(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0092255
(43) 공개일자 2018년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0094564
(22) 출원일자 2017년07월26일
심사청구일자 2017년07월26일
(30) 우선권주장
1020170017325 2017년02월08일 대한민국(KR)
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
제재영
부산광역시 남구 신선로 566, 304동 401호(지에스하이츠자이)
형준호
부산광역시 부산진구 당감로 17, 9동 1102호(삼익아파트)
오윤옥
부산광역시 남구 용호로 38-17, 209동 1402호(용호동, 일신님2차아파트)
(74) 대리인
위병갑

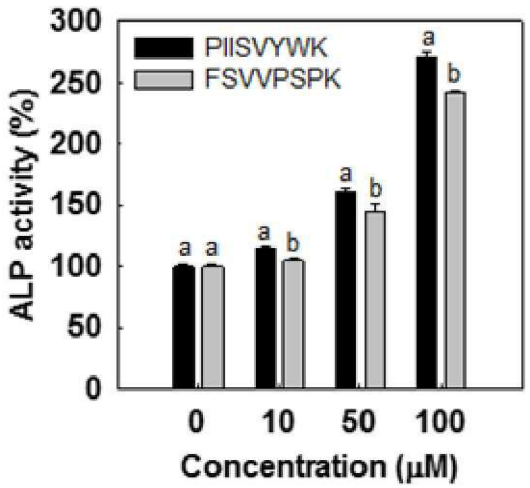
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **홍합단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드 및 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 효과가 있어 골질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0654 (2013.01)
C12N 2501/998 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A2B4016004
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 수산물로부터 골다공증 치료 및 완화 펩타이드 개발
기 여 율 1/1
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 홍합단백질 유래인 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 것을 특징으로 하는 펩타이드.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 및 대사성 골질환으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 홍합단백질 유래 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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] 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 사용시 정상적인 골 흡수 및 골 형성에 의한 골의 재형성(remodeling)이나 골절 이후 골 재생(healing)과정에 영향을 주어 골의 탄성이 떨어져 오히려 골강도에 좋지 않은 영향을 줄 수 있다는 우려들이 제기되고 있으며, 실제로 이로 인해 많은 환자에서 피로 골절을 일으킨다는 보고가 있다. 따라서, 골다공증 발병과 관련된 새로운 골대사 기전의 발견 및 골다공증 예방 또

는 치료제 개발의 필요성이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1486074호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드를 제공한다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 홍합단백질 유래인 것일 수 있다.

[0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 것일 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 골질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 골질환은 골다공증, 골관절염, 류미티스 관절염, 골연화증, 구루병, 섬유성 골염, 무형성 골질환 및 대사성 골질환으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나인 것일 수 있다.

[0013] 또한, 상기 펩타이드를 포함하는 조골세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 펩타이드는 서열번호 1(PIISVYWK) 또는 서열번호 2(FSVVPSPK)를 포함하는 골 형성 촉진용 펩타이드로서, 상기 펩타이드는 조골세포의 분화를 촉진시키는 효과가 있어 골질환의 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드를 처리한 후, ALP 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다($^{a,b}p<0.05$).

도 2는 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드를 처리한 후, 조골세포 분화에 관여하는 단백질 발현 여부를 웨스턴 블럿팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드를 처리한 후, 조골세포 분화에 관여하는 MAPKs 발현 여부를 웨스턴 블럿팅으로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드를 처리한 후, 조골세포의 미네랄 형성 여부를 확인한 결과를 나타낸 것이다($^{a-c}p<0.05$).

도 5는 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드와 BMP 길항제의 처리 유무에 따른 BMP 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드와 BMP 길항제의 처리 유무에 따른 MAPKs 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드와 MAPKs 저해제를 처리한 후, BMP 신호전달경로의 활성화 결과를 나타낸

것이다.

