



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138666
(43) 공개일자 2017년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/46 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/461 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0070735
(22) 출원일자 2016년06월08일
심사청구일자 2016년06월08일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
정원교
부산광역시 남구 분포로 111, 128동 2101호(용호
동, LG메트로시티아파트)
박남규
부산광역시 수영구 광안해변로 95, 103동 211호(
남천동, 삼익비치아파트)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 7 항

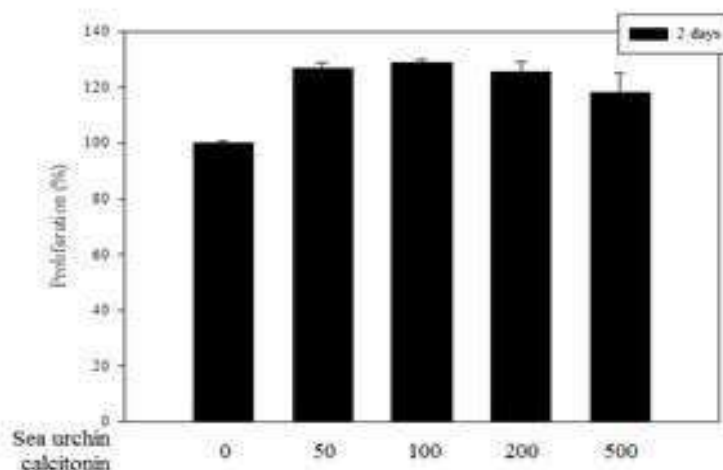
(54) 발명의 명칭 **성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩타이드는 ALP(Alkaline phosphatase) 활성을 증가시키고, 골미네랄화를 촉진시키는 활성이 우수하여 골 질환 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

또한, 세포독성이 일어나지 않으며, 약물에 대한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 체내에서도 안정한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 38/1767 (2013.01)
C12Y 301/03001 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/306 (2013.01)

허성영

부산광역시 남구 용소로21번길 97, 504호(대연동,
에이스원룸)

(72) 발명자

옹구앤반딧

부산광역시 남구 용소로21번길 21-6 (대연동)

고석천

제주특별자치도 제주시 선덕로3길 12

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJT200673

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발

기 여 율 50/100

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.24 ~ 2015.08.23

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20150220

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 해양수산생명공학기술개발사업

연구과제명 해양융복합 바이오닉스 소재 상용화 기술 개발

기 여 율 50/100

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2015.04.21 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 조골세포 형성능을 갖는 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 성게(Sea urchin) 유래인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 ALP(Alkaline phosphatase) 활성을 촉진 또는 증가시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 펩타이드는 골미네랄화를 촉진 또는 증가시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 5

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 골 질환은 뼈의 손상, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 또는 대사성골질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 골다공증은 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포(osteoclast)의 활성화에 따른 골흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증과, 노화가 되면서 조골세포(osteoblast)의 기능이 감소하여 골형성이 감소하는 노인성 골다공증으로 분류할 수 있다. 이러한 골다공증으로 인한 골절은 심각한 활동 제한에 이르게 되고, 고관절 골절의 경우 약 15-35%의 높은 사망률과 관련되어 있기 때문에, 골다공증성 골절이 발생하기 이전에 골다공증의 진단과 치료가 중요하다(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008).

[0003] 국내의 골다공증 유병률은 2008년 기준 최근 5년간 약 3배 증가되었고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회경제적 손실이 약 1조 500억원에 달할 정도로 심각한 수준에 이르고 있다고 보고된다(골다공증 진단 및 치료 지침 2007, 2008). 또한, 최신의 2009년도 국민건강통계에 따르면, 50세 이상 및 65세 이상 한국인 전체의 골다공증 유병률은 23.1%와 42.0%로 만성질환 중에서도 유병률이 매우 높게 나타나 국민건강에 커다란 문제로 떠오르고

있다(2009년 국민건강통계-국민건강영양조사).

