등을 포함할 수 있다. 필요한 경우, 개시된 조성물의 정제 제형은 표준 수성 혹은 비수성 수법에 의해 코팅될 수 있다. 조성물은, 또한 예를 들어, 응결 방지 첨가제, 방부제, 감미 첨가제, 착색제, 향미료, 건

조제, 가소제, 염료 등을 포함할 수 있다.

- [0040] 적절한 봉쇄제로는, 예를 들어, 한천(agar-agar), 탄산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 크로스카멜로스 나트륨, 크로스포비돈, 포비돈, 폴라크릴린 칼륨, 전분 글라이콜산 나트륨, 감자 혹은 타피오카 전분, 기타 전분, 호화 전분, 점토, 기타 알긴류, 기타 셀룰로스, 검 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0041] 적절한 윤활제로는, 예를 들어, 스테아르산 칼슘, 스테아르산 마그네슘, 광유, 경광유(light mineral oil), 글라이세린, 솔비톨, 만니톨, 폴리에틸렌 글라이콜, 기타 글라이콜류, 스테아르산, 라우릴황산나트륨, 탭크, 식물성 경화유(hydrogenated vegetable oil)(예컨대, 땅콩유, 면실유, 해바라기유, 참기름, 올리브유, 옥수수유, 대두유), 스테아르산 아연, 올레산 에틸, 라우르산 에틸, 한천, 실로이드(syloid) 실리카겔(AEROSIL 200, W.R.Grace Co., 미국 매릴랜드주의 볼티모어시에 소재), 합성 실리카의 응고 에어로졸(Evonik Degussa Co., 미국 텍사스주의 피아노시에 소재), 발열성 이산화규소(CAB-O-SIL, Cabot Co., 미국 매사추세츠주의 보스턴시에 소재), 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0042] 적절한 활택제로는, 예를 들어, 류신, 콜로이드성 이산화규소, 삼규산마그네슘(magnesium Trisilicate), 분말화 셀룰로스, 전분, 탭크 및 제3인산칼슘을 들 수 있다.
- [0043] 적절한 응결방지 첨가제로는, 예를 들어, 규산 칼슘, 규산 마그네슘, 이산화규소, 콜로이드성 이산화규소, 탭크, 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0044] 예컨대, 펩타이드 조성물용의 방부제로서 이용될 수 있는 적절한 향미생물 첨가제로는, 예를 들어, 염화벤즈알코늄, 염화벤즈에토늄, 벤조산, 벤질알코올, 뷰틸파라벤, 염화세틸피리디늄, 크레졸, 클로로부탄올, 데하이드로아세트산, 에틸파라벤, 메틸파라벤, 페놀, 페닐에틸 알코올, 페녹시에탄올, 아세트산 페닐수은산(phenylmercuric acetate), 질산 페닐수은산(phenylmercuric nitrate), 소르브산 칼륨, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨, 데하이드로아세트산 나트륨, 프로피온산 나트륨, 소르브산, 티메졸, 티모(thymo) 및 이들의 혼합물을 들 수 있다.
- [0045] 적절한 향산화제로는, 예를 들어, BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), 비타민 E, 프로필 갈레이트, 아스코르브산 및 그의 염 혹은 에스터, 토코페롤 및 그의 에스터, 알파-리포산 및 베타-리포산을 들 수 있다.
- [0046] 적절한 코팅 첨가제로는, 예를 들어, 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 셀룰로스 아세테이트 프탈레이트, 에틸셀룰로스, 젤라틴, 약제학적 글레이즈, 하이드록시프로필 셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸셀룰로스, 하이드록시프로필 메틸 셀룰로스 프탈레이트, 메틸셀룰로스, 폴리에틸렌 글라이콜, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트, 셀락(shellac), 수크로스, 이산화티탄, 카르나우바 왁스, 미세결정성 왁스 및 이들의 혼합물을 들 수 있다. 적절한 보호 코팅으로는 아쿠아코트(Aquacoat)(예컨대, 아쿠아코트 에틸셀룰로스 수성 분산제, 15% w/w, FMC 바이오폴리머, ECD-30), 유드라지트(Eudragit)(예컨대, 유드라지트 E PO PE-EL, 로엠 파마 폴리머스(Roehm PharmaPolymers)) 및 오파드리(Opadry)(예컨대, 오파드리 AMB 분산제, 20% w/w, 칼라콘사 제품)를 들 수 있다.
- [0047] 소정의 실시형태에서, 펩타이드 조성물용의 적절한 첨가제로는 수크로스, 탭크, 스테아르산 마그네슘, 크로스포비돈 혹은 BHA의 1종 이상을 들 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 또한 이하의 것들을 포함하지만 이들로 제한되는 것은 아닌 기타 부형제, 제제 및 그의 카테고리를 포함할 수 있다: L-히스티딘, 플루로닌(Pluronic)(등록상표), 폴록사머(Poloxamer)(예컨대 루트롤(Lutrol)(등록상표) 및 폴록사머 188), 아스코르브산, 글루타티온, 침투성 증강제(예컨대, 지질, 콜산 나트륨, 아실카르니틴, 살리실레이트류, 혼합 담즙염, 지방산 마이셀류, 킬레이터, 지방산, 계면활성제, 중간쇄 글라이세라이드류), 프로테아제 억제제(예컨대, 대두 트립신 억제제, 유기산), pH-강화제 및 생활성을 촉진시키는데 유효한 흡수 증강제(미국 특허 제6,086,918호 및 제5,912,014호에 기재된 것들을 들 수 있지만 이들로 제한되는 것은 아님), 씹을 수 있는 정제용 재료(예컨대, 텍스트로스, 프럭토스, 락토스 1수화물, 락토스 및 아스파탐, 락토스 및 셀룰로스, 말도텍스트린, 말토스, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스 및 구아검, 솔비톨 결정체 등); 비경구제(예컨대, 만니톨 및 포비돈 등); 가소제(예컨대, 세바스산 다이뷰틸, 코팅용 가소제, 폴리비닐아세테이트 프탈레이트); 분말 윤활제(예컨대, 베헨산 글라이세릴 등); 연성 젤라틴 캡슐(예컨대, 솔비톨 특수 용액 등); 코팅용 구형체(예컨대, 구형 당(sugar sphere)); 구형화제(spheronization agent)(예컨대, 베헨산 글라이세릴 및 미세결정성 셀룰로스); 현탁/겔화제(예컨대, 카라기난, 젤란검, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스, 포비돈, 전분 글라이콜산 나트륨, 잔탄검); 감미료(예컨대, 아스파탐, 아스파탐과 락토스, 텍스트로스, 프럭토스, 꿀, 말도텍스트린, 말토스, 만니톨, 당밀(molasses), 솔비톨 결정체, 솔비톨 특수 용액, 수크로스); 습식 과립제(예컨대, 탄

산칼슘, 무수 락토스, 락토스 1수화물, 말토덱스트린, 만니톨, 미세결정성 셀룰로스, 포비돈, 전분), 카라멜, 카복시메틸셀룰로스 나트륨, 체리 크림향 및 체리향, 무수 구연산, 구연산, 가루 백당, D&C 적색 제33호, D&C 황색 제10호 알루미늄 레이크(Aluminum Lake), 에데탄 이나트륨, 에틸 알코올 15%, FD&C 황색 제6호 알루미늄 레이크, FD&C 청색 제1호 알루미늄 레이크, FD&C 청색 제1호, FD&C 청색 제2호 알루미늄 레이크, FD&C 녹색 제3호, FD&C 적색 제40호, FD&C 황색 제6호 알루미늄 레이크, FD&C 황색 제6호, FD&C 황색 제10호, 글라이세롤 팔미토스테아레이트, 글라이세릴 모노스테아레이트, 인디고 카민, 레시틴, 만니톨, 메틸 및 프로필 파라벤, 모노 암모늄 글라이시리시네이트, 천연 및 인공 오렌지향, 약제학적 글레이즈, 폴록사머 188, 폴리덱스트로스, 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 폴리비돈, 호화 옥수수 전분, 호화 전분, 적색 산화철, 사카린 나트륨, 나트륨 카복시메틸 에터, 염화나트륨, 구연산 나트륨, 인산나트륨, 딸기향, 합성 흑색 산화철, 합성 적색 산화철, 이산화티탄 및 백랍(white wax).