도 8은 PIISVYWK 및 FSVVPSPK 펩타이드와 MAPKs 저해제를 처리한 후, ALP 활성 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 PIISVYWK (P1), FSVVPSPK (P2) 펩타이드, 및 에스트로겐(17β-estradiol)을 골다공증 모델에 투여 시 전체적인 골밀도 변화를 micro CT로 촬영한 후 사진 및 골밀도를 micro CT 측정으로부터 그래프로 정량화하여 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명의 용어, "골 형성"은 골조직의 바탕에 석회염이 침착하여 골조직을 이루는 일을 말한다.

[0017] 본 발명의 용어, "조골세포(osteoblast)"는 골기질을 합성, 분비하고, 기질에 칼슘, 마그네슘 이온 등의 무기염을 침착시킴으로서 골조직을 석회화시키는 능력을 갖고 있는 세포로서, 골 형성 등에 의해 뼈의 신생이 이루어지는 부위에서 볼 수 있다. 또한, 골 형성이 진행된 상태에서는 스스로 형성된 골조직 속에 묻혀 골세포가 되는 세포이다.

[0018] 본 발명의 용어, "예방"이란 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 골 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 골 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직 (골 결손 부위 등) 또는 세포에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 바에 따라 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 폐 내 투여, 직장 내 투여, 세포 내 직간접 투여될 수 있다. 이를 위하여 본 발명의 약적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0020] 본 발명의 약학 조성물은 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 약학 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 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. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "치료적 유효량 또는 약학으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0026] **실시예 1. 실험재료 및 방법**

[0027] **1.1. 재료**

[0028] 홍합단백질 유래 항산화 펩타이드 2종(PIISVYWK, 1004.57Da: 서열번호 1; FSVVPSPK, 860.09Da: 서열번호 2)은 Fmoc SPSS(solid phase peptide synthesis) 방법으로 합성하였다(Peptron Inc. 서울). 그 외 세포 배양에 사용된 재료는 Gibro-BRL(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 단백질 분석을 위한 항체(p-Smad1/5, Smad1/5/8, Dlx5, Runx2, osterix, p-ERK, p-JNK, p-p38 및 β-actin)는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 본 연구에 사용된 그 외 시약은 Sigma-Aldrich 社에서 구입하였다.

[0030] **1.2. 세포배양 및 시약 처리**

[0031] 실험에 사용된 마우스 유래 중간엽 줄기세포는 ATCC (D1 cell, CRL-12424)에서 구입하였고, 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 5% CO_2 및 37℃ 조건에서 배양하였다. 조골세포 분화를 위해서 분화용 배지(DMEM + 50 μg/mL ascorbic acid, 10 mM β-glycerolphosphate 및 10^{-7}M dexamethasone)는 이틀에 한번 씩 교환하였다.

[0032] BMP antagonist(noggin, 100 ng/mL) 또는 MAPKs 저해제(10 μM SB203580, 20 μM PD98059 및 10 μM SP600125)는 2시간 동안 세포에 처리한 후 펩타이드가 포함된 분화용 배지를 처리하여 지정된 시간동안 배양하였다.

[0034] **1.3. 세포독성 측정**

[0035] 사용된 2종의 펩타이드의 세포독성 측정은 MTT(3-(4,5-dimethythiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide)를 이용하였다. 24-well plate에 세포가 70-80% confluent한 상태가 되었을 때 펩타이드를 농도별로 처리한 후 24 또는 48시간 후에 1 mg/mL MTT 용액을 첨가하였다. 4시간 동안 인큐베이터에서 배양한 후, 배지를 제거하여 생성된 formazan은 DMSO에 녹여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0037] **1.4. ALP(alkaline phosphatase) 활성 및 염색**

[0038] ALP 활성 측정을 위해서 96-well plate에 세포를 배양 및 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 배지를 제거하였다. 세포를 PBS에 세척한 다음 0.1% Triton X-100가 포함된 25 mM sodium carbonate buffer (pH 10)를 이용하여 세포를 분해시키고, 상층액 100 μL를 효소반응액(1.5 mM $MgCl_2$, 3.8 mM p-nitrophenyl phosphate가 포함된 25 mM sodium carbonate buffer) 100 μL를 혼합하여 37℃에서 90분간 반응시킨 후 405nm에서 흡광도를 측정하였다. ALP 활성은 아래와 같이 계산하였다.