[0004] 기존에 알려진 골다공증 치료제로는 비스포스포네이트(bisphosphonate)계열의 약물이 있는데, 비스포스포네이트는 골의 무기질 성분에 침착되며, 비스포스포네이트가 침착된 골을 파골세포가 탐식할 경우 가수분해되지 않는 ATP 유사체(analogue)를 형성하여 세포에 독성을 나타내거나 파골세포 내에서 다양한 방식으로 파골세포의 활성 감소 및 세포사멸(apoptosis)을 초래해 골 흡수를 줄이고 이를 통해 골밀도를 증가시키는 것으로 알려져 있다. 이러한 약물들은 비교적 안전한 것으로 알려져 있으나, 최근 장기간 사용 시 정상적인 골 흡수 및 골 형성에 의한 골의 재형성(remodeling)이나 골절 이후 골 재생(healing)과정에 영향을 주어 골의 탄성이 떨어져 오히려 골 강도에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 우려들이 제기되고 있으며, 실제로 이로 인해 많은 환자에서 피로 골절을 일으킨다는 보고가 있다.

[0005] 따라서 골다공증 발병과 관련된 새로운 골대사 기전의 발견 및 골다공증을 비롯한 다양한 골질환의 예방 또는 치료제 개발의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제656571호
(특허문헌 0002) 한국등록특허 제585562호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 신규한 성게 유래의 칼시토닌 유사 펩타이드를 발견하였으며, 이에 조골세포 형성능이 우수하여 골 질환 치료제로 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 조골세포 형성능을 갖는 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 나아가 본 발명의 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 조골세포 형성능을 갖는 펩타이드를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 성게(Sea urchin) 유래일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 ALP(Alkaline phosphatase) 활성을 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 골미네랄화를 촉진 또는 증가시킬 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골 질환은 뼈의 손상, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 또는 대사성골질환일 수 있다.

[0017] 나아가 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 펩타이드는 ALP(Alkaline phosphatase) 활성을 증가시키고, 골 미네랄화를 촉진시키는 활성이 우수하여 골 질환 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0019] 또한, 세포독성이 일어나지 않으며, 약물에 대한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있으며, 체내에서도 안정한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 이틀간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 MC3T3-E1 cell line에 대한 세포증식도를 확인한 결과이다.

도 2는 이틀간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 MC3T3-E1 cell line에 대한 ALP 활성을 측정한 결과이다.

도 3은 일주일간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 MC3T3-E1 cell line에 대한 미네랄화 활성을 측정한 결과이다.

도 4는 이틀간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 D1 cell line에 대한 세포증식도 확인 결과이다.

도 5는 이틀간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 D1 cell line에 대한 ALP 활성을 측정한 결과이다.

도 6은 일주일간 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 처리한 D1 cell line에 대한 미네랄화 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 지구 표면의 약 70% 이상을 차지하고 있는 해양에는 수많은 자원들을 포함하고 있으며, 해양환경에서 서식하는 해양 무척추동물들이 제공하는 다양한 구조의 천연물들은 기능성 식품, 의약품 및 화장품 원료뿐만 아니라 의공학용 소재로 사용된다. 해양생물은 육상생물과 달리 수계라는 환경으로 인해 해양생물만의 특이한 대사과정을 가지며 그에 따른 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다. 육상생물자원을 대상으로 이미 많은 연구가 진행되어 있으나, 해양생물은 높은 종 다양성과 소재 확보의 제한성으로 인하여 미지의 천연물질개발에 대한 기대가 높이 평가되고 있다.

[0022] 본 발명에서는 새로운 골 질환 치료제로서의 소재로 성게를 주목하였는데 성게는 7~8월 동해와 남해에서 많이 채취되는 어패류로서, 엽산 함유량이 높아 소화 흡수에 좋고, 특히 강장제로 효능을 좋다고 알려져 있을 뿐, 골 질환의 치료에 사용할 수 있다는 내용에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0023] 본 발명자들은 성게에서 유래한 서열번호 1의 펩타이드에 골 질환 치료 활성이 있다는 것을 본 발명의 일실시예를 통하여 확인하였는데, 본 발명의 일실시예에 의하면, 마우스 유래 전조골세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1 셀라인과 마우스 골수유래 중간엽줄기세포(mouse bone marrow stem cell, BMSC)인 D1 셀라인을 이용하여 본 발명의 펩타이드 처리에 의한 각각의 세포증식 정도를 확인한 결과, 본 발명의 펩타이드는 세포 증식을 효율적으로 유도하는 성분을 함유하고 있음을 확인하였다(도 1 및 도 4 참조).