[0049] 본 발명에 있어서, 상기 장 질환은 염증성 장질환 또는 과민성 장 증후군과 같은 장의 정상적인 장벽 기능 손상 에 의해 야기되는 질환을 포함한다.

[0050] 염증성 장 질환 (IBD)은 크론병, 베체트병에 수반되는 장 병변, 궤양성 대장염, 출혈성 직장 궤양 및 회장 낭염 을 포함하며, 크론병 및 궤양성 결장염을 포함하는 질환 군을 지칭한다. 궤양성 결장염은 단지 대장에만 영향을 미친다. 궤양성 결장염에서의 염증 및 궤양은 대장의 4개 층 중 가장 안쪽에 있는 2개의 층인 점막층 및 점막하 층에 제한된다. 크론병에서 염증 및 궤양은 소장 및 대장 둘 다에서 장벽의 모든 층을 통해 확장할 수 있다.

[0051] 한편, 과민성 장 증후군은 기질적 원인이 없이 장기간 반복되는 복부팽만감 등의 복부 불편감 및 복통과 더불어 설사, 변비 등의 배변 습관의 변화를 동반하는 만성 질환이며 그 증상이 정신적인 요인이나 스트레스를 유발하는 사회 환경에 의해서 악화되기도 한다.

[0052] 본 명세서에 기재된 펩타이드 및 효능제는 장 질환과 연관된 내장 통증 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 장애와 연관된 통증의 치료, 예방 혹은 저감을 위하여 단독으로 혹은 병용 요법으로 이용될 수 있다.

[0053] 상기 '치료하는'이란, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미하며, 본원에서 사용된 상기 '치료'란 용어는 '치료하는' 이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서 포유동물에 있어서 장 질환의 치료 또는 치료요법은 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다:

[0054] 다:

[0055] (1) 장 질환의 성장을 저해함, 즉, 그 발달을 저지시킴,

[0056] (2) 장 질환의 확산을 예방함, 즉, 전이를 예방함,

[0057] (3) 장 질환을 경감시킴.

[0058] (4) 장 질환의 재발을 예방함, 및

[0059] (5) 장 질환의 증상을 완화함(palliating)

[0060] 본 발명에 따른 장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 유효한 양의 서열번호 1로 표시되는 펩타이드 를 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기에서 약학적으로 유효한 양이란 장 질환의 증상을 예방, 개선 및 치료하기에 충분한 양을 말한다.

[0061] 본 발명에 따른 펩타이드의 약학적으로 유효한 양은 0.5 ~ 100 mg/day/체중kg, 바람직하게는 0.5 ~ 5 mg/day/체중kg이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 장 질환 증상의 정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등에 따라 적절히 변화될 수 있다.

[0062] 또한, 상기에서 약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

[0063] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화 될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.

[0064] 또한, 본 발명에 따른 장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 활성 성분의 투여량은 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 환자의 중증도

등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있고, 본 발명에 따른 위장 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 장 질환의 증상을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.

[0065] 한편, 본 발명은 서열번호 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 식품용 조성물을 제공할 수 있으며, 본 발명에 따른 상기 식품용 조성물은 위장 질환 증상의 개선 또는 예방에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.

[0066] 본원에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0067] 본원발명에 따른 상기 식품용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0068] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 본원발명에서 상기음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 장 질환 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0070] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 장질환 증상의 개선 또는 예방을 위한 식품용 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0071] 본원발명의 식품용 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

## [0073] <실시예 1>

### [0074] 실험준비

#### [0075] 1-1. 재료준비

[0076] 해양 녹조류인 클라미도모나스(*Chlamydomonas sp.*(strain c-104))는 한국 해양 미생물 조류 은행(KMMCC)로부터 수득하였으며, 표준 F/2 Guillard's medium을 이용하여 배양하였다. 한편, 가수분해용 미생물인 바실러스 섭틸

러스(*Bacillus subtilis*, KCTC 3014)와 캔디다 유틸러스(*Candida utilis*, KCCM 50045)는 각각 미생물자원센터 및 한국미생물보존센터에서 수득하였으며, 이들 미생물을 배양하기 위한 영양 한천 및 YM 한천은 BD Difco™ (NJ, USA)로부터 구입하였다. 또한, 동물 세포주인 장의 신경교 세포(EGC/PK050399egrf), 소장 상피세포(IEC-6), 위의 상피 세포(AGS) 및 대식세포(RAW 264.7)는 ATCC로부터 수득하였고, 이들 세포 배양용 배지 및 FBS는 Lonza(Basel, Switzerland)에서 구입하였다.

바실러스 리체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 유래의  $\alpha$ -아밀라아제, 소 이자 유래의 인슐린, MTT 시약[(3-(3,4-dimethyl-2-yl)-2,5-dipheyltetrazolium bromide)], 그리스 시약, 대장균 026:B6 유래의 LPS는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하였고, 재조합 랫트 IFN- $\gamma$ 는 R&D systems(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. 그 밖의 화학물질과 시약은 분석용 등급의 제품을 구입하여 사용하였다.

## 1-2. 클라미도모나스의 생장 조건 수립

클라미도모나스의 최적의 생장 조건을 알기 위하여 250ml 플라스크에 100ml의 F/2 배지를 담고 클라미도모나스를 접종한 후, 온도(15, 20, 25, 30, 35 °C), 광도(50, 100, 150, 200, 250  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ), 배양 시간(0, 3.5, 7, 10.5, 14일)을 변수로 하여 3회 반복 실험을 통해 최적의 생장 조건을 수립하였다.

그 결과, 하기 표 1에 도시된 조건이 클라미도모나스의 대량 생산에 가장 적합한 조건임을 확인할 수 있었다.

표 1

| Variable                  | Optimal conditions                            |
|---------------------------|-----------------------------------------------|
| Temperature ( $X_1$ )     | 29.03 °C                                      |
| Light intensity ( $X_2$ ) | 164.2 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ |
| Time ( $X_3$ )            | 11.3 days                                     |

The pH and salinity was maintained at 8 and 33‰, respectively during the condition optimization

## 1-3. 클라미도모나스의 대량 생산 및 동결 건조

클라미도모나스의 대량 생산은 상기 실시예 2에서 결정된 최적 조건에서 실시하였다. 초기 배양은 5L 폴리카보네이트 병에서 시작하여 20L 배양으로 확대하고 10주 안에 최종 100L 배양으로 확대하였다. 이 때 염분 유지를 위하여 플라스크 내로 정기적으로 증류수를 첨가하였고 계속적으로 공기를 통과시켰다. 세포 밀도가  $10^{10}$  cells/ml에 도달하였을 때 배양을 멈추고 클라미도모나스를 원심분리기를 이용하여 10000 rpm으로 원심분리하였다. 한편 침전된 클라미도모나스 주위의 염분을 제거하기 위하여 상기 침전물에 증류수를 넣고 다시 한번 원심분리하고 즉시 -70°C로 동결건조하였다. 이 후 동결건조된 클라미도모나스는 사용하기 전까지 -20°C에서 보관하였다.