[0040] $\text{ALP activity (\%)} = (A - A_0)/A_0 \times 100$

[0041] A: 펩타이드 처리군, A_0: 무처리군

[0042] ALP 염색을 위해서 12-well plate에 세포를 배양한 후 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 배지를 제거하고 PBS에 2번 세척하였다. 10% formalin 용액을 처리하여 5분간 세포를 고정한 후 다시 PBS에 세척하고 BCIP/NBT 기질 용액을 well plate에 첨가한 후 37℃에서 15분간 배양하여 현미경으로 관찰하였다.

[0044] **1.5. Alizarin red S 염색(미네랄화 측정)**

[0045] 조골세포 분화의 마지막 단계인 석회화를 측정하기 위해서 12-well plate에 세포를 배양한 후 21일 동안 펩타이드를 처리하였다. 배양이 끝난 후 세포를 PBS에 세척하고 70% 에탄올 용액을 4℃에서 1시간 처리하여 고정시켰다. 2% Alizarin red S(pH 4.2) 용액을 상온에서 15분간 처리하여 염색 후 증류수로 4번 세척하여 완전히 건조시켰다. 현미경으로 세포의 미네랄 형성을 관찰하고, 정량을 위해서 10% cetylpyridinium chloride 용액을 사용하여 염색된 Alizarin red S 용액을 탈색 시켜 반응한 양을 562nm에서 흡광도를 측정하였다. 미네랄 형성 정도는 하기 수식을 이용하여 계산하였다.

[0047] Mineralization (%) = (A- A_0)/A_0 × 100

[0048] A: 펩타이드 처리군, A_0: 무처리군

[0050] **1.6. 웨스턴 블럿팅(Western blotting)**

[0051] 펩타이드를 7일 동안 처리한 후 RIPA buffer(Sigma Chemical Co.)를 이용하여 세포를 파괴한 후 단백질을 추출하여 정량하였다(Pierce BCA assay kit, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리한 후 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 5% 스킴밀크로 블러킹한 후, 1차 항체를 처리하여 4℃에서 오버나잇하였고, 이후 2차 항체를 처리하여 상온에서 2-3시간 반응시킨 후 ECL(enhanced chemiluminescence) assay kit (Pierce Biotechnology, IL, USA)를 이용하여 PVDF 멤브레인 상의 단백질을 검출하였다.

[0053] **1.7. 마우스 준비 및 약물처리 프로토콜**

[0054] 실험에 사용된 모든 마우스는 7주령의 C57BL/6N 마우스이며 Envigo社 (미국)로부터 구입하였고 1주일간 순화기간을 거쳤다.

[0055] 골다공증 모델을 만들기 위해 한 그룹 당 4-5마리 총 14마리의 12주령 암컷 마우스에게 난소적출 수술(OVX)을 실시하였고, 일주일 후에 서열번호 1 및 2 펩타이드 (각각 50 μg/25 g 마우스) 및 PBS(Gibco) 100 μL를 하루에 한 번 2달간 복강 투여하였다. 대조군으로는 골다공증의 Sham 모델로 한 그룹당 4마리의 암컷 마우스를 피하 절개만 실시하였교, 100 μL PBS를 복강 투여하였다.

[0056] 난소적출 수술 후 일주일 후에 골다공증의 효율적 유발을 위하여 칼슘결핍 식이(Envigo社, 미국)를 제공하였다. 정상 마우스는 수술 없이 정상 식이를 제공하였다.

[0058] **1.8. 마이크로 씨티(micro CT)**

[0059] 마우스로부터 대퇴골을 분리하여 근육을 제거하고 생리식염수로 세척한 후 24시간 동안 4% 포르말린에 고정시키고 골밀도를 측정하였다. 대퇴골의 미세 단층 촬영은 micro-CT scanner (Inveon preclinical CT, Siemens Healthcare, 미국)를 사용하여 샘플 길이 1.9 cm, 폭 2 cm, 80 keV의 광자 에너지, 500 μA의 전류를 흘려 측정하였다. 골밀도 측정을 위해서 그룹당 동일한 부위의 2 mm^3의 부피 부분을 Siemens Inveon Software를 이용하여 측정하였다.