[0024] 본 발명의 다른 일실시예에서는 마우스 유래 전조골세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1 셀라인과 마우스 골수유래 중간엽줄기세포(mouse bone marrow stem cell, BMSC)인 D1 셀라인을 이용하여 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드 처리에 의한 조골세포 초기분화표지인 ALP 활성을 측정한 결과, 본 발명 펩타이드 처리에 의하여 ALP 활성이 증가되었음을 알 수 있었다(도 2 및 도 5 참조).

[0025] 또한, 본 발명에서는 마우스 유래 전조골세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1 셀라인과 마우스 골수유래 중간엽줄기세포(mouse bone marrow stem cell, BMSC)인 D1 셀라인을 이용하여 조골세포에 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 첨가하여 골 미네랄화 형성을 확인한 결과, 본 발명의 펩타이드 처리에 의하여 골 미네랄화 형성이 촉진되었음을 알 수 있었다(도 3 및 도 6 참조).

[0026] 따라서, 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 조성물은 골 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 “골 질환”이란 뼈의 손상, 골다공증, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 또는 대사성골질환을 의미한다.

- [0028] 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 ‘펩타이드’는 약학적 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량 %로 포함될 수 있으며, 5~30중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 5~20중량%로 포함될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0032] 본 발명은 약학적 조성물은 연구자, 의사, 약사 또는 기타 임상에서 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 1~10,000mg/kg/day, 바람직하게는 1~200mg/kg/day 내지의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.
- [0033] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 조성물은 골질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 상기 펩타이드를 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 펩타이드를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 유효성분인 상기 펩타이드의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 펩타이드는 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 30 중량 %로 포함될 수 있으며, 5~30중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 5~20중량%로 포함될 수 있다.
- [0037] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 상기 펩타이드는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가되는 것이다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목

적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0038] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 상기 펩타이드를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0039] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~10중량%, 바람직하게는 0.01~0.1중량%로 포함되는 것이다.

[0040] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 뿐만 아니라, 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 좋다.

[0041] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0042] <실시예 1>

[0043] 재료 준비

[0044] 본 발명의 실험을 위하여 DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium), trypsin-EDTA, 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin), FBS(fetal bovine serum)은 Gibco BRL, Life Technologies(Grand Island, NY, USA)에서 취득하였으며, MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide), Alizarin red-S, cetylpyridinium chloride monohydrate, p-nitrophenyl phosphate (p-NPP), ascorbic acid, 텍사메타손(dexamethasone) 및 β -글리세로인산칼슘(glycerophosphate)은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

[0045] <실시예 2>

[0046] 본 발명의 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드 제조 방법

[0047] 본 발명에서는 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 합성하기 위하여 Fmoc-법을 사용하여 고상법으로 펩타이드를 합성하였다. C-말단에 아마이드(amide)화된 형태의 펩타이드를 합성하기 위해 Fmoc-NH₂-PAL-resin을, C-말단이 free한 경우는 Fmoc-amino acid-Wang-resin을 사용하였다. 정제된 펩타이드는 모두 L형 아미노산으로 합성하였으며, C말단이 아마이드(amide)화되어 있는 comyrin-NH₂와 free한 형태인 comyrin-OH의 펩타이드들을 합성하였다.

[0048] 상기와 같이 제조된 본 발명의 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 아미노산 서열은 서열번호 1과 같다.

[0049] <실시예 3>

[0050] 본 발명의 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 골질환 치료 효과

[0051] 본 발명자들은 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드에 골질환을 치료하는 효과가 있는지를 확인하기 위하여 마우스 유래 전조골세포(pre-osteoblast)인 MC3T3-E1 셀라인과 마우스 골수유래 중간엽줄기세포(mouse bone marrow stem cell, BMSC)인 D1 셀라인을 이용하여 각각의 세포증식, 조골세포 초기분화표지인 ALP 활성 및 Alizarin red S를 이용한 조골세포의 미네랄화를 확인하였다.