## 1-4. 통계분석

본 발명에 있어서 모든 데이터는 별도의 언급이 없는 한 독립된 3번의 실험에서 얻어진 평균±표준편차로 나타내었으며, 다른 처리군간의 통계 비교는 SPSS 프로그램(version 12.0)과 함께 ANOVA 기법에 의해 분석하였다. 또한,  $p < 0.05$  이하의 값에 대해서만 유의한 것으로 판단하였다.

## <실시예 2>

[0087] **클라미도모나스 가수분해 및 활성 펩타이드 분리**

[0088] **2-1. 가수분해용 미생물 배양**

[0089] 클라미도모나스의 가수분해에 사용할 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)는 각각 상기 미생물 특이적인 성장 배지 영양 한천(growth media nutrient agar) 및 효모와 곰팡이 한천(yeast and mold agar)에서 배양하였다. 즉, 상기 배지는 멸균 후 플레이트에 넣어 굳히고, 굳혀진 한천 위에 상기 균주를 스트리킹하여 37℃에서 3일간 배양하였다. 성장 곡선의 로그기(log phase)에 있는 미생물을 레플리카(replica)한 후, 1cm<sup>2</sup> 조각으로 잘라 각 미생물마다 총 5 조각을 준비하여, 클라미도모나스에 접종하였다.

[0090] **2-2. 클라미도모나스 세포벽 분해**

[0091] 상기 가수분해용 미생물을 이용한 가수분해에 앞서, 클라미도모나스의 세포 벽을 분해하였다. 우선 상기 동결 건조된 클라미도모나스 50g을 절굿공이를 이용하여 분쇄하고 갈아 증류수와 혼합한 후, 증류수를 이용하여 고체 비율이 5%가 되도록 1L 용액을 만들었다. 상기 용액의 pH를 6으로 맞추고, 55℃까지 가열한 후, 세포벽 분해 효소인 termamyl 120L(0.01% v/w)을 첨가하고 동일 온도에서 교반하며 2시간 동안 가수분해하였다. 이 후 혼합액을 121℃, 15 psi로 10분간 가압멸균처리한 후 냉각하고 미생물 접종에 앞서 1시간 동안 초음파를 처리하여 추가 분해하였다.

[0092] **2-3. 미생물을 이용한 가수분해 조건 설정**

[0093] 상기 실시예 2-2에서 일부 가수분해된 클라미도모나스를 추가 가수분해하기 위하여 상기 실시예 2-1에서 배양한 미생물을 접종하고, 교반 배양기(Dongwon scientific, Korea)을 이용하여 100rpm, 37℃에서 12~72시간 배양하였다. 가수분해물은 6000g에서 30분간 원심분리하고, 그 상청액을 동결건조하였다.

[0094] 각 조건에서 가수분해된 가수분해물의 단백질 함량을 비교한 결과, 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*)와 칸디다 유틸리스(*Candida utilis*)을 혼합하여 36시간 동안 가수분해한 경우 가장 높은 단백질 함량을 나타내는 것으로 나타났으며, 따라서, 본 발명자들은 상기 조건을 클라미도모나스를 가수분해하는 최적 조건으로 설정하였다.

[0095] **2-4. 이온 교환 크로마토그래피를 이용한 분리**

[0096] 상기 가수분해물은 HiPrep 16/1- 디에틸아미노에틸 고속 유량(DEAE FF) 이온 교환 컬럼 상의 FPLC(AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)을 이용하여 정제하였다. 즉, 상기 가수분해물을 20mM sodium acetate buffer(pH 4.0)으로 평형화된 HiPrep<sup>TM</sup> 16/10 DEAE FF 이온 교환 컬럼 상에 로딩하고, 유속 2mL/min으로 동일 버퍼 상에서 NaCl(0-2M)의 선형 구배로 분리하였다. 각 분획(4mL)은 280nm에서 모니터링하고, 감압하에 동결건조한 후, 생활성을 조사하였다. 이후, 높은 생활성을 가지는 비독성 분획은 순수 펩타이드를 수득하기 위하여 추가로 HPLC 정제하였다.

[0097] 상기 이온 교환 크로마토그래피로 분리된 분획은 유속 1mL/min으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 포함하는 아세토니트릴(0~30% 또는 0~40% in 30 min)의 선형 구배로 YMC pack pro C18(4.6×250mm I.D., YMC Co., Ltd) 상의 역상 HPLC(RP-HPLC, Dionex ultimate 3000 Korea, Lts., Sunnyvale, CA)를 이용하여 추가 정제하였다. 분리된 피크는 280nm에서 관찰하였고, 수집된 분획물을 회전 농축기를 이용하여 농축하였다.

[0098] **2-5. 아미노산 서열 분석**

[0099] 정제 펩타이드의 분자량과 아미노산 서열은 전기분무 이온화(ESI) 소스와 결합된 혼성 Q-TOF LC/MS/MS 질량 분석기(AB Sciex Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 분석하였다. 이를 위하여 정제된 펩타이드는 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해한 후 전자분무 소스에 넣고 이중 대전된 (M+2H)<sup>2+</sup> 상태에서 질량분석기로 분석하였다. 분자량을 결정한 후, 펩타이드를 단편화하고 이온 분무 전압(IS)은 5.5kV, 커튼 가스(CUR)는 30 units으로 설정하고 Denovo sequencing progrma(AB Sciex Instruments, Foster City, CA)를 이용하여 서열분석하였다.

[0100] 그 결과, 세 번째 분획물에서 ENLDDLE의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 수득할 수 있었다(도 1 참조).

표 2

|        |        |         |                  |
|--------|--------|---------|------------------|
| [0101] | NO.    | 아미노산 서열 |                  |
|        | 서열번호 1 | ENLDDLE | 클라미도모나스 가수분해 분획물 |

[0102] <실시예 3>

[0103] 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교 세포 활성 억제 효과 분석

[0104] 3-1. 장 신경교 세포 활성화 조건 수립

[0105] 장 신경교 세포는 정상적 생리 조건에서는 어떠한 전-염증 조절 물질이나 상피 세포에 유해한 물질을 분비하지 않는다. 그러나, 다양한 장 관련 병증이 장 신경교 세포의 과발현에 기인하여 유발되는바, 본 발명자는 인위적으로 장 신경교 세포를 활성화시키고자 하였다. 이를 위하여 정상교세포 활성화 물질로 이미 알려진 LPS 및 IFN- $\gamma$ 를 사용하였으며, 장 신경교 세포에 LPS 및 IFN- $\gamma$ 를 처리한 결과 NO 생산, iNOS 및 CD-14 유전자 발현이 증가되는 것을 확인하였다. 한편, LPS 및 IFN- $\gamma$ 를 각각 2 $\mu$ g/ml과 20ng/ml을 처리한 경우 장 신경교 세포에 세포 독성을 나타낸 바, LPS 및 IFN- $\gamma$ 는 각각 1 $\mu$ g/ml과 10ng/ml을 처리하여 사용하기로 하였다.