[0061] **실시예 2. 혼합단백질 유래 펩타이드의 ALP(alkaline phosphatase) 활성 결과**

[0062] 항산화 펩타이드가 조골세포 분화에 미치는 영향을 조사하기 위해서 먼저 초기 조골세포 분화에서 관찰되는 바이오마커인 ALP의 활성을 측정하였다. 7일 동안 펩타이드(PIISVYWK 및 FSVVPSPK)를 농도별로 처리한 결과, 농도의존적으로 ALP 활성을 증가시키는 것을 확인하였고, 100 μM 처리 시 PIISVYWK가 약 270%, FSVVPSPK가 약 242%의 ALP 활성 증가를 보임을 확인하였다(도 1).

[0064] **실시예 3. 조골세포 분화에 관여하는 단백질 발현 결과**

[0065] ALP 활성 측정에서 두 종류의 펩타이드가 100 μM 농도에서 아주 우수하였기 때문에 100 μM 농도를 처리하여 다음 실험을 진행하였다. 세포주에 7일간 펩타이드를 처리한 후 단백질을 추출하여 웨스턴 블럿팅을 실시하였다. 그 결과, 두 종류의 펩타이드는 조골세포 분화에 관여하는 BMP-2/4(bone morphogenetic protein)의 발현을 증가시켰음을 확인하였다(도 2).

[0066] 또한, BMP-2/4는 다운스트림 신호체계에 있는 Smad1/5의 인산화를 촉진시켜 세포 내 신호전달을 촉진시키고, 인

산화된 Smad1/5는 조골세포 분화 및 형성에 관여하는 특정 단백질을 생산하는데 중요한 역할을 하는 전사조절인자인 Dlx-5, Runx-2 및 Osterix를 활성화 여부를 확인하였다. 그 결과, 두 종류의 펩타이드는 BMP-2/4의 발현을 증가시켜 다운스트림 신호전달물질인 Smad1/5 및 전사조절인자인 Dlx-5, Runx-2 및 Osterix가 모두 발현 또는 활성이 증가시킴으로써, 조골세포의 분화를 촉진시키는 것을 확인하였다(도 2). 또한, 조골세포 분화의 바이오마커인 type I collagen의 발현을 강하게 증가시키는 것도 확인하였다(도 2).

[0067] 또한, MAPKs(mitogen-activated protein kinases)는 조골세포 분화에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있어, 본 발명자들은 두 종류의 펩타이드가 MARKs에 활성시키는 효과가 있는지를 확인하는 실험을 진행하였다. 그 결과, MARKs인 p-p38, p-ERK 및 p-JNK의 인산화를 증가시켜 조골세포 분화를 촉진시키는 것을 확인하였다(도 3).

[0068]

[0069] **실시예 4. 펩타이드에 의한 조골세포의 미네랄 형성 결과**

[0070] 두 종류의 펩타이드(PIISVYWK 및 FSVVPSPK)를 21일 동안 처리한 후 미네랄 형성을 Alizarin red S 염색으로 관찰하였다. 그 결과, 두 종류의 펩타이드는 조골세포의 미네랄 형성을 강하게 촉진하는 것을 확인하였다. 구체적으로 PIISVYWK는 대조군에 비해 302%, FSVVPSPK는 282%의 미네랄 형성이 증가되었음을 확인하였다(도 4).

[0072] **실시예 5. BMP 길항제(noggin) 및 MAPKs 저해제 처리에 따른 BMP 신호전달경로 및 MAPKs 인산화에 미치는 영향**

[0073] 두 종류의 펩타이드가 BMP 신호전달경로 및 MAPKs 인산화 경로의 활성화에 따른 조골세포 분화 촉진을 규명하기 위해 먼저 BMP의 길항제인 noggin을 처리한 후 관련 단백질 발현을 웨스턴 블럿팅으로 확인하였다. 그 결과, noggin과 펩타이드를 함께 처리한 군에서는 펩타이드만 처리한 군에 비해 BMP-2/4 및 다운스트림 신호전달물질의 발현이 현저히 감소함을 확인하였다(도 5).