[0052] <3-1> 성계 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 세포 증식 확인 결과

[0053] MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석은 탈수소 효소작용에 의해 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸리움을 청자색의 포르마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사

법으로 이 검사법은 세포의 증식과 성장을 알아보는 대표적인 실험방법 중 하나로 살아있는 세포 수에 비례해서 흡광도를 나타낸다.

[0054] 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 농도(50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$)에 따른 조골세포 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다.

[0055] 배양한 MC3T3-E1 세포를 0.4% 트립판 블루 염색법을 이용하여 세포 수를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 96웰 플레이트에 분주한 후, 농도 별로 준비된 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 20 μl 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%의 CO_2 인큐베이터에서 4시간 더 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 100 μl 씩 첨가하여 생성된 불용성의 포르마잔 결정을 용해시킨 뒤 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하였으며, 세포증식률은 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다. MTT 분석으로 확인한 결과는 도 1과 같다.

[0056] MC3T3-E1 세포에 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때, 아무 것도 처리하지 않은 대조군(100%)에 비하여 모두 120% 정도의 증식률을 보임을 알 수 있었다(도 1 참조).

[0057] 또한, 본 발명자들은 D1 셀라인에서도 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 농도(50, 100, 200, 500 $\mu\text{g/ml}$)에 따른 조골세포 성장에 미치는 영향을 확인한 결과, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 대조군과 비슷한 정도의 세포 증식을 보였으나, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 대조군에 비해 약 110% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었다(도 4 참조).

[0058] 따라서, 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드는 세포 증식을 효율적으로 유도하는 성분을 함유하고 있는 것으로 생각된다.

[0059] <3-2> 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 ALP 활성 증가 효과

[0060] 염기성 인산분해 효소(Alkaline phosphatase, ALP)는 거의 모든 조직에 존재하며 특히 골조직에 존재하는 ALP는 골 성장이 활발히 일어날 때 그 활성이 증가한다.

[0061] 따라서 조골세포 활성을 나타내는 바이오마커로서 MC3T3-E1 조골세포에서의 ALP 활성을 측정하여 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드가 조골세포의 골 성장활성에 미치는 영향을 확인하였다. 구체적인 실험방법은 하기와 같다.

[0062] 배양된 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 96웰 플레이트에 분주한 후, 농도별로 준비된 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 20 μl 씩 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%의 CO_2 인큐베이터에서 48시간 배양하였다. 48시간 배양 후 PBS로 3회 세척하고 0.1% Triton X-100을 20 μl 씩 넣은 다음 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%의 CO_2 인큐베이터에서 30분간 용해시켰다. 용해된 세포의 상등액 5 μl 는 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 상등액에 20 μl 의 0.1N glycine과 100 μl 의 100mM p-NPP를 첨가한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%의 CO_2 인큐베이터 30분간 반응시켰다. 반응 후 0.1N NaOH로 반응을 정지하고 200 μl 를 취해 405nm에서 흡광도를 측정하여 ALP 효소에 의해 p-nitrophenol로 전환되니 양을 산출하였다. 세포수의 차이가 ALP 활성도에 영향을 미칠 수 있으므로 총 단백질 양을 측정하여 나누어 줌으로써 단위 세포수에 대한 ALP 활성도를 계산하였다.

[0063] 그 결과, 아무 것도 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하였을 때 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 약 120% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었고, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 약 150% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었다(도 2 참조).

[0064] 또한, 본 발명자들은 D1 셀라인에서도 ALP 활성을 측정하여 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드가 조골세포의 골 성장활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 대조군과 ALP 활성정도가 비슷하였으나, 아무 것도 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하였을 때 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 약 120% 정도의 증가율을 보였으며, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때는 약 160% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었다(도 5 참조).

[0065] <3-3> 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드의 미네랄화 형성 효과

[0066] 골 미네랄화 형성능은 조골세포의 분화에 중요한 표식인자이다. Alizarin은 식물성 염료로서 칼슘에 특이적으로

흡착력이 높다. 이것은 무기질화된 세포의 기질에 염색되므로 석회화된 양과 염색 정도가 상호 비례한다.

[0067] 본 발명에서는 조골세포에 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 첨가하여 골 미네랄화 형성을 확인하였으며, 구체적인 실험 결과는 하기와 같다.