[0106] 3-2. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교 세포(EGC) 활성 저해가 IEC-6 세포의 밀착 결합(tight junction)에 미치는 효과 분석

[0107] 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드가 장 신경교 세포의 활성을 저해하는지 확인하고자, 본 발명자들은 우선 장 신경교 세포의 저해 활성이 IEC-6 세포의 밀착 결합에 미치는 영향을 분석해 보았다.

[0108] 이를 위하여 LPS 1 $\mu$ g/ml과 IFN- $\gamma$  10ng/ml에 의해 활성화된 장 신경교 세포를 이용하여 IEC-6 세포를 기저측 유도(basolateral induction)한 경우, 밀착 결합 단백질인 ZO-1과 occludin 발현을 관찰하고, 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 처리한 경우 ZO-1과 occludin 발현이 어떻게 변화하는지 웨스턴 블라팅, RT-PCR 및 면역세포화학을 이용하여 관찰하였다.

[0109] 3-2-1. 세포배양

[0110] 장 신경교세포와 IEC-6 세포(Intestinal epithelial cells)는 열-불활성화된 10% FBS와 100  $\mu$ g/ml 스트렙토마이신, 100  $\mu$ g/ml 페니실린이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 이용하여 배양하였다.

[0111] 한편, 장 신경교세포와 IEC-6 세포의 공배양(co-culture)을 위하여, IEC-6 세포는 24 또는 6 웰 플레이트 배양 인서트(pore size 0.4  $\mu$ m; SPL, Korea)에서 배양하고, EGC는 24 또는 6 웰 플레이트에서 단일층으로 배양하였다. 시료 또는 자극 물질을 처리한 장 신경교세포에 IEC-6 세포의 배양 인서트를 이동시켜 공배양하였다.

[0112] 3-2-2. 웨스턴 블라팅

[0113] 웨스턴 블라팅을 위하여 IFN- $\gamma$  (10 ng/ml)와 LPS (1  $\mu$ g/ml)로 자극한 장 신경교세포에 펩타이드를 처리하고, IEC-6 세포와 24시간 동안 공배양하였다. 이후, 세포를 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 150 mM NaCl, 1% Igepal CA-630 (NP-40), 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% sodium dodecyl sulphate를 포함하는 RIPA 버퍼(Sigma)를 이용하여 얼음에서 5분간 방치하여 용해하였다. 세포 잔해는 원심분리기를 이용하여 제거하고 상청액을 신속하게 동결하였다. 단백질 농도는 BCA Protein Assay Kit (Thermo scientific)를 이용하여 측정하였고, 세포 용해물(단백질 20  $\mu$ g)을 SDS-PAGE 겔 전기영동으로 분리한 후, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이동시켰다. 멤브레인을 5% BSA로 2시간 동안 상온에서 블라킹하고 항체를 이용하여 4℃에서 밤새도록 반응시켰다. 이후, 2차 항체로 1시간 동안 상온에서 반응시키고, chemiluminescent ECL assay kit (Amersham Pharmacia Biosciences)로 an LAS3000 ® Luminescent image analyser 를 이용하여 밴드를 확인하고 단백질 발현은 Multi Gauge V3.0

software (Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)로 정량화하였다.

### 3-2-3. RT-PCR

세포를 10cm 배양 접시에서 배양한 후, 세포가 배양 접시의 70% 정도를 차지할 때 시료를 4시간 동안 처리하고 IFN- $\gamma$  (10 ng/ml)와 LPS (1  $\mu$ g/ml)로 24시간 동안 자극하였다. 총 RAN는 Trizol 시약으로 용해하고, 클로로포름을 5:1 비율로 첨가한 후 100 rcf로 15분간 4℃에서 원심분리하였다. 분리된 상층액을 이소프로판올을 1:1 비율로 첨가하여 9300 rcf로 10분 동안 원심분리하여 생성된 RNA 침전물은 75% 에탄올 세척하고, diethyl pyrocarbonate-treated RNAase free water로 용해하였다. RNA 양은 micro-plate reader (Tecan Austria GmbH)로 260nm에서 정량하였고, 추출된 총 RNA(2  $\mu$ g)는 Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI)를 이용하여 단일 가닥 cDNA를 합성하였다. cDNA는 하기 표 3에 기재된 프라이머로 증폭시켰다. 증폭 주기는 프라이 특이적 어닐링 온도에 따라 조절하였으며, PCR 산물은 1.5% 아가로오스 겔을 이용하여 TAE 버퍼로 100V에서 30분간 전기영동한 후 EtBr 염색하여 AlphaEase® gel image-analysis software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)로 관찰하였다.

표 3

| NO. | 염기서열(5'→3')             | 프라이머 이름            |
|-----|-------------------------|--------------------|
| 1   | TTGGGACAGAGCCTATGGAACGG | ZO-1 sense         |
| 2   | GAGCGAACTGAATGGTCTGATGC | ZO-1 antisense     |
| 3   | ACTGACTGGGTTTGGGCTAC    | Occludin sense     |
| 4   | TCACCAAGGAAGCGATGAAGCAA | Occludin antisense |
| 5   | AATCCCATCACCATCTTCCA    | GAPDH sense        |
| 6   | CCTGCTTCACCACCTTCTTG    | GAPDH antisense    |

### 3-2-4. 면역세포화학법

장 섬유교세포를 6웰 플레이트에서 배양하고(배지 1ml), 펩타이드를 4시간 동안 전처리한 후, IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) 및 LPS (1  $\mu$ g/ml)를 24시간 동안 추가로 자극하였다. 이후, 배지를 모아 9000 rcf에서 5분간 원심분리하고, 이를 IEC-6 세포와 1:4 비율로 혼합한 후, poly-D-lysine coated cover slips (12 mm)에서 12시간 동안 배양하였다. 이후, 커버 슬립을 세척하고, 4 % paraformaldehyde으로 10분간 고정시켰으며, PBS로 다시 세척하였다. 세포는 0.1% tween 20으로 10분간 투과성을 높여주고, 1% cell culture grade bovine serum albumins으로 상온에서 1시간 동안 처리하여 블라킹하였다. 이후, 세포를 1차 항체(1:300 희석)으로 4℃에서 밤새 반응시키고, anti-goat secondary antibody conjugated with Alexa Fluor 488 or 555 (1:1000 희석) (Santa cruz)로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역-염색된 세포는 DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole)로 추가 염색하고, fluoro-shield mounting media (Sigma)로 마운팅하였으며, 현광현미경(CTR 6000 Leica, Germany)으로 관찰하였다.

그 결과, LPS 1  $\mu$ g/ml과 IFN- $\gamma$  10ng/ml에 의해 활성화된 장 신경교세포를 이용하여 IEC-6 세포를 기저측 유도(basolateral induction)한 경우, ZO-1의 단백질과 mRNA 발현이 감소되었으나, 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 처리한 경우 이들 발현이 다시 증가하는 것을 확인할 웨스턴 블라팅, RT-PCR, 면역세포화학법을 통해 확인할 수 있었다(도 2 참조).

또한, Occludin도 활성화된 장 신경교세포에 의해 자극된 IEC-6 세포에서 그 단백질과 mRNA 발현이 감소되었으나, 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 처리하자 그 발현이 다시 증가하는 것으로 나타났다(도 3 참조).

### 3-3. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교세포(EGC) 활성 저해가 IEC-6 세포의 산화적 스트레스에 미치는 효과 분석

활성화된 장 신경교세포(EGC)에서 분비되는 전염증 조절자들은 IEC-6 세포에 산화적 스트레스를 유발할 수 있다. 따라서, 이러한 IEC-6 세포에 유발되는 산화적 스트레스를 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 효과적

으로 억제할 수 있는지 확인해 보았다.