[0074] 일반적으로 BMPs의 활성화는 MAPKs의 인산화 증가와 관련이 있다고 알려져 있으나, 본 발명에서는 BMP 길항제를 처리한 경우 펩타이드에 의한 MAPKs(p-p38, p-ERK 및 p-JNK) 인산화에 어떠한 변화를 주지 않는 것을 확인하였다(도 6).

[0075] 반면, MAPKs 저해제인 SB203585(p38 저해제), PD98059(ERK 저해제) 및 SP600125(JNK 저해제)를 처리한 결과, 펩타이드만 처리한 군에서는 BMP-2/4, 인산화 Smad1/5 및 전자조절인자인 Runx-2의 발현이 증가하였으나, MAPKs 저해제를 함께 처리한 군에서는 BMP-2/4, 인산화 Smad1/5 및 전자조절인자인 Runx-2의 발현이 억제됨을 확인하였다(도 7).

[0077] MAPKs 저해제가 조골세포 분화에 미치는 영향을 확인하기 위해서 조골세포 분화 초기 바이오마커인 ALP의 발현을 염색을 통하여 확인하였다. 그 결과, 두 종류의 펩타이드를 처리한 세포에서는 ALP의 발현이 증가하여 아주 강하게 염색되는 것을 확인할 수 있었으나, MAPKs 저해제 중 PD98059(ERK 저해제) 및 SP600125(JNK 저해제)에 의해서는 ALP의 발현이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 8).

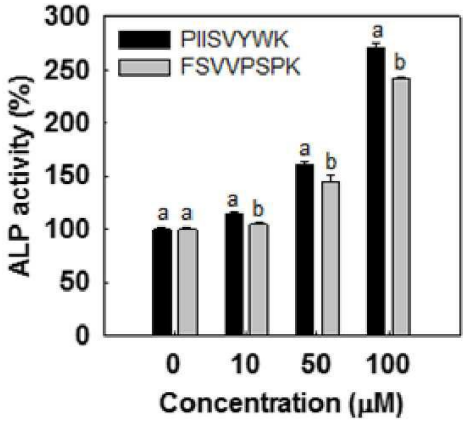
[0078] 따라서, 두 종류의 펩타이드는 ERK 및 JNK의 인산화에 영향을 주는 신호전달경로에 관여하고, BMPs 신호전달경로의 활성화를 시킴으로써, 조골세포 분화를 촉진시킬 수 있어 골질환, 특히 골다공증의 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

[0080] **실시예 6. 골다공증 모델에서 펩타이드가 골형성에 미치는 영향**

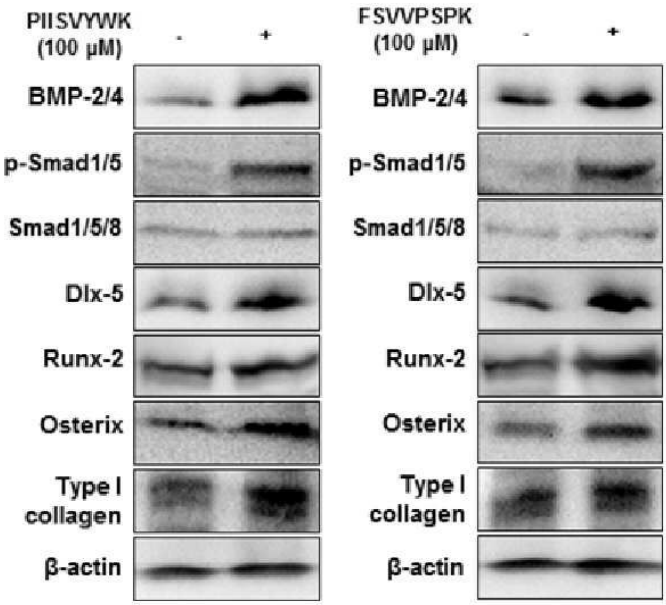
[0081] 두 종류의 PIISVYWK (P1) 및 FSVVPSPK (P2) 펩타이드가 난소적출 및 칼슘결핍식이로 유도한 골다공증 모델에서 골형성에 미치는 영향을 측정하였다. Micro CT 촬영 사진과 골밀도 변화 결과에 대한 그래프는 도 9에 나타내었다. 골다공증을 유발한 모델에 PIISVYWK (P1) 및 FSVVPSPK (P2)의 펩타이드를 각각 투여한 결과 PBS만 주입한 마우스보다 골밀도가 유의적으로 증가한 것으로 확인되었고, 양성대조군으로 사용된 17β-estradiol(Est, 에스트로겐)보다 우수한 골형성 정도를 나타내었다. 두 펩타이드 모두 Normal 마우스보다 높거나 유사한 골밀도를 보였다.