[0068] 먼저, 배양한 MC3T3-E1 세포를 1×10^5 cell/ml로 조정하여 플레이트에 배양한 후 미네랄화 유도를 위해 분화유도 배지와 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 농도별로 첨가하여 7일간 배양하였다. 배양 후 70% 에탄올로 4℃에서 1시간 세포를 고정시켰다. Alizarin-Red(AR) 솔루션은 10ml 증류수에 40mM이 되도록 농도를 맞춘 후 pH4.2로 조정하였다. 세포 고정 후 AR 솔루션(2ml/웰)으로 10분간 염색한 후 증류수로 2~5회 세척하여 염색되지 않는 부분은 PBS로 세척하였다.

[0069] 표면이 마르지 않도록 PBS로 적셔주면서 현미경으로 관찰하였고, 노들(nodule) 형성 확인 후 10mM sodium phosphate(10% cetylpyridinium chloride, pH 7.0)을 2ml/웰 첨가하여 ELISA reader로 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 10μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 대조군과 골 미네랄화 형성 정도가 비슷하였으나, 아무 것도 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하였을 때 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50μg/ml 및 100μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 골 미네랄화 형성 정도가 약 110% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었다(도 3 참조).

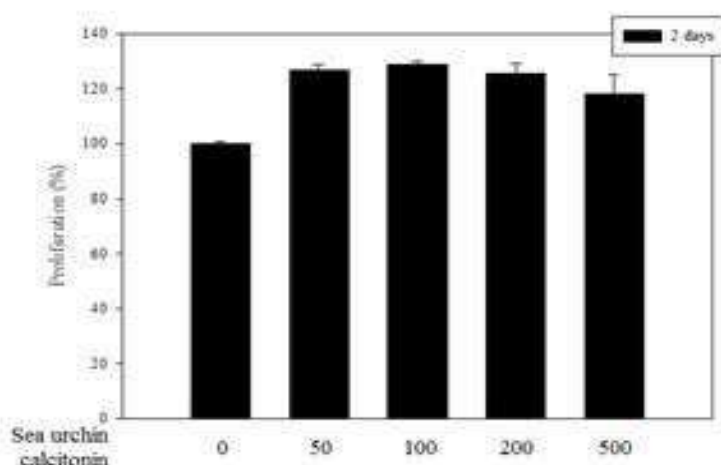
[0071] 또한, 본 발명자들은 D1 셀라인에서도 골 미네랄화 형성 정도를 측정하여 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드가 조골세포의 골 성장활성에 미치는 영향을 확인한 결과, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 10μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 대조군과 골 미네랄화 형성 정도가 비슷하였으나, 아무 것도 처리하지 않은 대조군(100%)과 비교하였을 때 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 50μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 약 110% 정도의 증가율을 보였으며, 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드를 100μg/ml의 농도로 처리하였을 때는 약 120% 정도의 증가율을 보임을 알 수 있었다(도 6 참조).

[0072] 따라서, 상기의 결과로 미루어보아 본 발명의 성게 유래 칼시토닌 유사 펩타이드에 MC3T3-E1 및 D1 세포주에서 세포증식 효과가 있고, 조골세포 초기분화표지인 ALP 활성을 증가시키는 활성이 있으며, 조골세포의 골 미네랄화 형성을 촉진시키는 효과가 있어, 이를 골질환의 예방 및 치료에 사용할 수 있는 효과가 있다.

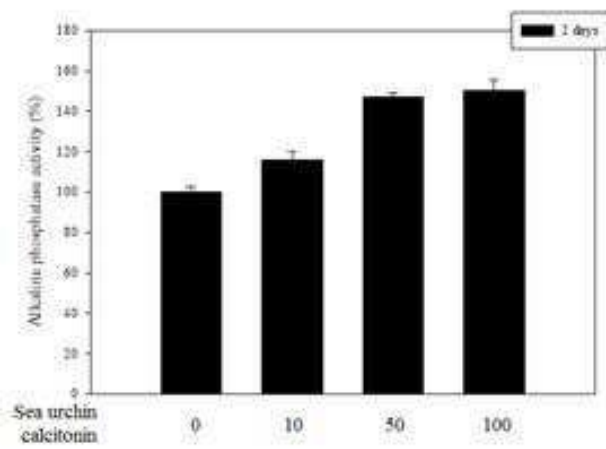
[0073] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