[0123] IEC-6 세포내 ROS를 확인하기 위하여 dichlorofluorescein (DCFH)의 산화 정도를 측정하였는데, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 세포 내로 손쉽게 분산되고 세포 내 에스테라아제에 의해 디아세틸화되어 친수성이 강하고, 형광이 없는 DCFH로 변환하며, 세포내에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 DCFH를 형광이 있는 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 산화시킨다. 본 발명에서는 장신경교세포를 DCFHDA (5 μM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA)로 1시간 동안 처리하고 본 발명에 따른 펩타이드를 1시간 동안 추가적으로 처리하였다. 이후, 1mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 37°에서 2시간 동안 처리하고, 세포를 스크래핑하여 탈착시킨후 형광을 Cell Quest analysis software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용한 FACSCalibur flow cytometer (488 nm excitation, 530 nm emission)를 이용하여 측정하였다.

[0124] 그 결과, 활성화된 장 신경교세포는 IEC-6 세포의 ROS 생성을 증가시켰으나, 활성 펩타이드를 처리한 경우에는 IEC-6세포의 ROS를 활성화된 장 신경교세포를 처리하기 전 상태로 감소시키는 것으로 나타났다(도 4 참조). 따라서, 본 발명에 의한 펩타이드는 장 신경교세포에 의해 유도되는 염증 반응을 효과적으로 진정시킬 수 있음을 확인할 수 있었다.

[0125] 한편, 활성화된 장 신경교세포에 의해 유도된 IEC-6 세포의 ROS 생성은 IEC-6 세포의 DNA 손상을 유도할 수 있는데, 이러한 DNA 손상이 본 발명의 펩타이드에 의해 효과적으로 차단될 수 있는지 추가적으로 확인해 보았다.

[0126] 이를 위하여 장 신경교세포와 공배양한 세포를 IEC-6 세포를 이용하여 Neutral comet assay를 실시하였다. 이는 Oxiselect™ comet assay kit (STA-350, Cell Bio Labs, Inc)를 이용하여 제조자 방식에 따라 실시하였는데, 세포는 0.5% 저용해점 아가로오스에 현탁시켜 0.5% 아가로오스로 전코팅된 프로스티드 글래스 현미경용 슬라이드로 이동시켰다. 슬라이드에 용해 시약(2.5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Trizma base, 1% N-lauroylsarcosine, NaOH to pH 10.0, and 1% v/v Triton X-100)을 넣고 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 25V에서 40분간 전기영동하였다. Comet tails은 제조자 방식에 따라 SYBR green으로 염색한 후 형광 현미경으로 관찰하였다.

[0127] 한편, Hoechst staining을 위하여 장 신경교세포를 6 웰 플레이트에서 배양하고, 펩타이드를 4시간 동안 전처리한 후 IFN-γ (10 ng/ml)와 LPS (1 μg/ml)로 추가 24시간 동안 자극하였다. 그 후 배양 배지를 수집하여 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 상기 배지를 poly-D-lysine coated cover slips (12 mm)에서 배양한 IEC-6 세포에 1:4 비율로 혼합하고, 24시간 동안 추가 배양하였다. 이후 커버 슬립을 세척하고 4 % paraformaldehyde로 10분간 고정한 후, PBS로 다시 세척하였다. 세포는 0.1% Triton X-100으로 10분간 투과성 있게 만들고, 1 μg/ml DNA binding dye인 Bisbenzimidazole Hoechst 33342 (Sigma, MO, USA)로 밤새도록 염색하였다. 염색된 세포는 PBS로 세척한 후 형광현미경(CTR 6000 Leica, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

[0128] 그 결과, 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 활성화된 장 신경교세포에 의해 유도된 IEC-6 세포의 DNA 손상을 효과적으로 차단하는 것으로 확인되었다(도 5 참조). 즉, 본 발명의 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드는 장 신경교세포의 ROS 생성을 억제하여 IEC-6 세포 DNA의 산화적 손상을 방지하는 것을 알 수 있었다.

[0129] **3-4. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교세포(EGC) 활성 저해가 IEC-6 세포의 세포사멸에 미치는 효과 분석**

[0130] 상기 실시예 3-3을 통하여 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 활성화된 장 신경교세포에 의해 유도된 IEC-6 세포의 DNA 손상을 효과적으로 억제하는 것을 확인한 바, 본 발명자들은 상기 펩타이드가 IEC-6의 세포사멸도 효과적으로 억제하는지 MTT assay 및 Annexin V/PI 염색으로 확인해 보았다.

[0131] MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay를 위하여 세포는 24위 공 배양 플레이트에  $5 \times 10^3$  cells/well로 분주하였다. 24시간 후, 세포를 신선한 배지로 세척하고, 다양한 농도의 펩타이드 및 저해제로 4시간 동안 처리하였다. 이후 세포를 PBS로 세척하고, 100 μl의 MTT solution (1 mg/ml)을 첨가한 후 4시간 동안 반응시킨 후 제거하였다. 이 후, 형성된 formazan crystals을 용해하기 위하여 100 μl의 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 첨가하였다. 광학밀도는 ultraviolet (UV) microplate reader (Tecan Austria GmbH, Grodig, Austria)를 이용하여 540nm에서 측정하였다. 상대적인 세포 생존은 대조군과 비교하여 측정하였

고, 3번 이상의 독립된 실험의 평균치로 결과를 도시하였다.

[0132] 한편, Annexin V/PI 염색은 Annexin V-FITC kit (BD, CA, USA)를 이용하여 제조자 방식에 따라 유세포 분석기를 이용하여 측정하였다. 즉, 시료 처리된 세포를 스크래핑하고 원심분리기로 모아, 차가운 PBS로 2번 세척한 후,  $1 \times 10^6$  cells/ml이 되도록 결합용 버퍼에 재현탁시켰다. 이후, 5  $\mu$ l의 20  $\mu$ g/ml Annexin V-FITC와 50  $\mu$ g/ml의 PI를 첨가하고, 15분간 암 조건에서 반응시켰다. 세포사멸의 정량 분석은 Cell Quest analysis software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)를 이용한 FACSCalibur 유세포 분석기로 분석하였다.

[0133] 그 결과, 활성화된 장 신경교세포와 공배양된 IEC-6 세포는 세포사멸 기전이 활성화되고 세포 증식이 현저히 억제되는 등 세포사멸이 유도되는 것으로 확인되었으나, 클라미도모나스 유래의 활성 펩타이드를 처리하면 이들 세포사멸이 효과적으로 억제되는 것을 확인할 수 있었다(도6 참조). 특히 세포사멸을 유도하는 bax와 caspase-3 발현이 감소하고, 세포사멸을 억제하는 bcl-2 발현이 증가하는 것으로 확인되었다(도 7 참조).

[0134] **3-5. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교세포(EGC) 활성화 저해가 IEC-6 세포의 세포주기에 미치는 효과 분석**

[0135] 상기 실시예 3-4의 세포사멸과 관련하여 본 발명자들은 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 저해함으로써 IEC-6 세포의 세포주기에도 영향을 미칠 수 있는지 확인하였다.