도면

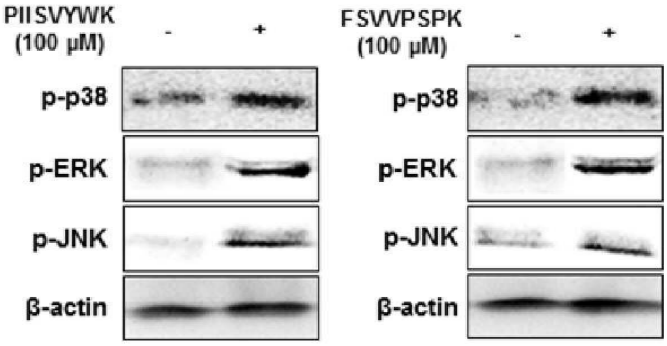
도면1



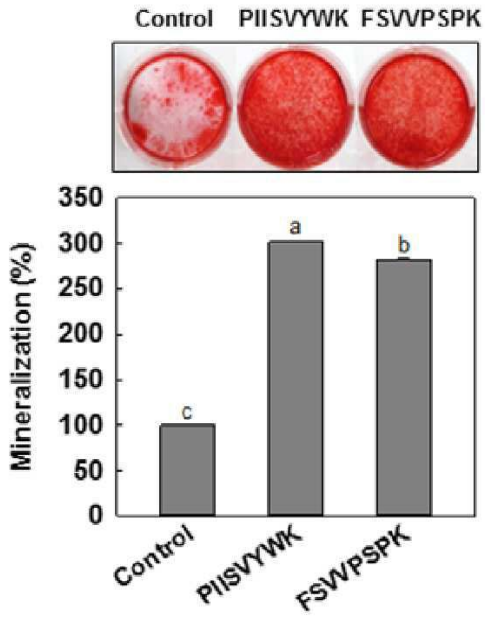
도면2



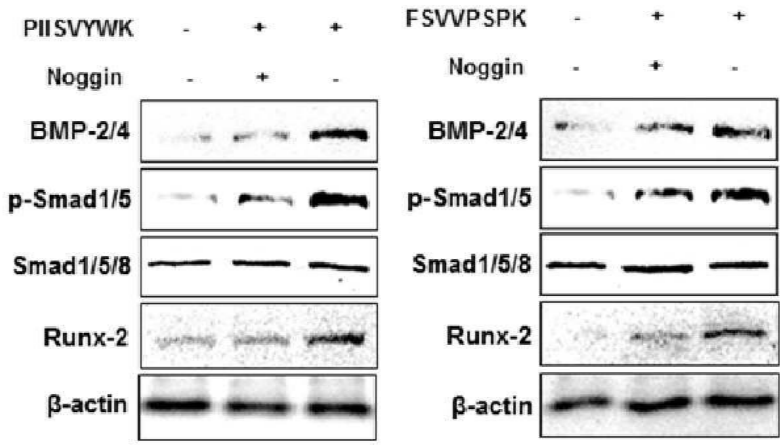
도면3



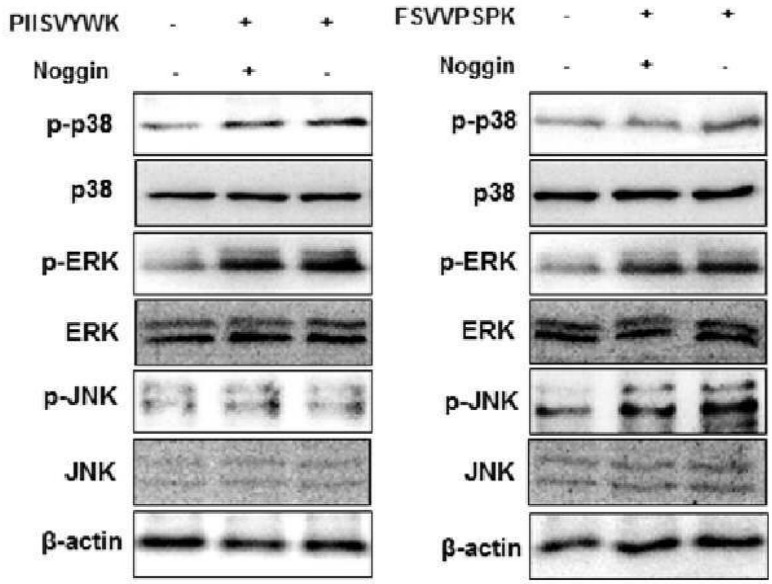
도면4


Control
PIISVYWK
FSVVPSPK
Mineralization (%)
350
300
250
200
150
100
50
0
a
b
c
Control
PIISVYWK
FSVVPSPK

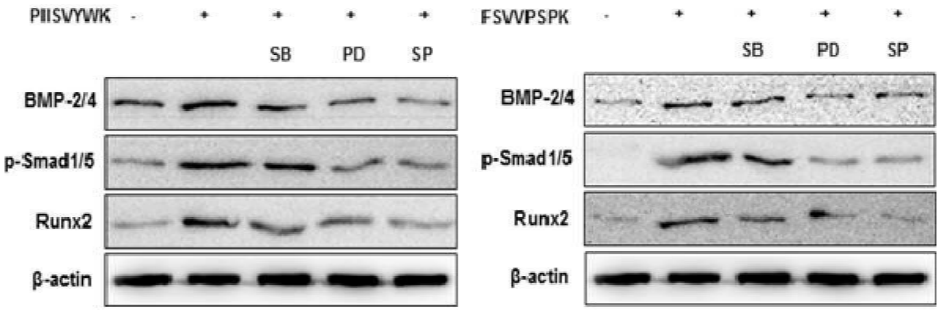
도면5


PIISVYWK