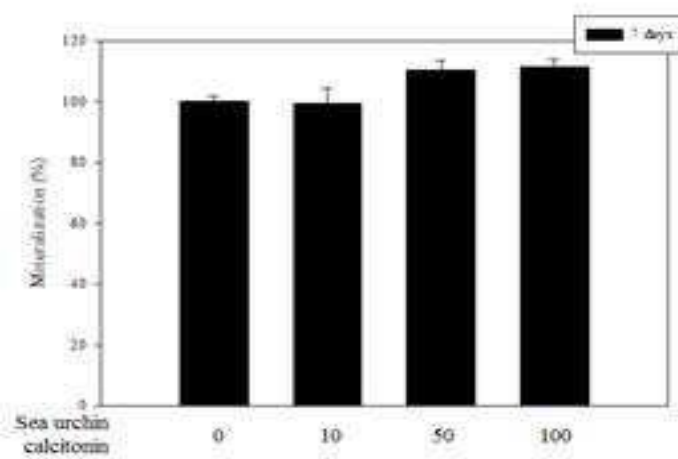
도면1



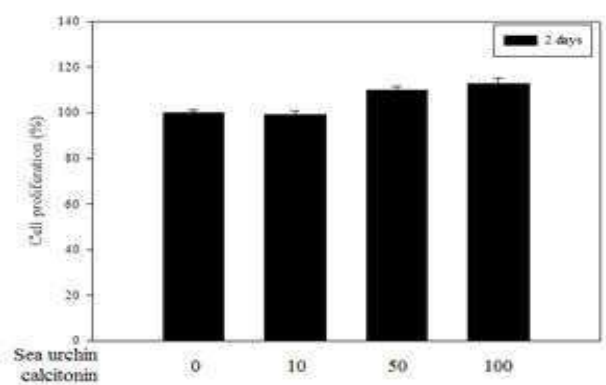
도면2



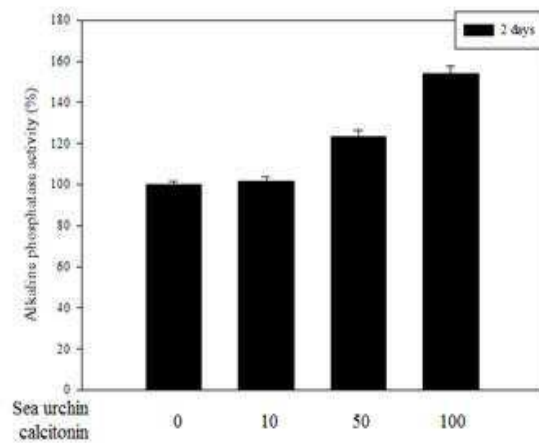
도면3



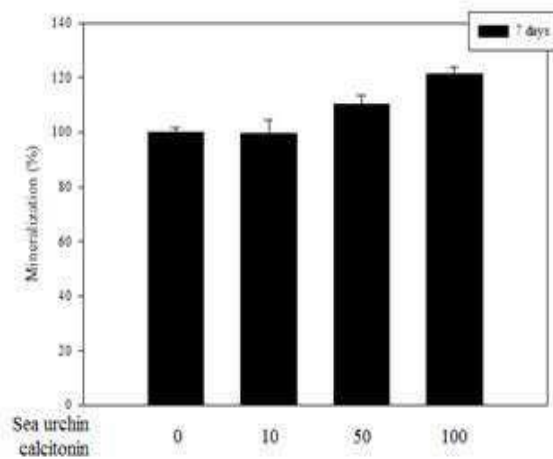
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Composition for preventing or treating bone disease comprising
from sea urchin calcitonin-like peptide
- <130> PN1506-171
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 37
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> sea urchin calcitonin-like peptide's sequence

<400> 1

Ser Lys Gly Cys Gly Ser Phe Ser Gly Cys Met Gln Met Glu Val Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Gly Leu Asn Gly Pro

35