[0136] 이를 위하여 IEC-6 세포를 다양한 조건에서 장 신경교세포와 24시간 동안 공배양하였다. IEC-6 세포를 스크래핑하고 차가운 PBS로 세척한 후, 1% (w/v) paraformaldehyde를 처리하였다. 이후 ice-cold 70% (v/v) ethanol을 최소 12시간 처리하고, PBS로 2번 세척한 후, RNase (200  $\mu$ g/ml final concentration)와 반응시키고 propidium iodide (100  $\mu$ g/ml final concentration)로 30분간 염색하였다. 이후, 세포를 FACSCalibur system (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 유세포 분석한 후, Cell Quest analysis software (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA)로 데이터를 분석하였다.

[0137] 그 결과, 활성화된 장 신경교세포에 의해 IEC-6 세포는 G1기에서 세포주기가 억류되는 것으로 나타났으나, 본 발명의 활성 펩타이드를 처리한 경우 이러한 세포 억류가 감소되고 정상적인 세포 주기로 되돌아가는 것을 확인하였다(도 8 참조).

[0138] **3-6. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교세포(EGC) 활성화 저해가 IEC-6 세포의 DNA 손상 신호전달 물질에 미치는 효과 분석**

[0139] 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상과 관련하여 이에 관여하는 신호전달 물질의 활성화를 관찰해 보았다. 이를 위하여 IEC-6의 세포사멸과 세포 주기 억류에 관여하는 ATM과 ATR의 활성화를 관찰해 보았는데, 장 신경교세포의 활성화는 IEC-6 세포의 ATM과 ATP의 인산화를 촉진시키고, chk2에 의한 p53의 인산화를 유도하였으나, 본 발명에 의한 활성 펩타이드를 처리한 경우 ATM/chk2/p53 신호전달을 억제하였으며, 이에 따라 세포사멸과 세포 주기 억류 효과도 사라지는 것을 알 수 있었다(도 9 참조).

[0140] **3-7. 클라미도모나스 유래 활성 펩타이드의 장 신경교세포(EGC) 활성화 저해 효과**

[0141] 본 발명에 의한 활성 펩타이드가 장 신경교세포 활성을 저해하는 기전에 대해 연구해 보고자 본 발명자들은 iNOS 발현을 분석해보았다. NF- $\kappa$ B 전사인자가 iNOS 유전자의 발현을 조절하기 때문에 본 발명자들은 NF- $\kappa$ B 신호전달 분자에 활성 펩타이드가 어떠한 영향을 미치는지 확인하였는데, NF- $\kappa$ B 신호전달 분자는 TLR-2 및 TLR-4를 통한 LPS와 IFN- $\gamma$  자극에 의해 활성화되었고, NF- $\kappa$ B가 이러한 자극에 의하여 핵 내로 이동하는 것을 확인하였다(도 10 참조). 그러나, 활성 펩타이드를 처리하는 경우 TLR2, TLR4, IKK, I $\kappa$ B와 같은 단백질 수준이 낮아졌고, NF- $\kappa$ B의 핵 내부로의 이동도 현저히 저해되었다. 따라서, 본 발명자들은 본 발명의 활성 펩타이드가 NF- $\kappa$ B의 핵 내부로의 이동을 차단하여 iNOS 유전자의 발현을 억제하는 것을 알 수 있었다.

[0142] 본 발명자들은 상기와 같은 기전을 좀 더 명확히 확인해보고자, NF- $\kappa$ B와 iNOS의 저해제 활성을 본발명에 의한 활성 펩타이드의 효과와 비교해 보았다. 장 신경교세포에 이와 같은 저해제를 처리한 후, LPS와 IFN- $\gamma$ 로 자극

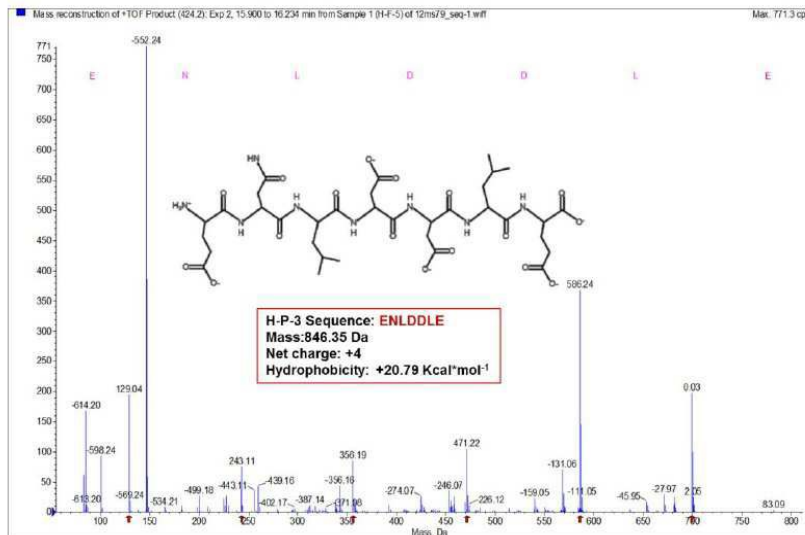
하고, 이후 IEC-6 세포와 공배양 하였을 때, 펩타이드를 처리한 샘플 및 NF- $\kappa$ B와 iNOS의 저해제를 처리한 샘플에서 세포사멸이 거의 유사한 수준으로 확인되었다(도 11 참조).

[0143]

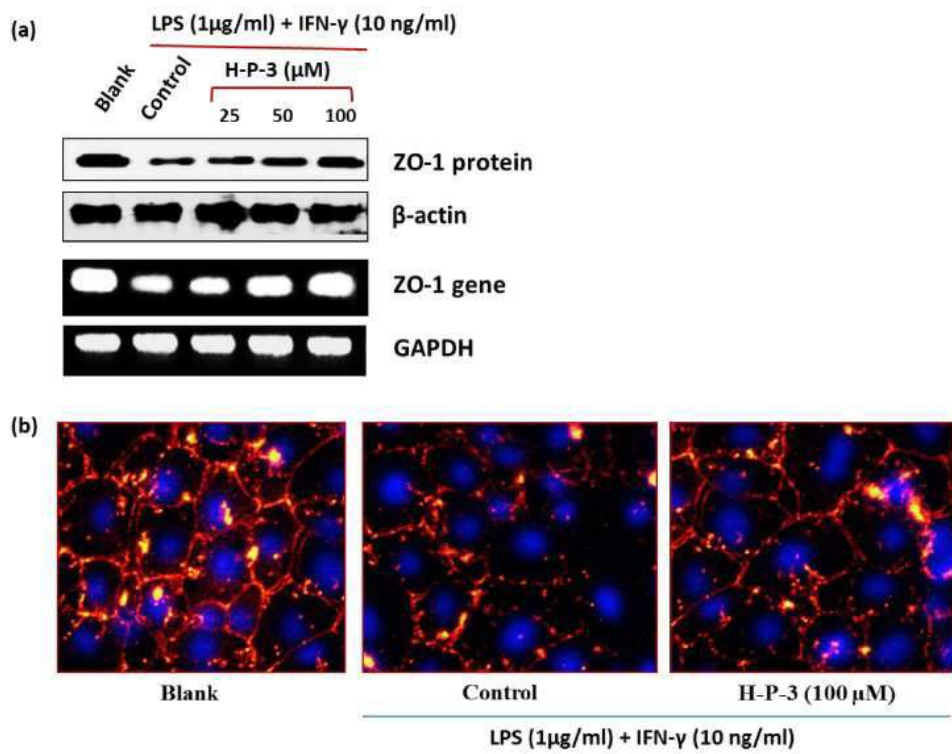
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