Noggin
BMP-2/4
p-Smad1/5
Smad1/5/8
Runx-2
β-actin
FSVVPSPK
Noggin
BMP-2/4
p-Smad1/5
Smad1/5/8
Runx-2
β-actin

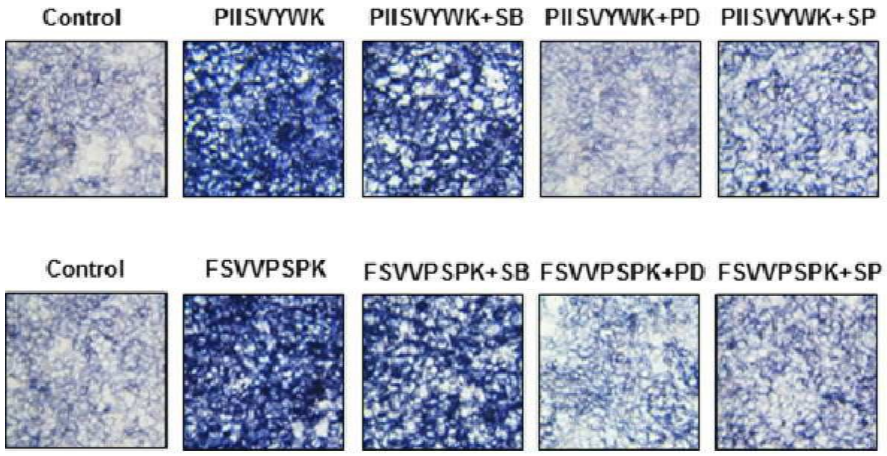
도면6


PIISVYWK - + +
Noggin - + -
p-p38
p38
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
β-actin
FSVVPSPK - + +
Noggin - + -
p-p38
p38
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
β-actin