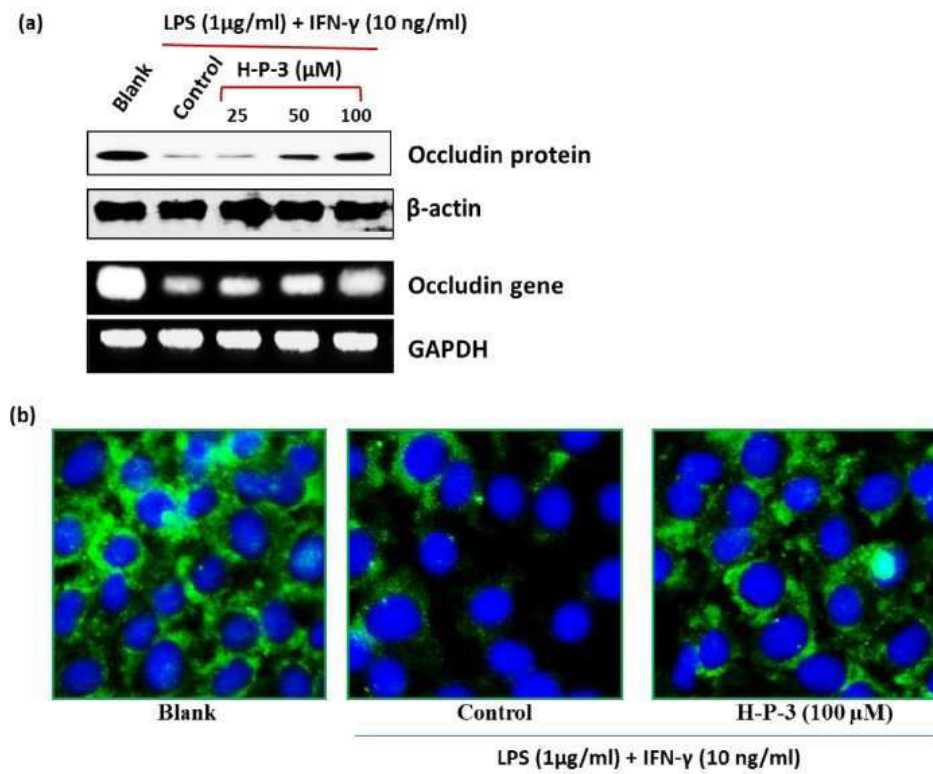
### 도면1



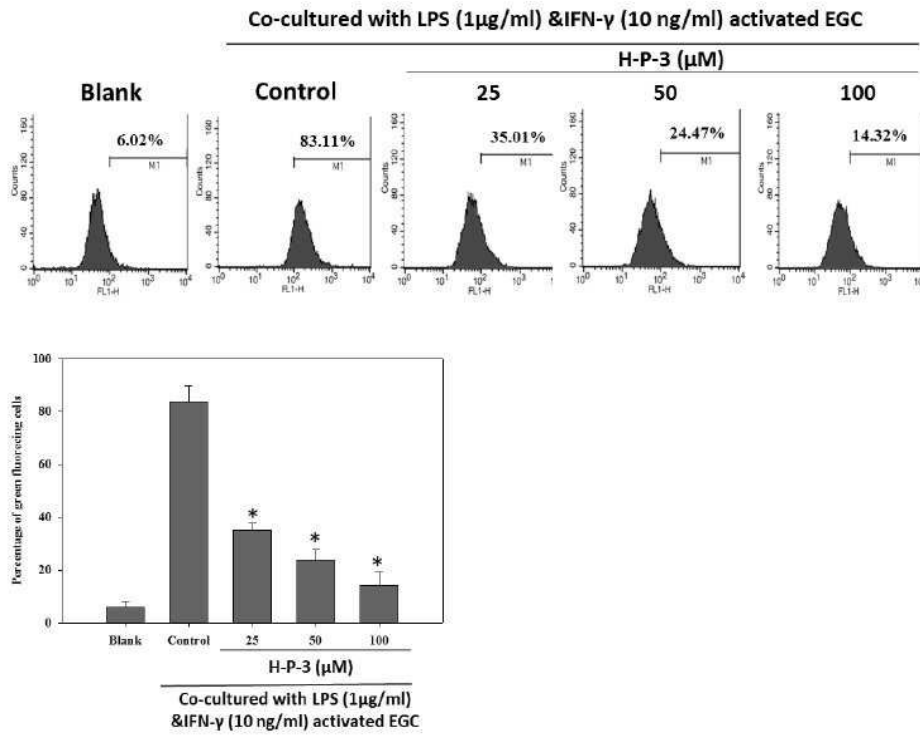
도면2



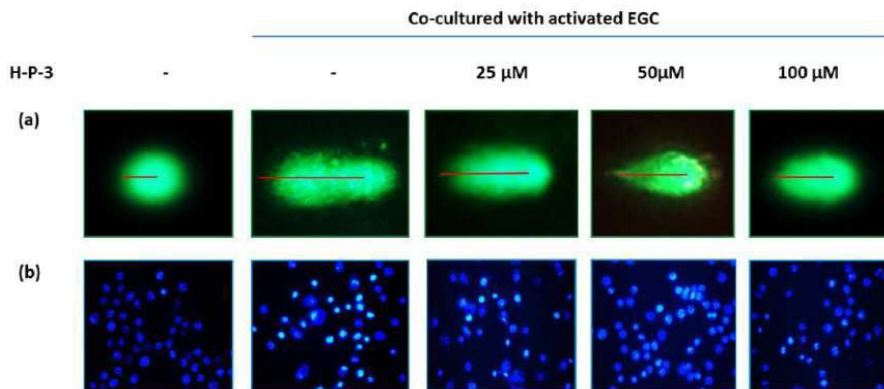
도면3



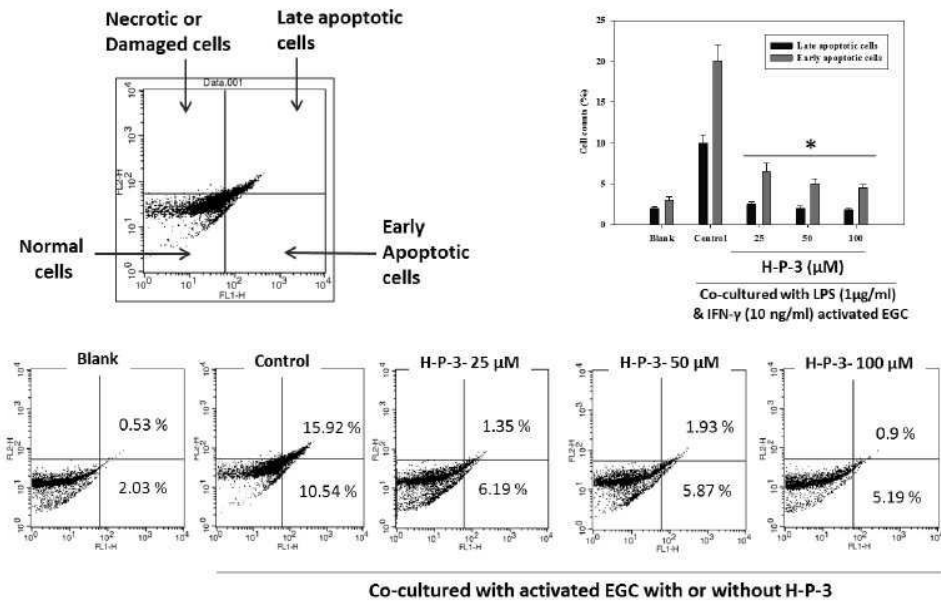
도면4



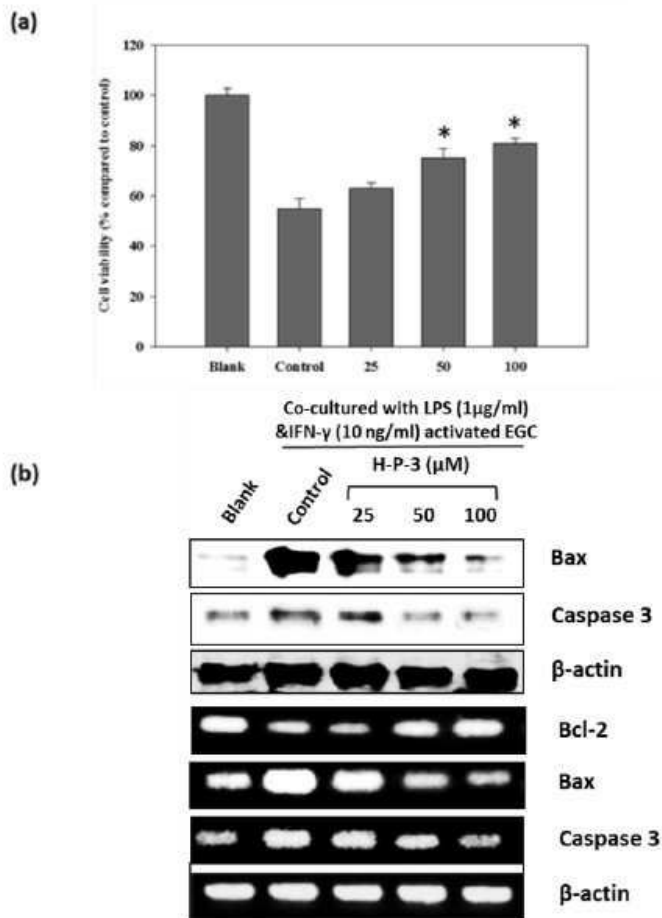
도면5



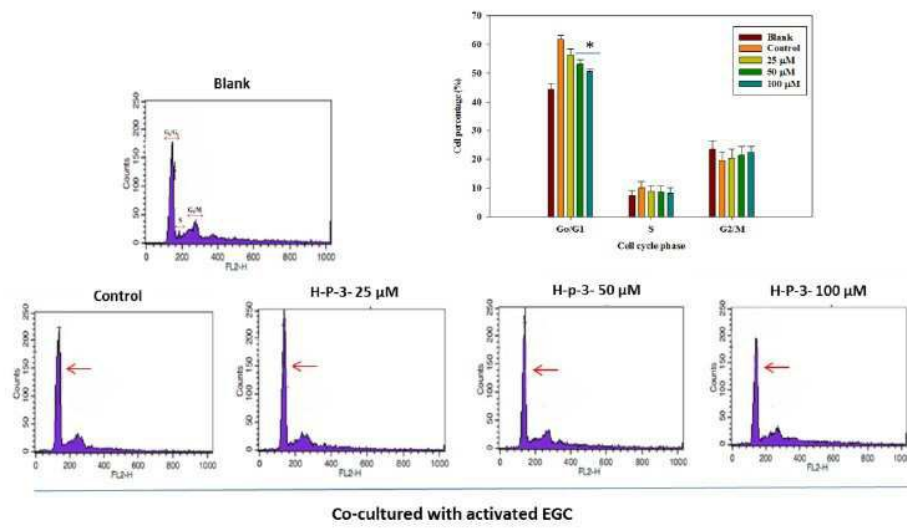
도면6



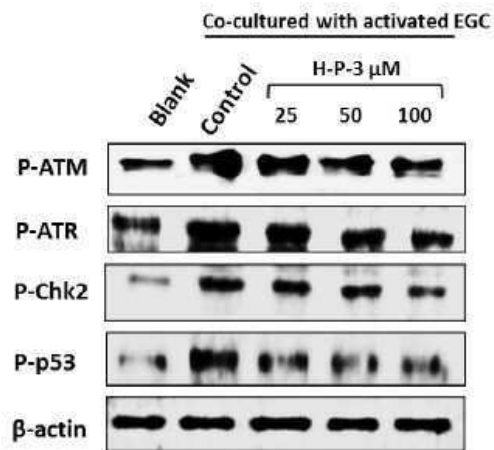
도면7



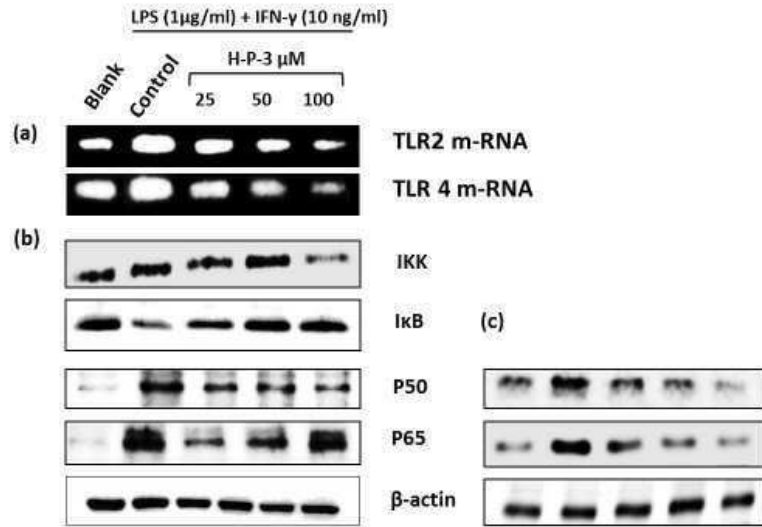
도면8



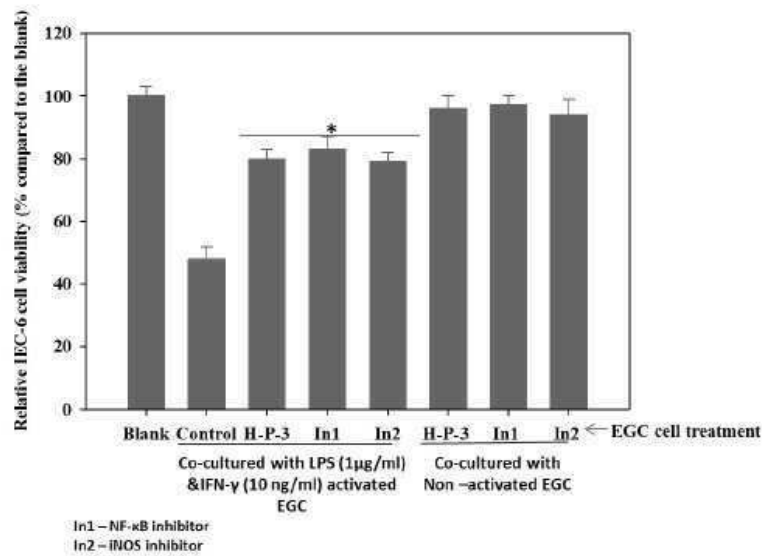
도면9



도면10



도면11



## 서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Composition for treating or preventing intestinal disorders  
comprising peptide derived from chlamidomonas sp.
- <130> PN1305-146
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 7
- <212> PRT

<213> Chlamidomonas sp.

<400> 1

Glu Asn Leu Asp Asp Leu Glu

1

5