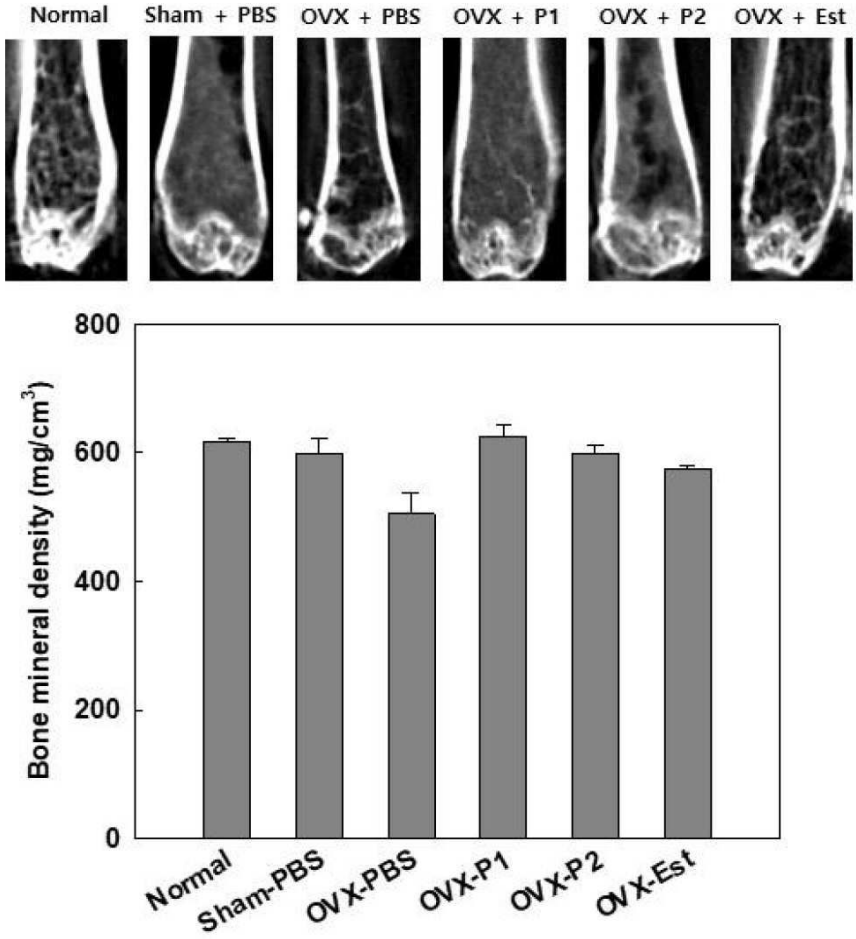
도면7


PIISVYWK - + + + +
SB PD SP
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx2
β-actin
FSVVPSPK - + + + +
SB PD SP
BMP-2/4
p-Smad1/5
Runx2
β-actin

도면8


Control
PIISVYWK
PIISVYWK+SB
PIISVYWK+PD
PIISVYWK+SP
Control
FSVVPSPK
FSVVPSPK+SB
FSVVPSPK+PD
FSVVPSPK+SP

도면9



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation of Pukyong National University

<120> Composition for preventing and treating bone disease comprising mussel protein-derived peptides as active ingredient

<130> PN1701-020

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 1

Pro Ile Ile Ser Val Tyr Trp Lys

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> artificial sequence

<400> 2

Phe Ser Val Val Pro Ser Pro Lys

1 5